精巣組織内乳酸脱水素酵素 (LDH) の研究

1. ラットにおける LDH およびそのアイソザイムの 消長と精巣機能の発達

	内	島	豊
埼玉医科大学泌尿器科学教室	平	賀	聖
	岡	田	耕
東京医科歯科大学泌尿器科学教室	根	岸	壮
(主任: 横川正之教授)	大	島	博
			幸

STUDIES OF LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) IN THE TESTIS

1. Relation of testicular LDH and its isozymes to development of testicular function in rats

Yutaka Uchijima, Seigo Hiraga and Koichi Okada

Department of Urology, Saitama Medical School, Moroyoma, Iruma-gun, Saitama

Takeharu Negishi and Hiroyuki Oshima

Department of Urology, Tokyo Medical and Dental University School of

Medicine, Bunkyo-Ku, Tokyo

(Director: Prof. M. Yokokawa)

Testicular LDH and its isozymes were investigated using (1) male Wistar rats aged 2 to 90 days and (2) 37-day-old male rats hypophysectomized at 20 days of age.

LDH activity in cytosol of the testis (105,000×g, supernatant) was measured utilizing LDH Monotest kit. Isozymes were separated by electrophoresis on agar gel plate, stained with staining solution of LDH Isozyme-Test and quantitated with Densitron 1 M at 570nm. Testicular tissues with Bouin solution were sliced at 4 μ and stained with Hematoxyline-Eosine or PAS. The 50 cross and round tubular sections of each slide were selected and tubular diameter and most advanced germ cell in each section were recorded.

1) LDH activity in rat testes increased with advance of age until 22-day-old and revealed plateau after the age of 22 days.

2) Distribution of LDH activity among isozymes changed with age. A-type LDH (LDH-4 and LDH-5) decreased and B-type LDH (LDH-1 and LDH-2) increased with advance of age.

3) LDH-X was detected in the testis of rat aged 28 days and its activity increased showing a significant correlation with testis weights.

4) Cap phase or more advanced spermatids were present in most of seminiferous tubule of the testis where LDH-X was detected. It appears likely that cap phase or more advanced spermatids evolves into the production of testicular LDH-X in rats.

5) LDH activity in the testes of the hypophysectomized rats decreased. The LDH-X was not detected after hypophysectomy.

要旨: ラット精巣組織内 LDH 活性およびアイソザイムを測定し, ラット成長による LDH 活性およびアイソザイムの消長を検討すると共に, 各精巣組織の精細胞の分化, 成熟と対比して LDH-X の出現時期を検討し, 以下の結果を得た.

(1) LDH 総活性は22日齢まで加齢とともに増加し, 22日齢以後はほぼ一定の値を示した.

(2) 加齢とともに Atype (LDH-4 と LDH-5) の比率は減少し, Btype (LDH-1 と LDH-2) の比率は

増加した。

(3) LDH-X は28日齢ラット精巣に最初に認められ、精巣重量と有意の高い相関を示した。

(4) LDH-X は多数の Cap 期精子細胞が出現して始めて認められた。

(5) 下垂体摘出により精巣組織内 LDH 活性はコントロールラット精巣より著明に低値となり、LDH-X も認められなくなつた。

I. 緒 言

乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase, 以下 LDH と略す) は各々分子量が35,000からなるサブユニットの四量体で電気泳動上5つのアイソザイムに区分され陽極側より LDH-1 (B_4, H_4), LDH-2 (B_3A, H_3M_1), LDH-3 (B_2A_2, H_2M_2), LDH-4 (B_1A_3, H_1M_3), LDH-5 (A_4, M_4) と命名されている¹⁾。これらの5つのアイソザイム以外に LDH-3 と LDH-4 の間に泳動する LDH 活性が、精巣あるいは射精液中に特異的に認められ 'band X' と報告された²⁾。Band X はヒト以外の哺乳類や鳥類の精巣組織内にも広く認められ、ヒト、イヌ、ウサギおよびネズミでは band X は1本、ラットやモルモットで2本、ウシで3本認められ、ハトでは1本から5本の band X の存在が報告されている³⁾。この band X について生化学的、物理学的、免疫学的、遺伝学的研究が詳細に行なわれ band X は LDH-A₄あるいは LDH-B₄とは異なる遺伝子によつて支配される事が明らかになり LDH-C と記載され、band X が1本の場合は C₄であるが band X が2本以上ある動物では C と A, C と B あるいは C と A および B というサブユニット間の結合も報告されている^{4)~6)}。

われわれはこの LDH-X に着目し射精液中の LDH-X が妊孕能の指標の一つとして臨床的に有用であることを明らかにした⁷⁾。今回ラット精巣組織内の LDH 活性およびアイソザイムを検索し、ラット成長による LDH 活性およびアイソザイムの消長を検討するとともに各精巣組織の造精機能と対比して LDH-X の出現時期を検討し若干の知見を得たのでここに報告する。

II. 研究対象ならびに方法

(1) 研究対象

Wistar 系および Wistar 今道系ラットを使用し、市販の飼料で飼育した。

2日齢, 5日齢, 10日齢, 15日齢, 20日齢~37日齢, 40日齢, 45日齢, 50日齢, 60日齢, 66日齢, 72日齢, 80日齢, 90日齢の Wistar 系ラットの体重を測定後、除臍して得た精巣組織を用いた。また20日齢の Wistar 今道系ラットの下垂体を摘出し37日齢で除臍して得た

精巣組織も用いた。

(2) 研究方法

(a) 試料作成

精巣組織は摘出後ただちに白膜を剥離して必要量を秤量し、細切後1mlの氷冷0.25M 蔗糖溶液を加えてテフロンガラスホモジナイザーでホモジナイズし、そのホモジネイトを105,000×g, 60分間冷凍遠心沈殿して、その上清を酵素測定を試料とした。

(b) LDH 活性測定

LDH モノテスト (ベーリンガー・マンハム社製) 用試験液 (0.62mM 焦性ブドウ酸, 0.19mM NADH, 51.7mM リン酸緩衝液, pH=7.5) 1.0ml と試料20 μ l をじゆうぶん混和し、37℃で1分間当りの NADH 消費量を、340nm の吸光度の変化 (ΔE) を Quickrate (オリンパス社製) で測定し、LDH 活性を計算した [LDH 活性値 (U/l) = ΔE /分 $\times$ 4921 $\times$ 0.52]。

(c) LDH アイソザイム測定

寒天ゲルプレートに試料を LDH 活性が1.600mU/ml になる様に希釈あるいは濃縮後、試料塗布構に塗布した。寒天ゲルプレート1枚につき30mA の電流を流し、冷蔵庫内で冷却しながら90分間電気泳動を行なった。泳動した寒天ゲルプレート1枚につき LDH Is-ozyme-Test (和光純薬工業社製) の染色液7ml を流し込み、遮光孵卵器で37℃60分間反応させた。反応終了後、寒天ゲルプレートを脱色固定しセロファンに寒天ゲルを移し替え乾燥する。出来上つたセロファンをデシントロン 1M (常光社製) を用いて570nm で各アイソザイムの比率を測定した。

(d) 蛋白測定

蛋白量は Lowry らの方法⁸⁾で測定し、検量線は牛アルブミン溶液を用いて作成した。

(e) 組織学的検索

精巣組織の一部はブアン液に固定後、パラフィン包埋した。4 μ の切片を作成し Hematoxylin-Eosin 染色および PAS 染色を行なった。

Zeiss のマイクロメータで精細管断面がほぼ円形で stage が同一な精細管を少なくとも2つ以上含むように50個の精細管を選び、それらの直径を測定し、かつ各々

の精細管内にある精細胞のうちもつとも分化が進んでいるものを記録した。ラット精細胞の分化・成熟の別定は Leblond らの分類⁹⁾に従った。

III. 成 績

(1) ラット体重, 精巣重量, 精細管直径と日齢

加齢とともに体重および精細管直径はほぼ直線的に増加し, 精巣重量は27日齢以降急速な増加を示した (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

精巣重量と精細管直径は有意の相関を示した ($y = 0.11x + 111.1$, x : 精巣重量, y : 精細管直径, $r = 0.84$, $n = 118$, $p < 0.001$).

(2) ラット精細胞分化と日齢

10日齢および15日齢では精細管の大部分でもつとも分化した精細胞は精祖細胞であつた。20日齢後精細胞の分化・成熟は急速に進行し, 22日齢にいたると精子細胞の出現を認め, 29日齢にいたると, 精細管の半数以上に精子細胞を認める。しかし精子が出現するのは32日齢であり, 66日齢にいたるとほとんどの精細管内に精子を認めた (Table 1)。

(3) ラット精巣組織内 LDH と日齢

生後2日より90日齢にいたるラット精巣組織内の LDH 活性ならびに LDH のアイソザイム分画を調べた成績を一括して Table 2 に示す。LDH-3 と LDH-4 の間および LDH-4 と LDH-5 の間に各々 LDH-X₁, LDH-X₂ のバンドを認めたが (Fig. 4), 両者を加えた値を LDH-X 活性とした。

LDH 総活性は22日齢まで加齢とともに増加を示し, 22日齢以後はほぼ一定の値を示した (Fig. 5).

Fig. 1 Growth curve : body weight

● : Mean $\pm$ S.D. For experimental numbers, refer to footnotes to Table 2.

LDH アイソザイムで LDH-1 と LDH-2 を Btype, LDH-4 と LDH-5 を Atype とすると Btype のアイソザイムは 2 日齢で 4.4%, 5 日齢で 21.8%, 15 日齢で 28.1%, 20 日齢で 49.2% と比率の増加を認め 21 日齢以後では全体の 60~70% を占めるようになった。一方 Atype のアイソザイムの比率は 2 日齢の 68.3% が最高で加齢とともに低下し 21 日齢以後は全体の 10~20% を占めるようになった (Fig. 6)。LDH-X は 27 日齢までの精巣組織には認められず, 28 日齢で 4 匹中 3 匹, 29 日齢で 5 匹中 1 匹に LDH-X を認め, 30 日齢以後のラットにおいて全匹 LDH-X を認めた。LDH-X₁ と LDH-X₂ の両者に出現時期の相異を認めなかつた。

(4) ラット精巣重量と LDH 活性およびアイソザイム

Fig. 2 Growth curve : testis weight
See legend to Fig. 1.

Table 1 The change in percentage distribution of most advanced germ cell type in seminiferous tubules of rat whose age changed from 10th. to 90th. day, (Mean±SD)

Germ cell type Age (day)	Spermatogonia	Spermatocytes					Spermatids		
		preleptotene	leptotene	zygotene	pachytene	diplotene-secondary s.	golgi	cap	acrosome-maturation
10 (n=2)	100	0	0	0	0	0	0	0	0
15 (n=3)	90±4	10±4	0	0	0	0	0	0	0
20 (n=4)	4.5±5.3	23.0±10.4	24.0±11.0	23.0±6.6	25.5±23.2	0	0	0	0
22 (n=3)	0	0	1.3±1.2	11.3±9.9	86.0±10.6	0.7±1.2	0.7±1.2	0	0
24 (n=2)	0	0	0	3.0±4.2	82.3±2.8	2.0±0	12.0±8.5	0.7±1.2	0
25 (n=5)	0	0	0	4.4±4.3	81.6±6.8	1.6±2.3	12.0±4.5	0.4±0.9	0
26 (n=4)	0	0	0	0	80.5±12.6	3.5±1.9	13.5±5.7	2.0±2.8	0
27 (n=5)	0	0	0	2.8±3.4	70.0±18.1	1.2±0.9	20.0±11.9	6.0±11.3	0
28 (n=1)	0	0	0	6.0	64.0	0	28.0	2.0	0
28 (n=3)	0	0	0	0	32.0±13.9	0	36.0±10.4	32.0±21.1	0
29 (n=4)	0	0	0	1.0±2.0	56.5±27.7	2.5±1.0	21.0±15.4	19.0±26.4	0
29 (n=1)	0	0	0	0	14.0	2.0	10.0	74.0	0
30 (n=6)	0	0	0	0	26.7±6.3	1.3±1.6	18.0±16.2	54.0±24.8	0
31 (n=5)	0	0	0	0	15.6±3.9	1.6±1.7	13.6±8.7	69.2±9.6	0
32 (n=4)	0	0	0	0	6.0±5.9	0.5±1.0	3.5±1.0	89.0±6.0	1.0±2.0
33 (n=3)	0	0	0	0	18.7±28.9	0.7±1.2	10.7±15.0	53.2±33.8	16.7±16.2
35 (n=7)	0	0	0	0	4.6±5.4	0.9±1.6	2.0±2.0	74.0±17.8	18.5±22.3
36 (n=3)	0	0	0	0	0	0	4.0±8.1	52.0±5.3	44.0±12.5
37 (n=4)	0	0	0	0	0	1.0±1.2	0	54.0±19.0	45.0±19.7
40 (n=3)	0	0	0	0	0	0	0	35.3±4.2	64.7±4.2
66 (n=5)	0	0	0	0	0	0	0	0	100
90 (n=5)	0	0	0	0	0.8±1.1	0	0	0	99.2±1.1

Fig. 3 Growth curve : seminiferous tubular diameter
See legend to Fig. 1.

生後20日頃を境いとしてラット精巣中での造精機能の分化増殖が急速になるので (Table 1), 20日齢以前および以後の2つの時期における両者の相関性を検討した。

(a) 20日齢前

2日齢のLDH活性値はそれ以後の日齢のLDH活性値と比較して有意かつはなはだしく低値であり、これの存在により見掛け上加齢とLDH活性との相関性を生じる恐れがあるので、統計上相関性の検討対象から除外した。

Fig. 4 Agar gel electrophoretic patterns of LDH isozymes in cytosol of rat testes aged 25 (a) and 40 (b) days, rat muscle (c) and rat heart (d). From left to right LDH-5, LDH-4, LDH-3, LDH-2, LDH-1.

精巣重量と精巣組織内LDH活性は有意の相関を示した (Fig. 7). LDH-2も精巣重量との間に相関を示した (Table 3).

Fig. 5 The relation of total LDH activity to age See legend to Fig. 1.

Fig. 6 The relation of percent distribution of LDH isozymes to age. See legend to Fig. 1.

Fig. 7 The regression lines of LDH activity in testes aged 5 to 15days. *These values are excluded from calculation of stastical indexes. For reasons, see text.

Fig. 8 The regression lines of LDH-X activity in testes of rat whose age changed from 20th. to 90th. day.

(b) 20日齢後
精巣組織内総 LDH 活性は精巣重量との間に相関を認めなかつた。アイソザイムでは LDH-4 を除くすべ

Table 2 The change of total LDH activity and its isozymes in testes of rat aged 2 to 90day. (Mean±S.D.)

Age (day)	Testis weight (mg)	LDH activity (mU/mg protein)	LDH Isozymes (%) [*]					
			LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-X	LDH-4	LDH-5
2 (n=14)	2.2±0.7	454±144	3.1±0.1	1.3±0.3	27.2±10.5	0	63.4±11.1	4.9±0.9
5 (n=5)	7.7±1.6	1261±204	5.4±3.6	16.4±8.3	48.4±9.4	0	24.3±15.4	5.3±2.2
10 (n=5)	11.7±3.5	1706±204	2.4±0.6	12.8±2.7	32.8±3.7	0	48.2±4.2	3.7±2.6
15 (n=5)	29.7±5.2	1910±492	3.8±1.6	24.3±2.0	37.5±0.9	0	31.9±3.0	2.1±0.6
20 (n=4)	71.4±19.0	1992±267	20.5±1.8	29.2±1.0	24.2±0.9	0	20.8±1.8	5.1±0.7
21 (n=7)	86.4±5.7	2299±261	22.1±1.0	35.5±1.2	22.5±1.0	0	16.8±0.9	2.8±0.6
22 (n=5)	117.8±18.9	2928±545	31.0±3.5	26.3±5.1	24.7±3.6	0	16.8±2.4	0.9±0.4
23 (n=5)	138.4±42.0	2826±565	33.0±3.2	39.8±2.2	18.0±1.3	0	8.7±0.7	0.3±0.1
24 (n=5)	144.6±31.3	2917±499	34.8±1.8	36.6±0.5	17.5±1.5	0	10.6±0.7	0.2±0.1
25 (n=5)	162.3±33.6	2578±257	32.8±1.6	31.7±0.8	22.7±1.9	0	12.2±1.0	0.3±0.2
26 (n=5)	193.3±40.8	2427±343	29.5±6.2	32.4±3.7	22.9±2.9	0	14.1±0.9	0.9±0.2
27 (n=11)	203.1±35.6	2725±675	38.4±6.4	30.0±1.4	16.9±7.9	0	13.2±1.3	1.2±0.9
28 (n=10)	263.0±53.8	2610±591	39.3±4.0	34.2±2.0	13.4±2.3	0	11.4±2.1	1.4±0.6
29 (n=8)	295.8±80.7	3194±779	35.0±6.4	27.6±0.3	20.4±4.3	1.1±0.7	14.5±2.5	1.2±0.7
			43.9±2.8	29.0±1.0	9.8±3.2	0	14.3±2.0	2.7±1.3
30 (n=10)	340.8±37.5	2821±998	38.9	29.2	16.6	1.8	12.3	0.8
31 (n=8)	408.3±35.4	2701±697	41.1±5.9	32.7±3.1	13.1±2.9	2.4±1.3	9.4±2.1	1.2±0.6
32 (n=5)	437.5±32.7	3126±473	34.0±4.0	29.8±1.7	14.0±1.5	3.5±1.6	13.7±1.1	4.7±2.5
35 (n=4)	512.4±98.9	2804±1654	39.4±3.2	30.7±0.8	14.8±1.2	2.2±0.8	12.0±1.0	0.7±0.3
36 (n=8)	578.8±75.9	2839±956	39.4±2.7	28.2±1.1	14.4±0.7	1.8±0.5	14.3±1.5	1.7±1.3
37 (n=5)	606.8±47.2	2946±702	36.5±4.4	27.2±4.1	10.0±2.7	5.0±2.4	16.1±3.0	4.8±2.6
40 (n=5)	816.3±88.6	3082±316	38.5±2.1	28.0±0.6	14.2±0.3	2.5±1.1	14.7±0.9	1.8±0.5
45 (n=5)	1043.3±126.7	2687±249	50.6±4.8	19.1±2.6	9.1±2.3	5.5±0.9	13.2±1.6	2.2±0.5
50 (n=5)	1146.7±104.5	2871±247	42.4±4.1	24.1±1.0	7.3±1.4	6.0±2.2	17.1±2.5	2.7±1.1
60 (n=5)	1411.4±91.7	3116±644	49.8±1.1	25.3±1.1	6.2±0.6	5.8±0.4	10.6±1.9	2.0±0.6
72 (n=5)	1436.3±158.6	3007±441	40.9±5.7	25.7±2.3	8.2±1.1	9.5±2.1	11.8±1.4	3.5±2.4
80 (n=5)	1403.3±86.7	2737±476	45.0±4.4	16.8±2.3	5.5±0.6	14.0±1.9	15.3±1.2	3.1±0.5
90 (n=6)	1651.9±116.0	2988±533	41.0±1.4	28.1±0.7	10.0±2.2	8.6±3.7	10.2±1.4	1.7±0.4

*The number of rat differed from the number with being measured for total LDH activity.

Table 4 The effect of hypophysectomy on growth, LDH activity and its isozymes in testes. (Mean±S.D.)

	CONTROL (n = 5)	HYPOPHYSECTOMY (n = 6)	Difference
Body weight (g)	133.6±19.0	61.3±1.9	P<0.001
Testis weight (mg)	608.8±27.3	31.3±3.3	P<0.001
Seminiferous tubular diameter (μm)	206.2±27.3	132.1±16.5	P<0.001
LDH activity (mU/mg protein)	2946±702	1261±405	P<0.001
LDH-1	1138±290	632±171	P<0.01
LDH-2	828±205	91±53	P<0.01
LDH-3	418±104	216±89	P<0.05
LDH-X	72±35	0	P<0.001
LDH-4	430±96	280±97	P<0.05
LDH-5	52±7	39±29	n. s.

Table 3 The relation of testis weight to LDH activity and its isozymes.

I. Before 20days

I. Before 20 days

LDH	Regression line	Coefficient of correlation	N	Significance
total LDH	Y=25.8X+1190	0.58	15	P<0.05
LDH-1	Y=0.2X+60	0.04	15	n. s.
LDH-2	Y=12.4X+83	0.75	15	P<0.01
LDH-3	Y=8.7X+446	0.44	15	n. s.
LDH-X	—	—	—	—
LDH-4	Y=8.6X+438	0.30	15	n. s.
LDH-5	Y=-1.1X+75	-0.35	15	n. s.

II. After 20 days

LDH	Regression line	Coefficient of correlation	N	Significance
total LDH	Y=0.2X+2704	0.13	141	n. s.
LDH-1	Y=0.3X+919	0.35	141	P<0.001
LDH-2	Y=-0.1X+895	-0.20	141	P<0.02
LDH-3	Y=-0.2X+516	-0.56	141	P<0.001
LDH-X	Y=0.2X-9	0.74	80	P<0.001
LDH-4	Y=0.04X+337	0.15	141	n. s.
LDH-5	Y=0.04X+37	0.36	141	P<0.001

でのアイソザイムが精巣重量と相関した。LDH-Xは精巣重量250mg にいたって始めて出現するが、その活性は精巣重量と極めて高い相関を示した (Table 3, Fig. 8).

(5) 精細胞分化と精巣組織内 LDH-X の関係

精祖細胞が精細管の大部分を占める10日齢および15日齢ではLDH-Xを認めず、Cap期の精子細胞を含む精細管が半数以上を占める30日齢以後の精巣では必ずLDH-Xを認めた。Fig. 9およびTable 2に示すように28日齢と29日齢においては同日齢であつても pachytene 期精母細胞までの精細胞を含む精細管の比率が精子細胞を含む精細管の比率より高い精巣ではLDH-Xを認めず、その逆ではLDH-Xを認めた。

(6) 下垂体摘出ラットについて

下垂体摘出ラットをコントロールの37日齢ラットと比較すると体重、精巣重量、精細管直径および精巣内LDH活性は有意の減少を示した (Table 4)。アイソザイムではLDH-5を除くすべてのアイソザイム活性は下垂体摘出ラットにおいて有意の減少を示し、LDH-X活性も消失した。

コントロールラットの精細胞分化をみると精細管の99%以上でCap期 नाही acrosome 期の精子細胞が

Fig. 9 The change in percent distribution of most advanced germ cell type in seminiferous tubule of rat whose age changed from 26th. to 31th. day.

Fig. 10 The pattern of most advanced germ cell type in seminiferous tubule of control and hypophysectomized rat.
n.d. : not detected. $\square$, $\blacksquare$: Mean $\pm$ S.D.

認められたが、下垂体摘出ラットでは精細管の63%で精祖細胞まで、25%で pachytene 期精母細胞までの分化しか認められなかった (Fig. 10).

IV. 考 案

本実験においてラットの成長に伴う体重、精巣重量および精細管直径の増加動態は従来の報告と同じであった¹⁰⁾. 性成熟の完成時期を造精機能の面で mature spermatogenesis: ほとんどの精細管で mature sper-

matozoa の出現を認める時期と定義するなら本実験では性成熟は40日齢以降66日齢までの間に完成すると考えられ、精巣重量が60日齢以降急激な増加を示さない事実をも考えあわせると60日齢までには性成熟が完成していることが示唆される. Kreuger ら¹¹⁾は Holtzman ラットで60日齢、大島¹²⁾は Wistar ラットで60日齢、Swerdloff ら¹⁰⁾は49日齢と63日齢の間に各々性成熟の完成時期を設定しており、本実験の成績と一致し、

自験ラットの各パラメーター（体重、精巣重量、精細管直径、造精機能）は一般性を持つと考えられた。

LDH 総活性は本実験で2日齢から22日齢まで急激な活性値の増加を認めたが、22日齢以後は2,700mIU/mg protein 前後の値を示した。この性成熟に伴うLDH 総活性の変動はその生理的意義についても、変動そのものについても一致した見解はまだ得られていない。すなわち精細胞の分化・成熟は10日齢頃から開始され60日齢までは進行すると考えられるので本実験で20日齢までしかLDH 総活性が精巣重量と関連しないことは、精巣組織内LDH 総活性が精母細胞までの分化・成熟と関係することを示唆するが、この点についてはなお詳細な検討が必要であろう。一方精巣組織内r-GTPはSertoli細胞の指標となり得る事が示唆¹³⁾されているが、Sertoli細胞1個当りのH³-thymidineのとりこみが生後7日齢が最大で14日齢以後ではとりこをみられない事実¹⁴⁾を考えるとLDH 総活性の変動はSertoli細胞の機能変化とも関係づけがたい。

分泌されるアンドロゲンの指標である副性器重量の増大や精巣におけるコレステロールからプレグネノロンの変換が20日齢以後増加する事実¹²⁾からLDH 総活性の変動はLeydig細胞の指標ともならないと考えられる。一方Holtzmanラット精巣組織内LDH 総活性についてHodgenら¹³⁾は5日齢から25日齢まで急速な低下を認め、それ以後ゆつくりと上昇することを観察しているが、この変化に対する十分な説明は行なわれていない。

本実験ではAtypeのアイソザイムが加齢と共に減少し、逆にBtypeのアイソザイムが増加した。このようなアイソザイムの変化は加齢によつてすべての臓器で生じるわけではなく、Markertら¹⁵⁾はマウスで胎生期では個体全体としてAtypeが優位であるが、骨格筋や肝臓ではアイソザイムの変化は認めず、各臓器においても変化の程度は異なると報告し、本実験とは逆にニワトリの胸筋では成長と共にBtypeのアイソザイムが減少しAtypeのアイソザイムが増加したとの報告もある。

この変動の意義についてCahnら¹⁶⁾はニワトリでは乳酸の蓄積は早期の胚にとつては有害であり乳酸の産生をできるだけ抑制する必要がある¹⁷⁾、それにはBtypeのアイソザイムが優位の方が都合が良い。なぜなら焦性ブドウ酸の上昇によりBtypeのアイソザイムはAtypeのアイソザイムに比べ、活性が抑制され易

く、乳酸の産生が抑制されるからである。一方、ラットのような胎盤を持つ動物では乳酸が産生されても母体側へ移動するため、特にBtypeのアイソザイムでなくてもよいのだとしているが、胎性期のアイソザイムの優位性の違いについては説明できても、アイソザイムの変動の意義についての説明にはなっていない。

LDH-Xの出現時期を造精機能導入と関連づけて検索することはLDH-Xが造精機能の指標の一つとなり得るかどうかのみではなく、LDH-X生成部位を決定する重要な鍵となる。

本実験で精細管のほとんどで精祖細胞までしか認められない10日齢および15日齢ラット精巣組織にはLDH-Xを認めず、Vitamine A 欠乏食により精上皮の変性を来し、Sertoli細胞と精祖細胞のみとなつた精細管ではほとんど占められる精巣組織にはLDH-Xを認めないという報告¹¹⁾もあり、LDH-Xは精祖細胞あるいは、Sertoli細胞では形成されないと考えられる。

ウサギでは生後8週、SW (Swiss Webster) 系マウスでは生後16日、Quackenbush系マウスでは生後14~16日、ラットでは生後22日（但し電気泳動上は27日以後）にLDH-Xの出現が認められ、いずれも組織学的に第1次精母細胞までは進んだ精細胞の出現時期に相当するので、精細胞の中でも第1精母細胞で最初にLDH-Xが形成される可能性が報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。

本実験成績ではラット精巣において27日齢まではLDH-Xを認めず、30日齢以後のラットでは全匹LDH-Xを認めた。この27日齢から30日齢までの間の精細胞の質的、量的変化を明らかにすることによりLDH-X生成に関与する細胞が推定できる。そこでこの時期の精巣組織の構成細胞をみると、この時期のどの日齢のラット精巣にも成熟したLeydig細胞、Sertoli細胞は認められるのでLDH-Xの生成にこれらの細胞は関与していないことが想定される。これに対し、27日齢およびLDH-Xを認めない28日齢と29日齢のラット精巣ではCap期の精子細胞の存在する精細管の出現頻度は各々6.0%, 2.0%, および19.0%であるのに対し、明らかにLDH-Xが証明される28日齢、29日齢、30日齢のラット精巣ではCap期の精子細胞の存在する精細管の出現頻度が各々32.0%, 74.0%, 54.0%と飛躍的に高くなっている。この成績はCap期精子細胞がLDH-Xの精巣内生成に強く関与していることを示すが、成熟した精細胞の出現が増加することは第一次精母細胞がさらに分化・成熟し得る状態へと質的変化を遂げている可能性を示しており、第一次精母細胞

内での LDH-X 生成を完全に否定するものではない。実際, Hinz ら²⁰⁾は免疫学的に SW 系マウスで mid-pachytene 期精母細胞に強い抗 LDH-C₄抗体に結合させた蛍光物質の沈着を認め, Wheat ら²¹⁾も mid-pachytene 期精母細胞で最初に LDH-X が形成されると報告している。

精子形成過程には FSH とテストステロンの作用は必須である。本実験で下垂体摘出により LDH 総活性が著明に減少し, LDH-X 活性も消失した事は LDH-X 生成に間接的か直接的な作用かは不明であるが, FSH と LH が重要な働きをもっていることが示唆される。

V. 総 括

ラット精巣組織内 LDH 活性およびアイソザイムを測定し以下の結果を得た。

(1) ラット精巣において造精機能は60日齢までには完成すると考えられた。

(2) ラットの成長にともない Atype のアイソザイムの比率は減少し, 逆に Btype のアイソザイムの比率は増加した。

(3) LDH-X は精巣重量と高い相関 ($r=0.74$) を示した。

(4) LDH-X は28日齢以降多数の Cap 期精子細胞が出現して始めて認められた。

文 献

- 1) Shaw, C.R. and Barto, E.: Genetic evidence for the subunit structure of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **50**, 211—214, 1963.
- 2) Blanco, A. and Zinkham, W.H.: Lactate dehydrogenase in human testes. *Science*, **139**, 601—602, 1963.
- 3) Zinkham, W.H., Blanco, A. and Clowry, L.J.: An unusual isozyme of lactate dehydrogenase in mature testes. Localization, ontogeny and kinetic properties. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 571—578, 1964.
- 4) Blanco, A., Zinkham, W.H. and Kupchuk, L.: Genetic control and ontogeny of lactate dehydrogenase in pigeon testes. *J. Exp. Zool.*, **156**, 137—152, 1964.
- 5) Goldberg, E.: Immunochemical specificity of lactate dehydrogenase-X. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **68**, 349—352, 1964.
- 6) Lindhal, R. and Mayeda, K.: Lactate dehydrogenase isozymes of the mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. III. Immunochemical studies on the nature of testicular LDH-X. *Comp. Biochem. Physiol.*, **49B**, 43—50, 1974.

- 7) 内島 豊: ヒト射精液中の乳酸脱水素酵素とそのアイソザイム. *日泌尿会誌*, **72**, 643—661, 1981.
- 8) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Lindall, R.J.: Protein measurement with the foline phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265—275, 1981.
- 9) Leblond, C.P. and Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **55**, 548—573, 1952.
- 10) Swerdloff, R.S., Walsh, P.C., Jacobs, H.S. and Odell, W.D.: Serum LH and FSH during sexual maturation in the male rat. Effect of castration and cryptorchidism. *Endo.*, **88**, 120—128, 1971.
- 11) Krueger, P.M., Hodgen, G.D. and Sherins, R.J.: New evidence for the role of Sertoli cell and spermatogonia in feedback control of FSH secretion in male rats. *Endo.*, **95**, 955—962, 1974.
- 12) 大島博幸: 思春期の睪丸におけるアンドロゲンの生成と代謝. *ホと臨床*, **17**, 101—107, 1969.
- 13) Hodgen, G.D. and Sherins, R.J.: Enzymes as markers of testicular growth and development in the rat. *Endo.*, **93**, 985—989, 1973.
- 14) 岡田耕市: 精細胞, Sertoli 細胞および Leydig 細胞の増殖, 成熟に関する実験的研究. *日泌尿会誌*, **61**, 1125—1146, 1970.
- 15) Markert, C.L. and Ursprung, H.: The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Devel. Biol.*, **5**, 363—381, 1962.
- 16) Cahn, R.D., Kaplan, N.O., Levine, L. and Zwilling, E.: Nature and development of lactic dehydrogenase. *Science*, **136**, 962—969, 1962.
- 17) Grabowski, C.T.: Lactic acid accumulation as a cause of hypoxia-induced malformation in the chick embryo. *Science*, **134**, 1359—1360, 1961.
- 18) Goldberg, E. and Hawtrey, C.: The ontogeny of sperm specific lactate dehydrogenase in mice. *J. Exp. Zool.*, **164**, 309—316, 1967.
- 19) Blackshaw, A.W. and Elkington, J.S.H.: The effect of age and hypophysectomy on growth and the isoenzymes of lactate dehydrogenase in the mouse testis. *Biol. Reprod.*, **2**, 268—274, 1970.
- 20) Hintz, M. and Goldberg, E.: Immunochemical localization of LDH-X during spermatogenesis in mouse testes. *Devel. Biol.*, **57**, 375—384, 1977.
- 21) Wheat, T.E., Hintz, M., Goldberg, E. and Margoliash, E.: Analyses of stage-specific multiple forms of lactate dehydrogenase and of cytochrome C during spermatogenesis in the mouse. *Differentiation*, **9**, 37—41, 1977.

(1982年5月28日受付)