Spermatogenesis に関する研究

第2編 器官培養下における spermatogenesis に対する

testosterone と FSH の作用機序の検討

(睪丸機能の研究 第8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

II. Effect of Testosterone and FSH on Spermatogenesis in Organ Culture

(Studies on Testicular Function, Report 8)

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 testis. Since previous experiments on the determination of appropriate experimental conditions for rat testicular culture suggested that the best maintenance of primary spermatocytes was 2 mg/ml of glucose, 50 μ g/ml of testosterone and 200 μ g/ml of FSH, the present investigation was undertaken to define the actions of these additives in the aforementioned concentrations. Data from 7 days and 14 days of cultures were statistically analyzed by analysis of variance.

As the interpretation of the mode of action of these factors on spermatogenesis is very intricate, data obtained in this series of experiments may be summarized by opinion. The results are summarized as follows.

1) In cultures of 2 mg/ml of glucose medium containing a concentration of glucose double that normally present in a control medium, it was demonstrated that differentiation of germ cells was not induced by addition of glucose, while good maintenance of primary spermatocytes was observed for at least 7 days in culture. This suggests that glucose, as the energy source, acts on Sertoli cells to give nutrients to germ cells.

2) In cultures of 50 μ g/ml concentration of testosterone medium, it was demonstrated that the number of resting, leptotene and zygotene spermatocytes, i.e. early stages of primary spermatocytes, which have been associated with differentiation of spermatogonia increased. A reduction in the number of pachytene spermatocytes, a late stage of primary spermatocytes, and an increase in the number of pyknotic cells were noticeable, since the supplying capacity of Sertoli cells could not be accompanied by an increase in the number of early stages of primary spermatocytes (an explanation is given in subsection 3, concerned with the action of FSH). The primary spermatocytes are suggested to be the source of these pyknotic cells because of the anatomical arrangement of the intratubular cells. Therefore, testosterone may affect the mitotic division of spermatogonia.

Since the duration of spermatogenesis always progresses at a constant speed, resting, leptotene and zygotene spermatocytes observed in preculture must develop into pachytene spermatocytes, the next stage of zygotene primary spermatocytes, in 7 days and 14 days in culture, and resting, leptotene

and zygotene spermatocytes after 7 days in culture must be differentiated from spermatogonia in precultures.

Our interpretation of pyknotic cells is as follows: It has been demonstrated that degenerative processes of germ cells, such as degeneration, pyknosis (necrosis) and disappearance, should be considered as a constant and regular feature of *in vivo* normal testis, and that the number of spermatozoa produced per spermatogonia should be, in the rat, only 52% of theoretical yield. The pyknotic cells, the degenerated germ cells, are phagocytosed by Sertoli cells. The increase in the number of pyknotic cells and the reduction in the number of primary spermatocytes indicate a decrease in the supplying capacities as well as the phagocytic properties of Sertoli cells. Therefore, the presence of pyknotic cells may reflect the Sertoli cell function.

3) Data from experiments containing 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of FSH produced the following two effects.

3)-a) The effect of FSH on the increase in the number of resting, leptotene and zygotene spermatocytes was observed, and was greater than that of testosterone. This indicates that mitotic division of spermatogonia is affected by some action of FSH as well as of testosterone.

3)-b) The other effect of FSH was maintenance of pachytene spermatocytes, and a significant observed increase in the number of primary spermatocytes on the whole. However, no increase in the number of pyknotic cells was observed. The relationship between testosterone and FSH in the number of pyknotic cells of 14-day cultivated explants statistically exhibited interaction. It was shown that the number of pyknotic cells decreased that had increased with the addition of testosterone alone in the presence of testosterone and FSH, and the number of primary spermatocytes increased. In view of this evidence, FSH may act by way of the Sertoli cells in stimulating them to give nutrients to germ cells.

4) The FSH preparations were contaminated with LH, which presumably stimulated the Leydig cells to secrete testosterone. Thus, a question arises concerning the role of the FSH observed in acting synergistically with testosterone. However, isolated seminiferous tubules from rat testes were studied in organ culture, and still the action of FSH on maintenance of primary spermatocytes was demonstrated.

緒 言

spermatogenesis に対する gonadotropin や testosterone 等の hormone の作用は種々の哺乳動物で実験されており、それらの *in vivo* と *in vitro* の研究から数多くの知見が得られている。しかしこれら hormone の作用点については spermatogenesis の複雑性から未だ十分に解明されていない面が少なくない。著者は未熟 rat 睪丸の器官培養を行い、primary spermatocytes の培養による消失過程から testosterone と FSH には primary spermatocytes を残存保持させる作用があること、また glucose にも短期間培養では若干の効果がみられることを報告した(第1報¹⁷⁾)。しかしこれら諸因子の germ cell に対する作用機序には明らかな違いがあることが予想された。本実験では作用機序を解明するために以下の3点を中心に検討してみた。

① spermatogenesis の進行時間は *in vivo* でも hormone の有無にかかわらず一定である (Clermont & Harvey, 1965⁷⁾)。器官培養でも pachytene spermatocytes

までは、*in vivo* の状態と全く同じ速度で進行するという特性を考慮し、培養による resting, leptotene, zygotene, pachytene spermatocytes の変化をみることにした。

② *in vivo* における正常睪丸組織でも germ cell は変性→壊死→消失過程をたどっており、実際には spermatogonia からの理論的 spermatozoa 産生数の52%しか産生されていないと報告されている (Clermont, 1962⁹⁾)。変性した germ cell が消失する際にこれら処理する細胞は Sertoli cell (Clermont & Morgentaler, 1955⁸⁾) や macrophage (Phadke & Phadke, 1961²⁵⁾)、lymphocyte 由来の spermiophage (Tjioe & Steinberger, 1967⁴¹⁾) 等が考えられる。しかし器官培養という条件下では、Sertoli cell とするのが妥当であり、培養による pyknotic cell の変化を検討すること。上記①②の所見を分散分析法で総合判定し諸因子の作用点を分析した。

③ FSH 中の LH の contamination による Leydig cell での testosterone 産生による作用との共同作用を除外するために、間質細胞を完全に除去した精細管のみの

培養を行うこと。

以上3点を中心に testosterone と FSH の作用機序を検討したので報告する。

(I) 各種 primary spermatocytes に対する glucose, testosterone, FSH の影響について

実験材料および方法

(a) 培養組織, (b) 実験器具及び培養方法

(第1編¹⁷⁾) と同じ

(c) glucose, testosterone, FSH の添加

(第1編¹⁷⁾) において glucose は 2mg/ml, testosterone は 50 μ g/ml, FSH は 200 μ g/ml 濃度で primary spermatocytes の保持が最も良好であつたのでこれらの濃度について検討した。Table 1 はそれらの組み合わせを示したものである。G₁ は glucose 1mg/ml, G₂ は 2mg/ml, T₀, F₀ は testosterone, FSH を添加しない培養液, T₅₀, F₂₀₀ はそれぞれ testosterone 50 μ g/ml, FSH 200 μ g/ml 濃度の培養液であることを示す。

(d) 培養組織の組織学的検索

(第1編¹⁷⁾) と同じ。

(e) 組織標本の解析方法

(第1編¹⁷⁾) に準じ培養中気相に近い部分で組織標本が比較的良好に保持されている部分の円形精細管10個を選ぶ, resting, leptotene, zygotene, pachytene spermatocytes と pyknotic cell を count した。培養21日目では

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

		glucose (mg/ml)	testosterone (μ g/ml)	FSH (μ g/ml)
Medium	G ₁ T ₀ F ₀ *	1	0	0
	G ₁ T ₅₀ F ₀	1	50	0
	G ₁ T ₀ F ₂₀₀	1	0	200
	G ₁ T ₅₀ F ₂₀₀	1	50	200
	G ₂ T ₀ F ₀	2	0	0
	G ₂ T ₅₀ F ₀	2	50	0
	G ₂ T ₀ F ₂₀₀	2	0	200
	G ₂ T ₅₀ F ₂₀₀	2	50	200

G₁ T₀ F₀* (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.

ほとんどの実験で primary spermatocytes は消失するので培養7日目, 14日目について検討した。本実験では 6 rat 辜丸について7回の培養を行い, 1回の培養では 48個から64個の dish を作成した。本実験で培養7日, 14日目の分析で使用した dish 総数は, 134個である。Table 1 は glucose, testosterone, FSH 添加別による8群の分類を示す。

実験結果

Fig. 1. Variations of resting, leptotene & zygotene spermatocytes in organ culture.

Table 2. Variations of the primary spermatocytes and pyknotic cells in organ culture.

days in culture medium*	resting, leptotene & zygotene spermatocytes					pachytene spermatocytes				
	0 Mean ±SE	7	Mean ±SE	14	Mean ±SE	0 Mean ±SE	7	Mean ±SE	14	Mean ±SE
G ₁ T ₀ F ₀ (5)**	26.82 ±2.08	5.8, 0.4 7.8, 0.6 0.0,	2.92 ±1.61	0.5, 0.4 3.8, 0.0 0.0,	0.94 ±0.72	11.27 ±1.27	8.9, 1.3 23.6, 0.0 0.0,	6.76 ±4.52	0.1, 0.9 0.0, 0.0 0.0,	0.40 ±0.37
G ₁ T ₅₀ F ₀ (6)		19.0, 11.7 1.0, 9.1 4.9, 2.8	8.08 ±2.71	0.5, 0.8 5.8, 1.2 4.2,	2.50 ±1.05		13.3, 0.3 13.0, 0.1 22.9, 4.9	9.08 ±3.64	0.1, 6.1 0.0, 0.0 0.0,	1.90 ±1.22
G ₁ T ₀ F ₂₀₀ (4)		21.5, 11.9 14.5, 8.2	14.03 ±2.80	1.3, 4.4 4.6,	3.43 ±1.06		3.9, 11.3 2.7, 32.9	12.70 ±6.99	4.4, 0.2 0.0,	1.53 ±1.43
G ₁ T ₅₀ F ₂₀₀ (4)		21.9, 19.4 14.5, 4.3	15.03 ±3.89	0.4, 17.3 0.5, 5.4	5.90 ±3.97		20.3, 1.4 4.4, 21.3	11.85 ±5.20	17.3, 0.5 7.2, 0.0	6.25 ±4.03
G ₂ T ₀ F ₀ (5)		4.9, 0.7 14.4, 2.8 0.8,	4.72 ±2.53	0.9, 0.7 0.8, 0.8 0.0,	0.64 ±0.16		20.7, 4.0 17.6, 0.2 0.0,	8.50 ±4.31	3.9, 2.0 0.0, 0.0 0.0,	1.18 ±0.78
G ₂ T ₅₀ F ₀ (4)		35.0, 7.3 10.0, 5.1	14.35 ±6.95	0.6, 0.1 2.7, 0.6	1.00 ±0.56		4.0, 14.5 0.8, 0.6	4.98 ±3.26	4.3, 0.7 0.0, 0.0	1.25 ±1.02
G ₂ T ₀ F ₂₀₀ (3)		19.6, 16.4 4.6,	13.53 ±4.56	2.0, 1.8 2.4,	2.06 ±0.17		5.4, 4.3 19.4,	9.70 ±4.86	9.0, 2.1 0.0,	3.70 ±2.71
G ₂ T ₅₀ F ₂₀₀ (4)		18.0, 15.0 23.0, 6.8	15.70 ±3.39	0.7, 5.8 1.7,	2.73 ±1.56		17.0, 16.5 3.2, 4.8	10.38 ±3.69	15.2, 0.7 0.0,	5.30 ±4.75

*: Refer to Table 1, *: One dish was lost.
()**: Number of the testes experimented.

(a) resting, leptotene, zygotene spermatocytes 数の培養による変化 (Table 2, Table 3, Fig. 1)

resting~zygotene spermatocytes は stage VII から stage XIV までの精細管でのみ観察されるが (Clermont & Harvey, 1965⁷⁾), 培養後の stage 分類は germ cell の association の乱れも加わり分類困難な面もあるので一括して分類した。Table 2 は各実験における10精細管の平均値を示し, mean はそれらの平均値を各群毎に再度平均した値である。Fig. 1 は Table 2 の mean±SE を図示したものである。Table 3 はこれらの data を分散分析法により解析したものである。primary spermatocytes の残存保持には testosterone と FSH には交互作用がないので, testosterone と FSH 同時添加の有無による理論的保持数のみを算出した。各群の例数に不揃いを生じたが, data 数不揃いに対しては調和平均法 (田口, 1976³⁸⁾) により処理した。器官培養という実験条件から $p < 0.1$ も無視しないで考慮した。以下 Table 3 の数値を中心に論じてゆく。

(a) —① glucose 添加培養

培養7日目では glucose 1mg/ml の基準培養液 (G₁) 群の精細管当りの resting~zygotene spermatocytes 数は 10.01 であり glucose 2mg/ml (G₂) 群では 12.08 であるが, 培養14日目では glucose 1mg/ml (G₁) 群は 3.19,

G₂ 群は 1.61 と逆転する。しかしこれらに有意の差はみられない。

(a) —② testosterone 添加培養

培養7日目では testosterone 非添加群 (T₀) は 8.80 に対し添加群 (T₅₀) では 13.29 と増加している ($p < 0.1$)。しかし培養14日目でも非添加群 (T₀) は 1.77 に対し添加群では 3.03 であるが有意の差は消失している (Fig. 1)。Table 2 に示した data で培養7日目で G₁ T₀ F₀ の 2.92, G₂ T₀ F₀ の 4.72 に対し G₂ T₅₀ F₀ は 14.35 と増加しており, glucose と testosterone の同時添加は FSH 単独添加に匹敵する。

(a) —③ FSH 添加培養

培養7日目では FSH 非添加群 (F₀) の 7.52 に対し添加群 (F₂₀₀) では 14.57 と有意の増加をみる ($p < 0.05$)。培養14日目では非添加群 (F₀) で 1.27, F₂₀₀ で 3.53 と有意の差は消失する。培養7日目で Table 2 に示した G₁ T₀ F₂₀₀ は 14.03, G₂ T₀ F₂₀₀ は 13.53 と glucose と FSH の同時添加の効果はみられず testosterone との作用効果の差が示唆される。

(a) —④ testosterone+FSH 添加培養

glucose には有意の作用がないため G₁ G₂ を一括して testosterone も FSH も添加しない群 (T₀ F₀) と testosterone+FSH 添加群 (T₅₀ F₂₀₀) について分散分析

(mean number of the cells per tubule.)

primary spermatocytes					pyknotic cells				
0 Mean ±SE	7	Mean ±SE	14	Mean ±SE	0 Mean ±SE	7	Mean ±SE	14	Mean ±SE
38.05 ±1.19	16.7, 0.6 1.3, 29.4 0.4,	9.68 ±5.81	0.5, 0.6 5.7, 0.0 0.0,	1.36 ±1.09	0.00 ±0.00	1.0, 0.0 0.2, 0.4 0.0,	0.40 ±0.16	1.6, 0.4 0.0, 0.0 0.0,	0.32 ±0.32
	22.4, 5.0 32.0, 2.9 34.5, 5.9	17.11 ±5.84	0.5, 0.3 11.9, 1.8 7.5,"	1.40 ±2.27		0.9, 5.1 1.0, 1.8 2.9, 1.1	2.13 ±0.66	0.9, 3.6 1.9, 0.7 0.5,"	1.52 ±0.57
	18.4, 32.8 10.9, 44.8	26.73 ±7.54	1.3, 8.8 4.8,"	4.97 ±2.16		1.1, 0.3 2.1, 0.0	0.88 ±0.46	2.3, 1.3 0.5,"	1.37 ±0.52
	39.7, 15.9 8.7, 43.2	26.88 ±8.57	0.4, 34.5 1.0, 12.6	12.13 ±7.96		1.7, 4.2 2.8, 0.5	2.30 ±0.78	2.5, 2.1 0.9, 0.9	1.60 ±0.41
	35.1, 4.8 20.9, 0.9 3.4,	13.02 ±6.54	0.9, 0.7 3.9, 2.8 0.0,	1.66 ±0.72		0.7, 0.6 0.1, 4.3 0.0,	1.14 ±0.80	0.2, 1.5 1.2, 0.0 0.0,	0.58 ±0.32
	9.1, 49.5 8.1, 10.6	19.33 ±10.07	0.6, 0.1 7.0, 1.3	2.25 ±1.60		0.7, 2.5 1.5, 6.5	2.80 ±1.28	1.2, 2.8 3.7, 0.7	2.10 ±0.69
	10.0, 20.7 39.0,	23.23 ±8.46	2.0, 10.8 4.5,	5.77 ±2.61		1.0, 0.9 0.2,	0.70 ±0.25	2.7, 0.8 1.3,	1.60 ±0.56
	32.0, 34.5 10.0, 27.8	26.08 ±5.53	0.7, 19.0 2.4,"	7.37 ±5.83		1.5, 0.5 1.0, 1.6	1.15 ±0.25	2.5, 0.3 1.0,"	1.27 ±0.64

Table 3. Analysis of variance (number of the cells per seminiferous tubule)

Factor	resting, leptotene & zygotene spermatocytes	pachytene spermatocytes	primary spermatocytes	pyknotic cells
7 days in culture G ₁ (glucose 1mg/ml)	mean μ " 10.01 ± 3.53	mean μ " 10.10 ± 4.32	mean μ " 20.10 ± 6.79	mean μ " 1.43 ± 0.67
G ₂ (glucose 2mg/ml)	12.08 ± 3.53	8.39 ± 4.32	20.41 ± 6.79	1.45 ± 0.67
T ₀ (testosterone 0 μ g/ml)	8.80 ± 3.53	9.42 ± 4.32	18.17 ± 6.79	0.78 ± 0.67
T ₅₀ (testosterone 50 μ g/ml)	13.29 ± 3.53 ^Δ	9.07 ± 4.32	22.35 ± 6.79	2.11 ± 0.67**
F ₀ (FSH 0 μ g/ml)	7.52 ± 3.53	7.33 ± 4.32	14.79 ± 6.79	1.62 ± 0.67
F ₂₀₀ (FSH 200 μ g/ml)	14.57 ± 3.53*	11.16 ± 4.32	25.73 ± 6.79*	1.26 ± 0.67
14days in culture G ₁ (glucose 1mg/ml)	3.19 ± 1.58	2.52 ± 2.94	5.71 ± 3.38	1.20 ± 0.49
G ₂ (glucose 2mg/ml)	1.61 ± 1.58	2.86 ± 2.94	4.26 ± 3.38	1.39 ± 0.49
T ₀ (testosterone 0 μ g/ml)	1.77 ± 1.58	1.70 ± 2.94	3.44 ± 3.38	0.97 ± 0.49
T ₅₀ (testosterone 50 μ g/ml)	3.03 ± 1.58	3.68 ± 2.94	6.54 ± 3.38	1.62 ± 0.49 ^Δ
F ₀ (FSH 0 μ g/ml)	1.27 ± 1.58	1.19 ± 2.94	2.42 ± 3.38	1.13 ± 0.49
F ₂₀₀ (FSH 200 μ g/ml)	3.53 ± 1.58	4.20 ± 2.94 ^Δ	7.76 ± 3.38*	1.46 ± 0.49

* 95% confidence limit, ^Δ p<0.1, * p<0.05, ** p<0.01

すると、それらの理論的細胞数は培養7日目で T₀ F₀ の5.28に対し T₅₀ F₂₀₀ 群では16.82と増加している。培養14日目でも T₀ F₀ 群の0.64に対し T₅₀ F₂₀₀ では4.16と増加している。

(a) —⑤ 小括

以上示したように、testosterone と FSH には、resting ~zygotene spermatocytes を増やす作用がありそれら hormone は spermatogonia の mitosis に作用することを

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

示している。

(b) pachytene spermatocytes 数の培養による変化 (Table 2, Table 3, Fig. 2)

(b) —① glucose 添加培養

培養7日目では glucose 1mg/ml の基準培養液 (G₁) 群は10.10, glucose 2mg/ml (G₂) 群は8.39と glucose 添加により pachytene spermatocytes は減少している。培養14日目では G₁ 群の2.52に対し G₂ 群では、2.86と逆転するがいずれも有意の差はみられない。

(b) —② testosterone 添加培養

培養7日目では非添加群 (T₀) は9.42, 添加群 (T₅₀) は9.07と減少している。培養14日目では T₀ 群の1.70に対し T₅₀ 群では3.68と逆転するが, pachytene spermatocytes に対する testosterone の効果に有意の差はみられない。glucose との同時添加の効果もみられない。

(b) —③ FSH 添加培養

培養7日目では非添加群 (F₀) の7.33に対し添加群 (F₂₀₀) は11.16と増加しているが有意の差はない。培養14日目では F₀ 群の1.19に対し F₂₀₀ 群は4.20と増加している ($p < 0.1$)。

(b) —④ testosterone+FSH 添加培養

glucose には有意の差はないので (a) —④と同様に G₁ G₂ を一括して分析すると理論的 pachytene sperm-

atocytes 数は培養7日目では非添加群 (T₀ F₀) の7.51に対し添加群 (T₅₀ F₂₀₀) では10.99と増加しているが有意の差はない。しかし培養14日目では T₀ F₀ 群の0.21に対し T₅₀ F₂₀₀ 群では5.18と増加している。

(b) —⑤ 小括

以上示したように glucose, testosterone には pachytene spermatocytes の保持作用はみられないが, FSH 添加で pachytene spermatocyte 数が増加し, 特に培養14日目で著明であつた。即ち FSH には, pachytene spermatocytes の保持作用があることを示している。

(c) primary spermatocytes 数の培養による変化 (Table 2, Table 3, Fig. 3)

上記 (a), (b) の spermatocytes を一括して分析する。

(c) —① glucose 添加培養

培養7日目では glucose 1mg/ml の基準培養液 (G₁) 群は20.10, glucose 2mg/ml (G₂) 群は20.41で差はない。培養14日目でも G₁ 群は5.71, G₂ 群は4.26でこれらに有意の差はない。

(c) —② testosterone 添加培養

培養7日目では非添加群 (T₀) の18.17に対し添加群 (T₅₀) では22.35と増加している。培養14日目でも T₀ 群の3.44に対し T₅₀ 群は6.54と増加しているが, いずれ

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

Fig. 4. Variations of pyknotic cells in organ culture

も有意の差はみられない。

(c) —③ FSH 添加培養

培養7日目では非添加群 (F₀) の14.79に対し添加群 (F₂₀₀) は25.73と増し (p<0.05), 培養14日目でも F₀ 群の2.42に対し F₂₀₀ 群では, 7.76と増加している (p<

0.05). しかし培養7日目でも 培養前の 38.05には及ばない。

(c) —④ testosterone+FSH 添加培養

(a) —④, (b) —④と同様に理論的 primary spermatocytes 数は培養7日目では非添加群 (T₀ F₀) の12.70

に対し添加群 ($T_{50} F_{200}$) では27.82と増加している。培養14日目でも $T_0 F_0$ 群の0.87に対し $T_{50} F_{200}$ 群では9.31と増加している。

(c) —⑤ 小括

以上示したように glucose には primary spermatocytes に対する有意の作用はみられない。testosterone には (a) で resting~zygotene spermatocytes を増加させる作用をみたが、primary spermatocytes 全体でみると増加傾向はあるが、有意の差は消失している。FSH には (a) の resting~zygotene spermatocytes と (b) の pachytene spermatocytes 数を共に増加させる作用があったが、primary spermatocytes 全体でも当然のことながら保持増数効果は著明である。

(d) pyknotic cell 数の培養による変化 (Table 2, Table 3, Fig. 4.)

培養前の精細管には pyknotic cell はみられない。培養と共に精細管内には pyknotic cell が認められるが、これは培養14日目までは Sertoli cell も spermatogonia もほぼ一定数保持されていることから primary spermatocytes 由来の細胞と考えられる。

(d) —① glucose 添加培養

培養7日目では glucose 1mg/ml の基準培養液 (G_1) 群では1.43, glucose 2mg/ml (G_2) 群では1.45と差はみられない。培養14日目でも G_1 群の1.20に対し G_2 群では1.39と有意の差はない。

(d) —② testosterone 添加培養 (Fig. 7)

培養7日目では非添加群 (T_0) の0.78に対し添加群 (T_{50}) は2.11と増加している ($p < 0.01$)。培養14日目でも T_0 群の0.97に対して T_{50} 群では1.62と増加している ($p < 0.1$)。

(d) —③ FSH 添加培養

培養7日目では非添加群 (F_0) の1.62に対し添加群 (F_{200}) は1.26と減少しているが、14日目では F_0 の1.13に対し F_{200} 群では1.46と増加している。しかしいずれも有意の差はみられない。

(d) —④ testosterone+FSH 添加培養

glucose には有意の差はないので $G_1 G_2$ 群を一括して分析すると理論的 pyknotic cell 数は培養7日目では非添加群 ($T_0 F_0$) の0.96に対し添加群 ($T_{50} F_{200}$) では1.93と増加しているが有意の差はない。しかし培養14日目では testosterone と FSH には交互作用の傾向が認められた ($p > 0.1$) (Fig. 5)。即ち、 $T_0 F_0$ 群は0.45, $T_0 F_{200}$ 群は1.48, $T_{50} F_0$ 群は1.81, $T_{50} F_{200}$ 群は1.43と

Fig. 5. Interaction of testosterone and FSH on the appearance of pyknotic cells in culture for 14 days.

なり、testosterone 添加による pyknotic cell の増加を FSH は抑えるが、testosterone 非添加の場合は逆に FSH により pyknotic cell が増えることを意味している。

(d) —⑤ 小括

上述したように glucose には pyknotic cell に対する作用はみられないが、testosterone には培養7日目 ($p < 0.01$)、14日目 ($p < 0.1$) とも pyknotic cell を増加させる作用がみられた。FSH 添加では培養7日目では減少し、14日目では逆に増加していた。しかし培養14日目では testosterone と FSH には交互作用の傾向 ($p < 0.1$) がみられ、これについては考按の章で詳述する。

(II) 精細管のみの培養 に対する testosterone と FSH の影響について

実験材料及び方法

(a) 培養組織

生後21日齢の未熟 rat 睪丸は間質細胞を除外する時に精細管壁の損傷を伴うために、容易に1本1本の精細管を取り出すことの可能な成熟睪丸 (60日齢) を技術的な制約上から選んだ。

(b) 実験器具及び培養方法

(器具)、(培養液) は (第1編¹⁷⁾) と同じ。

(培養法) —ガラス板上で精細管のみを分離し、基準培養液で3回洗浄した。一精細管の長さは1.5~2.0cm とし culture dish の lens-paper の上に4~5本の精細管を等間隔に載せた。他の操作は (第1編¹⁷⁾) に準じた。

(c) testosterone と FSH の添加

(第1編¹⁷⁾) に準じたが、testosterone は50μg/ml では精細管の萎縮が強かつたので5μg/ml 濃度で検討した。

(d) 培養組織の組織学的検索

(第1編¹⁷⁾) と同じ。

(e) 組織標本の解析方法

培養組織中のほぼ真円に近い精細管を各群で10~15個選び各精細管に含まれる primary spermatocytes の平均値を算出した。

実験結果

(a) primary spermatocytes/精細管の培養による変化 (Fig. 6)

glucose 濃度はいずれも 2mg/ml 培養液を使用した。

(II) — (1) では培養前の primary spermatocytes

Fig. 6. Variations of primary spermatocytes in organ culture (tubule culture of adult rats)

Fig. 7. Testicular explant of a 21-day-old rat maintained in culture for 7 days, showing good maintenance of surviving primary spermatocytes (PS) and presence of pyknotic cells (PC). Culture medium contained 2 mg glucose and 50 μg testosterone, per ml. ×640.

は45個あるが、培養4日目では $G_2 T_0 F_{200}$ 群は49個と増加している。以下 $G_2 T_5 F_0 > G_2 T_0 F_0$ であり、培養7日目でも $G_2 T_0 F_{200} > G_2 T_5 F_0 > G_2 T_0 F_0$ の順であった。

(II) — (2) では培養8日目ではいずれの群も primary spermatocytes は培養前の45個よりも減少しているが、 $G_2 T_5 F_{200} > G_2 T_0 F_{200} > G_2 T_5 F_0 > G_2 T_0 F_0$ の順であった。(1), (2) いずれの実験でも testosterone と FSH の primary spermatocytes 保持作用を認めるが、特に FSH にその作用が強かった。

(b) 培養組織所見

① 培養前組織 (Fig. 8)

Fig. 8. Seminiferous tubules isolated from the testis tissue of a 60-day-old rat prior to cultivation, showing good maintenance of cellular composition of the seminiferous tubule and absence of interstitial tissue. ×250.

精細管のみを分離した培養前の組織では間質細胞は完全に除去されている。

i) 精細管壁の障害もほとんどなく、精細管壁構造は正常に保たれている。

ii) spermatogenesis は年齢相当に正常に保持されている。

iii) Sertoli cell も正常に保持されている。

② $G_2 T_0 F_0$ 培養液 (glucose 2mg/ml 濃度) 4日間培養組織 (Fig. 9)

i) 精細管壁の肥厚と精細管径の萎縮は睾丸組織を細切した器官培養よりも早期にみられる。

ii) germ cell の減少と pyknotic cell の増加及び cell association の乱れが目立つが、iii) Sertoli cell はほぼ正常数保持されている。

③ $G_2 T_0 F_{200}$ 培養液 (glucose 2mg/ml, FSH 200

Fig. 9. Seminiferous tubules of a 60-day-old rat maintained in culture for 4 days, showing diminished diameter and decreased number of germ cells of the seminiferous tubules. Culture medium contained glucose, 2mg/ml. $\times 320$.

Fig. 10. Seminiferous tubules of a 60-day-old rat maintained in culture for 4 days, showing good maintenance of tubular structure and cellular composition of the seminiferous tubules. Culture medium contained 2 mg glucose and 200 μ g NI-AMDD-FSH, per ml. $\times 320$.

μ g/ml 濃度) 4日間培養組織 (Fig. 10)

- i) 精細管壁の肥厚はほとんどみられない。
- ii) germ cell は比較的良好に保持されている。cell association の乱れはあるが、spermatogenesis はほぼ正常に保たれている。
- iii) Sertoli cell は正常である。
- ④ $G_2 T_0 F_0$ 培養液 7日間培養組織 (Fig. 略)
- i) 精細管壁の肥厚、精細管径の萎縮は著明で、ii) germ cell の pyknotic change が著明である。cell association は完全に崩壊している。iii) Sertoli cell 数も減少している。
- ⑤ $G_2 T_0 F_{200}$ 培養液 7日間培養組織 (Fig. 略)

- i) 精細管壁の肥厚、精細管径の萎縮が強い。
- ii) germ cell は比較的良好に保持されているが cell association の乱れが著明である。
- iii) Sertoli cell は相当数ほぼ正常に保持されている。

(c) 小括

著者らの分離した精細管からは testosterone の分泌のないことが確められている。実験 (I) で認められた FSH の primary spermatocytes に対する残存効果は間質細胞を完全に除去した精細管のみの培養でも認められた。従つて FSH 添加によるこの効果は FSH 単独の作用と考えられる。実験 (I) で示したように testosterone には resting~zygotene spermatocytes 数を増加させる作用がみられたが、精細管のみの培養でも $G_2 T_5 F_{200}$ 培養液での残存保持が最も良く、testosterone と FSH には相乗作用が認められた。

考 按

A) 器官培養下における spermatogenesis について

睪丸の器官培養の研究では spermatogenesis の完成をみたという報告はない。しかし Steinberger らは一連の rat 睪丸の器官培養を行い、Vitamin A+Vitamin E の添加かまたは glutamine の添加により spermatogonia から primary spermatocytes までは、hormone の添加なしでも進行することを証明しているが (Steinberger & Steinberger, 1966³⁵⁾, 1967³⁶⁾), それ以降成熟をみることはできなかった。ところで in vivo における rat の spermatogonia から spermatozoa までの進行時間は未熟 rat で41.5日、成熟 rat で53.2日とされ (Huckins, 1965¹⁴⁾) spermatogenesis の進行時間は一定の speed を保っている。またこの間における germ cell は変性→壊死→消失過程をたどっており、実際産生数は spermatogonia からの理論的 spermatozoa 産生数の52%といわれている (Clermont, 1962⁹⁾)。そこで in vivo と in vitro における spermatogenesis の進行時間と germ cell の degeneration をおこした pyknotic cell について文献的に考按し、本実験の成績を検討してみたい。

A) —① spermatogenesis の進行時間について (Fig. 11)

前述した Huckins (1965¹⁴⁾) によると type A spermatogonia から leptotene spermatocytes までの進行時間は未熟 rat で5.5日、成熟 rat で13.3日であり leptotene spermatocytes から spermatids までは未熟 rat で13.0日、成熟 rat で17.2日である。spermiogenesis に要す

Fig. 11. Duration of spermatogenesis in prepubertal rat.

Age of animal (day)	Most advanced germ cells, in vivo (Huckins, 1965 ¹⁴)	(Steinberger, et al. 1970 ³⁷)	Organ culture (Steinberger & Steinberger)
Newborn		gonocytes	
1			(1966 ³⁵)
2			
3		primitive type A spermatogonia	primitive type A spermatogonia
4			
5	type A spermatogonia	type A spermatogonia	
6		type B spermatogonia	
7			
8			
9			
10			(1965 ³⁴)
11			resting spermatocytes
12	leptotene spermatocytes		↓
13			zygotene spermatocytes
14			
15			
16			
17			
18			zygotene spermatocytes
19			
20			
21			
22			
23			
24			
25	spermatids		pachytene spermatocytes
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			
36			
37			
38			
39			
40			
41			
42			
43			
44			
45			
46			
47			
48	spermatozoa		pachytene spermatocytes

る時間は未熟 rat で23.0日, 成熟 rat では22.7日で, spermatozoa の完成までにみられる未熟 rat と成熟 rat の期間の差は spermatids の形成されるまでに生ずるとされている。この進行速度は hormone 投与の有無にかかわらず変わらないとされている (Clermont & Harvey, 1965⁷)。即ち, 未処置成熟 rat, 下垂体剔除 rat, 及び下垂体剔除+testosterone or HCG 投与 rat はいずれも stage VII と stage VIII の pachytene spermatocytes までは12日間の観察で同一速度で進行したと報告している。

in vitro の器官培養でも in vivo と同一速度で進行すると報告されている。Steinberger & Steinberger (1965³⁴) は生後12日目の rat 睪丸を ³H-thymidine で label し, 3日から7日間培養で leptotene spermatocytes と zygotene spermatocytes まで進行し, 2週から3週間培養で pachytene spermatocytes まで進行することを認めている。また germ cell は spermatogonia のみである4日齢の rat 睪丸を14日間培養した場合も, zygotene spermatocytes まで進行し, 21日間培養で pachytene spermatocytes まで進行したと報告している (Steinberger & Steinberger, 1966³⁵)。ヒト睪丸の器官培養でも加藤 (1972¹⁶) は ³H-thymidine 処理により4日間培養で leptotene spermatocytes に, 14日間培養で pachytene spermatocytes までの成熟を観察している。しかし器官培養では spermatids 以降の成熟には成功していないので spermiogenesis については不明である。

このように下垂体剔除後の hormone 投与の有無という条件下でも, また器官培養という条件下でも primary spermatocytes までは未処置 in vivo の状態と同一速度で進行することが文献的に確認されたわけである。従つて本実験で培養開始日に観察された resting~zygotene spermatocytes は培養7日目には pachytene spermatocytes になつてははずであり, 培養7日目に観察された resting~zygotene spermatocytes は培養開始日には spermatogonia であつたことになる。

A) —② pyknotic cell について

器官培養では培養期間が長くなるにつれて germ cell 数は減少する。この germ cell の消失過程は変性→壊死→消失に向かうわけであるが, この消失段階で何らかの細胞で phagocyte されているのであろうか。

Clermont (1965⁹) は in vivo における rat の全精子発生過程を通じ, 退行消失しやすい段階は次の4つが主なものであるとしている。(i) type A spermatogonia の mitosis 期で10.6%, (ii) spermatocytes の第1 maturation division で12%, (iii) 第2 maturation division で15%, (iv) spermatids の acrosome phase 及び maturation phase の後半で10% (Rosen-Runge, 1955²⁸) が消失する。これらの消失過程における処理細胞は下垂体剔除 rat の spermatids が Sertoli cell に phagocyte されている所見 (Clermont & Morgentharler, 1955⁹) や睪丸内に注入した色素が Sertoli cell に取り込まれて

いる所見 (Clegg & Macmillan, 1965⁵⁰) から Sertoli cell と考えられている。

他に Phadke & Phadke (1961²⁵) は不妊男子の精液と副睾丸内液中に macrophage を観察している。Tjioe & Steinberger (1967⁴¹) は正常男子の睾丸生検で精細管内に spermiophage を観察しており、この場合、Sertoli cell は全く正常の形態をしていることから lymphocyte 由来の細胞と考えている。

このように pyknotic cell は何らかの細胞で phagocyte されるが、器官培養という条件下では Sertoli cell で行なわれると考える方が妥当である。また Sertoli cell は培養42日までの観察で、16~19個/精細管とほぼ一定数保持されるのに対し、primary spermatocytes は培養と共に急激に減少することも Sertoli cell との考えを裏付けるものである (第1編¹⁷)。この Sertoli cell 数の変動は hormone 添加の有無に関係なく、pyknotic cell が精細管内の primary spermatocytes の存在する位置で観察されることから、これらの大部分は primary spermatocytes 由来と考えられる。

次に培養前組織中には無かつた pyknotic cell が培養7日目の全群平均で約1.4/精細管、同様に14日目で約1.3/精細管と増加しているのは pyknotic cell を処理する Sertoli cell 機能の低下によるものかという問題が残る。primary spermatocytes/精細管が培養前の平均42個から7日間培養で平均20個、14日間培養で平均5個と減少しているが、Sertoli cell の phagocytosis 機能が完全に喪失したとすれば7日目で約22個、14日目で約37個の pyknotic cell がなければならぬことになる。しかし pyknotic cell は7日目で約1.4個、14日目で約1.3個となつている。これは Sertoli cell の処理能以上に germ cell の degeneration が多いということに他ならない。

testosterone 添加群の pyknotic cell は7日間培養で非添加群の約0.8/精細管に対し、約2.1/精細管 ($p<0.01$)、14日間培養で非添加群の約1.0/精細管に対し約1.6/精細管 ($p<0.1$) と増加している。この点に関し、著者らは次のように考えている。primary spermatocytes は Sertoli cell から栄養物の供給を受けており、testosterone 刺激により spermatogonia から分裂した primary spermatocytes が発育生存しうるだけの栄養を供給するには、この条件下での Sertoli cell の機能は十分でないと考えられる。なおこの pyknotic cell の増加は、培養7日目、14日目とも testosterone 添加群の resting~zygotene spermatocytes が増えていることから Sertoli cell の機能

が低下しているとは考えられず、testosterone が Sertoli cell の phagocytosis 機能に toxic に働いて機能低下させ、pyknotic cell の処理能が落ちたとは考えにくい。

FSH 添加群では pyknotic cell の増加はみられないが、primary spermatocytes は7日間培養 ($p<0.05$) 14日間培養 ($p<0.05$) とも非添加群より多い。このことから FSH は testosterone とは明らかに spermatogenesis に対する作用が異つていると考えられる。培養14日目の data で FSH と testosterone の pyknotic cell 数に対する影響は推計学的に言つて Fig. 5 にみられる如く交互作用の傾向があると言える。即ち、FSH を添加すると testosterone による pyknotic cell 数の増加を防ぐことができることを示している。FSH の Sertoli cell に対する作用と関連しており次節で考察する。

B) spermatogenesis に対する testosterone と FSH について

器官培養では下垂体剔除 rat に比べ、germ cell の消失速度が速いが (第1編¹⁷)、その理由としては、glucose 添加実験の成績などから生体内より器官培養の方が精細管内細胞の栄養補給がより悪いためではないかと我々は想定しているが、いまだ詳らかでない点が多い。そのように条件が悪くても器官培養は実験的に各種 hormone の effect をそれぞれ単独で検討しうる利点があり、そのために我々は本実験を試みた訳である。器官培養で testosterone の効果を認めたという報告はなく、gonadotropin については mouse 睾丸 (Lostroh, 1960⁴⁹)、蛙睾丸 (Basu ら, 1967⁵¹) 及び rat 睾丸 (熊本, 1967⁴⁸) の培養で認めたという3報告にすぎない。そこで testosterone と FSH の睾丸組織及び spermatogenesis に対する作用を文献的に考察し、本実験の器官培養の成績を検討してみたい。

B) ① testosterone の睾丸組織及び spermatogenesis に対する作用

LH 刺激により Leydig cell から分泌される testosterone の testicular fluid 中の濃度は末梢血中の約20倍も高く (Harris, 1973¹³)、睾丸リンパ液中の testosterone 濃度も精索静脈血中にはほぼ等しいこと (Setchell, 1970³⁰) 及び精細管内に testosterone 等の steroid に対する barrier も認められていないことから (Parvinen ら, 1970²⁴)、testosterone は精細管内細胞に作用することは明らかである。下垂体剔除 rat の片側に dihydrotestosterone (DHT) pellet を移植すると同側睾丸の spermatogenesis はある程度維持されるのに対し、対側睾丸では下垂体剔

除状態と同様の障害を受けている (Ahmad ら, 1973¹¹) ことから示唆される。

しかし testosterone の精細管内 germ cell と Sertoli cell に対する作用については不明の点も多い。Huckins & Cunningham (1975¹⁵) は下垂体剔除後の stage V と stage VII における type A spermatogonia の動態を観察し、20日目で一時的減少した type A spermatogonia は35日目には自己の再生能で hormone の投与なしでも逆に増加することを認めている。しかし hormone を投与しないと type B spermatogonia より先への成熟はないとしている。成熟 rat の下垂体を剔除すると spermatids と spermatocytes は減少するが (Clermont & Morgentaler, 1955⁸)、これは type B spermatogonia の減少によるとされている (Chowdhury & Steinberger, 1975⁴)。その type B spermatogonia 及び spermatocytes の減少を 2mg/day の testosterone または DHT の投与によりある程度予防できることから、testosterone は type A から type B spermatogonia への分裂期に作用すると考えられており、次の type B spermatogonia から pachytene spermatocytes までの成熟は hormone に無関係であるとされている。

Ahmad (1975²) は下垂体剔除 rat に 1mg/day の testosterone 又は DHT を4週間投与すると両群ともある程度の妊孕性を示したが、睾丸重量は testosterone 投与群で対照群の56%の重量を保持しえ、DHT 投与群で73%の重量を保持しえており、DHT の方が睾丸重量保持率が高いことを認め、testosterone はその代謝産物である DHT として作用する可能性を示唆している。

Tence & Drosowsky (1976³⁹) は培養した Sertoli cell で testosterone から androstenediol への転換を認め、Dorrington & Fritz (1975¹⁰) は20日齢 rat 睾丸から Sertoli cell enriched preparation と spermatocyte enriched preparation を分けて testosterone の代謝をみると、前者では androstenediol まで、後者では DHT までの転換をみている。一方 spermatids にはこれらの両酵素はないとされている (Dorrington & Fritz, 1973⁹)。また幼若 rat に ³H-testosterone と FSH を同時に投与すると睾丸内での ³H-testosterone 取り込みは ³H-testosterone 単独投与の約2倍となり、しかも DHT への転換は変わらないが、androstenediol への転換がその FSH の存在により増加することが認められている。これは Sertoli cell 内に 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性が存在することを示すものであり (Seilicovich & Rosner, 1974²⁹)、

Fig. 12. Concentration of testosterone, androstenediol and dihydrotestosterone in ng/100mg protein in interstitial tissue and in seminiferous tubules of rats at different ages. [From Podestá and Rivarola.²⁶]

spermatocytes には 5 α -reductase 活性のみしか存在しないのに対し、Sertoli cell には 5 α -reductase 活性と 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性の両方があることを示唆するものといえよう。睾丸精細管内の androgen level を詳細に測定した報告 (Podestá & Rivarola, 1974²⁶) では、Fig. 12 のように meiosis が始まる時期に androstenediol が急上昇し、その後で DHT が上昇してくることが確認されている。testosterone はその両者の上昇に併行して上昇していることから、testosterone が精細管内細胞により上記2者に turn over されるものと考えられている。そして androstenediol は meiosis 期に DHT はその後の spermatogenesis のより mature stage し作用するものと推定されている。

B) —② FSH の睾丸組織及び spermatogenesis に対する作用

培養した Sertoli cell に FSH を作用させると Sertoli cell での adenyl cyclase が活性化され cyclic AMP が増加し (Steinberger ら, 1975³³, Tung ら, 1975⁴²), protein kinase を活性化させ (Means ら, 1974²², 1975²¹) 蛋白合成をすることから、FSH の target organ は Sertoli cell であることが明らかとなつた。

また Sertoli cell では FSH 刺激により androgen binding protein (ABP) を作り (Hansson, 1973¹², Ritzen & French, 1974²⁷), 精細管内の androgen 濃度を高める作用が認められている。しかしこの ABP は testosterone により Sertoli cell 内で産生されるという報告もあり (Tindall & Means, 1976⁴⁰, Fakunding ら, 1976¹¹) 今後の研究がまたれるところである。

FSH は spermatogenesis に対して Sertoli cell を介して作用することは明らかである。しかし, germ cell へのことに spermatogonia に対しての直接作用の存在も色々議論されている。例えば, 16日齢 rat に FSH を投与すると9時間後から spermatogonia が増加し12時間後に maximum に達し対照群の200%まで増加し, 18時間後に対照群の値に戻る (Millis & Means, 1972²³⁾). この際 spermatogonia の degeneration は逆に6時間目から減少し, 9時間後には対照群の25%まで減少し15時間後に対照群の値に戻るという data になっている (Means, 1974²⁰⁾). この degenerated cell の減少は FSH により Sertoli cell の phagocytosis 機能が増加したためとも考えられるが spermatogonia の mitosis の増加は FSH の直接作用か Sertoli cell を介した二次的な作用かは明らかでない。いずれにしても効果的な spermatogenesis には FSH による十分な Sertoli cell 機能が作用する必要があるように思われる。

Vernon ら (1975⁴³⁾) は下垂体切除後30日を経過した rat に hormone 投与を行い, その spermatogenesis の回復を検討し, FSH, testosterone の spermatogenesis への作用を次のようにまとめている。(i) spermatogonia から pachytene spermatocytes までは LH または testosterone のみでは不十分であるが FSH を添加し初めて効

果がみられる。(ii) 次の pachytene spermatocytes から step 7 spermatids までの meiosis を含んだ成熟には FSH と LH (又は testosterone) の両者が必要である。

(iii) step 7 spermatids から spermatozoa への発育には (ii) の段階で FSH と LH を投与しておけば LH のみでも充分である。(iv) FSH のみでは pachytene spermatocytes までは進行するが meiosis 以降の成熟は起こらない。この data は spermatogenesis の回復には最初に FSH により Sertoli cell 機能がまず復活していなければならないこと, そして次の meiosis 期には LH と FSH の両方が必要であることを示唆している。しかし Steinberger ら (1967³²⁾, 1971³¹⁾) は meiosis 期では testosterone のみが作用し, FSH はより成熟した step の spermiogenesis の step 16~19のみに作用するとしている。この様に spermatogenesis に対する hormone 作用の機序が非常に複雑で, 今まで諸説に分かれている。そこで各研究者が考えている spermatogenesis に対する hormone の作用点を Fig. 13 にまとめてその相違点を比較してみた。

B) —③ 本実験における spermatogenesis に対する testosterone と FSH の作用の検討

前項において testosterone と FSH の spermatogenesis に対する作用について文献的に考察したが, その知見と

Fig. 13. Hormonal control of spermatogenesis.

我々の行った器官培養の成績とを比較検討してみたい。

本実験において21日齢 rat 辜丸を使用したのはこの時期では pachytene spermatocytes までの spermatogenesis を示し、germ cell の動態を分析観察するのに好都合であるためである。

(B) —③に述べた如く FSH 添加で primary spermatocytes は培養7日目、14日目とも有意の増加を認めた ($p < 0.05$)。しかし FSH 中の LH の contamination があり、その刺激で分泌された testosterone の協同作用が加味されているという考えもあるため、その点を検討するため LH の影響を受ける Leydig cell を除いた精細管のみの培養も行った。この場合幼若 rat では精細管から間質細胞を除外すると精細管壁の破損を伴うため生理的状态での実験が不可能なので、精細管のみを容易に分離できる60日齢の成熟 rat を使用した。この実験でも FSH 添加群での primary spermatocytes の保持が非添加群よりかなり良好という結果になった。即ち、FSH には Sertoli cell を介すると考えられる germ cell の直接保持作用のあることが証明されたと考えている。FSH 添加により培養7日目で resting~zygotene spermatocytes の増加がみられ ($p < 0.05$)、培養14日目で pachytene spermatocytes の増加傾向がみられた ($p < 0.1$)。前述したように器官培養でも spermatogenesis の進行時間は一定であることを考慮すると、培養7日目と14日目で観察されたこれらの spermatocytes は培養前には spermatogonia であり、培養中にそこまで成熟したと考えられる。また in vivo の実験で FSH により spermatogonia の mitosis が約2倍に増え (Millis & Means, 1972²³) 逆に spermatogonia の degeneration が減少する (Means, 1974²⁰) という報告もあることから、この培養7日目の spermatocytes は spermatogonia から新たに分裂成熟して出て来たものと考えられる。さらに FSH 添加により primary spermatocytes が増加したのに対し pyknotic cell が減少していることは、FSH が Sertoli cell を介して作用し培養という悪条件にも拘わらず germ cell を長期生存保持させたものといえよう。なお FSH の spermatogonia に対する直接作用の有無については今回の実験では証明することはできなかった。

testosterone 添加により resting~zygotene spermatocytes は7日間培養のみで増加していた ($p < 0.1$)。下垂体剔除直後から testosterone または DHT を投与するとある程度の spermatogenesis は維持される。しかし垂剔除後期間を経過した場合の primary spermatocytes までの

回復には前述の LH のほか FSH も同時に必要であると報告されている (Vernon ら, 1975⁴³)。我々の実験では正常 rat 辜丸を剔出後30分以内に培養しているために Sertoli cell 機能がまだ保持されており、testosterone 添加のみでも spermatogonia の分裂が惹起されたものといえる。しかし FSH 添加では培養14日目でも pachytene spermatocytes の保持が増加しているのに対し、testosterone 添加でその効果がみられない。これは primary spermatocytes の保持には Sertoli cell を介した FSH の作用が必須であることを証明している。

前述のように spermatogonia の mitosis を促進すると考えられる testosterone を添加すると spermatocytes の pyknotic cell が増加し、testosterone を添加しなければ pyknotic cell は減少し primary spermatocytes 消失が早い。これは testosterone により spermatogonia の mitosis によりできる spermatocytes 数がその栄養補給を受け持つ Sertoli cell の機能を上まわる数になったため、degeneration をおこし pyknotic cell が増加したものと考える。その際 FSH も同時し付加し Sertoli cell 機能を促進しておくこと pyknotic cell は左程増数しないことも別に確かめられている。その FSH と testosterone の pyknotic cell 数に対する effect はいわゆる推計学的交互作用として有意の関係にあることが算定された。

幼若 rat が成長する段階では leptotene spermatocytes から spermatids まで成長するのし13日かかるとされている (Huckins, 1965¹⁴)。所が本実験で使用した21日齢 rat 辜丸を14日間培養しても spermatids の出現をみない。日数的に言えば35日齢 rat に相当し、成長期 rat の in vivo の所見によれば既に当然 spermatids が出現してよいはずであるが、この様に出現しないということはいかなる meiosis 発現機序の障害の存在が考えられる。meiosis には FSH と LH (又は testosterone) が必要とされている。我々の実験でも glucose, testosterone, FSH を培養液中に添加しているが、どうしても spermatids までの成熟をみることはできなかった。これは培養という条件ではこれら hormone の Sertoli cell または germ cell 等に対する作用が十分に発現しなかつたものと言えよう。hormone の他にどのような重要な因子が meiosis に関与しているのか今後の研究課題と考えている。ただ前述したように meiosis には androstanediol が必須と考えられるので (Podestá & Rivarola, 1974²⁶)、それを用いての検討をしなければならない。

結 語

21日齢 rat 辜丸を器官培養し glucose, testosterone 及び FSH の spermatogenesis に対する作用を検討した。

(第1編¹⁷⁾)での培養条件の検討で glucose は 2mg/ml, testosterone は 50 μ g/ml, FSH は 200 μ g/ml の各濃度の培養液が primary spermatocytes の保持に最も有効だったので、これらの各濃度におけるそれらの効果について実験した。培養7日目と14日目の data について検討しその解析には分散分析法を用いた。

作用機序の解釈がかなり複雑なので我々の見解も合せて述べつつ data を総括することにする。以下その検討成績を述べる。

① glucose 濃度 1mg/ml を基準培養液 (glucose 濃度 1mg/ml) に添加した 2mg/ml 濃度での効果を検討したところ、7日間培養では germ cell の成熟に対する促進作用は認められなかったが、primary spermatocytes の生存保持に有効という所見になっていた。これは energy 源としての glucose が Sertoli cell の栄養補給に作用した効果であると解釈している。

② testosterone 濃度 50 μ g/ml 添加を検討したところ、spermatogonia の分裂効果と考えられる primary spermatocytes の初期 stage の resting, leptotene 及び zygotene spermatocytes 数の増数が認められた。Sertoli cell の栄養補給がその増数に伴わないためか(その理由は FSH との関係があり次項③に説明する) primary spermatocytes の後期の stage である pachytene spermatocytes 数の減少と pyknotic cell 数の増加が著明であった。この pyknotic cell はその形態と精細管内に占める位置から primary spermatocytes 由来と考えられる。従つて testosterone は spermatogonia の mitosis に関与すると考えられる。

何故なら spermatogenesis の進行時間は常に一定であるので、培養開始日に観察された resting~zygotene spermatocytes は培養7日目、14日目にはその後の stage である pachytene spermatocytes になっているはずであり、培養7日目に観察された resting~zygotene spermatocytes は培養開始日の spermatogonia から分裂成熟しているはずである。なお pyknotic cell について我々は次のように解釈している。in vivo における正常辜丸組織でも germ cell は常に変性→壊死→消失過程をたどつて、実際の spermatozoa 産生数は spermatogonia からの理論的産生数の52%にすぎないといわれている。pyknotic cell に落ち入った germ cell は Sertoli cell に phagocyte されると考えている。そこで培養組織中に

pyknotic cell 数が増加し primary spermatocytes 数が減少していることは Sertoli cell の germ cell に対する栄養供給能が低下していることを示すと同時に Sertoli cell の phagocytosis 能も低下していることを意味している。従つて pyknotic cell 数の有無は Sertoli cell 機能を反映すると考えられる。

③ FSH 濃度 200 μ g/ml 添加の効果としては次の2つが考えられる。

③—i) resting~zygotene spermatocytes 数の増数が認められた。しかもこの作用は testosterone よりも強く、spermatogonia の mitosis には testosterone のみでなく FSH の何らかの別の作用も働いていることが分つた。

③—ii) FSH 添加のもう一つの効果は pachytene spermatocytes の保持作用も認められ、特に primary spermatocytes 全体では有意の増加がみられた。しかもその際 pyknotic cell 数の増加は無かつた。また培養14日目での pyknotic cell 数に対して testosterone と FSH の間にはその作用が反比例的な関係(推計学的交互作用)にあり、②で述べた testosterone 添加で増加する pyknotic cell 数は FSH も同時に増加すると減少し、primary spermatocytes が添加するという結果になった。以上から FSH は Sertoli cell に作用して germ cell に対する栄養供給としての作用を賦活すると考えられる。

④ FSH には LH の contamination がありその刺激で分泌される testosterone の作用が FSH の作用に加味されたとの考えもある。そこで FSH 単独の作用をみるため LH の効果をうける Leydig cell を除いた精細管のみの培養を行つたが、やはり FSH には primary spermatocytes の保持作用が認められた。

稿を終えるにあたり、data の推計学的処理について御協力・御教示をいただいた砂川市立病院泌尿器科医長田宮高宏博士に深く感謝いたします。また種々の御協力をいただいた教室員各位に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第63回日本泌尿器科学会総会と第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) Ahmad, N., Haltmeyer, G.C. and Eik-Nes, K.B.: Maintenance of spermatogenesis with te-

- stosterone or dihydrotestosterone in hypophysectomized rats. *J. Reprod. Fert.*, **44**, 103—107, 1975.
- 3) Basu, S.L., Nandi, J. and Nandi, S.: Effects of hormones on adult frog (*Rana pipiens*) testes in organ culture. *J. Exp. Zool.*, **162**, 245—256, 1966.
 - 4) Chowdhury, A.K. and Steinberger, E.: A quantitative study of spermatogenesis in hypophysectomized, steroid-treated rats. *Anat. Rec.*, **181**, 332, 1975.
 - 5) Clegg, E.J. and Macmillan, E.W.: The uptake of vital dyes and particulate matter by the Sertoli cells of the rat testis. *J. Anat.*, **99**, 219—229, 1965.
 - 6) Clermont, Y.: Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: A revised model for the renewal of spermatogonia. *Am. J. Anat.*, **111**, 111—129, 1962.
 - 7) Clermont, Y. and Harvey, S.C.: Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology*, **76**, 80—89, 1965.
 - 8) Clermont, Y. and Morgentaler, H.: Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology*, **57**, 369—382, 1955.
 - 9) Dorrington, J.H. and Fritz, I.B.: Metabolism of testosterone by preparations from the rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **54**, 1425—1431, 1973.
 - 10) 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.
 - 11) Fakunding, J.H., 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.
 - 12) Hansson, V., Reush, 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.
 - 13) Harris, M.E.: Concentration of testosterone in testis fluid of the rat. *Biol. Reprod.*, **9**, 83, 1973.
 - 14) Huckins, C.: Duration of spermatogenesis in pre- and postpuberal Wistar rats. *Anat. Rec.*, **151**, 364, 1965.
 - 15) Huckins, C. and Cunningham, G.R.: Behavior of spermatogonia in hypophysectomized adult rats. *Anat. Rec.*, **181**, 380, 1975.
 - 16) 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．
 - 17) 木村正一，熊本悦明：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．日泌尿会誌，**69**，56—70，1978．
 - 18) 熊本悦明：第46回日本不妊学会関東部会特別講演．器官培養 rat 睾丸に対する諸 hormone の影響．1967．
 - 19) Lostroh, A.J.: In vitro response of mouse testis to human chorionic gonadotropin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **103**, 25—27, 1960.
 - 20) Means, A.R.: Metabolic effects of FSH on cells of the seminiferous tubules. in *Male Fertility and Sterility*, Mancini, R., ed., pp. 405—422, Acad. Press, New York, 1974.
 - 21) 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.
 - 22) Means, A.R., MacDougall, E., Soderling, T.R. and Corbin, J.D.: Testicular adenosine 3': 5' -monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 1231—1238, 1974.
 - 23) Millis, N.C. and Means, A.R.: Sorbitol dehydrogenase of rat testis: changes of activity during development, after hypophysectomy and following gonadotrophic hormone administration. *Endocrinology*, **91**, 147—156, 1972.
 - 24) 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.
 - 25) Phadke, A.M. and Phadke, G.M.: Occurrence of macrophage cells in the semen and in the epididymis in cases of male infertility. *J. Reprod. Fert.*, **2**, 400—403, 1961.
 - 26) Podestá, E.J. and Rivarola, M.A.: Concentration of androgens in whole testis, seminiferous tubules and interstitial tissue of rats at different stages of development. *Endocrinology*, **95**, 445—461, 1974.
 - 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) Roosen-Runge, E.C.: Untersuchungen über die Degeneration samenbildender Zellen in der normalen Spermatogenese der Ratte. *Zeitschrift für Zellforsch.*, Bd. **41**, S. 221—235, 1955.
- 29) Seilicovich, A. and Rosner, J.M.: Effect of FSH on the in vivo uptake and metabolism of ^3H -testosterone by immature rat testis. *Steroid Lipids Res.*, **5**, 1—9, 1974.
- 30) 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, Acad. Press, N.Y. & London, 1970.
- 31) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.*, **51**, 1—22, 1971.
- 32) Steinberger, E. and Duckett, G.E.: Hormonal control of spermatogenesis. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **2**, 75—87, 1967.
- 33) Steinberger, A., Heindel, J.J., Lindsey, J.N., Elkington, J.S.H., Sanborn, B.M. and Steinberger, E.: Isolation and culture of FSH responsive Sertoli cells. *Endocrine Res. Commun.* **2**, 261—262, 1975.
- 34) Steinberger, A. and Steinberger, E.: Differentiation of rat seminiferous epithelium in organ culture. *J. Reprod. Fert.*, **9**, 243—248, 1965.
- 35) 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.
- 36) Steinberger, A. and Steinberger, E.: Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. *J. Reprod. Fert., Suppl.* **2**, 117—124, 1967.
- 37) 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.
- 38) 田口玄一：実験計画法（上），p. 280丸善，1976.
- 39) Tence, M. and Drosowsky, M.: Biosynthesis and metabolism of testosterone by Sertoli cell-enriched seminiferous tubules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 47—55, 1976.
- 40) Tindall, D.J. and Means, A.R.: Concerning the hormonal regulation of androgen binding protein in rat testis. *Endocrinology*, **99**, 809—818, 1976.
- 41) Tjioe, D.Y. and Steinberger, E.: Spermiophage in human testes. *Fert. Steril.*, **18**, 807—811, 1976.
- 42) 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.
- 43) Vernon, R.G., Go V.L.W. and Fritz, I.B.: Hormonal requirements of the different cycles of the seminiferous epithelium during reinitiation of spermatogenesis in long-term hypophysectomized rats. *J. Reprod. Fert.*, **42**, 77—94, 1975.

（1978年6月8日受付，特別掲載）