Hexestrol dicaprylate のイヌ精巣組織およびアンドロ ジェン含量におよぼす影響

清水亮佑・稲葉俊夫・桜田豊三¹⁾
宮田秀明²⁾・蘭守龍雄

(大阪府立大学農学部家畜外科学教室 ¹⁾現所属: 東洋醸造株式会社 ²⁾大阪府立公衆衛生研究所)

野犬防止対策の一環として、合成エストロジェンの一
種で持続性の効果をもつ hexestrol dicaprylate (H_8)
を雄犬に 1 回注射し、一時的に去勢することが試行され
ている¹⁾。

著者らは H_8 の造精機能抑制機構について検討し、投
与した H_8 が直接あるいは間接に精巣のアンドロジェン
合成酵素を抑制し、造精機能の停止を起こさせることを
ほぼ明らかにした²⁻⁷⁾。しかしながら、 H_8 の実用化等
をも検討するに当り、精巣におよぼす影響、最適な投与量
と最小有効量、投与量による繁殖抑制期間と造精機能の
復元等について、さらに検討を加える必要がある。

今回、著者らはこれらについて組織学および生化学
的方法を用いて検討した。

材料と方法

1. 実験犬

供試犬は体重 6~11 kg, 推定年齢 1~5 年の雄雑種犬
で、一般臨床検査および精液性状検査によって正常と判
断されたものを使用した。

2. 精巣の組織学的観察

H_8 の犬における去勢効果について、最小有効量と持
続期間を検討するために、 H_8 20 mg/ml 含有のゴマ油剤
を用い、体重 1 kg 当り 0.1 mg (10 頭), 0.5 mg (8 頭),
1.0 mg (15 頭), 2.0 mg (14 頭) の 4 群に分け、1 回
筋肉内注射を行なった。投与後、経時的に精巣を摘出し
て重量を測定したのち、ホルマリン固定し、パラフィン

薄切標本として H-E 染色を施し、鏡検した。

精巣組織所見は対照犬の精巣をもとに、精細胞、セル
トリ細胞および間細胞の状態をその数的変化を中心に観
察し、記載した。その記載方法は正常に存在するもの
(+++), やや減少しているもの (++)、減少の強いもの
(+), 僅かに存在している程度のもの (±), 消失して
いるもの (—) として表わした。精細管直径については
ほぼ円形の精細管 20 個の直径を接眼マイクロメーター
で測定を行ない、その平均値を使用した。

重量表示については体重 1 kg 当りの精巣重量 (左右
平均) として、比率をもって表わした。

3. 精巣のアンドロジェン含有量の測定

H_8 の犬精巣のアンドロジェン含有量におよぼす影響
を検討するため、 H_8 20 mg/ml 含有のゴマ油剤を用い、
体重 1 kg 当り 2 mg の割合で筋肉内注射を行なった。
 H_8 投与後、経時的に実験犬から精巣を採取し、精巣中
のアンドロステンジオン (A) およびテストステロン (T)
をガスクロマトグラフィー法により測定した。

測定方法については、GORKI ら⁸⁾の方法に多少の変更
を加えて行なった。すなわち、図 1 に示すように、まず
各試料に $4\text{-}^{14}\text{C-T}$ (specific activity 58.8 mCi/mmol.
New England Nuclear Corp., U. S. A) の約 88,000 dpm
を操作開始時に加えて抽出・分離精製過程における損失
量の検討に用いた。採取した精巣は乳鉢でホモゲナイズ
後、メタノール-エチルエーテル (3:1, v/v) 混液で 2 回
抽出し、抽出液を減圧乾固後、酸化アルミニウム (Merk
社製) のカラムにのせ、クロロホルム-n-ヘキサン混液を
用いて、ステロイドを溶出させた。溶出液を乾固後、70%
メタノール/石油エーテル (1:1, v/v) を用いて溶液分
配操作をした。分配後の 70% メタノール層を減圧下で
メタノール成分を蒸発させた後、残った水層にベンゼン
を加え、 4-^3 ケト・ステロイド類を抽出した。この抽出
物を乾固後、シリカゲル HF-254 (Merk 社製) の薄層
クロマトグラフィー (TLC) に展開した。展開溶媒につ
いては、シクロヘキサン-酢酸エチル (1:1, v/v) のもの

Effects of hexestrol dicaprylate on the canine
testis.

SHIMIZU, Ryosuke, Toshio INABA, Toyozo SAKU-
RADA¹⁾, Hideaki MIYATA²⁾ & Tatsuo IMORI (Depart-
ment of Surgery and Obstetrics, School of Veterinary
Science, College of Agriculture, University of Osaka
Prefecture, Sakai, Osaka 591, ¹⁾Present address:
Toyo Jozo Co., LTD, Tokyo 108, ²⁾Public Hygiene
Institute of Osaka Prefecture, Osaka 574)

Japan. J. Anim. Reprod., 29(2), 1983.

Fig. 1. Flow sheet of GLC for 4-androstenedione and testosterone.

を使用した。TLC 上の A と T の標準品に一致する分画 (A: $R_f=0.38$, T: $R_f=0.29$) をそれぞれ採取した。

分離精製した A と T は、コレステランを内部標準物質として加えた後、水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラム (島津社製 GC-1C 型) を用いて測定した。1.5% SE-30 を充填した直径 4 mm, 長さ 3.375 m のカラムを用いた場合、カラム温度 257°C におけるコレステランを 1 とした時の relative retention time は A では 0.56, T では 0.58 を示した。

本法の T の回収率は 62.5 ± 3.7 (平均 $\pm$ SE) % であり、測定内変位係数は A では 4.1%, T では 5.4% を示した。測定感度は A, T ともに最小 0.01 μ g を示した。さらに、本法の特異性を調べるために、分離精製した試料をアセチル化した後、TLC を用いて標準品と比較したところ、両者の値には差を認めなかった。

成 績

1. 精巣重量および肉眼所見

体重 1 kg 当り H_8 0.1~2.0 mg を犬に投与したときの精巣重量におよぼす影響を図 2 に示した。

H_8 投与後精巣重量は 5 日目ですでに減少の兆を見せ始め、30 日目では 0.1 mg/kg 投与で約 80% に減少、0.5 mg/kg では 30 日目でも約 30% 重量にまでも減少を示した。しかし、1.0~2.0 mg/kg 投与の場合も 30 日目

Fig. 2. Weight of testis treated with H_8 .

での減少率は 0.5 mg/kg 投与の場合と比べて余り大きな差を示さず、28~25% 重量となった。

このように著しい減少を示した精巣重量の回復は 0.5 mg/kg 投与の場合、8 カ月目で約 85% 程度に、1.0 mg/kg 投与では 10 カ月目で約 70% 程度の重量までしか回復を示さなかった。

H_8 投与後の精巣の外部所見については、精巣の重量変化と平行しており、 H_8 の投与量が増すにつれ、精巣の萎縮、表面の張力の減少、皺の増加が顕著になった。

2. 精巣の組織所見 (表 1)

(1) 精細管径の変化

H_8 投与後の精細管径の変化は精巣重量の変化とはほぼ平行的な減少を示し、0.5 mg/kg 以上の投与では 1 カ月目で対照犬の約 1/2 程度となった。

(2) 精細管内の精子形成所見

① H_8 0.1 mg/kg 投与群

投与後 5 日目ですでに精子から精母細胞におよぶ精細胞群に減少の傾向が認められ、15 日目では精子から精細胞に至る細胞群の減少がより明らかとなった。30~40 日になると、これらの細胞数は回復が認められるに至った。

Table 1. Examination of germ cells in tubular cross section of dogs treated with H₈*

Dose of H ₈ (mg/kg B. W.)	Days after H ₈ injection	Spermatogonia	Spermatocyte	Spermatids	Sperms	Diameter of tubule (μ m)
0		+++	+++	+++	+++	220.1
0.1	5	+++	++	++	++	187.3
	10	++	++	+	+	178.4
	15	++	++	+	+	165.8
	30	++	++	++	+	170.2
0.5	10	++	++	±	±	177.5
	15	+	+	±	±	153.4
	30	+	±	—	—	121.6
	240	++	++	++	++	220.3
1.0	5	+++	+++	++	++	225.1
	10	++	++	±	+	170.7
	15	+	+	±	±	142.2
	30	+	±	—	—	104.3
	60	+	±	—	—	124.8
	120	+	—	—	—	115.1
	150	+	+	—	—	109.2
	300	++	+	+	+	180.0
2.0	5	++	++	++	++	205.1
	10	++	+	+	+	171.6
	15	+	+	+	+	160.2
	30	+	±	—	—	122.4
	60	+	+	—	—	127.4
	120	+	±	—	—	110.0

* —: not present, +: poor, ++: fairly good, +++: very good.

② H₈ 0.5 mg/kg 投与群

H₈ 0.5 mg/kg 投与例では、投与後 10 日目には精子細胞、精子は明らかに減少し、その他の精細胞の減少は僅かであった。また、一部の精祖細胞、精母細胞に核濃縮や核崩壊が認められた。15 日目には精細胞の減少は顕著であり、精細管内にはエオジンに染まる線維様物質や、合胞体性巨細胞が出現していた（図版、図 2）。30 日目には精細胞は著明に減少し、精子は消失していた（図版、図 3）。60, 120, 180 日目に精巣の生検を行なった結果、いずれの場合にも精子は認められなかった。240 日目には精細胞の数は対照に比べてやや減少していたが、細胞の変性は著明ではなく、回復の傾向を示していた。

③ H₈ 1.0 mg/kg 投与群

H₈ 1.0 mg/kg 投与例では、投与後 5~30 日目までの精細管の精子形成所見は 0.5 mg/kg 投与例とほとんど同様な経時的変化を示した。投与後 60~150 日では精祖細胞の変性が著しく、きわめて僅かな精母細胞（投与後 120 日目では精母細胞の消失を観察した、図版、図 4）と

セルトリ細胞のみが精細管上皮に存在した。エオジンに染まる線維様物質は依然認められたが、合胞体性巨細胞は認められなかった。投与後 270 日目に精巣の生検を行なった結果、精子は観察できなかった。しかし、300 日目には精細胞の減少はみられるが、精子に至るまでの全精細胞群の存在が確認できた。

④ H₈ 2.0 mg/kg 投与群

H₈ 2.0 mg/kg 投与例では、投与後 30~120 日目まで精子の消失がみられ、H₈ 1.0 mg/kg 投与例の所見と比較し、ほとんど同様の経時的変化を示した。

(3) セルトリ細胞および間細胞の所見

H₈ 投与によるセルトリ細胞および間細胞への影響については、H₈ 0.1 mg/kg 投与ではその影響が認められず、0.5 mg/kg 以上の投与群で、投与後 15 日目当りから精細胞の変性と脱落による減少にともなう、精細管の 1 横断面当りのセルトリ細胞の数は相対的な増加の傾向を示す。間細胞については僅かに萎縮像を呈して、その数は精細管の退縮にともなう相対的に増加する傾向にあった。

Table 2. 4-Androstenedione and testosterone level in testis of dogs treated with 2.0 mg/kg of H_8

Days after H_8 injection	No. of sample	4-Androstenedione ($\mu\text{g/g}$ testis)	Testosterone
0	(11)	0.17 ± 0.03	0.61 ± 0.09
1	(3)	0.03 ± 0.00	0.12 ± 0.02
2	(3)	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.01
3	(4)	N. D.*	N. D.
5	(4)	N. D.	N. D.
10	(3)	N. D.	N. D.
15	(3)	N. D.	N. D.
30	(3)	N. D.	N. D.
60	(3)	N. D.	N. D.

* N. D.: non-detectable.

3. アンドロジェン含有量について

犬に H_8 2.0 mg/kg 投与後、精巣中のアンドロジェン量を測定した結果を表に示した。A 含有量は、 H_8 投与後 1 日目では正常犬の約 1/5, 2 日目では約 1/25 を示し、3 日目以降 60 日目まで測定不可能であった。

T 含有量は H_8 投与後 1 日目では正常犬の約 1/5, 2 日目では約 1/17 量を示し、3 日目以降 60 日目まで測定が不可能であった。

考 察

本研究の目的である H_8 の犬におよぼす去勢の効果は、組織所見で精細管内から精子が消失した状態をもって有効と判定した。この基準に従うとき、去勢効果は 0.1 mg/kg 投与群では十分に認められず、0.5 mg/kg 以上の投与群で 30 日目より有効と判断でき、これらの持続期間については、0.5 mg/kg 投与で約半年、1.0 mg/kg 投与で約 9 カ月の去勢効果が得られたことになる。また実験犬において臨床的には副作用を示す病的な徴候はほとんど観察されなかった。これらの点から去勢を行なう目的で H_8 を臨床的に応用できるホルモン剤として一応認めてよいように思われる。

H_8 投与後の精細管上皮の変化は、ラットにおけるビタミン E 欠乏症⁹⁾、ヒツジのビタミン A 欠乏症¹⁰⁾、マウス^{11,12)}、ラット^{13,14)}、イヌ^{15,16)}、ウシ¹¹⁾に対するエストロジェン投与例、イヌの老齢性精巣萎縮¹⁷⁾等の組織所見と酷似していた。すなわち、変性の強弱あるいは持続性に差異はあっても、①精子、精子細胞が比較的早く消失する点、②精母細胞、精祖細胞が共に抵抗性を強く示すこと、さらに③セルトリ細胞は変化を受けにくく、むしろ

増加を示す点などは精巣に萎縮を起こさせる X 線照射¹⁸⁾の場合とは明らかに趣を異にする。すなわち、X 線照射で未分化の細胞の破壊が顕著に行なわれるため、精祖細胞の方がもっとも早く精細管上皮から脱落消失する。この点、 H_8 投与時とはきわめて対称的である。

本実験結果より、 H_8 投与後間細胞の増加が観察できたが、一般に精巣自身が著明に萎縮した場合には見掛上のものとも区別は判定し難い。これに関して、外間⁹⁾はビタミン E 欠乏症の場合、間細胞がやや増殖するが、細胞自体に変化がなかったと報告している。また早川¹⁵⁾は X 線照射において間細胞は増加するが、核異常を示すものが現われ、機能的に低下することを報告した。一方、小笠原¹¹⁾はウシにおいてエストロジェンの投与が間細胞の軽度の増生をもたらすことを観察し、報告した。さらに、BLOOM¹⁷⁾は老齢性精巣萎縮においては、間細胞の数は増加したり、減少したりすると報告している。これらの報告を総合してみると、間細胞の機能的な役割をこれらの組織所見だけをもって軽々しく推論することは必ずしも妥当ではないようである。

本実験では、精巣のアンドロジェン含有量を測定することにより、 H_8 の精巣におよぼす機能的影響をも検討したが、 H_8 投与後、急激に精巣中のアンドロジェン含有量の減少が起った。エストロジェン投与によるアンドロジェン分泌抑制の作用機構として、脳下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生の抑制が従来一般に考えられてきた。しかし、著者らは H_8 投与後の犬脳下垂体前葉中の性腺刺激ホルモンの産生をマウスの排卵反応を指標として調べたところ、 H_8 投与後 3 日目、5 日目でやや抑制が見られ、10 日目以降にきわめて強い抑制が起る結果を観察し得た⁷⁾。このことから、間細胞のアンドロジェン産生能が 1~2 日で急激な低下を起こした現象をも、 H_8 による脳下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生の抑制結果のみによるものとは考え難い。

BENGTTSSON らは放射性の diethylstilboestrol (DES) や polydiethylstilboestrol phosphate (DES-P) をラットに皮下注射した後、オートラジオグラフィーにより、それらの分布を調べた結果、精巣間質の間細胞に特に多く蓄積することを報告した。DES では注射後わずか 5 分で間細胞に放射能を検出し、DES-P では注射後 1 日目でその蓄積が最高となり、さらにそれが持続することをも観察した^{19,20)}。著者らはさきにマウスを用いて、 H_8 投与により精巣のアンドロジェン合成に関与する 17 α -hydroxylase, C₁₇₋₂₀lyase, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 等の酵素活性が抑制される事実を報告した⁴⁾。さ

PLATE

Explanation of Figures

Paraffin sections, $6\mu\text{m}$ in thickness, of testes from dogs treated with H_8 . Fixed in formalin. Hematoxylin-Eosin. $\times 600$.

Fig. 1. Non-treated control animal.

Fig. 2. Fifteen days after 0.5 mg of H_8/kg B. W. treatment. Note that tubules are small in size and germ cells are sparse. Syncytial cells are observed.

Fig. 3. Thirty days after 0.5 mg of H_8/kg B. W. treatment. Note that tubules are small and spermatids and sperms disappear. Degenerated spermatogonia are observed.

Fig. 4. One-hundred and twenty days after 1.0 mg of H_8/kg B. W. treatment. Note that tubules are small and spermatocytes, spermatids and sperms are not observed.

らに、犬精巣を用いた *in vitro* 実験によって H_8 が hexestrol に転換後、精巣に直接的に作用し、アンドロジェン産生能を低下させることをも報告している⁷⁾。

以上のことから、イヌに H_8 を投与した場合、急速に H_8 が精巣間質の間細胞に取り込まれて、アンドロジェン生成に関与する一連の酵素活性を直接抑制した結果として、アンドロジェン産生能の急激な低下が起こるものと考えたい。また 3 日目頃からは、脳下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生の抑制によって、さらに二次的にも間細胞のアンドロジェン産生をさらに強力に抑制するものとする。

(1982. 11. 15 受付)

文 献

- 1) 三木 (博)・山田 (法)・秋山 (陽)・野本 (敏)・金山 (保)・山本 (力)・鈴木 (雅)・高島 (利)・和田 (信)・並木 (武)・小野 (浩)・武石 (昌)・常包 (正): 東京獣畜誌, **24**, 29, 1977.
- 2) 蘭守 (龍)・中間 (実): 本誌, **13**, 26, 1967.
- 3) 稲葉 (俊)・清水 (亮)・蘭守 (龍): 本誌, **24**, 63, 1978.
- 4) 稲葉 (俊)・清水 (亮)・蘭守 (龍): 本誌, **24**, 110, 1978.
- 5) 清水 (亮)・稲葉 (俊)・蘭守 (龍): 本誌, **27**, 25, 1981.
- 6) 稲葉 (俊)・清水 (亮)・蘭守 (龍): 本誌, **27**, 75, 1981.
- 7) 清水 (亮)・岡 (章)・稲葉 (俊)・蘭守 (龍): 本誌, **28**, 100, 1982.
- 8) GORSKI, J., O. V. DOMINGUEZ, L. T. SAMUELS & R. E. ERB: *Endocrinology*, **62**, 234, 1958.
- 9) 外間 (考): 日不妊会誌, **13**, 59, 1968.
- 10) DUTT, B.: *Brit. Vet. J.*, **115**, 236, 1959.
- 11) 小笠 (晃)・杉浦 (邦)・横木 (勇): 本誌, **13**, 47, 1967.
- 12) ELY, C. A.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **84**, 501, 1953.
- 13) 小笠 (晃)・須川 (章)・松山 (茂): 本誌, **9**, 12, 1963.
- 14) 岡元 (健)・齊藤 (宗)・愛甲 (矩)・新山 (考): 最新医学, **17**, 331, 1962.
- 15) MULLIGAN, R. M. & D. L. BECKER: *Amer. J. Path.*, **23**, 299, 1947.
- 16) MULLIGAN, R. M.: *Amer. J. Path.*, **20**, 865, 1944.
- 17) BLOOM, F.: *Pathology of the dog and cat*, Amer. Vet. Pub., Inc., 1954.
- 18) 早川 (潤): 鹿大医誌, **12**, 1358, 1960.
- 19) BENGTTSSON, G. & S. ULLBERG: *Acta endocr.*, **43**, 561, 1963.
- 20) BENGTTSSON, G., S. ULLBERG & T. PERKLEV: *Acta endocr.*, **43**, 571, 1963.

Summary

Hexestrol dicaprylate (H_8), a long-acting estrogen, was used in an attempt to induce temporary sterilization of adult male dogs. Each dog received a single intramuscular injection of H_8 in oil. The doses were ranged from 0.1 to 2.0 mg/kg body weight. The morphological and histological changes in the testis, and androgen content of the testis were examined after H_8 injection.

In cases of 0.5 to 2.0 mg/kg dose levels, spermatozoa in each seminiferous tubule disappeared within 30 days, and this seemed to continue over 150 days. In a dog treated with 0.5 mg/kg, spermatozoa were not found in the testis on day 180, but were found on day 240. Testosterone and androstenedione were assayed in H_8 -treated and non-treated dog's testicles by GLC. The content of both androgens decreased markedly within 48 hours after injection with a dose of 2.0 mg/kg of H_8 , and further decreased to undetectable amounts in the 72 hours samples. Up to 60 days after H_8 injection, both androgens were in the undetectable level of our assay system.

This type of estrogen may probably be used for temporary sterilization of male dogs for about 6 month at the 0.5 mg/kg dose level.