成熟ラットの精子完成期に対する FSH, Testosterone の影響

横木勇逸・小笠 晃

(農林省家畜衛生試験場)

著者らは先に精子発生期のホルモン支配に関して、幼若ラットを用いた実験から支持細胞及び pachytene 期精母細胞の発育は FSH により刺激され、減数分裂期には testosterone が必要であり、さらにまた精祖細胞及び pachytene 期精母細胞の発育は FSH と testosterone の協力作用により促進されることを示唆した^{1,2)}。いっぽう精子完成期の精子細胞の成熟に対するホルモン支配に関して、CUTULY & CUTULY,³⁾ LOSTROH⁴⁾ STEINBERGER & DUCKETT⁵⁾, KALRA & PRASAD⁶⁾ は下垂体摘出(垂摘),あるいは estrogen, clomiphene により下垂体前葉の機能を抑制した幼若ラットを用いた実験で、外国製の ICSH, testosterone は精子細胞 step 8 以降において、その成熟を刺激しないと述べているが VERNON *et al.*⁷⁾ は ICSH が step 8 以降の精子細胞を完成した精子にまで成熟させうることを認めている。本報告では精子完成期のホルモン支配の一端を明らかにするために垂摘成熟ラットを用いて精子形成の維持に対する各種ホルモンの影響について形態学的に検討した。

材料及び方法

供試動物は生後 60 日齢に垂摘した Wistar 系雄ラット 72 頭で、これらは 8 群に区分された。すなわち第 1 群には testosterone propionate (TP 1600, 100 μ g), 第 2 群には TP (100 μ g) と cyproterone acetate (CA 3 mg), 第 3 群には NIH-ICSH (9, 3 μ g), 第 4 群には NIH-FSH (300, 150, 100 μ g), 第 5 群には NIH-FSH (300 μ g) と抗 ICSH 血清 3 ml 及び CA 20 mg, 第 6 群には PMSG (8, 1 IU), 及び第 7 群には PMSG 1 IU と CA 10 mg が投与された。これら各群において、ホルモン投与はそれぞれ垂摘翌日から 15 日間行われ、処置を受けたラットはすべて 76 日齢で解剖された。さらに第 8 群は testosterone デボ剤⁸⁾ (Durateston 2 mg) を垂摘

翌日から 10 日間隔で 3 ~ 31 回投与され、投与開始後 30 日, 151 日及び 313 日にそれぞれ解剖された。なおこの他に無処置正常ラット 16 頭, 垂摘無処置ラット 6 頭をそれぞれ対照として設けた。採取された生殖器は各部位ごとに秤量され、精巣はマキシモフ液で固定後、厚さ 3 μ のパラフィン切片が作製され、PAS-Hematoxylin 染色が施された。標本の観察は LEBLOND & CLERMONT⁹⁾ の精上皮細胞の分類法に従い、精上皮周期 stage V, VII, XII を示す 15 ~ 20 個の円形の精細管について A 型及び B 型精祖細胞, preleptotene 期, zygotene 期から pachytene 期への移行期及び pachytene 期の各精母細胞, step 5, 7 の頭帽期, step 12 の先体期及び step 17, 19 の成熟期の各精子細胞数が算定された。なお精細胞数はセルトリ細胞数との比率で示した。

成 績

1. 生殖器重量

第 1 群の TP 1600 μ g 投与群及び第 6 群の PMSG 8 IU 投与群の精巣重量は 75 日齢正常対照に比べて低い値を示した。ICSH を投与した第 3 群及び第 4 群の FSH 300 μ g 投与群の精巣重量は垂摘対照に比し有意 ($P < 0.1 \sim 1.0$) に増加したが、副生殖器の維持効果は極めて弱かった。TP・CA を併用投与した第 2 群及び PMSG・CA を併用投与した第 7 群の精巣及び副生殖器重量には垂摘対照と比較し有意の増加はみられなかった。

2. 精巣組織の形態学的観察

1) 減数分裂期前における精細胞集団の量的変化 (図 1): 第 1 群の TP 1600 μ g 投与群及び PMSG を投与した第 6 群における精子発生過程の各精細胞数は正常対照のそれにほぼ近い値を示した。しかし TP 100 μ g 投与群及び ICSH を投与した第 3 群では zygotene 期から pachytene 期への移行期の精母細胞数において減少がみられた。さらに TP・CA を併用投与した第 2 群, PMSG・CA を併用投与した第 3 群, 第 4 群の FSH 150, 100 μ g 投与群及び FSH・抗 ICSH 血清・CA を併用投与した第 5 群の各群ではこの移行期における精母細胞数は著しく減少し、垂摘対照に一致した値を示した。これに

Effects of administration of FSH and testosterone on the spermiogenesis in hypophysectomized adult rats.

YOKOKI, Yuitsu & Akira OGASA (National Institute of Animal Health, Kodaira-shi Tokyo, 187)

Japan. J. Anim. Reprod. 24 (2), 1978.

* The number shown here is the ratio of crude count of germ cells to count of Sertoli cells observed in the tubular cross section.

A: Type A spermatogonia at stage VII.
 A': Type A spermatogonia at stage XII.
 B: Type B spermatogonia at stage V.
 PL: Preleptotene spermatocytes at stage VII.
 L: Leptotene spermatocytes at stage XII.
 T: Transition form spermatocytes at stage V.
 P: Pachytene spermatocytes at stage VII.
 P': Pachytene spermatocytes at stage XII.

Fig. 1. Effects of various hormones on spermatocytogenesis.

対して第4群の FSH 300 µg 投与群における pachytene 期精母細胞数は第6群の PMSG 8 IU 投与群のそれに匹敵することを認めた。

2) 変態過程における精子細胞の量的変化(図2): 第1群の TP 1600 µg 投与群及び第3群の PMSG 8 IU 投与群の各 step の精子細胞数はそれぞれ正常対照のそれにほぼ近かった。PMSG 1 IU 投与群における step 17, 19 の成熟精子細胞数には減少がみられた。さらに TP・CA を併用投与した第2群, PMSG・CA を併用投与した第7群及び第4群の FSH 150, 100 µg 投与群では, 頭帽期精子細胞数の減少が著しく, 成熟精子細胞に発育するものは極めて僅かであった。なお FSH・抗 ICSH 血清・CA を併用投与した第5群では, step 8 以降に発育する精子細胞は全く認められず垂摘対照と同様極めて過疎な細胞集団を呈した。また第4群の FSH

300 µg 投与群における頭帽期の精子細胞数は, 第3群の ICSH 9 µg 投与群のそれと一致していたが先体期以降の精子細胞数には極めて著しい減少が認められた。また Stage VII の pachytene 期精母細胞に対する各 step の精子細胞の割合を 75 日齢正常対照を 100 として示すと(図3), 精子細胞集団の量的算定で少ない値を示した第1群の TP 少量投与群及び第2群の TP・CA 併用投与群, 第4群の FSH 150, 100 µg 投与群, 第5群の FSH・抗 ICSH・CA 併用投与群, 第7群の PMSG 併用投与群では, step 5, 7 の頭帽期精子細胞の割合が正常対照の 60~110% の範囲にあり, 又各群の投与群相互間においてもその差は少なく, 精母細胞1個が減数分裂を経て step 5, 7 の精子細胞に発育する割合は比較的高いことが認められた。しかし先体期以降におけるこれら投与群の精子細胞の割合は著しく低下し, 量的に算定

* See the footnote of Fig. 1.

- 5: Step 5 spermatid in cap phase of spermiogenesis at stage V.
 7: Step 7 spermatid in cap phase of spermiogenesis at stage VII.
 12: Step 12 spermatid in acrosomic phase of spermiogenesis at stage XII.
 17: Step 17 spermatid in maturation phase of spermiogenesis at stage V.
 19: Step 19 spermatid in maturation phase of spermiogenesis at stage VII.

Fig. 2. Effects of various hormones on spermiogenesis.

した値に一致することが認められた。以上の成績から変態過程における精子細胞の維持には testosterone がその主体をなすものと考えられた。

3. Testosterone 長期投与における精巣、副生殖器の変化 (Group 8, 図 1~3)

Testosterone の長期投与において精巣重量は投与期間が長くなるに従い減少し、313 日間の投与群では垂摘後 15 日間経過した対照ラットのそれに一致する値を示した。これに反して副生殖器重量は著しく増加した。また精上皮周期の分類法により算定した精母細胞数及び精子細胞数は 30 日 (1 カ月), 151 日 (5 カ月), 313 日 (10 カ月) 間投与の各群とも 60 日齢, 76 日齢の正常対照群に比較し低い値を示した。しかし 1 カ月, 5 カ月投

与群相互間には、頭帽期 step 7 迄の精子細胞数では差違はなかったが step 12 以降の精子細胞数では 5 カ月投与群にその減少が著しかった。10 カ月投与群における各 stage の精細胞数は他の 2 群に比較しいずれも低値を示し、特に変態過程の成熟期精子細胞数に極めて著しい減少がみられた。

考 察

著者らは前報で精子発生過程のホルモン支配について検討を重ねて来たが、本報告では垂摘成熟ラットを用いて精子完成期における FSH, testosterone の影響について観察を行った。その結果 TP, PMSG の高用量単独投与群では先に報告^{10,11)}した精子形成維持実験の成績と

* Percentage to the number of spermatids developed from one stage VII pachytene spermatocyte in the 76-day-old normal control rat.

** See the footnote of Fig. 2.

Fig. 3. Ratio of spermatids in male rats during spermiogenesis after administration with various hormones.

同様に、正常対照に近い程度に精子形成が維持されることを認めた。しかし TP, ICSH の低用量投与あるいは CA の併用投与により androgen 作用を抑制した場合には、zygotene 期から pachytene 期への移行期精母細胞及び変態過程にある先体期、成熟期の精子細胞に著しい減少がみられたことから、この時期における精細胞は androgen 依存性が強いことが示唆された。いっぽう A 型精祖細胞が leptotene 期精母細胞に发育する過程及び pachytene 期精母細胞から減数分裂を経て頭帽期精子細胞を形成する迄の過程においては、FSH 及び testosterone が必要であるといわれている^{2,4)}。しかし本実

験においてこれらの過程は少量の TP 投与、CA の併用投与あるいは FSH 単独投与によっても維持されたことから androgen の依存性は比較的低いように思われた。さらに垂摘ラットではホルモン不在でも少数の step 7 精子細胞が認められているので¹²⁾、この時期においては少量のホルモンで精細胞の変性が防止され发育が順調に進むものと考えられた。しかし先体期以降の发育は FSH 単独でその維持効果は認められず testosterone が主役を演ずることが示唆された。またこのような短期間の精子形成維持実験では、回復実験^{3,4,13)} における成績とは異なり、精子細胞の変態過程に FSH が必要でないとする

VERNON *et al.*⁷⁾ の報告を支持する成績を得た。最近 HANSSON *et al.*¹³⁻¹⁶⁾ は FSH がセルトリ細胞に作用して androgen binding protein (ABP) を産生することを明らかにし、さらに垂摘により ABP は消失するが垂摘後直ちに androgen を投与するとこの機能は維持されることを明らかにした。本実験において TP 高用量投与群で精子生産が維持されたことは上述したように投与 TP により ABP の産生が維持されて、精子細胞への testosterone の供給が円滑に行われたことを示唆している。しかし testosterone を長期間投与した場合には、投与期間が長期になるに従い精細胞は漸次変性消失し、10 カ月目においては前述の TP 少量投与群、TP・CA 併用投与群の精細胞所見とはほぼ等しいことが認められた。このことはセルトリ細胞の ABP 産生機能は TP により初め刺激されたが、この刺激が長期間持続すると ABP 産生機能は衰退し、その結果精子細胞への testosterone の供給に不足を来すことを示唆するものである。塩田らは¹⁷⁾ LH-RH による能動免疫ラットあるいは垂摘ラットに TP を投与した実験から、LH あるいは androgen 以外のホルモンが精子形成に必須であることを指摘している。また Lostroh⁴⁾ は FSH と生長ホルモンを併用した場合には精子細胞の発育は認められないが、FSH と ICSH の併用によって精子生産が可能であることを報告している。これらのことから精子形成の維持は testosterone 単独では限界があること、また FSH は長期間にわたる精子形成の維持、特に精子細胞の変態過程に重要な役割を演じていることが推察された。

要 約

垂摘成熟ラットに垂摘翌日から (1) TP, (2) TP・CA, (3) NIH-ICSH, (4) NIH-FSH, (5) NIH-FSH・抗 ICSH 血清・CA, (6) PMSG, (7) PMSG・CA の 15 日間投与あるいは (8) Testosterone を長期間 (30 日, 151 日, 313 日間) 投与して精上皮周期 stage V, VII, XII における精細胞数を算定し、精子完成期に対するこれらのホルモンの影響を検討して次の成績を得た。

- 1) TP 1600 μ g あるいは PMSG 8 IU 投与により精母細胞及び精子細胞数は正常対照に近い値を示した。
- 2) TP あるいは ICSH の少量投与では zygotene 期から pachytene 期への移行期精母細胞と先体期、成熟期精子細胞数に減少が認められた。
- 3) FSH 100, 150 μ g 投与群、TP 100 μ g 投与群、FSH 300 μ g・抗 ICSH 血清・CA 併用投与群、PMSG 1 IU・CA 併用投与群では zygotene 期から pachytene

期への移行期精母細胞に著しい減少が認められた。また頭帽期精子細胞は先体期精子細胞以降に成熟するものは少なく、存在しても極めて僅かであった。

4) FSH 300 μ g 投与群には頭帽期に至る各過程の精子細胞が多数みられたが先体期以降の精子細胞の発育は著しく低下した。

5) Testosterone 長期投与群では、投与期間が長くなるに従って精巣重量は減少し、313 日 (10 カ月) 目では垂摘対照とはほぼ等しい値を示した。また精細胞数も同様に減少し、特に先体期以降の精子細胞において、その変性が著しく細胞数は減少した。

6) 以上の成績から zygotene 期から pachytene 期精母細胞の移行過程及び step 8 精子細胞以降の変態過程における精細胞の維持には testosterone が主役を演じ、FSH にはその作用のないことを認めた。しかし長期にわたる精子形成の維持は testosterone 単独では限界があり、FSH の協力作用が必要であることが示唆された。

おわりに、ご校閲をいただいた当場飼料安全性研究部中原達夫部長に深謝します。

(1977. 8. 18 受付)

文 献

- 1) 小笠(晃)・横木(勇): 本誌 22, 1, 1976.
- 2) 小笠(晃)・横木(勇): 第 82 回日本獣医学会講演要旨, 153, 1976.
- 3) CUTULY, E. & E. C. CUTULY: *Endocrinology* 26, 503, 1940.
- 4) LOSTROH, A. J.: *Endocrinology* 85, 438, 1969.
- 5) STEINBERGER, E. & G. E. DUCKETT: *J. Reprod. Fert. Suppl.* 2, 75, 1967.
- 6) KALRA, S. P. & M. R. N. PRASAD: *Endocrinology* 81, 965, 1975.
- 7) VERNON, R. G., V. L. W. GO & I. B. FRITZ: *J. Reprod. Fert.* 42, 77, 1975.
- 8) 横木(勇)・小笠(晃): 本誌 21, 102, 1975.
- 9) LEBLOND, C. P. & Y. CLERMONT: *Amer. J. Ant.* 90, 167, 1952.
- 10) MATSUYAMA, S., Y. YOKOKI & A. OGASA: *Nat. Inst. Hlth Quart.* 11, 41, 1971.
- 11) OGASA, A. & Y. YOKOKI: *Nat. Inst. Hlth Quart.* 10, 82, 1970.
- 12) CLERMONT, Y. & S. C. HARVEY: *Ciba Found. Colloq. Endocrinol.* 16, 173, 1967.
- 13) NELSON, W. O.: *Amer. J. Physiol.* 129, 430, 1940.
- 14) HANSSON, V., E. REUSCH, O. TRYGSTAD, O. TORGERSEN, E. M. RITZEN & F. S. FRENCH: *Nature. New Biology* 246, 1973.

- 15) HANSSON, V., O. TRYGSTAD, F. S. FRENCH, W. S. MCLEAN, A. A. SMITH, D. J. TINDALL, S. C. WEDDINGTON, P. PETRUSZ, S. N. NAYFEH & E. M. RITZEN: *Nature* 250, 387, 1974.
- 16) WEDDINGTON, S. C., V. HANSSON, E. M. RITZEN, L. HAGENAS, F. S. FRENCH & S. N. NAYFEH: *Nature* 254, 145, 1975.
- 17) 塩田(邦)・高橋(迪)・鈴木(善): 日本内分泌学会 東部部会講演要旨集 (13), 44, 1976.

Summary

Hypophysectomized adult rats were injected daily with (1) testosterone propionate (TP, 1,600 or 100 μ g), (2) TP (100 μ g) and cyproterone acetate (3) NIH-ICSH-S 18 (9.3 μ g), (4) NIH-FSH-S 9 (300, 150, 100 μ g), (5) NIH-FSH (300 μ g), rabbit ICSH-antiserum (3 ml) and CA (20 mg), (6) PMSG (8 or 1 IU), (7) PMSG (1 IU) and CA (10 mg) for 15 days, or (8) testosterone depot (testosterone propionate, testosterone phenylpropionate, testosterone isocaproate, and testosterone decanoate; 2 mg) for a long time (30, 151, and 313 days) beginning with the next day of hypophysectomy. They were examined for the effects of these hormones on the stage of spermiogenesis by counting germ cells in stages V, VII and XII of the cycle of the seminiferous epithelium.

1. The counts of spermatocytes and spermatids in rats administered with 1,600 μ g of TP or 8 IU of PMSG were close to those in normal intact controls.

2. Spermatocytes in the transitional stage from zygotene to pachytene and spermatid in the acrosomic stage and maturation phases decreased in number in rats injected with a small dose of TP or ICSH.

3. A marked decrease was observed in the number of spermatocytes in the transitional stage from zygotene to pachytene in rats of four different groups which were administered with FSH (100 or 150 μ g) or TP (100 μ g) alone, simultaneously with PMSG and CA, or simultaneously with FSH, rabbit ICSH-antiserum, and CA respectively. There were no or only a few cap-phase spermatids which were in the process of maturation to step 8 of the acrosomic phase.

4. Many spermatids in every step of the cap-phase of spermiogenesis were observed in rats injected with 300 μ g of FSH alone. In these rats, however, the development of spermatids was disturbed remarkably in the acrosomic phase.

5. The testes decreased in weight in proportion to the prolongation of the period of injection with testosterone. The testicular weight measured on the 313th day after the beginning of injection was almost the same as that in the hypophysectomized control. In rats on the 313th day, germ cells of every stage were reduced in number and especially spermatids in and after the acrosomic phase decreased remarkably in number.

6. Testosterone might play a leading role in the maintenance of spermatocytes in the transitional stage from zygotene to pachytene and in the process of metamorphosis in and after step 8 of spermiogenesis. It was observed that FSH itself had no effect on hypophysectomized adult rats. It was suggested that the action of testosterone itself might be insufficient to maintain spermatogenesis for a long time and that the synergistic action of FSH might be necessary for testosterone to continue its action in such case.