

①

主論文

Ethane dimethanesulphonate (EDS) のラット精巣障害に対する Testosterone の防御的役割に関する研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室（主任 大森弘之教授）

山 根 享

STUDY ON THE PROTECTIVE EFFECTS OF TESTOSTERONE AGAINST TESTICULAR DAMAGE INDUCED BY ETHANE DIMETHANESULPHONATE (EDS) IN THE RAT

SUSUMU YAMANE

Department of Urology (Director : Prof. H. Ohmori),
Faculty of Medicine, Okayama University, Okayama, Japan

西 日 本 泌 尿 器 科 別 冊

1995年4月発行

（第57巻第4号）



- 6) Aso, Y. and Homma, Y.: A survey on incidental adrenal tumors in Japan. J. Urol. **147**: 1478-1481, 1992.

1984.

- 7) 竹内和男:超音波検査マニュアル-副腎-, 外科 **46**: 1316-1322,

(1994年10月6日受理)

Ethane dimethanesulphonate (EDS) のラット精巣障害に対する Testosterone の防御的役割に関する研究

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任 大森弘之教授)

山 根 享

STUDY ON THE PROTECTIVE EFFECTS OF TESTOSTERONE AGAINST TESTICULAR DAMAGE INDUCED BY ETHANE DIMETHANESULPHONATE (EDS) IN THE RAT

SUSUMU YAMANE

Department of Urology (Director: Prof. H. Ohmori),
Faculty of Medicine, Okayama University, Okayama, Japan

The protective effects of a testosterone microcrystal suspension (Tmcs) and testosterone propionate (TP) were studied in a rat model of sterility in order to assess the role of androgens, especially testosterone (T), in spermatogenesis. The seminiferous tubular T level was reduced by the administration of ethane dimethanesulphonate (EDS), which is directly toxic to Leydig cells. In rats treated with Tmcs prior EDS administration, the seminiferous tubular T level increased without affecting the serum gonadotropin or T levels. This demonstrated the protective action of Tmcs against seminiferous tubular damage and also showed that the seminiferous tubular T level had an important influence on spermatogenesis. On the other hand, when TP was administered before EDS, seminiferous tubular androgen showed a protective effect, even though it also had a suppressing tendency. This suggested that some of the administered T was incorporated by the testis and played a role in priming as well as stimulating spermatogenesis, later reducing the intrinsic T level by suppressing the hypothalamus-pituitary axis. (Nishinohon J. Urol. 57: 448-454, 1995)

key words: testicular damage, ethane dimethanesulphonate (EDS), protective action of testosterone

キーワード: 精巣障害, ethane dimethanesulphonate (EDS), テストステロンの防御的役割

結 言

特発性男性不妊症の病因, さらにはその治療法については明確な解答が得られていないのが現況である。しかし精子形成に androgen が必要であることは古くから知られており¹⁾, さらに精細管内 testosterone (T) 濃度は Leydig 細胞より分泌される内因性 T に影響されることが報告されている²⁾。また教室の永井³⁾は, Leydig 細胞をアルキル化作用により選択的に傷害することで造精機能障害を惹起すると Morris ら⁴⁾が報告した, Ethane dimethanesulphonate (EDS) を用いて不妊ラットを作成し, human chorionic gonadotropin (hCG) および androgen の造精機能障害に対する防御作用について報告している。さらに大枝⁵⁾は, hCG の防御作用について詳細な検討を加え, EDS 投与前後で継続して hCG を投与することにより, 精細管内 T が維持され, 精細管障害が軽減されると述べている。今回著者は, 精子形成に精細管内 androgen が重要な役割を果たしていることを確認するために, ラット精巣内に男性ホルモン懸濁液, すなわち testosterone microcrystal suspension (Tmcs) を種々の濃度・時期で局所投与し, その作用について組織学的, 内分泌学的に詳細な検討を行った。さらに比較として精細管内 T を抑制すると考えられる外因性 testosterone, すなわち testosterone propionate (TP) の全身投与についても, 種々の濃度・期間で検討

を行った。

対象および方法

I. 実験方法 (Fig. 1)

実験には 11 週齢の Sprague-Dawley 系雌性ラットを使用した。対象ラットを A~I の 9 群に分け, C~I 群は Tmcs あるいは TP の投与量により 2~4 のサブグループに分けた。使用したラット数は AB 群それぞれ 4 頭, C 群以下は 1 サブグループにつき 4 頭とした。以下に各群の内容を記す。

A. control 群: EDS の溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) を生理的食塩水で 4 倍に希釈し, 2.0 ml/kg を実験第 8 日目にエーテル麻酔下に腹腔内投与した。

B. EDS 群: EDS は, Jackson ら⁶⁾の方法に従って作成し, dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解したのち, DMSO の 3 倍量の生理的食塩水で希釈し, 75 mg/2 ml となるように調整し, これをエーテル麻酔下に 75 mg/kg 腹腔内投与した。

C. Tmcs 群: T を精巣内に局所投与するために, Tmcs を用いた。これは, T 原末 300 mg に対してアセトン 1 ml で溶解加温したものを冷水中でマイクロクリスタル化し, さらにグラスフィルターで濾過した後, 界面活性剤である Tween 添加生食水に入れ, 再懸濁した後, 滅菌して作成した。この群は Tmcs を実験第 8 日目にエー

EDS のラット精巣障害に対する T の防御的役割に関する研究

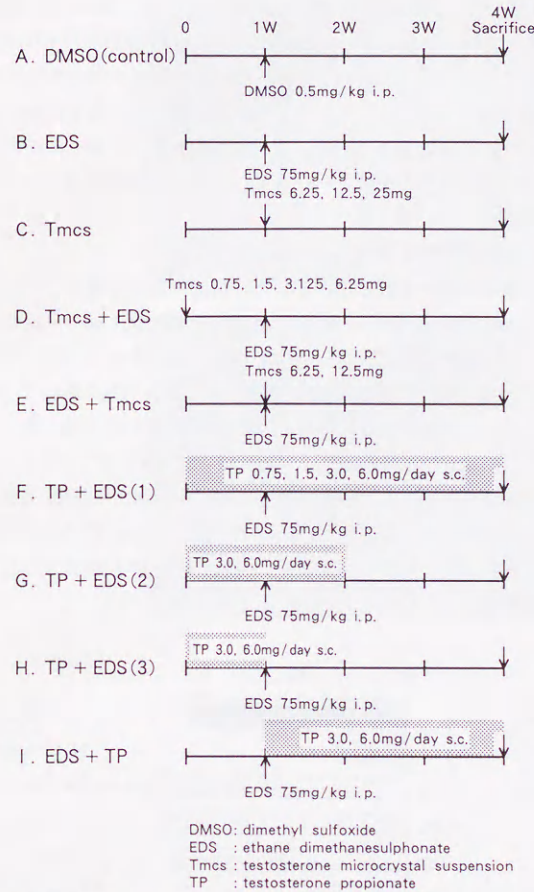


Fig. 1 Schedule of the experiment. The subjects were given DMSO or EDS on the 8th day and were sacrificed on the 28th day of the experiment. (groups A and B) The administration of Tmcs was divided into three major groups (C~E) while the administration of TP was divided into four major groups (F~I)

テル麻酔下に精巣内に 23 G 注射針を用いて注入した。Tmcs の投与量は 6.25, 12.5, 25 mg/NS 0.25 ml の 3 種類とした。

D. Tmcs+EDS 群: 実験第 1 日目に Tmcs を精巣内に注入し, 第 8 日目に EDS を投与した。Tmcs の投与量は 0.75, 1.5, 3.125, 6.25 mg/NS 0.25 ml の 4 種類とした。

E. EDS+Tmcs 群: 実験第 8 日目に Tmcs を精巣内に注入し, 同時に EDS を投与した。Tmcs の投与量は 6.25, 12.5 mg/NS 0.25 ml の 2 種類とした。

F. TP+EDS(1)群: TP を実験第 1 日目から 28 日目までの毎日 1 日 1 回皮下投与し, 第 8 日目に EDS を投与した。TP の 1 回投与量は 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 mg の 4 種類とした。

G. TP+EDS(2)群: TP を実験第 1 日目から 14 日目まで連日投与し, 第 8 日目に EDS を投与した。TP の 1 回投与量は 3.0, 6.0 mg の 2 種類とした。

H. TP+EDS(3)群: TP を実験第 1 日目から 7 日目まで連日投与し, 第 8 日目に EDS を投与した。TP の 1 回投与量は 3.0, 6.0 mg の 2 種類とした。

I. EDS+TP 群: 実験第 8 日目に EDS を投与し, 同日より 28 日

目まで TP を連日投与した。TP の 1 回投与量は 3.0, 6.0 mg の 2 種類とした。

屠殺は実験開始後 29 日目にエーテル麻酔下に行い, まず下大静脈より採血した後, 精巣および副性器を摘出した。そして精巣および副性器重量, 血中 T・LH・FSH 濃度, 精細管内 T および 5 α -dihydrotestosterone (DHT) 濃度の測定を行った。また, 精細管直径を計測し, 組織学的に精細管障害の程度を評価した。以上について各群の間で比較検討を行った。

II. 精細管内 androgen 濃度測定

精細管分離は穂坂らにより報告された方法⁷⁾に従い, 精細管内 T および DHT 濃度は, Sephadex LH-20 microcolumn chromatography を用いた RIA 法により測定した⁸⁾。

III. ラット血清 T, LH, FSH 濃度測定

血清 T は二抗体法による RIA キットにて測定し, LH, FSH に関しては, National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIADDK) より提供を受けた rat LH, FSH 測定用 RIA キットにより, RP-2 スタンダードを用いて測定した。

IV. 精細管直径測定

オリンパス社製デジタル測微接眼装置 OSM-D4 ($\times 400$) を用いて既に報告した方法で測定した⁵⁾。

V. 統計学的有意差検定

比較する 2 群の分散が等しい場合は t 検定を, 等しくない場合は Welch 検定によった。

結 果

I. 体重

屠殺時のラットの体重は 480~520 g と実験開始時に比較してばらつきが認められたが, 各群間に有意な変動は認められなかった。

II. 精巣, 副性器重量 (Table 1)

精巣重量に関してであるが, control 群に比較して, EDS 群で有意に精巣重量の低下を認めた。

Tmcs 単独群 (Tmcs 群) では, いずれの投与量においても control 群と差は認めなかった。Tmcs を前投与し 1 週後に EDS を投与した群 (Tmcs+EDS 群) では, Tmcs 0.75 mg のみ EDS 群と同程度の精巣重量の低下を認めた。また EDS+Tmcs 同時投与群 (EDS+Tmcs 群) でも, EDS 群とほぼ同様に精巣重量の低下を認めた。

一方, TP 投与群では, TP+EDS (1) 0.75, 1.5 mg 群, TP+EDS (3) 3.0 mg 群に精巣重量の軽度の低下を, また EDS+TP 群では著明な低下を認めた。

精囊重量に関しては Tmcs 群では control 群と差は認めなかったが, Tmcs+EDS 群および EDS+Tmcs 群とも EDS 群とほぼ同等の著明な低下を認めた。一方, TP 群に関しては TP 投与量が増加し, 期間が延長するに従い, 増加傾向を示し, さらに control 群よりも有意の増加を認める群もあった。その他, 精巣上体・前立腺などの副性器の重量についても, 同様の傾向を認めた。

III. 血中ホルモン濃度 (Table 2)

血中 T 濃度は, control 群と比較して Tmcs 群は差がなく, 一方, Tmcs+EDS 群および EDS+Tmcs 群では有意に低値を示し, EDS 群と差は認められなかった。

また TP+EDS 群においては, 投与量, 投与期間に相関して末梢

血中 T 濃度の上昇を認めた。
LH 濃度に関して、Tmcs 群は control 群とほとんど差はみられ

Table 1 Comparison of the weight of the testicle and seminal vesicle (g).

Experiment	testicle	seminal vesicle
A. DMSO (control)	1.77±0.14	1.62±0.09
B. EDS	1.10±0.22*	0.92±0.15*
C. Tmcs 6.25mg 12.5mg 25mg	1.48±0.09 1.57±0.13 1.43±0.22	1.36±0.15 1.55±0.15 1.46±0.13
D. Tmcs+EDS 0.75mg 1.5mg 3.125mg 6.25mg	1.12±0.22* 1.40±0.25 1.31±0.34 1.33±0.10	0.72±0.37 1.09±0.22* 0.84±0.07* 0.85±0.31*
E. EDS+Tmcs 6.25mg 12.5mg	1.02±0.17* 1.04±0.14*	0.73±0.24* 0.82±0.14*
F. TP+EDS (1) 0.75mg 1.5mg 3.0mg 6.0mg	1.48±0.11 1.53±0.18 1.78±0.11 1.68±0.10	1.15±0.16* 1.57±0.31 2.26±0.27* 2.64±0.36
G. TP+EDS (2) 3.0mg 6.0mg	1.55±0.11 1.65±0.16	1.44±0.13 2.17±0.29
H. TP+EDS (3) 3.0mg 6.0mg	1.30±0.06* 1.62±0.07	0.59±0.13* 1.22±0.05*
I. EDS+TP 3.0mg 6.0mg	1.20±0.13 1.26±0.11	1.98±0.21 2.26±0.24*

(mean±s. d. n=4) *p<0.01

Table 2 Comparison of the serum testosterone levels (ng/ml), serum LH levels (mIU/ml) and serum FSH levels (mIU/ml).

Experiment	T	LH	FSH
A. DMSO (control)	5.2±1.3	0.49±0.14	4.16±0.87
B. EDS	0.8±0.6*	2.67±1.00	7.86±1.72*
C. Tmcs 6.25mg 12.5mg 25mg	6.1±3.9 5.8±2.1 4.4±3.8	0.88±0.35 0.41±0.20 0.36±0.05	3.70±1.01 5.18±1.72 4.90±1.65
D. Tmcs+EDS 0.75mg 1.5mg 3.125mg 6.25mg	1.2±1.1* 1.4±1.0* 1.7±0.5* 1.5±1.3*	2.34±0.87 2.53±0.73 2.92±1.23 2.48±0.28*	6.08±1.70 5.91±2.30 4.10±0.71 4.98±1.50
E. EDS+Tmcs 6.25mg 12.5mg	0.9±0.7* 1.0±0.2*	3.05±1.99 2.67±0.71*	7.56±1.75 9.59±2.28*
F. TP+EDS (1) 0.75mg 1.5mg 3.0mg 6.0mg	3.1±0.4 5.5±2.1 12.2±1.4* 18.2±7.4	0.32±0.12 0.22±0.09 0.24±0.10 0.25±0.14	1.96±0.86 2.62±0.98 1.85±0.40* 2.54±0.34
G. TP+EDS (2) 3.0mg 6.0mg	3.3±0.1 7.1±1.1	0.27±0.17 0.26±0.15	2.26±0.76 3.06±1.24
H. TP+EDS (3) 3.0mg 6.0mg	2.6±0.6 4.1±1.0	0.34±0.42 0.15±0.12	3.12±0.38 2.85±0.61
I. EDS+TP 3.0mg 6.0mg	13.3±4.4 17.7±7.7	0.29±0.09 0.17±0.12	2.22±1.02 2.16±0.22

(mean±s. d. n=4) *p<0.01

なかったが、Tmcs+EDS 群および EDS+Tmcs 群は EDS 群とほぼ同等の著明な上昇を示した。一方、TP+EDS 群および EDS+TP 群はいずれも control 群と同等かあるいはやや低下傾向を認めた。

FSH 濃度は EDS 群、EDS+Tmcs 群に有意の上昇を認め、また Tmcs+EDS 0.75 mg に軽度の上昇がみられた。しかし、その他の Tmcs+EDS 群および TP+EDS 群、EDS+TP 群では control 群と差は認められなかった。

IV. 組織学的効果 (Fig. 2, 3a~d)

精巣障害の程度をみる指標として、精細管直径を測定した (Fig. 2)。Control 群と比較して EDS 群は著明な精細管直径の短縮を示したが、Tmcs 群は差を認めなかった (Fig. 3a)。Tmcs+EDS 群に関して、1.5 mg 以上で精細管直径は保たれていた (Fig. 3b)。しかし、EDS+Tmcs 群は著明な精細管直径の短縮を認めた (Fig. 3c)。

一方、TP 投与群では、TP+1 週間後 EDS 投与群では 3.0 mg 以上で投与期間に関係なく精細管直径は保たれており (Fig. 3d)、さらに 1.5 mg 投与、すなわち TP+EDS (1) 1.5 mg 群で軽度防御効果が認められた。しかし、EDS+TP 群は EDS 群と差はみられず、著明な精細管障害を示した。

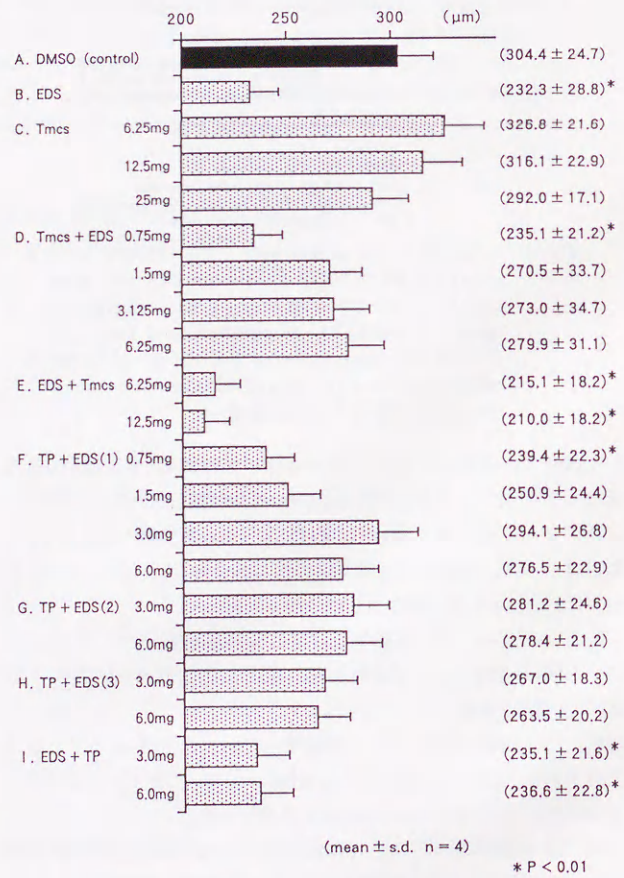


Fig. 2 Comparison of the diameter of the seminiferous tubules (μm). As compared with the DMSO (control) group, significant decreases were observed in the EDS group, 0.75mg Tmcs levels in the Tmcs+EDS group, 6.25mg Tmcs levels in the EDS+Tmcs group, 12.5mg Tmcs levels in the EDS+Tmcs group, 3.0mg TP levels in the EDS+Tmcs group, and 6.0mg TP levels in the EDS+Tmcs group.

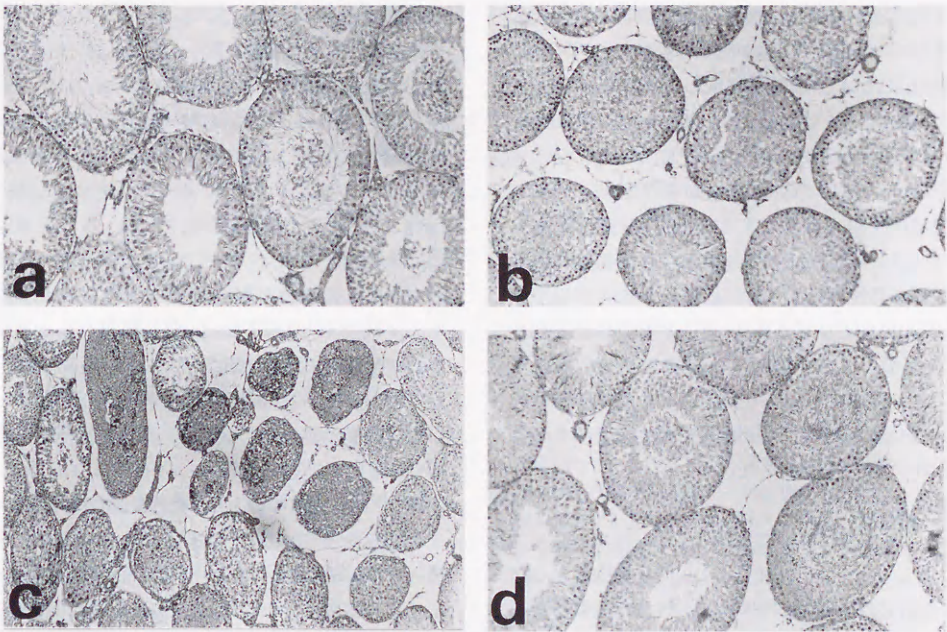


Fig. 3 The histological findings of the testis. Compared with the DMSO (control) group, no significant change was observed in the 12.5mg Tmcs levels in the Tmcs group (a), no atrophy of the seminiferous tubule was noted in the 1.5mg Tmcs levels in the Tmcs+EDS group (b), marked atrophy was noted in the 12.5mg Tmcs levels in the EDS+Tmcs group (c), and no atrophy was noted in the 6.0mg TP levels in the TP+EDS (2) group (d). (H&E, ×100)

Table 3 Comparison of the intratubular testosterone levels (ng/g. t. w.) and intratubular DHT levels (ng/g. t. w.).

Experiment	T	DHT
A. DMSO (control)	273.8±92.8	27.3±19.1
B. EDS	19.5±7.3*	4.4±2.8
C. Tmcs 6.25mg 12.5mg 25mg	288.5±97.2 294.5±116.8 418.8±135.1	21.6±17.5 16.7±14.2 8.4±9.2
D. Tmcs+EDS 0.75mg 1.5mg 3.125mg 6.25mg	36.1±18.4* 48.0±17.4* 59.4±21.0* 70.7±34.9*	7.5±2.3 5.8±2.0 14.6±5.0 10.7±9.5
E. EDS+Tmcs 6.25mg 12.5mg	51.1±43.2* 93.3±77.8*	3.6±5.1 4.0±5.9
F. TP+EDS (1) 0.75mg 1.5mg 3.0mg 6.0mg	1.8±1.2* 2.2±1.9* 2.1±1.3* 2.7±1.8*	0.5±0.4 0.7±0.4 1.6±1.1 1.4±0.9
G. TP+EDS (2) 3.0mg 6.0mg	1.1±0.5* 2.1±1.7*	0.5±0.3 0.8±0.5
H. TP+EDS (3) 3.0mg 6.0mg	5.0±2.6* 5.3±2.8*	0.8±0.4 1.3±0.8
I. EDS+TP 3.0mg 6.0mg	1.9±0.7* 3.0±2.5*	1.4±0.9 2.0±1.1

(mean±s. d. n=4) *p<0.05

V. 精細管内 androgen 濃度 (Table 3)

精細管内 T 濃度についての検討では、Tmcs 群は control 群と同

等かあるいは上昇を示したが、EDS 群は control 群の約 1/14 と著明な低下を示した。Tmcs+EDS 群は EDS 群の約 2 倍の濃度を、また、EDS+Tmcs 群は約 2～4 倍の濃度を認めた。一方、TP 群はすべて EDS 群よりもさらに著明な低値を示した。精細管 DHT 濃度については、精細管内 T とは異なり、Tmcs 群と control 群に比較して低下傾向を示した。また Tmcs+EDS 群および EDS+Tmcs 群は EDS 群よりやや上昇傾向を認めた。

一方、TP 群では精細管内 T 濃度と同様、EDS 群より低い、著明な低下を認めた。

考 察

男性不妊症の過半数は特発性と考えられており、現在解明のための研究がなされつつあるが、その研究においてはヒトから採取できる精巣のサンプル量に制限があること、さらに特発性不妊症に類似した動物モデルの作成が困難であることなどが大きな障壁となっている。

ラットで精巣機能を検討する際、薬剤によるラット精巣障害のほとんどがホルモン環境に影響を与えないものであり、著者らも Adriamycin をラットに投与して精巣障害を惹起させ、検討を加えたが、精細管内 androgen 濃度に影響は認められなかった⁹⁾。最近、Morris ら⁹⁾、Jackson ら⁹⁾ は、EDS が Leydig 細胞機能を選択的に障害して、精子形成障害をきたすことを報告している。教室の永井⁹⁾ は EDS が精細管内 androgen 濃度を著明に低下させることを報告している。Jackson ら⁹⁾、永井⁹⁾ は hCG 投与、T 全身投与で EDS による精巣障害を防御できることを報告しており、さらに永井⁹⁾ は Tmcs 精巣内注入でも EDS による精巣障害を防御できると述べて

いる。さらに教室の大枝⁹⁾はhCGによる防御作用の詳細な検討で、5IU/日の少量投与でEDSの精細管障害が防御可能であり、EDSによる精細管障害が発生したときには大量のhCG投与が必要であるとともに、精子形成を維持するためには約50 ng/g. t. w. (gram tissue weight)以上のT濃度が必要であると推察している。

ヒトにおける検討で、前立腺などのandrogen標的臓器とは異なり、精細管内ではTがDHTより優位であること、精細管内Tは末梢血中LH、FSHおよびLeydig細胞より分泌されるT濃度に影響を受けないこと、および特発性不妊症では精細管内Tのみが低下を示す症例が存在することが判明している⁸⁾。そこで著者は精子形成に対するandrogenの役割を詳細に解明する目的で精巣内に直接Tmcsを注入して、Tを持続的に放出させて、EDSの精巣障害に対する影響を検討した。さらに精細管内androgen濃度を低下させるT全身投与の影響についても比較検討した。

I. Tmcs 精巣内注入について

最初にTmcs注入による影響について検討したが、精巣重量および精細管直径に関しては、control群と差はなく、注入操作および高濃度のT放出による障害はないことが判明した。さらに精囊重量、血中LH、FSHおよびT濃度についてもcontrol群と差はなく、精巣内に注入されたTmcsが末梢血中にほとんど移行しないことも判明した。また精細管内T濃度についてTmcs 25 mg群を除いてはcontrol群とほぼ同じレベルであったことは、TmcsのT放出が徐放性であることが推察される。ただ厳密な意味ではTmcs注入後の精細管内T濃度の推移をみるべきである。著者はTmcs注入1週間後に屠殺した1頭で、精細管内T濃度を検討したが、精巣内に存在するTmcsを本実験系の分離法では完全に除去できず、20 mcg/g. t. w.以上の異常高値を示した。このことより、本実験系における精細管内T濃度の推移については検討をあきらめざるをえなかった。一方、精細管内DHT濃度に関しては、control群と比較して低値であった。この理由については十分な考察は困難であり、精巣間質内あるいは間質と精細管におけるparacrine的調節によるものと推察するが、今後の詳細な検討が必要である。

II. TmcsのEDS精巣障害に対する防御効果について

従来Tは精子形成に重要な働きをしていると言われながら、精子形成維持に必要なT濃度がどの程度なのかは不明である。Anthonyら¹⁰⁾は下垂体摘除ラットにおける実験で弱androgen作用を有するpregnenoloneを投与することにより、精巣上体におけるandrogen binding protein (ABP)および精子受精能が維持されることを報告している。このことは精子形成に関し、全身投与されたpregnenoloneから変換された微量のTが精細管に移行し、T濃度を維持しているものと推察される。また大枝⁹⁾は前述したごとくEDS腹腔内投与ラットの精巣障害に対して、hCGを投与にて精細管内T濃度が約50 ng/g. t. w.以上あれば防御効果を示しており、精子形成維持には50 ng/g. t. w.以上の精細管内Tが必要であると述べている。

またTurnerら¹¹⁾は著者と同様にTを精巣内に注入して、GnRH antagonistによる精巣障害に対する防御効果について検討している。精巣間質液中T濃度測定を行い、control群とほぼ同じ濃度(100ng/ml)が得られるT微粒結晶20 mgを精巣内に注入することにより、GnRH antagonistによる精巣重量および精子産生量の減少

が防御できたと報告している。

今回の成績でD群のTmcs 1.5 mg以上では、精細管直径が保たれ、EDS精巣障害がある程度防御可能であった。このときの精細管内T濃度をみるとTmcs 1.5 mg以上群では48.0~70.7 ng/g. t. w.であるのに対し、防御できなかった0.75 mg群は36.1 ng/g. t. w.と50 ng/g. t. w.以下であったことより、精子形成維持には50 ng/g. t. w.の精細管内T濃度が必要であると考ええる。しかしEDS+Tmcs同時投与群において、精細管内T濃度が50 ng/g. t. w.以上を示したにもかかわらず、EDSの精巣障害は防御できなかった。一方、大枝⁹⁾はEDS+hCG同時投与群において、hCG 100 IU以上の大量投与することによりEDSの精巣障害をある程度防御できたと報告している。このことを考え併せるとLeydig細胞からはT以外に精子形成に重要な役割を果たす因子を分泌していることが推察される。

III. TP 全身投与のEDS精巣障害に対する防御効果について

Tを全身投与すると、精巣における内因性androgenは抑制され、精細管T濃度も低下する¹²⁾。臨床的にも反跳現象を利用したT療法はよく知られている¹³⁾。ところで、Jacksonら⁶⁾、永井³⁾はTP全身投与にてEDSによる精巣障害に対して防御効果を示すと報告しているが、これは従来の内因性androgenが精子形成に重要な役割を果たしているという概念と相反するものである。そこで著者はTPの投与量および投与期間を変えて詳細に検討を行った。今回の成績では、TP全身投与により従来の報告通り、投与量、投与期間に関係なく精細管内TはEDS群よりもさらに有意の低値を示した。しかし、精細管直径に関しては、EDS投与1週間前よりTPを1.5 mg以上投与した群では投与期間に関係なく十分な防御効果を認めた。一方、EDS+TP同時投与群ではEDS群よりさらに著明な精細管内T濃度の低下を示すとともに精細管萎縮がみられた。

TPの前処置がEDSの精巣障害を防御した理由については今後のさらに詳細な検討が必要であるが、現時点で推察を述べれば、全身投与されたTが当初、精巣に移行してparacrineにSertoli細胞を刺激して精子形成調節因子を分泌する¹⁴⁾、すなわちプライミングの役目を果たし、その後、直ちに間脳下垂体系を抑制して内因性Tを低下させるものと考ええる。最近、Sharpeら¹⁵⁾はラット精細管を造精過程の第2~5期、第6~8期、第9~12期に分けて、EDSおよびT esters 25 mgを同時に投与して精細管の蛋白合成について検討している。EDS投与4日後の成績では、第6~8期においてのみEDSが精細管の蛋白合成を著明に抑制するが、T esters投与により完全に防御できると報告している。この成績と著者らの成績とのdiscrepancyについての考察は非常に難しいが、Sharpeら¹⁵⁾は25mgと大量のTを投与していること、また著者はEDS投与の後にTPを投与したためにタイムラグが生じたことによりTがSertoli細胞を刺激することができなかったことによるものではないかと考える。

IV. 精細管内DHT濃度について

前立腺、精囊などのandrogen標的臓器では、DHTとandrogen receptor (AR)とが結合して蛋白合成がなされ男性ホルモン作用が発揮される。また精巣上体頭部に関しても、主たるandrogenはDHTであり精巣上体間質より精巣上体管内へ多量に移行し、精子成熟に関与するといわれている¹⁶⁾。一方、精細管内におけるDHTの

役割については、未だ判然としないが、ARはラットSertoli細胞に存在し、造精過程第9~12期、第13~1期に関与するといわれている¹⁷⁾¹⁸⁾。ヒト精細管内ARについても検討され、特発性男子不妊症ではAR低値例が存在するが、AR量と精細管内DHT濃度との間に関連性のないことが報告されている¹⁹⁾。今回の成績で精細管内DHT濃度は、androgen標的臓器と異なりTより低値であり、EDS投与により著明に低下したが、Tmcs+EDS群およびEDS+Tmcs群ではEDS群よりやや高値を示した。またhCG前投与群では大枝⁹⁾が述べているごとく精細管内DHT濃度はEDS群よりやや高値を示している。このことは精巣あるいは精細管内に存在する5 α -reductaseはわずかであり、さらにその局在はLeydig細胞が主体ではあるが⁷⁾²⁰⁾²¹⁾、Sertoli細胞を中心とした精細管内にも存在し²⁰⁾、またEDS投与によっても3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, 17 α -hydroxylaseに比較して10%ぐらいの酵素活性が温存されるためと考える²¹⁾。しかし、精子形成におけるDHTの意義については今回の検討でも見いだすことができず、現時点では山本¹⁶⁾が述べてるようにDHTの作用部位は精巣上体と考えるべきであろう。

V. Tmcs 精巣内移植療法の臨床応用について

特発性男子不妊症の病因および治療については明確な解答がえられていないのが現状であるが、一部には精子形成過程でandrogenが不足している症例もあるのではないかと推察する。精子形成におけるTの役割は動物実験より精細管内の栄養細胞であるSertoli細胞の供給機能(精細管周囲のmyoid cellを介するかもしれないが)を維持することといわれている^{22)~24)}。また臨床的には特発性男子不妊症の一部に精細管内T濃度低値例が存在し、Leydig細胞より分泌される内因性Tにある程度依存するが、末梢血中LH、FSHおよびT濃度を反映するものではないことが報告されている²⁵⁾²⁶⁾。T精巣内移植治療法に関しては、Oshimaら²⁷⁾が精巣内へTペレットを外科的操作により移植し、その有効性について報告しているが、Tmcs注入は外科的侵襲が少なく、より簡便な方法と考える。

しかしTmcs精巣内移植療法の臨床応用については今後解決しなければならない重要な問題点がある。その点を挙げると、①精細管内T濃度を測定するために、男子不妊症患者すべてに精巣生検が必要であるのか②1回のTmcs精巣内移植療法により精子形成能が維持されるのか③EDSにより惹起された不妊ラットが精細管内T濃度が低値を示す特発性男子不妊症と同一モデルとなり得るのかなどである。とくに③に関し、EDSにより惹起された精巣障害は45日で自然回復するといわれており⁴⁾²⁸⁾、またEDS+Tmcs同時投与群で精巣障害が防御できなかったこと、すなわち特発性不妊症と同様の状況モデルであるEDSにより障害をすでに受けた精巣では、Tmcs注入では回復出来ないこと、さらにT全身投与によって精巣障害が防御できることなどの問題点が挙げられる。今後さらに検討を重ねていくつもりである。

結 語

造精機能に対する精細管内androgenの役割を追及するために、EDS不妊ラットを用い、ラット精巣内にTestosterone microcrystal suspension (Tmcs)を注入し、その防御的効果を検討した。併せて、testosterone propionate (TP)を全身投与し検討を行った。

1. Tmcs精巣内注入による直接精巣障害は認められず、また血

中ホルモン濃度にも影響を与えなかった。

2. TmcsをEDS投与前に投与した群では、精細管内T濃度を上昇させ、EDSによる精細管障害に対する防御的效果を示し、造精機能にtestosteroneが重要な因子の一つであり、さらにその精細管内濃度は50 ng/g. t. w.必要であることが示唆された。

3. TPをEDS投与前に投与すると、精細管内androgenはむしろ抑制傾向にあるにもかかわらず、防御的效果を示した。これは、全身投与されたtestosteroneがある程度精巣に移行し、精子形成調節因子を刺激する、いわゆるプライミングの役割を果たし、その後、間脳下垂体系を抑制することにより内因性testosteroneを低下させたものと推察された。

(稿を終えるにあたり、御指導および御校閲を賜った恩師大森弘之教授に深謝いたします。また、研究を直接御指導いただいた大橋輝久講師(現岡山赤十字病院泌尿器科)に感謝いたします。さらに貴重な御助言および御協力を頂いた神戸川明帝京大学産婦人科教室助教授(現帝国臓器製薬株式会社)、当教室大枝忠史講師、そして測定に御協力いただいた湯川厚巳技官に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第35回日本不妊学会総会、第79回日本泌尿器科学会総会および第10回日本アンドロロジー学会において発表した。)

文 献

- Steinberger, A. et al.: Mammalian testes in organ culture. Exp. Cell Res. **36**: 19-27, 1964.
- 大橋輝久・他: 精細管内Androgen濃度の研究 第2報. 日不妊会誌. **33**: 651-656, 1988.
- 永井 敦: Ethane dimethane sulphonate (EDS)投与によるラット造精機能障害およびその防御的薬剤の検討. 日泌尿会誌. **83**: 1322-1329, 1992.
- Morris, I. D. et al.: Ethylene dimethanesulfonate destroys Leydig cells in the rat testis. Endocrinology **118**: 709-719, 1986.
- 大枝忠史: Ethane dimethanesulphonate (EDS)投与によるラット造精機能障害の検討—hCGの防御的役割について—. 日泌尿会誌. **84**: 1026-1035, 1993.
- Jackson, C. M. and Jackson, H.: Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethanesulphonate. J. Reprod. Fertil. **71**: 393-401, 1984.
- 穂坂正彦・他: ヒト分離精細管におけるtestosteroneの代謝. 日不妊会誌. **28**: 143-150, 1983.
- 入江 伸・他: 精細管内Androgen濃度の研究 第一報. 日不妊会誌. **33**: 236-243, 1988.
- 永井 敦・他: Adriamycin投与ラットにおける造精機能障害に関する内分泌学的、組織学的検討. 日不妊会誌. **35**: 573-577, 1990.
- Anthony, C. T. et al.: Investigations on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the hypophysectomized, pregnenoloneenolone-injected rat. Endocrinology **114**: 1419-1425, 1984.
- Turner, T. T. et al.: On the maintenance of male fertility in the absence of native testosterone secretion: site-directed hormonal therapy in the rat. Fertil. Steril. **54**: 149-156, 1990.
- 入江 伸・他: 精細管内Androgen濃度の研究 第三報. 日不妊会誌. **34**: 908-913, 1989.
- 瀧原博史: 特発性男子不妊症に対するTestosterone Clomiphene投与療法. 日不妊会誌. **25**: 101-111, 1980.
- Desjardins, C.: Endocrine signaling and male reproduction. Biol. Reprod. **24**: 1-21, 1981.

15) Sharpe, R. M. et al. : Relative roles of testosterone and the germ cell complement in determining stage-dependent changes in protein secretion by isolated rat seminiferous tubules. *Int. J. Androl.* **16** : 71-81, 1993.

16) 山本雅憲：精子成熟に及ぼすアンドロジェンの微小環境とその調節因子. ホと臨床. **39** : 95-98, 1991.

17) Grootegoed, J. A. et al. : Absence of a nuclear androgen receptor in isolated germinal cells of rat testis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **9** : 159-167, 1977.

18) Isomaa, V. et al. : Nuclear androgen receptors in different stages of the seminiferous epithelial cycle and the interstitial tissue of the rat testis. *Endocrinology* **116** : 132-137, 1985.

19) 大橋洋三：男子不妊症における精細管内アンドロゲンレセプターの研究. 日泌尿会誌. **81** : 1686-1693, 1990.

20) Dorrington, J. H. and Fritz, I. B. : Cellular localization of 5 α -reductase and 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase in the seminiferous tubule. *Endocrinology* **96** : 879-889, 1975.

21) O'Shaughnessy, P. J. and Murphy, L. : Steroidogenic enzyme activity in the rat testis following Leydig cell destruction by ethylene-1, 2-dimethanesulphonate and during subsequent Leydig cell regeneration. *Endocrinology* **131** : 451-457, 1991.

22) 大島博幸：アンドロゲン結合蛋白. 医学のあゆみ **132** : 615-620, 1985.

23) Skinner, M. K. et al. : Purification of a paracrine factor, P. Mod. S, produced by testicular cells that modulates Sertoli cell function. *J. Biol. Chem.* **263** : 2884-2890, 1988.

24) Buch, J. P. et al. : Partial characterization of a unique growth factor secreted by human Sertoli cells. *Fertil. Steril.* **49** : 658-665, 1988.

25) 入江 伸：特発性男子不妊症における精細管内 androgen 濃度の研究. 日泌尿会誌. **81** : 855-861, 1990.

26) 大枝忠史・他：特発性乏精子症患者における精細管内テストステロン濃度の臨床的検討. 日不妊会誌. **36** : 642-647, 1991.

27) Oshima, H. et al. : Clinical evaluation of testosterone pellet implantation in the testis as a treatment of male infertility. *In* Troen, P. and Nankin, H. R. : The Testis in Normal and Infertile Men. 1st ed. p. 561, Raven Press, New York, 1977.

28) Rommerts, F. F. G. and Hoogerbrugge, J. W. : In vitro effects of ethylene dimethane sulfonate (EDS) on isolated Leydig cells. *In* Boland, B. et al. : Annals of the New York Academy of Sciences. vol. 513, Cell Biology of the Testis and Epididymis. pp. 401-404, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.

(1994 年 10 月 6 日受理)

