Spermatogenesis に関する研究

第1編 器官培養下における spermatogenesis に対する testosterone

と FSH の基礎的検討 (睪丸機能の研究 第7報)

札幌医科大学泌尿器科学教室 木 村 正 一
(主任: 熊本悦明教授) 熊 本 悦 明

STUDIES OF SPERMATOGENESIS

1. Fundamental Study of Spermatogenesis in Organ Culture Concerning the Hormonal

Regulation of Testosterone and FSH

(Studies on Testicular Function, Report 7)

Masaichi Kimura and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology, Sapporo Medical College

(Director: Prof. Y. Kumamoto)

The effect of glucose, testosterone and FSH on spermatogenesis was studied in organ cultures of 21-day-old rat testes by modification of Trowell's method. The control medium used in all cultures consisted of MEM (Eagle's minimum essential medium), supplemented with 10% fetal calf serum, 1 mM of sodium pyruvate, 0.1 mM each of alanine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glycine, proline and serine, and 3 mM of glutamine and penicillin 100 U, per ml. The culture medium was maintained at PH 7.1 and explants were incubated at 31°C in a gas atmosphere of 5% CO₂ and 95% air.

The results are summarized as follows.

1) In the control medium, primary spermatocytes showed a marked diminution in number during 4 to 7 days in culture, and gradually disappeared in almost all tubules within 14 days in culture, even though spermatogonia were well maintained and mitotic activity continued after 42 days in culture.

2) Sertoli cells in all tubules were well maintained at an almost definite number of 16 to 19 per seminiferous tubules for as long as 42 days.

3) Effects of glucose:

In cultures grown in 2 mg/ml concentration of glucose medium, the number of primary spermatocytes was slightly greater than in the control medium containing 1 mg/ml of glucose for 7 days in culture. In cultures grown in a 3 mg/ml concentration of glucose medium, however, the seminiferous tubules showed moderate diminution in diameter and moderate thickening of the tubular wall with the number of primary spermatocytes being smaller than in the control medium.

4) The osmotic pressure in the culture medium was evaluated to study the toxic effect of a higher concentration of glucose on the maintenance of primary spermatocytes. The osmotic pressure being 330 mosm/L in the 2 mg/ml concentration of glucose medium and 335 mosm/L in the 3 mg/ml concentration, the osmotic pressure was proved to be within 330 mosm/L in view of the maintenance of primary spermatocytes and the structure of seminiferous tubules.

5) Effect of testosterone:

The concentration of testosterone in culture medium for the best maintenance of primary spermatocytes was 50 µg/ml concentration, and 5 µg/ml, 100 µg/ml, in that order.

6) Effect of NIAMDD-rat FSH, B-1:

Addition of FSH to the control medium resulted in good maintenance in the number of primary spermatocytes. A 200 $\mu\text{g/ml}$ concentration of FSH was more effective for the maintenance of primary spermatocytes than 100 $\mu\text{g/ml}$ of FSH.

As mentioned above, the most effective culture medium for the maintenance of primary spermatocytes was proved to be 2 mg/ml of glucose, 50 $\mu\text{g/ml}$ of testosterone and 200 $\mu\text{g/ml}$ of FSH.

緒 言

睪丸組織に対する testosterone と FSH の作用については最近 *in vivo* の研究で spermatogenesis に不可欠な支持細胞である Sertoli cell に対する作用が注目されている。Sertoli cell 内での testosterone の代謝 (Dorrington ら, 1975⁶⁾⁷⁾) や androgen binding protein (ABP) 産生能 (Fakunding ら, 1976⁸⁾, Tindal & Means, 1976³⁵⁾) 及び FSH の蛋白合成能 (Means, 1975²³⁾, Steinberger ら, 1975³⁴⁾, Tung ら, 1975³⁸⁾, Dorrington ら, 1975⁹⁾, Fakunding ら, 1976⁸⁾) や ABP 産生能 (Hansson ら, 1973¹¹⁾, Ritzén & French, 1974²⁷⁾, Steinberger ら, 1975³⁴⁾, Fritz ら, 1976⁹⁾) など Sertoli cell 機能維持に極めて重要な役割をなしていることが明らかにされている。しかし *in vivo* における spermatogenesis との関連においてはまだ十分に解明されていない面が少なくなく、色々議論のある所である。

spermatogenesis に対するこれら hormone の作用については一応現在までのところ testosterone は gonocyte の分裂期と meiosis 期に作用し、FSH は主に spermiogenesis 期にのみ作用しそれぞれ spermatogenesis に対し促進的に働くことが報告されている (Steinberger, 1971³³⁾)。しかし今までの *in vivo* におけるこれら hormone と spermatogenesis との関係の研究は germ cell の成熟度との関係に主眼がおかれ、germ cell の保持増数の問題については比較的なおざりにされていた。正常な spermatogenesis の維持には germ cell の成熟と増数が両輪の輪のように作動することが必須である。そこで著者はこのような立場で hormone の作用を検討すべく実験を行った。

ところで germ cell が生命を維持し成熟増数をするためには代謝刺激作用のある上記 hormone 他に栄養補給が必要である。生物の最も基本的な栄養物質と考えられる炭水化物の glucose については現在のところ胎児性腺の発育 (朝山 & 古沢, 1961²⁾) と spermiogenesis 期に必須とされているが (Davis & Morris, 1963⁵⁾, Means & Hall, 1968¹⁹⁾²⁰⁾, 1969²¹⁾), 未熟睪丸の germ cell に対しては未だ明らかにされていない。そこで glucose に

についても testosterone や FSH と同じ立場で germ cell の保持に対して如何なる影響を及ぼすかを明らかにするために合せて実験を行った。

研究手段として複雑な環境で行われている spermatogenesis を検討するには、組織を体外環境下に置き換えた器官培養法が spermatogenesis の促進因子を簡明に分析できると考えた。即ち器官培養法の利点は組織の環境を人為的に control し、その結果起つた事実からその誘因と結果を観察できることにある。しかし器官培養法は組織を異常な状況下で保持させるため、組織はその悪条件から当然変性を起してくる。本教室において加藤 (1972¹³⁾) は成人男子の睪丸器官培養でこの問題について検討し既に報告している。本実験では至適培養条件を決めるため spermatogenesis を開始し始めた時期の幼若 rat 睪丸を用い培養液の osmotic pressure と培養液に添加した glucose, testosterone 及び FSH の濃度により germ cell の保持数がどのように変化するかという基礎的な検討を行ったので報告する。

実験材料及び方法

a) 培養組織

生後21日齢の Wistar 系未熟 rat の睪丸を用いた。この時期の睪丸はようやく primary spermatocytes が出現する程度の状態で成熟睪丸の約 1/18 の重量である。この状態の睪丸は培養用に細切することも成熟睪丸に比して容易なことも好都合な点である。頸部を脱臼させた直後に睪丸を無菌的に摘出し培養組織とした。

b) 実験器具及び培養方法

(器具) : Falcon 社製 organ culture dish を使用した。grid 上には市販の lens-paper を置いたが、lenspaper は ethylalcohol で洗淨した後乾燥させたものを使用した。

(培養液) : 基本培養液は MEM (Gibco 社製) を使用し次のものを添加した。① amino acid : (Steinberger & Steinberger, 1966³⁰⁾) と同様に 1mM pyruvate と各々 0.1mM の alanine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glycine, proline, serine 及び 3mM glutamine (いずれも Sigma 社製) ② 10% fetal calf serum (Gibco

社製) ③ 100u/ml penicillin G. これらを PH 7.1に調整し基準培養液とした。

(培養法) : 無菌的に採取した率丸を無菌室にて大型 dish 中に置いたガラス板上で Bard-perker knife を用いてほぼ1mm³ 近くに細切した。培養は Trowell (1959³⁷⁾) 法により組織片を culture dish の lens-paper の上に7~8個ずつ等間隔に載せた。培養液は lens-paper の下面が液に接するまで注入した。その他は加藤 (1972¹³⁾) が報告した方法に準じ, dish は5% CO₂+95% air を気相とする incubator (池本理化工業製 CO₂-incubator B 型) 中に31℃で静置した。培養液は週2回交換した。

c) glucose, testosterone, FSH の添加

glucose は基準培養液 (G₁ 培養液: この中には1mg/ml の glucose が含まれている) に1mg/ml を添加し G₂ 培養液 (glucose : 2mg/ml) を作り, 2mg/ml 添加し G₃ 培養液 (glucose : 3mg/ml) を作成した。培養による培養液中の glucose 濃度の変化は Technicon 社製 Auto-analyzer I 型で, osmotic pressure の変化は Precision 社製 Osmette 2007型で測定した。

FSH (NIAMDD-Rat FSH, B-1. Dr. A.F. Parlow より供与) は基準培養液で溶解し, 100μg/ml, 200μg/ml 濃度に添加した。testosterone は95% ethylalcohol で溶解し5μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml 濃度に添加した。い

Table 1. Composition of media used in organ culture of rat testes.

Medium		glucose (mg/ml)	testosterone (μg/ml)	FSH (μg/ml)
	G ₁ *	1	0	0
	G ₁ T ₅₀	1	50	0
	G ₁ F ₁₀₀	1	0	100
	G ₁ F ₂₀₀	1	0	200
	G ₁ T ₅₀ F ₂₀₀	1	50	200
	G ₂	2	0	0
	G ₂ T ₅	2	5	0
	G ₂ T ₅₀	2	50	0
	G ₂ T ₁₀₀	2	100	0
	G ₂ F ₂₀₀	2	0	200
	G ₂ T ₅₀ F ₂₀₀	2	50	200
	G ₃	3	0	0

G₁* (control medium) : Eagle's minimum essential medium, supplemented with 1mM of pyruvate and 0.1mM each of: alanine, asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, proline, serine, 3mM glutamine, 100u/ml penicillin, 10% fetal calf serum.

れも培養液100ml に対し95% ethylalcohol が0.1ml 入るように調整し, 対照となる基準培養液にも同量の ethylalcohol のみを添加した。培養液の記号と内容を Table 1 にまとめて記載した。

d) 培養組織の組織学的検索

培養組織片は培養終了直後に Bouin 液で固定した。paraffin 包埋後 5μ の連続切片を作製し Hematoxylin-Eosin 染色または PAS-Hematoxylin 染色, Van-Gieson 染色, Azan 染色を行つた。

e) 組織標本の解析方法

組織標本の中で central necrosis を起している部分は除外した。同一組織標本中でも各精細管に保持さる primary spermatocytes 数は精細管によりまちまちである。そこで培養中気相に近かつた部分で比較的よく組織標本が保持されている所で, 円形精細管20個を選び, ① 各精細管に含まれる primary spermatocytes の平均値と ② primary spermatocytes を含む精細管の百分率を算出した。

実験結果

a) primary spermatocytes 数の培養による変化

a)-① glucose 添加による影響 (Fig. 1)

primary spermatocytes/精細管: 培養前では45個みら

Fig. 1. Variations of primary spermatocytes in organ culture.

れた primary spermatocytes は G₁, G₂, G₃ 培養液とも培養4日目より急激に減少する。しかし G₂ 培養液での保持率が最も良く, 7日間培養で G₁, G₃ 培養液で約2.6個であるのに対し G₂ 培養液では6.3個の primary spermatocytes が保持されている。

primary spermatocytes を含む精細管の百分率: 培養前では全部の精細管中に保持されている。培養による

Fig. 2. Variations of primary spermatocytes in organ culture.

G_2 : glucose 2 mg/ml. T_5 : testosterone 5 μ g/ml.
 T_{50} : testosterone 50 μ g/ml. T_{100} : testosterone 100 μ g/ml.

primary spermatocytes 数の減少に伴い、それを含む精細管も減少してくる。しかし G_2 培養液では primary spermatocytes 数は急激に減少するものの培養 7 日目では各精細管中にわずかの primary spermatocytes 数が保持されている。

a)-② testosterone 添加による影響 (Fig. 2)

primary spermatocytes/精細管: 培養前では40個みられた primary spermatocytes は培養 8 日目で G_2 培養液では 4 個に激減している。しかし testosterone を添加すると保持はわずかに良くなる。50 μ g/ml 濃度培養液 (G_2T_{50}) が19個と最も多く 5 μ g/ml 濃度培養液 (G_2T_5) の14個, 100 μ g/ml 濃度 (G_2T_{100}) の12個の順となり, testosterone 添加中で G_2T_{100} 培養液での保持が最も悪かった。

primary spermatocytes を含む精細管の百分率: 培養前では全部の精細管中に保持されている。培養による primary spermatocytes 数の減少に伴い、それを含む精細管も減少してくる。 G_2T_{50} 培養液の50%が最も良く、以下 G_2T_{50} 培養液の50%が最も良く、以下 G_2T_5 培養液の35%, G_2T_{100} 培養液の30%, G_2 培養液の20%の順であつた。即ち, testosterone は 50 μ g/ml 濃度で最も保持率が良好である。

a)-③ FHS 添加による影響 (Fig. 3)

primary spermatocytes/精細管: 培養前の primary spermatocytes は42個, FSH 200 μ g/ml 濃度培養液 (G_2F_{200}) の24個が最も良く、以下100 μ g/ml 濃度培養液

Fig. 3. Variations of primary spermatocytes in organ culture.

G_1 : glucose 1 mg/ml. F_{100} : FSH 100 μ g/ml. F_{200} : FSH 200 μ g/ml.

(G_1F_{100}) の16個, FSH を添加しない培養液 (G_1) の6個であつた。

primary spermatocytes を含む精細管の百分率: 培養前では全部の精細管中に保持されている。 G_1F_{200} 培養液の60%が最も良く、以下 G_1F_{100} 培養液の50%, G_1 培養液の20%の順の20%である。即ちFSH は200 μ g/ml 濃度で保持率が最も良好であつた。

b) Sertoli cell 数の培養による変化 (Fig. 4)

実験 a)-①②③で明らかとなつたように, primary spermatocytes を最も多く保持させるには基準培養液に glucose 1mg/ml, testosterone を50 μ g/ml, FSH は200 μ g/ml 添加した培養液での培養が最適であつた。そこで, これらの培養液で rat 睪丸を培養した場合 primary spermatocytes は早期に消失するが, 支持細胞である Sertoli cell 数はどのような影響を受けるかを検討した。 G_1 は基準培養液, G_2 は glucose 2mg/ml 濃度培養液, G_2T_{50} は glucose 2mg/ml, testosterone 50 μ g/ml 濃度培

Fig. 4. Variations of Sertoli cells in organ culture.

○—○ : (G_1) glucose 1 mg/ml.
 ●—● : (G_2) glucose 2 mg/ml.
 □—□ : (G_2T_{50}) glucose 2 mg/ml, testosterone 50 μ g/ml.
 ■—■ : (G_2F_{200}) glucose 2 mg/ml, FSH 200 μ g/ml.

養液, G_2F_{200} は glucose 2mg/ml, FSH 200 μ g/ml 濃度培養液であることを示す。いずれも42日間の培養を行った。Sertoli cell 数/精細管は16~19個とほぼ一定数保持されており, 添加した glucose, testosterone, FSH による数的な影響は認められなかった。各精細管は培養42日まで比較的良好に保持されており, G_2 培養液では培養42日目でも spermatogonium の mitosis を観察できた (Fig. 19)。

c) 培養液内 glucose 濃度の培養による変化 (Table 2, Fig. 5)

Table 2. Mean concentration of glucose and mean osmotic pressure in culture medium before and after 4 days culture.

	glucose (mg/ml)	osmotic pressure (mosm/L)
0 day culture	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD
medium G_1 (n=6)	0.91 $\pm$ 0.03	323 $\pm$ 2
G_2 (n=6)	1.96 $\pm$ 0.07	330 $\pm$ 4
G_3 (n=3)	2.99 $\pm$ 0.04	335 $\pm$ 3
4 days culture		
medium G_1 (n=6)	0.48 $\pm$ 0.09	299 $\pm$ 5
G_2 (n=6)	1.12 $\pm$ 0.10	325 $\pm$ 6
G_3 (n=3)	1.76 $\pm$ 0.07	329 $\pm$ 5

G_1 : glucose 1mg/ml, G_2 : glucose 2mg/ml
 G_3 : glucose 3mg/ml

Fig. 5. Mean concentration of glucose in culture medium before and after 4 days culture.

a)-①の実験から生物の energy 源として最も基本的な物質と考えられる glucose を添加すると primary spermatocytes の保持にやや有効な結果が得られた。そこでどの程度に germ cell が glucose を消費するかを検討するために4日間培養後における glucose 濃度の変化を測定してみた。 G_1 は基準培養液, G_2 , G_3 は G_1 にそ

れぞれ1mg/ml, 2mg/ml の glucose を添加した培養液である。培養4日後の培養液中の glucose 濃度は G_1 培養液で0.91mg/ml から0.48mg/ml に, G_2 培養液で1.96mg/ml から1.12mg/ml に, G_3 培養液で2.99mg/ml から1.75mg/ml に減少していた。

d) 培養液の osmotic pressure の培養による変化 (Table 2, Fig. 6)

a)-①と c) の実験から睪丸組織は glucose を消費し, G_2 培養液では G_1 培養液よりも primary spermatocytes の保持にやや有効な結果が得られたが, glucose 濃度 3mg/ml の G_3 培養液では逆に悪くなるという矛盾が生じた。そこで, これら培養液の osmotic pressure を測定してみると G_1 培養液では323mosm/L G_2 培養液では330mosm/L G_3 培養液で335mosm/L と glucose を添加

Fig. 6. Mean osmotic pressure in culture medium before and after 4 days culture.

した培養液の osmotic pressure は上昇していた。4日間培養後では培養液の osmotic pressure は G_1 で299mosm/L G_2 で325mosm/L G_3 で329mosm/L となっており, 培養液に添加した物質による osmotic pressure の上昇が培養組織を悪くする一因であることが示唆された。

e) glucose, testosterone, FSH の混合添加培養 (Fig. 7)

Fig. 7は生後21日齢 rat 睪丸の器官培養における各因子の組み合わせによる primary spermatocytes の残存を示す典型的な pattern である。実験 (1)では primary spermatocytes/精細管は testosterone または FSH 添加群において培養4日目では培養前よりも多くなっている。培養7日, 10日目では $G_2T_{50}F_{200} > G_1T_{50}F_{200} > G_1T_{50}$ の順で glucose, testosterone, FSH の効果を認める。しかしどの実験群でも primary spermatocytes は培養7日目でも全精細管に認められた。実験 (2)では, 培養7日

Fig. 7. Variations of primary spermatocytes in organ culture.

G₁: glucose 1 mg/ml. G₂: glucose 2 mg/ml. T₅₀: testosterone 50 μ g/ml.
F₂₀₀: FSH 200 μ g/ml.

目, 14日目とも glucose, testosterone, FSH 添加群で効果を認めるが, primary spermatocytes/精細管は全体的に減少しており, 特に培養14日目ではほとんど差を認められない程度である. 実験 (3)に長期間培養した場合の primary spermatocytes の残存例を示す. 培養21日目では G₂F₂₀₀ にのみ primary spermatocytes の残存を認めるが (Fig. 18), この場合でも28日目では完全に消失している. G₁ では primary spermatocytes は培養と共に徐々に減少し, これはいずれの実験でも培養14日目前後で完全に消失している.

f) 培養組織所見 (Table 3)

glucose 無添加培養では, G₁ 培養液 (基準培養液) と G₂ 培養液について検討したが, germ cell の保持はほとんどの例で G₂ 培養液で良好であるので G₁ については省略する. Table 3 は各培養組織の平均的な所見である.

① 培養前組織像 (Fig. 8) 精細管壁の線維化, 肥厚等の所見はなく, germ cell は spermatogonia から primary spermatocytes (leptotene, zygotene spermatocytes が多い) までの spermatogenesis を示している. pyknotic cell はほとんどなく, Sertoli cell も相当数正常にみられる.

② G₂ 培養液での培養組織像

培養7日目では精細管壁の肥厚がみられてくる (Fig. 10). spermatogonia と Sertoli cell はほぼ正常数保持されているが, primary spermatocytes は極度に減少している. pyknotic cell もみられる. 培養14日目では primary spermatocytes と pyknotic cell は消失し, 各精細管当りの細胞数も減少している. 培養42日目 (Fig. 19) では spermatogonia の減少がみられるが, 依然として spermatogonia の mitosis もみられることがある.

③ G₂T₅₀ 培養液での培養組織像

Table 3. Histologic findings of rat testicular tissue before and after cultivation.

Medium*	Days in culture	1)* Tubular wall	2)* Tubular diameter	3)* Spermatogonia	4)* Primary spermatocytes	5)* Sertoli cells	6)* Pyknotic cells	
G ₁	0	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Fig. 8
G ₁	7	(-)-(+)	(+)-(H)	(-)	(H)-(H)	(-)	(-)-(+)	Fig. 9
G ₂	7	(-)-(+)	(+)-(H)	(-)	(H)	(-)	(-)-(+)	Fig. 10
G ₃	7	(+)-(H)	(+)-(H)	(-)	(H)-(H)	(-)	(-)-(+)	(omit)
G ₂ T ₅₀	7	(-)-(+)	(+)-(H)	(-)	(H)-(H)	(-)	(H)-(H)	Fig. 11
G ₂ F ₂₀₀	7	(-)-(+)	(-)-(+)	(-)	(-)-(+)	(-)	(-)-(H)	Fig. 12 Fig. 13
G ₂ T ₅₀ F ₂₀₀	7	(-)-(+)	(+)-(H)	(-)	(+)-(H)	(-)	(+)-(H)	Fig. 14
G ₂ F ₂₀₀	10	(-)-(+)	(+)-(H)	(-)	(+)-(H)	(-)	(-)-(H)	Fig. 15
G ₁	14	(+)	(+)-(H)	(-)-(+)	(H)	(-)	(-)	(omit)
G ₂	14	(+)	(+)-(H)	(-)	(H)	(-)	(-)	Fig. 16
G ₂ T ₅₀	14	(+)	(+)-(H)	(-)	(H)-(H)	(-)	(-)-(H)	(omit)
G ₂ F ₂₀₀	14	(+)	(+)-(H)	(-)	(+)-(H)	(-)	(-)-(H)	Fig. 17
G ₂ T ₅₀ F ₂₀₀	14	(+)	(+)-(H)	(-)	(H)-(H)	(-)	(-)-(H)	(omit)
G ₂ F ₂₀₀	21	(H)	(H)	(+)-(H)	(H)-(H)	(-)	(-)	Fig. 18
G ₂	42	(H)	(H)	(+)-(H)	(H)	(+)	(-)	Fig. 19

1)*: (-)normal, (+)mild thickening, (H)moderate thickening, (H)extreme thickening.

2)*: (-)normal, (+)mild diminution, (H)moderate diminution, (H)marked diminution.

3)* 4)* 5)*: (-)normal, (+)mild diminution, (H)moderate diminution, (H)disappearance.

6)*: (-)none, (+)mild increase, (H)moderate increase, (H)extreme increase.

Medium*: G₁ glucose 1mg/ml, G₂ glucose 2mg/ml, G₃ glucose 3mg/ml,

T₅₀ testosterone 50 µg/ml, F₂₀₀ FSH 200 µg/ml.

培養7日目 (Fig. 11) では精細管壁, spermatogonia, Sertoli cell は G₂ 培養液とほぼ同様の所見である。しかし primary spermatocytes 中 resting から zygotene spermatocytes までの増加と pyknotic cell の増加が特徴的である。しかし pachytene spermatocytes は少ない。培養14日目では spermatogonia, Sertoli cell は培養前とほぼ同様にみられるものの primary spermatocytes は極度に減少している。培養21日目以降では primary spermatocytes は完全に消失している。

④ G₂F₂₀₀ 培養液での培養組織像

培養7日目 (Fig. 12, Fig. 13) では精細管壁, spermatogonia, Sertoli cell は G₂ 培養液とほぼ同様の所見である。primary spermatocytes の保持は良好で培養前よりも多数保持されている場合もある。このような良好な培養状態でも (Fig. 12), central necrosis は必ず認められる。pyknotic cell は少ない。培養10日目 (Fig. 15) 頃まで primary spermatocytes は良好に保持される場合があるが、培養14日目 (Fig. 17) ではこれらは急激に

減少し, pyknotic cell の増加がみられる。精細管壁の肥厚は軽度のみられるが, spermatogonia と Sertoli cell は培養前とほぼ同様に保持される。[primary spermatocytes は培養21日目 (Fig. 18) でもみられることがあるが、28日目以降では完全に消失している。

⑤ G₂T₅₀F₂₀₀ 培養液での培養組織像

培養7日目 (Fig. 14) では精細管壁の肥厚, 線維化はむしろ強いことが多い。spermatogonia, Sertoli cell はほぼ正常数保持されている。primary spermatocytes の保持は G₂T₅₀ 培養液よりも良いが, pyknotic cell は G₂F₂₀₀ 培養液よりも多い。培養14日目では精細管壁の肥厚, 線維化はさらに強くなり, primary spermatocytes の残存も減少している。培養21日目以降では primary spermatocytes は完全に消失しているが, Sertoli cell はほぼ正常に保持されている。

考 按

A) 器官培養法の限界について

rat 睪丸の器官培養の条件については Steinberger ら

Fig. 8. Testis of a 21-day-old rat prior to cultivation. $\times 250$.

Fig. 9. Testicular tissue after 7 days in culture in control medium, showing occasional surviving primary spermatocytes (PS). Culture medium contained glucose, 1mg/ml. $\times 250$.

Fig. 10. Testicular tissue after 7 days in culture. Culture medium contained glucose, 2mg/ml. Note maintenance of primary spermatocytes (PS) and presence of pyknotic cells (PC) and mitosis (M). $\times 250$.

Fig. 11. Testicular tissue after 7 days in culture. Culture medium contained 2mg glucose and 50 μ g testosterone, per ml. Note good maintenance of primary spermatocytes (PS) and presence of pyknotic cells (PC). $\times 400$.

Fig. 12. Testicular fragment after 7 days in culture, showing good maintenance of tubular structure and presence of central necrosis (CN). Culture medium contained 2mg glucose and 200 μ g NIAMDD-FSH, per ml. $\times 100$.

Fig. 13. Details of cellular composition of the seminiferous tubules in fig. 12. Note good maintenance of primary spermatocytes (PS). $\times 250$.

Fig. 14 Testicular tissue after 7 days in culture. Culture medium contained 2mg glucose, 50 μ g testosterone and 200 μ g NIAMDD-FSH, per ml. Note good maintenance of pachytene primary spermatocytes (PS) and presence of pyknotic cells (PC). $\times 320$.

Fig. 17. Testicular tissue after 2 weeks in culture. Culture medium contained 2 mg glucose and 200 μ g NIAMDD-FSH, per ml. Note good maintenance of surviving primary spermatocytes (PS) and presence of pyknotic cells (PC). $\times 250$.

Fig. 15. Testicular tissue after 10 days in culture, showing good maintenance of primary spermatocytes (PS). Culture medium contained 2mg glucose and 200 μ g NIAMDD-FSH, per ml. $\times 400$.

Fig. 18 Testicular tissue after 3 weeks in culture. Culture medium contained 2 mg glucose and 200 μ g NIAMDD-FSH, per ml. Note maintenance of occasional surviving primary spermatocytes (PS). $\times 320$.

Fig. 16. Testicular tissue after 2 weeks in culture, showing mitosis (M) and occasional surviving primary spermatocytes (PS). Culture medium contained glucose, 2mg/ml. $\times 320$.

Fig. 19. Testicular tissue maintained in culture medium for 6 weeks. Culture medium contained glucose, 2mg/ml. Note good maintenance of tubular structure and presence of mitosis(M) $\times 400$.

(1964²⁹⁾, 1966³⁰⁾, 1967³¹⁾) が詳細に検討している。即ち、培養温度は31°C, 気相は5% CO₂+95% air, 培養液の PH は7.0±0.2が最適であるとしている。培養液は合成培養液を比較検討した結果, Eagles's minimum essential medium (MEM) に1.0mM sodium pyruvate と0.1mM の alanine, asparagine, aspartic acid, glycine, proline, serine を加え、抗生物質として100U/ml の penicillin G と100μg/ml の streptomycin, 5μg/ml の fungizone, これに10% calf serum を添加したものにおいて良好な結果を得、これを基本培養液とした。さらに12U/ml の vitamin A, 50μg/ml の vitamin C, 60μg/ml の vitamin E の添加、または4mM の glutamine 濃度では gonadotropin の存在なしでも germ cell は量的には減少するが、質的には spermatogonia から primary spermatocytes が形成されることを証明した。そこで著者は MEM を基本培養液とし、amino acid の組成は Steinberger らと全く同じにし、抗生物質は100U/ml の penicillin G のみとし、10% fetal calf serum, 4mM glutamine 濃度で、PH を7.1に調整したものを基準培養液とした。

hormone 無添加器官培養における spermatogenesis に対する主な障害因子として、①無 gonadotropin 状態による spermatogenesis の抑制と②培養という異常条件による抑制が考えられる。

まず無 gonadotropin 状態下における germ cell 数の変化を下垂体剔除 rat の実験で文献的に考察してみたい。Clermont & Morgentaler (1955⁴⁾) の下垂体剔除後の rat 睪丸の germ cell 数の変化によると、spermatids 数は下垂体剔除直後から急激な減少を示し、約30日後にはほとんど消失する。また primary spermatocytes は下垂体剔除直後から急激に減少をみるが、60日を経過してもまだ少数ながら存在することを示している。この点に関し、Chowdhury & Steinberger (1975³⁾) は下垂体剔除後30日目の観察から stage VII の resting spermatocytes から stage XIII の pachytene spermatocytes までの進行が急激に減少していると報告している。次に器官培養という異常状態における germ cell の消失過程は本実験でみられたように下垂体剔除による場合よりも早期におこっている。hormone 無添加器官培養における primary spermatocytes の残存は培養4日目頃から急激に少なくなり、培養14日目では完全に消失していた。熊本(1967¹³⁾) も未熟 rat 睪丸を roller tube culture method で培養し、primary spermatocytes の消失をみているが、培養2週間目で完全に消失したと報告している。加藤(1972¹³⁾)

は Trowell 法によるヒト睪丸の germ cell の消失過程をみているが、下垂体剔除 rat の germ cell の消失過程と極めてよく類似しているが、primary spermatocytes は培養2週目ではやはり消失したと報告している。これらの実験結果は無下垂体 hormone 状態の in vivo の条件と器官培養という in vitro の状態では germ cell の障害速度に著しい差のあることを示している。

しかし本実験における Sertoli cell は培養42日までの観察では hormone 添加の有無にかかわらず培養前と変わらない16~19個/精細管がほぼ一定数保持されていることから、spermatogenesis には gonadotropin は極めて重要な因子であるが、その他にも器官培養法では不十分な重要な障害因子のあることが示唆されているといえる。

B) 培養液の問題点について

睪丸組織を器官培養下で良好に保持するためには、培養法の改良の他に培養液に諸種の物質を添加し、培養組織を出来るだけ生体内環境に近い状態に置くことが必要である。そこで生物の最も基本的な栄養物質である glucose 添加の影響について文献的に考察し、本実験結果について考えてみたい。

B)-① glucose 濃度について

spermatogenesis に対する glucose の影響については不明の点が多い。mouse 胚生殖巣原基(交尾後12~13日目)の廻転培養法による実験で、朝山ら(1961²⁾)は48時間以内の培養では3mg/ml glucose 濃度が最適の培養状態であるとしているが、原基の性分化促進作用は認めていない。

rat 睪丸組織中の蛋白合成能の研究では glucose 依存性は spermatids が出現する生後28日目前後からみられることから spermatids にあるとの報告がある。9mM glucose (約1.62mg/ml) 濃度で Davis ら(1963⁹⁾)は成熟 rat 睪丸で約600%増加するとし、Means ら(1968¹⁹⁾)も成熟 rat ではこの蛋白合成作用を認めているが、未熟 rat 睪丸ではこの作用を認めていない(1968²⁰⁾)。このような spermatids の glucose 依存性は glucose が amino acid の transport を高めて蛋白合成を促進させると考えている(1969²¹⁾)。

Gunaga ら(1972¹⁰⁾)は rat 睪丸内 glycogen 含有量を調べているが、胎生期と成熟 rat で高いことから、前述した胎児性腺の発育と spermatogenesis に関与することが示唆される。

しかし rat に gonadotropin を投与した場合の睪丸内 glycogen 濃度の変化は興味深い。Leiderman & Mancini

(1974¹⁸⁾) は60日齢の成熟 rat に LH を投与すると glycogen 含有量は減少するが、これは spermatids での glycolysis によるものとしている。しかし spermatogenesis が resting spermatocytes まで進行している16日齢の未熟 rat に LH を投与してもやはり睪丸内 glycogen 含有量が減少したという事実は spermatids 以外の睪丸内細胞での glycolysis が増強されたことを示唆している。

Steinberger (1967²¹⁾) は rat 睪丸の器官培養で基本培養液に1mg/ml, 2mg/ml を添加しても germ cell の成熟には無関係であるとしている。本実験でも germ cell の質的な刺激効果は認められないが、primary spermatocytes の量的な残存効果をみる限りでは1mg/ml 添加例(2mg/ml 濃度)で培養4日目、7日目でわずかに有効であつたが統計学的に有意の差はなかつた。また培養液中の glucose 濃度は培養4日目で G₁ 培養液(基準培養液)で0.91mg/ml から0.48mg/ml に、G₂ 培養液で1.96mg/ml から1.12mg/ml と減少しており、睪丸組織内で glucose は消費されたことになる。培養7日目までは G₂ 培養液での primary spermatocytes の保持が良好であることから、glucose は germ cell の保持に必須のものと考えられる。一方3mg/ml 濃度では primary spermatocytes の残存は逆に減少し、精細管の萎縮が著明となり、次項で述べるが、高濃度の glucose は睪丸の器官培養条件としては不適當である。

B) ②培養液の osmotic pressure について

睪丸の器官培養で培養液の osmotic pressure についての報告はない。Paul (1965²⁰⁾) は L 型細胞の増殖に対する培養液の osmotic pressure の影響について報告しているが、maximum growth (100%) は 255.6mosm/L, 75% growth は 200.2~338.2mosm/L, 50% growth は 184.8~385.0mosm/L である。本実験で使用した G₁ 培養液(基準培養液)、G₂ 培養液、G₃ 培養液の osmotic pressure はそれぞれ 323mosm/L, 330mosm/L, 335mosm/L であつた。G₃ 培養液での培養例で精細管の萎縮と primary spermatocytes の減少が G₁, G₂ 培養液での培養例よりも強いことは energy 源としての glucose の効果よりも osmotic pressure の上昇による障害の方が強く現われたものと解釈される。従つて睪丸の器官培養における培養液の osmotic pressure の上限は 330mosm/L と考えられ、最も理想的な培養経過を観察するには、これを超えない程度に各細胞代謝に必要な物質を含んだ合成培養液を作成しなければならない。換言すれば、ここ

に器官培養の限界があることが示唆されるように思われる。

c) testosterone 又は FSH 添加培養における濃度決定条件について

前述したように器官培養では下垂体剔除 rat に比べ germ cell の消失速度が著しく速いことを認めたが、このような状況下で testosterone と FSH が germ cell に対して如何なる影響を及ぼすかを検討するために各 hormone の添加濃度について文献的に考察してみたい。

LH 刺激により Leyding cell から分泌される testosterone の睪丸内での濃度は非常に高いことが知られている。Ahmad ら (1973¹¹⁾) の下垂体剔除 rat の片側睪丸内に dihydrotestosterone pellet を移植した場合の spermatogenesis は同側睪丸ではある程度維持されるのに対し、対側睪丸では下垂体剔除状態と同様の障害を受けることから、睪丸内 testosterone 濃度は非常に高いことが想定される。20日齢前後の未熟 rat の末梢血の testosterone 濃度は 90ng/dl (Lee ら, 1975¹⁷⁾) から 160ng/dl (Miyachi ら, 1973²⁴⁾) と報告者により差はみられるが、成熟 rat の testicular fluid 中の testosterone 濃度は末梢血中の 1.6 ± 0.4 ng/ml に対し、 29.6 ± 4.2 ng/ml と約18倍も高く (Harris, 1973¹²⁾) また睪丸リンパ液中の testosterone 濃度も精索静脈血にほぼ等しく (Setchell, 1970²⁸⁾) 精細管内に testosterone 等の steroid に対する barrier も認められていないことから (Parvinen ら, 1970²⁵⁾) testosterone は精細管内細胞に作用することも明らかである。

器官培養で添加 hormone の作用をみる場合、in vivo の測定値よりも数百倍から数千倍の高濃度で実験されているが、testosterone について Steinberger (1967²²⁾) は 2μg/ml 熊本 (1967¹⁵⁾) は 50μg/ml, 加藤 (1972¹³⁾) は 10, 50, 100μg/ml 濃度で検討している。本実験では 5μg/ml, 50μg/ml, 100μg/ml, の各濃度培養液について primary spermatocytes の残存効果をみた場合、50μg/ml 濃度で最も保持率が高かつたので、次報で発表予定の testosterone の spermatogenesis に対する作用機序をみる場合はこの濃度を使用することにした。

FSH の target organ は Sertoli cell であるとされている。第1の作用として Sertoli cell での adenyl cyclase を活性化し細胞内の cyclic AMP の増加 (Steinberger ら, 1975³⁴⁾, Tung ら, 1975³⁸⁾) と protein kinase の活性化 (Means ら, 1974²²⁾) が起こり蛋白合成 (Means, 1975²³⁾) が行われる。第2の作用は FSH 刺

激により Sertoli cell 内で ABP が作られ (Hansson ら, 1973¹¹⁾, Ritzen & French, 1974²⁷⁾) 精細管内の androgen 濃度を高めるとされている. しかし ABP 産生については最近 testosterone でも産生されるという data もあり (Tindall & Means, 1976³⁵⁾, Fakunding ら, 1976³⁾) testosterone の Sertoli cell に対する直接作用も考えられるところである. この FSH の末梢血濃度は生後20日齢前後の未熟 rat で220ng/ml (Lee ら, 1975¹⁷⁾) から600ng/ml (Miyachi ら, 1973²⁴⁾) と報告者によりかなりの差がみられる. 培養液中の濃度については Steinberger ら (1970³²⁾) は20, 50, 100 μ g/ml, 熊本 (1967¹⁵⁾) は200 μ g/ml, 加藤 (1972¹³⁾) は100, 500, 1,000 μ g/ml の各濃度で検討している. 本実験では100 μ g/ml, 200 μ g/ml の各濃度で testosterone と同様に primary spermatocytes の残存効果をみたが, 200 μ g/ml で最も良好だったことから次報で発表予定の spermatogenesis に対する FSH の作用機序の検討は200 μ g/ml 濃度培養液で行うことにした.

D) oligospermia 症例の治療に対する臨床的応用

以上述べてきたように spermatogenesis には gonadotropin 等の hormone の他にも germ cell の代謝に必要な栄養物質が必要であることが証明されている. 所で,

Fig. 20 Histologic findings of testicular tissues biopsied from hypospermatogenic and normal men.

臨床的に精子発生不全のある睾丸では障害が高度になるにつれて精細管壁の肥厚が強くなり (熊本ら1972¹⁰⁾), このことは精細管壁を通して管内へ浸透すべき栄養物質の通過障害を示唆している. Fig. 20 (木村ら, 1977¹⁴⁾) は男子不妊症患者の精細胞所見と血管病変を示したものである. severe hyalinosis とは睾丸細小動脈の1/2以上が硝子様物質で狭窄されているものであり, mild hyalinosis とは程度の軽いものであるが, 精子発生不全が高度になるにつれて hyalinosis の程度も強くなっている. この様に精子発生不全睾丸の血管にはかなり高度の肥厚があり, しかも肥厚変性の強いもの程精子発生障害の強いことがわかる. また実験的に睾丸動脈を結紮し, 乏血状態にすると germ cell の変性と減少が起ることも報告されており (Tjioe & Steinberger, 1970³⁶⁾) 何らかの形で精細管内栄養状態の悪化が起ると, 精細胞消失が惹起されるのではないかと想像される. このことは臨床的にみても, 培養実験上言えた栄養物質不足が精子発生能維持に障害を与える一つの因子になっていることがうかがえる. そこでこのような症例に対して血管拡張剤

Fig. 21. Total sperm counts from oligospermic patients before and after administration of Kallikrein (for 3 to 12 months).

Fig. 22. Total sperm counts from oligospermic patients before and after administration of Cholexamin (for 3 to 12 months).

とされている Kallikrein または Cholexamin 投与により精子発生能にどのような効果があるか検討してみた。Fig. 21, 22 はその治療前後の sperm count の変動をみたものである。oligospermia の原因は種々考えられるが、この data は臨床的にも栄養物質の精細管内への透過不全により精細管内の栄養状態悪化が起つているものがあることを示唆しており、培養実験で得た data と一致する点のあることがわかった。

結 語

21日齢 rat 睪丸を Trowell 法により器官培養し、glucose, testosterone および FSH の spermatogenesis に対する効果について検討した。培養液は MEM+10% fetal calf serum+1.0mM sodium pyruvate+0.1mM の alanine, aspartic acid, asparagine, glutamic acid, glycine, proline, serine+3mM glutamine+100U/ml penicillin G を基準培養液とした。培養液の PH は7.1、気相は5% CO₂+95% air とし、31°Cで培養した。以下に検討した成績を述べる。

① 基準培養液では培養4日目から培養7日目にかけ

て primary spermatocytes は急激に減少し、培養14日目ではほとんどの精細管で消失してしまう。しかし spermatogonia は残存し続け、42日間培養組織中にも spermatogonia の mitosis がみられた。

② Sertoli cell は培養42日間までの観察では、16~19個/精細管とほぼ一定数良好な状態で保持されていた。

③ glucose 濃度の影響：1mg/ml glucose の基準液に比して2mg/ml 濃度培養液は培養7日目までの primary spermatocytes 保持にやや有効という結果になった。また3mg/ml 濃度培養液では逆に精細管の萎縮と精細管壁の肥厚が強く、primary spermatocytes の保持も基準培養液よりも悪かつた。

④ 一方 glucose 濃度が悪影響を及ぼす原因として osmotic pressure について検討した。培養液の osmotic pressure は glucose 2mg/ml 濃度で330mosm/L、3ml/ml 濃度で335mosm/L であり、睪丸の器官培養における培養液の osmotic pressure の上限は germ cell の保持と精細管壁の状態から glucose 2mg/ml の330mosm/L と考えられる。

⑤ testosterone 濃度の影響：primary spermatocytes の保持に対する testosterone 濃度は培養8日目までの検討では50μg/ml 濃度が最も良く以下5μg/ml、100μg/ml の順であつた。

⑥ FSH 濃度の影響：FSH の添加は基準培養液での培養より primary spermatocytes の保持に有効であつた。その効果は200μg/ml 濃度の方が100μg/ml 濃度よりも良好であつた。

以上から glucose は2mg/ml、testosterone は50μg/ml、FSH は200μg/ml の各濃度培養が primary spermatocytes の生存保持に最も有効であることが分つた。

稿を終えるにあたり、種々の御協力、御教示をいただいた札幌医科大学病理学教室菊地浩吉教授ならびに北海道大学染色体研究施設佐々木本道教授に心から謝意を表します。また種々の御協力をいただいた加藤修爾博士（現、市立室蘭総合病院泌尿器科医長）と教員各位に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第13回日本泌尿器科学会総会、第24回日本内分泌学会東部部会総会において発表した。

文 献

- 1) Ahmad, N., Haltmeyer, G.C. and Eik-Nes, K.B.: Maintenance of spermatogenesis in rats with intratesticular implants containing testosterone or dihydrotestosterone (DHT). Biol. Reprod., 8, 411—419, 1973.

- 2) 朝山新一, 古沢 満: マウス生殖巣原基の体外培養—性分化と培基の検討. 実験形態学誌, 15: 34—47, 1961.
- 3) Chowdhury, A.K. and Steinberger, E.: A quantitative study of spermatogenesis in hypophysectomized, steroid-treated rats. *Anat. Res.*, **181**, 332, 1975.
- 4) Clermont, Y. and Morgenthrer, H.: Quantitative study of spermatogenesis in hypophysectomized rat. *Endocrinology*, **57**, 369—382, 1955
- 5) Davis, J.R. and Morris, R.N.: Effect of glucose on incorporation of L-lysine-U- C^{14} into testicular proteins. *Am. J. Physiol.*, **205**, 833—836, 1963.
- 6) Dorrington, J.H. and Armstrong, D.T.: Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol- 17β synthesis in cultured Sertoli cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2677—2681, 1975.
- 7) Dorrington, J.H. and Fritz, I.B.: Cellular localization of 5α -reductase and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in the seminiferous tubule of the rat testis. *Endocrinology*, **96**, 879—889, 1975.
- 8) Fakunding, J.L., Tindall, D.J., Dedman, J.R., Mena, C.R. and Means, A.R.: Biochemical actions of follicle-stimulating hormone in the Sertoli cell of the rat testis. *Endocrinology*, **98**, 392—402, 1976.
- 9) Fritz, I.B., Rommerts, F.G., Louis, B.G. and Dorrington, J.H.: Regulation by FSH and dibutyl cyclic AMP of the formation of androgen-binding protein in Sertoli cell-enriched cultures. *J. Reprod. Fert.*, **46**, 17—24, 1976.
- 10) Gunaga, K.P., Rao, M.C., Sheth, A.R. and Rao, S.S.: The role of glycogen during the development of the rat testis and prostate. *J. Reprod. Fert.*, **29**, 157—162, 1972.
- 11) Hansson, V., Reusch, E., Trygstad, O., Torgersen, O., Ritzén, E.M. and French, F.S.: FSH stimulation of testicular androgen binding protein. *Nature New Biol.*, **246**, 56—59, 1973.
- 12) Harris, M.E.: Concentration of testosterone in testis fluid of the rat. *Biol. Reprod.*, **9**, 83, 1973.
- 13) 加藤修爾: 睾丸機能の研究. 第2報 器官培養下におけるヒト睾丸の spermatogenesis の研究. 日泌尿会誌, **63**, 519—538, 1972.
- 14) 木村正一, 熊本悦明, 鈴木知勝, 菊地浩吉: 第6回アンドロロジー研究会, 乏精子症および無精子症々例における睾丸細小動脈の形態学的変化. 1977.
- 15) 熊本悦明: 第46回日本不妊学会関東地方部会特別講演, 器官培養 rat 睾丸に対する諸 hormone の影響. 1967.
- 16) 熊本悦明, 寺田雅生: 精子発生不全の発生機序. 医学のあゆみ, **82**, 1020—1028, 1972.
- 17) Lee, V.W.K., DE Kretser, D.M., Hudson, B. and Wang, C.: Variations in serum FSH, LH and testosterone levels in male rats from birth to sexual maturity. *J. Reprod. Fert.*, **42**, 121—126, 1975.
- 18) Leiderman, B. and Mancini, R.E.: Effect of FSH and LH on the glycogen concentration in testis of intact and hypophysectomized rats. *Acta Physiol. latinoam.*, **24**, 305—311, 1974.
- 19) Means, A.R. and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis: I. Comparison between stimulation by SFH and glucose. *Endocrinology*, **82**, 597—602, 1968.
- 20) Means, A.R. and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis: II. Role of adenosine-triphosphate (ATP) in stimulation by glucose. *Endocrinology*, **83**, 86—96, 1968.
- 21) Means, A.R. and Hall, P.F.: Protein biosynthesis in the testis: III. Dual effect of glucose. *Endocrinology*, **84**, 285—297, 1969.
- 22) Means, A.R., MacDougall, E., Soderling, T.R. and Corbin, J.D.: Testicular adenosine $3'$: $5'$ -monophosphate -dependent protein kinase: Regulation by follicle stimulating hormone. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1231—1238, 1974.
- 23) Means, A.R.: Biochemical effects of follicle-stimulating hormone on the testis. in *Handbook of Physiology*, Sect. 7, *Endocrinology*, vol. V, Male Reproductive system, Greep, R. O., Astwood, E.B., Hamilton, D.W. and Geiger, S.R., ed., pp. 203—218, American Physiological Society, Washington, D.C., 1975.
- 24) Miyachi, Y., Nieschlage, E. and Lipsett, M.B.: The secretion of gonadotropins and testosterone by the neonatal male rat. *Endocrinology*, **92**, 1—5, 1973.
- 25) Parvinen, M., Hurme, P. and Niemi, M.: Penetration of exogenous testosterone, pregnenolone, progesterone and cholesterol into the seminiferous tubules of the rat. *Endocrinology*, **87**, 1082—1084, 1970.
- 26) Paul, J.: *Cell and Tissue Culture*, third ed., pp. 28—30, Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 1965.
- 27) Ritzén, E.M. and French, F.S.: Demonstration of an androgen binding protein (ABP) in rabbit testis: Secretion in efferent duct fluid and passage into epididymis. *J. Steroid Biochem.*, **5**, 151—154, 1974.
- 28) Setchell, B.P.: Testicular blood supply, lymphatic drainage, and secretion of fluid. in *The*

- Testis, vol. I, Johnson, A.D., Gomes, W.R. and Vandemark, N.L. ed., pp. 101—239, Acad. Press, N.Y. & London, 1970.
- 29) Steinberger, A., Steinberger, E. and Perloff, W.H.: Mammalian testes in organ culture. *Exp. Cell Res.*, **36**, 19—27, 1964.
 - 30) Steinberger, A. and Steinberger, E.: Stimulatory effect of vitamins and glutamine on the differentiation of germ cells in rat testes organ culture grown in chemically defined media. *Exp. Cell Res.*, **44**, 429—435, 1966.
 - 31) Steinberger, A. and Steinberger, E.: Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **2**, 117—124, 1967.
 - 32) Steinberger, E., Steinberger, A. and Ficher, M.: Study of spermatogenesis and steroid metabolism in cultures of mammalian testes. *Rec. Progr. Hormone Res.*, **26**, 547—588, 1970.
 - 33) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.*, **51**, 1—22, 1971.
 - 34) Stienberger, A., Heindel, J.J., Lindsey, J.N., Elkington, J.S.H., Sandborn, B.M. and Steinberger, E.: Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells. *Endocrine Res. Commun.*, **2**, 261—272, 1975.
 - 35) Tindall, D.J. and Means, A.R.: Concerning the hormonal regulation of androgen binding protein in rat testis. *Endocrinology*, **99**, 809—818, 1976.
 - 36) Tjioe, D.Y. and Steinberger, E.: A quantitative study of the effect of ischemia on the germinal epithelium of rat testes. *J. Reprod. Fert.*, **21**, 489—494, 1970.
 - 37) Trowell, O.A.: The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp. Cell Res.*, **16**, 118—147, 1959.
 - 38) Tung, P.S., Dorrington, J.H. and Fritz, I.B.: Structural changes induced by follicle-stimulating hormone or dibutyryl cyclic AMP on presumptive Sertoli cells in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 1838—1842, 1975.

(1978年6月8日受付, 特別掲載)