抗癌剤および抗 androgen 剤による spermatogenesis 障害の実験的研究

札幌医科大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 熊本悦明教授)

南 部 明 民 熊 本 悦 明

STUDIES OF SPERMATOGENIC DAMAGES INDUCED BY ANTI-CANCER AGENT AND ANTI-ANDROGENIC AGENTS IN RAT TESTES

Akihito Nambu and Yoshiaki Kumamoto

Department of Urology, Sapporo Medical University, School of Medicine
(Chief: Prof. Y. Kumamoto)

To investigate the mechanisms responsible for and recovery process of spermatogenic damage induced by anti-cancer agent and anti-androgen agents, we experimented with rats injected with those agents.

Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) was selected as the anti-cancer agent causing spermatogenic damage. Flutamide and cyproterone acetate were selected as anti-androgen agents.

Both of these agents induced histopathological spermatogenic damage. The influences of CDDP on spermatogonia and spermatocytes were remarkable, compared with cyproterone acetate and flutamide, which damaged mainly spermatids. CDDP had severely damaging effects on the DNA-synthesizing activity of spermatogenesis, based on findings using monoclonal antibody proliferating cell nuclear antigen (PCNA), compared with anti-androgen agents.

We also studied Sertoli cell function of drug-induced spermatogenic damage in rat testes. Measuring the contents of transferrin in rat testes indicated the damage to Sertoli cell function. High doses of CDDP (8 mg/kg) affected testicular transferrin concentration, but 4 mg/kg and 2 mg/kg of CDDP had no significant effect on Sertoli cell function. Cyproterone acetate and flutamide had severely damaging effects on Sertoli cell function not only at a high dose (30 mg/kg) but at low doses of 15 mg/kg and 7.5 mg/kg.

These results showed that an anti-cancer agent primarily affects the DNA synthesizing activity of spermatogonia and spermatocytes, but high doses of these agents also have damaging effect on Sertoli cells, and anti-androgen agents mainly affect Sertoli cells.

Key words: spermatogenesis, DNA synthesizing activity, Sertoli cell

要旨: 薬剤による spermatogenesis 障害の発現機構, および回復過程を検討する目的で, ラットの spermatogenesis に障害を与え, 精細管内の組織学的所見と, 抗 PCNA 抗体を用いた spermatogenesis の DNA 合成能, さらに精巣組織内 transferrin 濃度を指標とした Sertoli 細胞機能の関係について経時的に検討した。

投与薬剤として, 抗癌剤 (CDDP) および抗 androgen 剤 (cyproterone acetate, flutamide) を使用した。

CDDP 投与群では, 組織学的検討には spermatogonia, spermatocyte の障害が顕著であり, 抗 androgen 剤投与群では spermatid の障害が顕著であった。DNA 合成能の評価では, CDDP 投与群で投与量依存性の顕著な障害を示したのに対し, 抗 androgen 剤投与群ではそれぞれ 30mg/kg の高投与量群のみで有意な障害が認められた。Sertoli 細胞機能の指標としての精巣組織中 transferrin 濃度の変化を見

ると、抗 androgen 剤投与群では、低投与量群においても投与量依存性に Sertoli 細胞機能の障害が認められていた。しかし CDDP 投与群では 8mg/kg の高投与量群でのみ有意な低下を示していた。

今回の実験検討の結果から、CDDP においては DNA 合成能への障害が、抗 androgen 剤では Sertoli 細胞機能障害が、夫々主たる障害機構であるが、両薬剤とも高投与量になると、他の障害を合併し、より高度な障害を惹起することが明らかになった。

キーワード：spermatogenesis, DNA 合成能, Sertoli 細胞

緒 言

近年、癌治療学の進歩はめざましく、抗癌剤による治療後の生存年数が著しく延長した疾患群がある。泌尿器科領域においては、特に精巣腫瘍症例で、患者の生命予後は改善している¹⁾。その結果、症例が生殖年齢に多いこともあり、副作用としての妊孕能の障害が浮上し、臨床上的問題となっている²⁾³⁾。

しかし、その抗癌剤による精子形成能 (spermatogenesis) 障害の詳細な検討は必ずしも充分とは言えない点がある。そこで、精巣腫瘍に対する化学療法の主たる薬剤である cis-diamminedichloroplatinum (以下 CDDP) の spermatogenesis 障害について、実験的に詳細に検討を試みた。同時に、spermatogenesis 障害を発症させる他の作用機序の薬剤として、抗 androgen 剤 (cyproterone acetate, flutamide)⁴⁾⁵⁾での検討を行い、抗癌剤と抗 androgen 剤との spermatogenesis 障害発症機序の相違点を分析し、抗癌剤による spermatogenesis 障害の特徴を検討したので報告する。

方 法

(1) 実験動物および投与薬剤

実験動物として、8 週齢雄 Sprague-Dawley 系ラットを使用した。Spermatogenesis に障害を与える薬剤として抗癌剤、および比較の目的で抗 androgen 剤を用いた。

抗癌剤は、精巣腫瘍に対する化学療法を想定し CDDP を用いた。投与量の設定は十分な spermatogenesis 障害を惹起し、かつラットの生存率を考慮して、LD 50 相当の 8mg/kg 投与群を設定した。薬剤投与量と障害との関係を検討する目的で、そこから 1/2 量の 4mg/kg 投与群および 1/4 量の 2mg/kg 投与群を設定した。

精巣腫瘍患者に対する多剤併用化学療法 (PVB) での CDDP 投与量 20mg/m²⁶⁾は、ラットではおよそ 2.69 mg/kg に相当する⁷⁾。

抗 androgen 剤としては、中枢および末梢での抗 androgen 作用のある cyproterone acetate と、主に末梢

での抗 androgen 作用を持つ flutamide を使用した。抗 androgen 剤の投与量は CDDP 投与群と比較検討するため、組織学的に同じ程度の spermatogenesis 障害度を示す投与量として、基礎的検討の結果、両薬剤ともに 30mg/kg とした。これは CDDP 8mg/kg 投与群での 2 週目での精巣組織所見 (total germinal cell index) とほぼ同様の障害所見を示した投与量である。さらに各々 1/2 量の 15mg/kg 投与群、1/4 量の 7.5mg/kg 投与群を設定した。

CDDP は生理食塩水 1ml に溶解し、腹腔内 1 回投与とした。抗 androgen 剤は dimethyl-sulpho-oxide (DMSO) に溶解し、1ml を腹腔内投与した。

各薬剤投与群で薬剤投与後それぞれ 2 週 (14 日) 目、4 週 (28 日) 目、6 週 (42 日) 目、8 週 (56 日) 目、10 週 (70 日) 目に両側精巣を摘出した。それぞれ精巣摘出時点で各群 n=5 となるようにラット数を調整した。

また対照群として生理食塩水のみ 1ml を腹腔内投与した群を薬剤投与前 (n=12) および各週 (n=5) で設定した。この対照群間では以下に述べる各検討項目には、週数による有意な変動は認めなかった。経時的変化を示すため、対照群は薬剤投与前 (0 週) のみ示した。

(2) Spermatogenesis の組織学的障害度の検討

摘出した精巣は、片側はブアン液に固定後、パラフィン包埋し、5μm の連続切片を作成した。1 枚は hematoxylin-eosin 染色を行い、光顕的に精細管を観察した。ここで精細管内での各精細胞数 (spermatogonia 数, spermatocyte 数, spermatid 数) を Sertoli 細胞数で除した数値を求めた。これをそれぞれの精細胞の germinal cell index として組織学的な spermatogenesis の評価の指標とした⁸⁾。また各段階の germinal cell index の合計を total germinal cell index とした。さらに各精細胞の germinal cell index を結んだ曲線をグラフ化したものを spermatogenic curve⁸⁾とした (Fig. 5)。

なお精細管は Leblond, Clermont⁸⁾の stage 分類で

I から VIII までの精細管を選択した。

精細管は剖面において比較的円形に近い20精細管を選び、その平均値で評価した。

(3) Spermatogenesis における DNA 合成能の評価

連続切片のもう一方は、組織染色用に脱パラフィン処置を行ったのちに、抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を用い、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法による免疫組織染色を行った。抗 PCNA 抗体で染色された精細胞数を、同じ細管内の Sertoli 細胞数で除した値の平均値を PCNA labeling index とし、spermatogenesis 過程における DNA 合成能を示す指標とした。抗 PCNA 抗体は DAKO 社製、また免疫組織染色は Vector 社製 ABC キットを使用した。精細管は円形に近いものを20精細管選択し、その平均で評価した。

(4) 精巣組織内 transferrin 濃度の測定

摘出した他方の精巣は、白膜および肉眼的に観察された血管を除去したのち mince した。さらに血球成分の混入を除去するため PBS buffer で洗浄し、1,500回転、5分間遠沈した。遠沈後上清を捨て、再び洗浄、遠沈し、この操作を4回繰り返した。光顕にて血球成分の混入のないことを確認したのち、triton homogenator にて homogenate し、105,000g にて超遠沈を加えた。そこで得られた上清を cytosol 分画とした。

Cytosol 分画中の transferrin 濃度は Skinner ら¹⁰⁾の方法に従って radio-immunoassay 2 抗体法にて測定した。Cytosol 分画中の蛋白濃度は Bradford の¹¹⁾方法にて測定し、単位蛋白あたりの transferrin 濃度を

Sertoli 細胞機能の指標とした¹²⁾。

有意差の検定は、Mann-Whitney U 検定にて行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

(1) 薬剤による spermatogenesis 障害時の精巣の組織学的所見

対照群、CDDP 8mg/kg 投与群、cyproterone acetate 30mg/kg 投与群および flutamide 30mg/kg 投与群でのそれぞれ2週目における精巣組織所見を Fig. 1 に示した。CDDP 投与群では対照群に比較して spermatogonia, spermatocyte の減少した精細管が多く観察された。Cyproterone acetate 投与群、flutamide 投与群では spermatid の脱落現象 (sloughing) を示す精細管が多く観察された。

(1)-(a) CDDP 投与群における精巣の組織学的所見

CDDP 8mg/kg, 4mg/kg および 2mg/kg の3投与群の投与後の total germinal cell index および spermatogonia, spermatocyte, spermatid の各精細胞それぞれの germinal cell index の推移を Fig. 2a, b, c にまとめた。3投与量群とも spermatogonia index, spermatocyte index, spermatid index 各々が、まず平行移動する形で下降し、その後回復を示していた。ただ spermatid index は、spermatogonia index の最低を示す2週目より、遅れて4週目に最低値となっていた。Spermatid index の4週目の低下度は薬剤投与量に依存的であった。

CDDP 2mg/kg の低投与量群では、2週目で spermatid index の低下は軽度であったが、spermatocyte

Fig. 1 Histopathological appearance from rat testis administrated saline (a), CDDP 8mg/kg (b), cyproterone acetate 30mg/kg (c) and flutamide 30mg/kg, (d), injected after 2 weeks.

Fig. 2a Effect of CDDP 8mg/kg on germinal cell index.

Fig. 2b Effect of CDDP 4mg/kg on germinal cell index.

index のみが有意な低下を示した。

(1)-(b) Cyproterone acetate 投与群における精巣の組織学的所見

Fig. 2c Effect of CDDP 2mg/kg on germinal cell index.

Cyproterone acetate 30mg/kg, 15mg/kg, 7.5mg/kg の投与後、各 germinal cell index の推移をまとめた Fig. 3a, b, c を見ると、次のような所見になっている。

各投与群とも、CDDP 投与群にみられた所見とは異なり spermatogonia, spermatocyte の germinal cell index の低下があまり著しくないが、それにも拘わらず spermatid index の低下は比較的顕著であるという特徴が認められた。

(1)-(c) Flutamide 投与群における精巣の組織学的所見

Flutamide 30mg/kg, 15mg/kg, 7.5mg/kg 投与後の germinal cell index の推移を Fig. 4a, b, c に示した。Flutamide 投与群においても cyproterone acetate 投与群と同様、spermatogonia index, spermatocyte index の低下は少なく、spermatid index の低下が目立つ。しかも spermatid index の最低値は、CDDP 投与群で見られたように 4 週目ではなく 2 週目であり、むしろ 4 週目からは回復し始めている所見であった。

(1)-(d) Spermatogenic curve による検討

以上の 3 薬剤の spermatogenesis に対する障害の内容を、別の立場からまとめたのが Fig. 5 である。本図は各精細胞の germinal cell index を plot し、それ

Fig. 3a Effect of cyproterone acetate 30mg/kg on germinal cell index.

Fig. 3c Effect of cyproterone acetate 7.5mg/kg on germinal cell index.

Fig. 3b Effect of cyproterone acetate 15mg/kg on germinal cell index.

Fig. 4a Effect of flutamide 30mg/kg on germinal cell index.

Fig. 4b Effect of flutamide 15mg/kg on germinal cell index.

Fig. 4c Effect of flutamide 7.5mg/kg on germinal cell index.

を線で結んだ spermatogenic curve⁸⁾を投与薬剤ごとにまとめた図である。

この図において最も特徴的な所見は、3薬剤における2週目のcurveの所見(太線)である。CDDP 8 mg/kg投与群でのcurveは「下に凸」の形であり、spermatidと spermatocyteの細胞数比は1.35と1以下

上であった。一方、cyproterone acetate 30mg/kg, flutamide 30mg/kg投与群では、2週目の時点でこの細胞数比がそれぞれ0.74, 0.73と1以下に低下し、curveは逆に「上に凸」の形であった。

この所見は抗androgen剤では急激なSertoli細胞機能障害による、著しいspermatidの障害が先行した

Fig. 5 Spermatogenic curves of damaged rat testes induced by CDDP 8mg/kg, cyproterone acetate 30mg/kg and flutamide 30mg/kg.

結果と考えられる。

(小括1)

以上、3種薬剤の投与後における germinal cell index の推移をまとめると、抗癌剤である CDDP と、抗 androgen 剤では変化のパターンに顕著な差が示されていた。

CDDP は spermatogonia をはじめ、spermatocyte および spermatid の3細胞群ともにある程度平行して投与量依存性に高度化する障害が見られたが、抗 androgen 剤投与群においては、spermatogenesis の細胞分裂期を中心とした、spermatogonia および spermatocyte での障害は比較的軽度であり、spermatogenesis の late stage である spermatid における障害が顕著に認められた。

(2) Spermatogenesis 障害時の DNA 合成能の経時的変化

そこでこのような精細胞障害発症の機序を明らかにするため、spermatogenesis における DNA 合成能障害の程度を、PCNA labeling index の経時的変化にて検討した。

(2)-(a) CDDP 投与群における DNA 合成能の経時的変化

Fig. 6 に CDDP 投与群における DNA 合成能の経時的変化を示した。CDDP 投与群では8mg/kg、4mg/kg、2mg/kg の全投与量群で有意な低下が認められ、しかもほぼ投与量に比例して障害度が高度化する所見が示されている。また、すべて2週目を nadir として低

下し、徐々に10週目に向け回復傾向を示していた。

(2)-(b) 抗 androgen 剤投与群における DNA 合成能の経時的変化

Cyproterone acetate 及び flutamide 投与群においては、両群とも30mg/kg 投与群では有意な低下がみられたが、15mg/kg、7.5mg/kg 投与群では有意な障害は認めなかった(Fig. 7, 8)。前項の組織学的所見で示

Fig. 7 Effect of cyproterone acetate on PCNA labeling index index.

Fig. 8 Effect of flutamide on PCNA labeling index index.

Fig. 6 Effect of CDDP on PCNA labeling index index.

された spermatid の著しい障害にも拘わらず15mg/kg, 7.5mg/kg の低投与量群ではDNA 合成能障害はほとんど出現しないという所見となっていた。

(小括2)

PCNA labeling index による spermatogenesis でのDNA 合成能の検討結果, CDDP では8mg/kg の高投与量では勿論のこと, 4mg/kg, 2mg/kg の低投与量群でも, 2週目において有意な低下を示し, DNA 合成能の強い障害が認められた。一方, 抗 androgen 剤ではともに30mg/kg の高投与量ではDNA 合成能障害を認めたが, 低投与量群ではDNA 合成能は障害されず, CDDP との顕著な違いであった。

(3) Spermatogenesis 障害時の Sertoli 細胞機能

次に spermatogenesis 障害発現のもう一つの原因と考えられる, Sertoli 細胞機能障害を検討してみた。Sertoli 細胞機能の生化学的指標のひとつである transferrin 産生能を精巣組織内 transferrin 濃度で検討したのが Fig. 9~11 である。

(3)-(a) CDDP 投与群の精巣組織内 transferrin 濃度の経時的変化

CDDP 投与群での推移を示した Fig. 9 をみると, 8 mg/kg 投与群では著しい transferrin 濃度の低下がみられ, 4週目に最低となり, その後10週に向けて回復した。しかし4mg/kg, 2mg/kg 投与群では transferrin 濃度の低下は軽度であり, 先に検討した PCNA label-

Fig. 9 Effect of CDDP on testicular transferrin concentration.

ling index のような, 薬剤投与量に平行した curve の動きとは異なる所見であった。

(3)-(b) Cyproterone acetate 投与群の精巣組織内 transferrin 濃度の経時的変化

Cyproterone acetate 投与後の精巣組織内 transferrin 濃度の推移を見ると, 各投与量群の transferrin 濃度は, 容量依存性に障害を受け, 3投与群ともに同様

Fig. 10 Effect of cyproterone acetate on testicular transferrin concentration.

Fig. 11 Effect of flutamide on testicular transferrin concentration.

な回復経過を示していた (Fig. 10)。

(3)-(c) Flutamide 投与群の精巣組織内 transferrin 濃度の経時的変化

Flutamide 投与群の所見でも 30mg/kg, 15mg/kg, 7.5mg/kg の推移は Fig. 11 に示したごとく, cyproterone acetate 投与群同様, 比較的容量依存性の障害で進行した。

(小括 3)

精巣組織内 transferrin 濃度による Sertoli 細胞機能の検討結果では, 抗癌剤と抗 androgen 剤での所見の差異は, 前項の PCNA labeling index による DNA 合成能と反対の結果を示していた。すなわち, 高投与量群では, 両薬剤ともに Sertoli 細胞機能の障害が認められたが, 低投与量群では抗癌剤では Sertoli 細胞機能障害を認めず, 逆に抗 androgen 剤投与群では, 低投与量群でも有意に Sertoli 細胞機能障害が発現するという結果であった。

考 察

抗癌剤の薬理作用は主として DNA 合成能障害にあり, 抗癌剤による spermatogenesis 障害の発現機序も, その DNA 合成能障害によることは推定される。今回の実験で使用した CDDP は, 腫瘍細胞の分裂時 (DNA 合成時) に細胞の DNA との間に DNA-蛋白との結合 (DNA-protein cross links), および DNA 鎖間架橋 (interstrand cross-links) を形成することにより抗腫瘍効果を発現する¹³⁾。

抗癌剤による spermatogenesis 障害の実験的研究も, 主としてその DNA 合成能障害の観点からの報告が多い。

Lu ら¹⁴⁾は, 7 種類の抗癌剤をマウスに投与し, これらの薬剤が spermatogonia に対し, 細胞障害 (cell death) を発症させることを組織学的に示した。また Mistrich ら¹⁵⁾は, 抗癌剤による spermatogonia への障害は, 薬剤の種類により spermatogonia における細胞分裂時の障害パターンが異なることを示した。CDDP では A2-type の spermatogonia から B-type の spermatogonia での細胞分裂を特に強く障害することを報告している。

このような光顕による組織学的研究のみならず, Vawdra ら¹⁶⁾は, 実際に精細胞の thymidine の取り込み能を検討し, CDDP による spermatogenesis 障害が DNA 合成能の障害であることを示した。

また, これとは別に Sertoli 細胞機能障害という観点から, Pogach ら¹⁷⁾はラットの血清および精巣組織

中の androgen-binding-protein (ABP) を測定し, CDDP 10mg/kg の大量投与により血清中の ABP 濃度が低下したことから, Sertoli 細胞機能障害の発症を推定している。しかし ABP の測定については, 今だ一定の評価は得られてなく, また血中濃度の低下のみで Sertoli 細胞機能障害を推定するには検討を要するところである。

一方, 同様に spermatogenesis 障害をもたらす抗 androgen 剤に関しての研究として, Flickinger ら¹⁸⁾はラットに cyproterone acetate を投与し, 電顕にて Sertoli 細胞内に多くの脂肪滴の出現を認め, 形態的な Sertoli 細胞機能の障害発症を推定している。そして同時に認めた late stage の spermatid の顕著な脱落は, その Sertoli 細胞機能の低下によると説明している。

馬場ら¹⁹⁾は, 摘出したラット精巣の灌流実験で cyproterone acetate が testosterone の分泌能の低下を来すことを示し, 直接 Leydig 細胞機能が影響を受けていると報告した。

Cyproterone acetate の抗 androgen 剤作用は主に中枢での gonadotropin 抑制にあるが, 主に末梢性に抗 androgen 剤作用を示す flutamide での研究では Chandolia ら⁵⁾は, flutamide による障害精巣において精巣の間質機能が低下し, spermatogenesis 障害が発症するとしている。

このように薬剤による spermatogenesis 障害の研究は個々の薬剤での検討が多く, 作用機序の異なる薬剤の障害を同じ方法において評価し, その相違点の比較研究は行われていなかった。そこで著者らは, 特に CDDP の spermatogenesis 障害の特徴を, 抗 androgen 剤での障害と比較し検討した。

今回の検討結果から, 抗 androgen 剤である cyproterone acetate や flutamide では 30mg/kg の高投与量のみならず, 低投与量群でも精巣組織内 transferrin 濃度の有意な低下が認められ, Sertoli 細胞機能への抑制作用が示された。組織学的にも Sertoli 細胞機能障害の反映とされる, spermatid 数の低下が特に顕著にみられており, これらは理論的にも合致する所見と云える。

一方, 抗癌剤 (CDDP) による spermatogenesis 障害は DNA 合成能への直接的な障害が主体であると考えられた。ただ CDDP 8mg/kg の高投与量群においては精巣組織 transferrin 濃度も有意な低下があり, Sertoli 細胞機能の障害も同時に認めた。

これは CDDP は投与量が多ければ強い細胞毒性を

発現し、Sertoli 細胞に障害を及ぼした結果と推定された。そして Sertoli 細胞機能低下が起きれば、spermatogenesis 初期の DNA 合成を行っている spermatogonia や spermatocyte も代謝障害が起き、精細管内 DNA 合成能低下の別の一要因となっている可能性もある。

すなわち CDDP 8mg/kg の高投与量群においては spermatogenesis 障害の発現機序として、直接的な DNA 合成能障害の他に、Sertoli 細胞機能を介した DNA 合成能障害の両者の関与が考えられた。

ところでラットにおける CDDP 8mg/kg という投与量は、ヒトではおよそ 54mg/m² になる⁷⁾。精巣腫瘍に対する多剤併用化学療法—PVB では、CDDP の投与量は 1 回 20mg/m²⁶⁾ であり、通常は 5 日間連日静脈内投与される。投与方法は異なるが、投与量としては桁違いに高い量ではなく、臨床的にもこの CDDP による Sertoli 細胞機能障害は十分に発現しうると考えられる。

今後、抗癌剤の spermatogenesis 障害予防や治療において、今回の検討は基礎的研究として意義のあるものと考ええる。

文 献

- 1) 古武敏彦, 三木恒次: 辜丸腫瘍の治療と現況. 癌と化学療法, 15, 195—204, 1987.
- 2) Thachill, J.V., Jewett, M.A.S. and Rider, W.D.: The effects of cancer and cancer therapy on male fertility. J. Urol., 126, 141—145, 1981.
- 3) Berthelesen, J.G. and Skakkebaek, N.E.: Gonadal function in men with testis cancer. Fertil. Steril., 39, 68—75, 1983.
- 4) Huhtaniemi, I., Parvinen, M., Venho, P. and Rannikko, S.: Combination of a GnRH agonist with an antiandrogen or bromocriptine in the treatment of prostatic cancer; slight potentiation of antigonadal effects. Int. J. Androl., 14, 374—386, 1991.
- 5) Chandolia, R.K., Weinbauer, G.F., Fingscheidt, U., Bartlett, J.M. and Nieschlag, E.: Effects of Flutamide on testicular involution induced by an antagonist of gonadotropin-releasing hormone and on stimulation of spermatogenesis by follicle-stimulating hormone in rats. J. Reprod. Fertil., 93, 313—323, 1993.
- 6) Einhorn, L.H. and Donahue, J.: Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastin and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. Ann. Int. Med., 87, 293—298, 1977.
- 7) Freireich, E.J., Gehan, E.A., Rall, D.P., Schmidt,

- L.H. and Skipper, H.E.: Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. Cancer Chemotherapy Reports, 50, 219—245, 1966.
- 8) 熊本悦明, 伊藤直樹, 丸田 浩, 南部明民: Spermatogenesis 障害精巣の病理学的所見の検討—われわれの障害判定法 (市川・熊本分類および germinal cell index) の臨床的意義について—. 病理と臨床, 7, 296—306, 1989.
- 9) Leblond, C.P. and Clermont, Y.: Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. Ann. N.Y. Acad. Sci., 55, 548—573, 1952.
- 10) Skinner, M.K. and Fritz, I.B.: Androgen stimulation of Sertoli cell function is enhanced by peritubular cells. Mol. Cell Endocrinol., 40, 115—122, 1985.
- 11) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248—254, 1976.
- 12) Skinner, M.K., Cosand, L. and Griswold, M.D.: Purification and characterization of testicular transferrin secreted by rat Sertoli cells. Biochem. J., 218, 313—320, 1984.
- 13) Plooy, A.C.M., van Dik, M. and Lohman, P.H. M.: Induction and repair of DNA cross-links in Chinese hamster ovary cells treated with various platinum coordination compounds, in relation to platinum binding to DNA, cytotoxicity, mutagenicity, and antitumor activity. Cancer Res., 44, 20543—20551, 1984.
- 14) Lu, C.C. and Meistrich, M.L.: Cytotoxic effects of chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. Cancer Res., 39, 3575—3582, 1979.
- 15) Mistrich, M.L.: Stage-specific sensitivity of spermatogonia to different chemotherapeutic drugs. Biomed. Pharmacotherapy, 38, 137—142, 1984.
- 16) Vawda, A.I. and Davis, A.G.: Effects of cis-platin on mouse testis. Acta Endocr., 112, 436—441, 1986.
- 17) Pogach, L.M., Lee, Y., Gould, S., Giglio, W., Meyhofer, M. and Huang, H.F.S.: Characterization of cis-platinum induced Sertoli cell dysfunction in rodents. Toxicol. Appl. Pharmacol., 98, 350—361, 1989.
- 18) Flickinger, C.J. and Loving, C.K.: Fine structure of the testis and epididymis of rats treated with cyproterone acetate. Am. J. Anat., 146, 359—384, 1976.
- 19) 馬場志郎: Cyproterone Acetate のラット辜丸機能に及ぼす効果. 日泌尿会誌, 73, 636—643, 1982.
(1994年9月5日受付, 12月12日受理)