

Testosterone 投与後の“はねかえり現象” に関する実験的研究

—Flow cytometry (FCM) による睪丸組織内 DNA 量分布測定—

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

磯 山 理 一 郎

DNA FLOW CYTOMETRIC EVALUATION OF SPERMATOGENESIS OF THE REBOUND PHENOMENON WITH TESTOSTERONE IN ADULT MALE RATS

Riichiro ISOYAMA

From the Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine

(Director: Prof. J. Sakatoku)

To examine the effects of the rebound phenomenon on the rat testis, adult male Wistar rats were treated with 0.3 mg/day of testosterone propionate (TP) for 39 days.

Observations were made on 0, 26, 52, 78 and 104 days following the TP treatment. The response of the testis was investigated by determining the testicular weight and DNA flow cytometric analysis in the testicular cells.

The % haploid cells (spermatids) increased at the 52nd and the 78th day after TP treatment, and were equal to the rate of the control group.

The % diploid cells and % tetraploid cells showed no change.

The duration of the rebound phenomenon was about 2–2.5 months.

Key words: Rebound phenomenon with testosterone, FCM

緒 言

近年、不妊症夫婦において男性側因子に対する認識が高まり、男子不妊症として受診する患者が漸増しているが、病因は不明なものが多いため、確かな治療法を容易には決定できず、現在なおも模索中というのが現状である¹⁻³⁾。

1950年 Heller ら⁴⁾が正常成人男子に多量のテストステロン (以下T) を長期間投与すると睪丸組織では精細管上皮に変性萎縮を起し、精液所見では高度の乏精子症や無精子症になるがT投与中止後6~31ヵ月後に睪丸組織の回復・改善を認め“はねかえり現象”のあることを報告し1951年 Heckel ら⁵⁾により5例の乏精子症患者に臨床応用され改善を認めて以来男子不妊症の治療法の一つとして広く利用されている⁶⁻⁸⁾。

このT投与後の“はねかえり現象”に関して、その発現時期における睪丸造精機能に関する実験的報告は少なく、わずかに、1979年那須⁹⁾が、ラットに0.3 mgのTを39日間連日投与し、投与終了後78日目に“はねかえり現象”を起した時期において、睪丸内精上皮細胞のうち、pachytene spermatocyte 及び step 7 spermatid の数が stage VII の精細管では対照群よりも増加していたことを報告し、同様の実験系において、本現象の内分泌学的本体は、1981年藤井¹⁰⁾が feed back 機構を介してのみ起こるのではなく、睪丸内T濃度が高く維持されるためとし、1983年清水¹¹⁾が、睪丸内T濃度の高値は LH を trigger として、17 α -hydroxylase が律速酵素として働いているとしているのみである。

今回、著者は、flow cytometry (以下 FCM) に

て睾丸組織内 DNA 量分布を測定することにより DNA 量を指標とした造精機能評価法¹²⁻¹⁵⁾を用いて、ラットによる同様の実験系にて、T投与中止後、那須の報告⁹⁾より更に長期にわたって睾丸造精機能を検討した。

材料及び方法

生後10~12週の Wistar 系成熟雄性ラット 40 匹を任意に 2 群に分け、一方には testosterone propionate (以下 TP) 0.3 mg を 0.2 ml のオリーブ油に溶解して39日間連日大腿部に皮下注射した。もう一方にはオリーブ油のみ 0.2 ml 同様に投与し対照群とした。TP 投与終了日、終了後26, 52, 78, 104日目と任意に各々各群 4 匹ずつエーテル麻酔下に採血屠殺した。なお、飼育 cage・実験順序も乱数表に従い任意とした。

測定

ラットの体重測定後直ちに両側睾丸摘出し、重量を測定した。同時に FCM による DNA 量分布測定用標本として、任意に決めた左側睾丸の中央部を採取し、橋本¹³⁾・川井^{14,15)}と同様の方法で Fig. 1 のごとく、mince 後 collagenase 処理にて遊離細胞とし、70% ethanol 固定後 ribonuclease, pepsin 処理後 50 µg/ml propidium iodide で核 DNA を蛍光染色し、FCM (Becton-Dickinson 社 FACS III) で各検体 5 × 10⁴ 個の細胞の DNA 量を測定し、DNA

ヒストグラムを得た。得られたヒストグラムは3峰性となり、各 peak の面積を計算し¹⁶⁾、haploid cell (1C), diploid cell (2C), tetraploid cell (4C) の細胞比率を算出し検討した。なお S phase は睾丸組織では極少数で変化に乏しいため、今回は検討から除外した。また diploid cell (2C) の標準サンプルとして、ラット脾臓を同様の処理方法にて用い、peak が 60 channel になるように FCM を調整した。

結 果

1) 睾丸重量 (Fig. 2)

両側睾丸重量の変化を見ると、対照群と比較して、投与終了後 0 日目では非常に有意に (p<0.001) 低

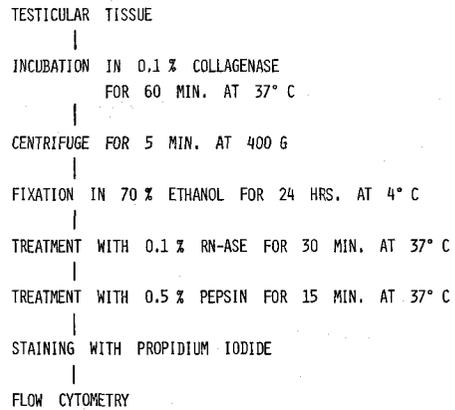


Fig. 1. Methods

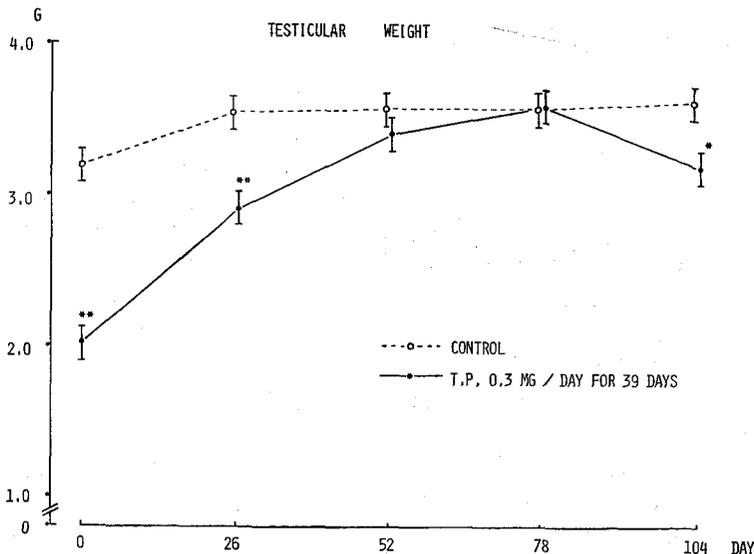


Fig. 2. Testicular weight, (*: P<0.05, **: P<0.01 in comparison between TP treatment group and control group) mean ± SE

値を示し、強い睾丸造精機能抑制を示唆する。TP 投与終了後26日目では0日目より有意の回復($p < 0.001$)を認めるが、まだ対照群より有意に ($p < 0.001$) 低値である。TP 投与終了後52日目及び78日目では対照群との差は認めず十分な睾丸造精機能の回復が示唆される。対照群ではオリーブ油投与終了後0日目において、以後の対照群より有意に ($p < 0.05$) 低値を示し、連日にわたる皮下注射の stress の影響が推察される。TP 投与終了後104日目では、投与終了直後か

ら上昇していた睾丸重量が、終了後78日目より有意に ($p < 0.05$) 低下しており、対照群と比較しても有意に ($p < 0.05$) 低下している。これは“はねかえり現象”が長く継続しなかったことを暗示しており、清水の報告¹¹⁾で睾丸内T濃度が、TP 投与終了後64日目で peak を示した後、漸次低下して終了後112日目で対照群とはほぼ同濃度となっていることとよく一致している。

2) % 1C (% haploid cells) (Fig. 3)

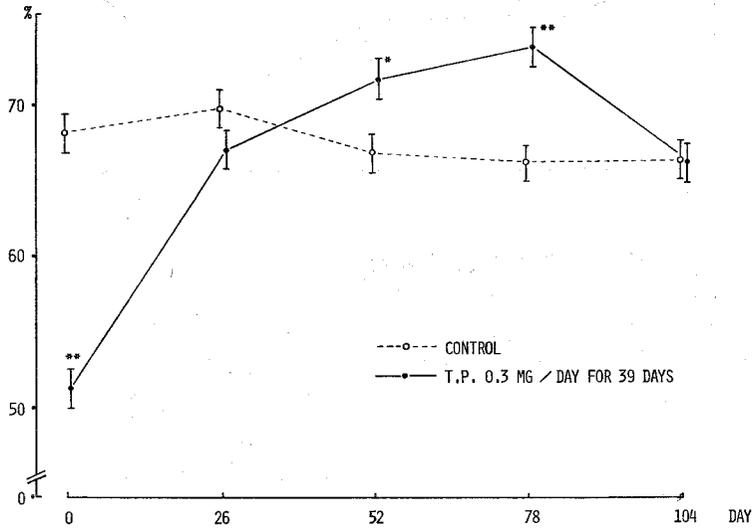


Fig. 3. %1C (%haploid cells), (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ in comparison between TP treatment group and control group) mean \pm SE

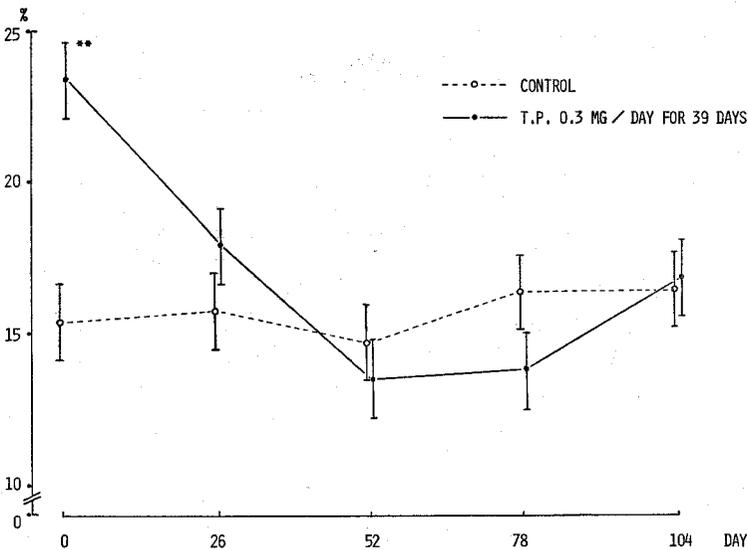


Fig. 4. %2C (%diploid cells), (**: $P < 0.01$ in comparison between TP treatment group and control group) mean \pm SE

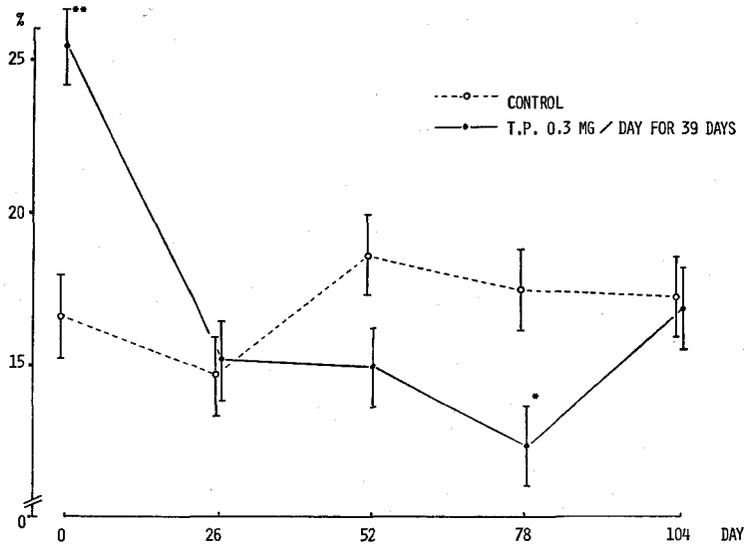


Fig. 5. %4C (%tetraploid cells), (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ in comparison between TP treatment group and control group) mean \pm SE

対照群では% haploid cells は変化を認めないが、TP 投与群では対照群と比較して、投与終了後0日目では非常に有意 ($p < 0.001$) に低値を示しているが、TP 投与終了後26日目には急速に回復し、52日目では有意 ($p < 0.05$) に、78日目では非常に有意 ($p < 0.001$) に高値を示し、“はねかえり現象”を確認することができる。しかし、この高値は長くは続かず104日目では既に対照群と同比率となっている。

3) % 2C (% diploid cells) (Fig. 4)

対照群では% diploid cells に変化を認めないが、TP 投与終了後0日目では、対照群と比較して非常に有意 ($p < 0.001$) に、TP 投与群の他の実験日の値と比較しても非常に有意 ($p < 0.01$) に高値を示している。しかし FCM による評価が細胞成分の比率による場合、% haploid cells が TP 投与終了後0日目で、かなりの低値を示していることから、その相対的変化である可能性があり、一概に diploid cell の絶対的増加と考えることには危険が伴う。

4) % 4C (% tetraploid cells) (Fig. 5)

% 2C の場合と同様、TP 投与終了後0日目では対照群と比較して非常に有意 ($p < 0.001$) に、TP 投与群の他の実験日の値と比較しても非常に有意 ($p < 0.001$) に高値を示している。また TP 投与終了後78日目では対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に低値を示している。この場合も、TP 投与終了後0日目と78日目では、% 1C の増減が大きいため、その相対的変化による変動を考慮に入れねばならない。

5) % 2C/2C + 4C (% diploid cells/non-haploid cells) (Fig. 6)

そこで、変動の大きい% 1C を除いた diploid cell と tetraploid cell のみで non-haploid cell 内での変化を検討すると、non-haploid cell における% diploid cells は、TP 投与群と対照群の間に差を認めず、ほとんど変化がないことが示される。

6) % 4C/2C + 4C (% tetraploid cells/non-haploid cells) (Fig. 7)

同様に non-haploid cell 内での% tetraploid cells においても、TP 投与群と対照群との間に差を認めず、ほとんど変化のないことが示された。

このことから diploid cell, tetraploid cell には絶対数における変動はないことが示唆される。

7) 1C/2C ratio (haploid cells/diploid cells ratio) (Fig. 8)

また、今回の実験において、構成する細胞成分^{13~15,17}から最も変動が少ない⁹⁾と思われる diploid cell を基準にとって、haploid cell との比を検討すると、TP 投与終了後0日目でやはり非常に有意 ($p < 0.001$) に低値を示し、26日目で急速な上昇を示し、52日目では平均値は対照群より高値であるが、有意な差を認めない。投与終了後78日目では非常に有意 ($p < 0.01$) に高値を示しており、“はねかえり現象”が確認できる。しかし、104日目では既に対照群と同比を示し、“はねかえり現象”の終焉が示唆される。% 1C の変化と比較すると、TP 投与終了後52日目での

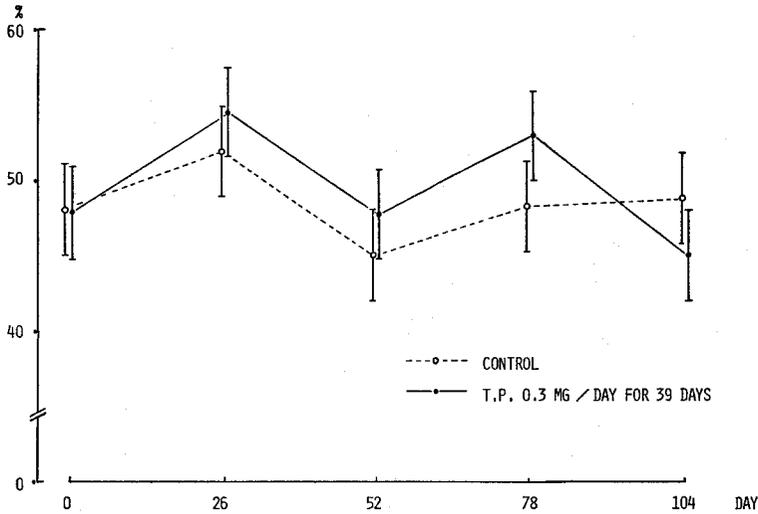


Fig. 6. %2C/2C+4C (%diploid cells/non-haploid cells), mean \pm SE

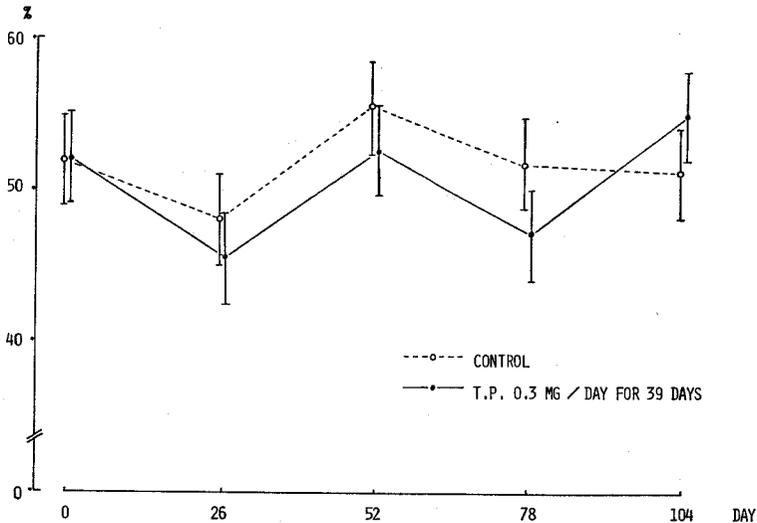


Fig. 7. %4C/2C+4C (%tetraploid cells/non-haploid cells), mean \pm SE

対照群との有意な差が認められない。このことは那須⁹⁾が stage VII の精細管において、step 7 spermatid を sertoli cell correction により検討した結果とよく一致している。

8) 4C/2C ratio (tetraploid cells/diploid cells ratio) (Fig. 9)

同様にして diploid cell を基準にして tetraploid cell との比を検討すると、TP 投与群と対照群との間に差を認めない。このことは、やはり辜丸組織内での tetraploid cell の絶対数における変動は認めないものと推察される。

考 察

Heller ら⁴⁾の報告以来、臨床応用されている⁵⁻⁸⁾T 投与による“はねかえり現象”はT投与終了後も造精機能障害が継続する場合¹⁸⁾もあり、その適応に関しては酒徳⁶⁾及び Charny¹⁹⁾が注意を喚起しているが、他に有効な治療法がみあたらない場合においては、有用な治療法の一つである。したがって、この“はねかえり現象”における造精機能を検討することは重要なことと考える。Berndtson ら²⁰⁾はTをラットに投与すると、pachytene spermatocyte 及び step 7 spermatid が stage VII 精細管において sertoli

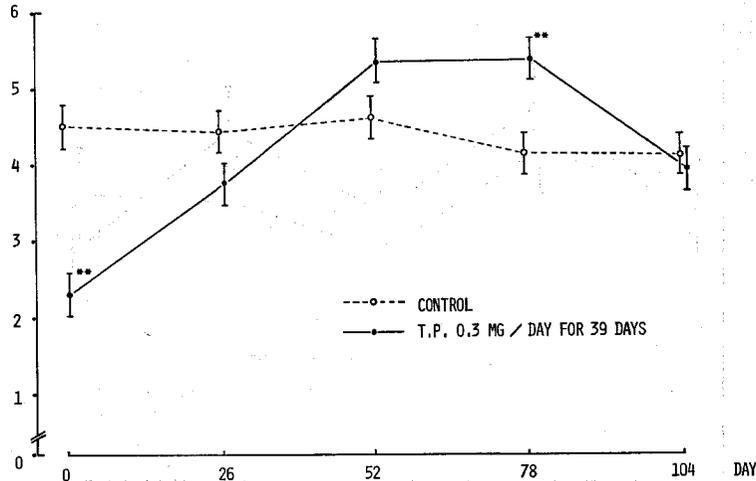


Fig. 8. 1C/2C ratio (haploid cells/diploid cells ratio), (**: $P < 0.01$ in comparison between TP treatment group and control group) mean \pm SE

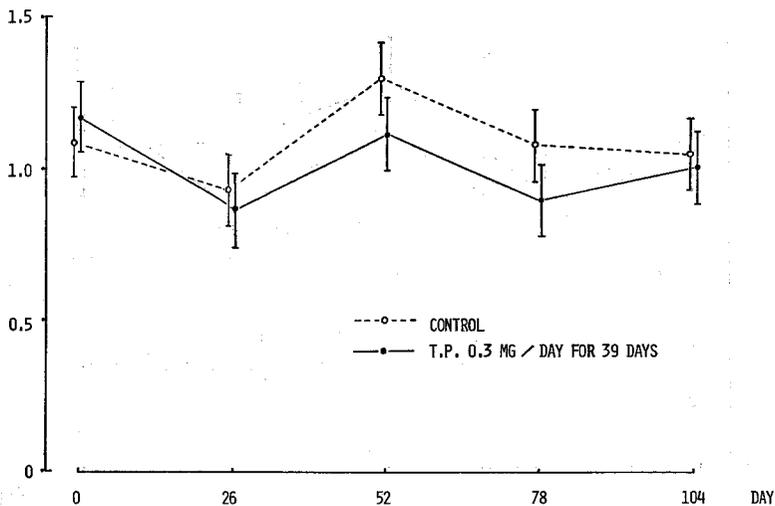


Fig. 9. 4C/2C ratio (tetraploid cells/diploid cells ratio), mean \pm SE

cell correction した場合に減少することを報告している。また Ludwig²¹⁾ はラットに少量のTを投与すると造精機能が抑制されたと報告しているが、T投与による“はねかえり現象”の発現時期における造精機能を形態学的に検討したものは、那須⁹⁾の報告のみである。しかし、ラット睪丸では精細管上皮の stage ごとに成熟度が異なり^{22,23)}、睪丸組織全体として造精機能評価することは多大な労力と熟練を必要とし、なかなか困難である。そこで、FCM を用いて睪丸組織の DNA 量分布から造精機能評価を行なう場合、精細管上皮の stage は考慮に入れる必要がない。その評価は精細管ごとのものではなく、睪丸組織全体とし

ての評価だからである。また多量の細胞が測定可能であり、より定量的動態の評価も可能である。

那須⁹⁾は stage VII の精細管において T 投与後 78 日目まで検討しているが、step. 7 spermatid において投与終了後 78 日目で対照群と比較して有意 ($p < 0.05$) に高値を認めている。FCM 測定による % haploid cells は haploid cell が spermatid を表現している^{13-15,17)}ことから spermatid においては既に投与終了後 52 日目で対照群より有意 ($p < 0.05$) に高値を認める。その高値は 78 日目まで増加しつつ継続する。今回の測定では FCM の測定可能閾値の関係から、1C 以下の spermatozoa 及び spermatid を

定量評価することから除外した。このため測定された spermatid は steps 1~11 spermatids²³⁾ に相当すると考えられ、steps 1~11 spermatids では、TP 投与終了後52日目で“はねかえり現象”を生じ、78日目で peak に達したあと104日目は“はねかえり現象”は消失しており、その期間は長いものではなく、約2~2.5カ月の間と思われる。これは清水¹¹⁾が、TP 投与終了後112日目で既に睾丸内T濃度が対照群と同等となることを示しているが、今回の結果とよく一致する。また那須⁹⁾は、pachytene spermatocyte においても、TP 投与終了後78日目は有意 ($p<0.01$) に増加したことを報告しているが、FCM では、tetraploid cell が主に primary spermatocyte (leptotene, zygotene, pachytene and diplotene primary spermatocytes) を表現^{13~15,17)} している。このことから検討すると、今回の結果からは primary spermatocyte には変化は認められないと考える。これは pachytene primary spermatocyte のみを DNA 量分布から計測できなかったため、他の step の細胞数にその変化を吸収されたものと思われる。

以上のように、FCM による造精機能評価は非常に有用である反面、FCM での評価は細胞比率として表現され、組織学的な詳細な評価にはなじまず、光顕レベルの検討と併行させることにより、よりいっそうその定量性を発揮するものと考えている。

結 語

Wistar 系成熟雌性ラットに TP 0.3 mg を39日間連日投与し、投与終了後の造精機能評価を FCM による睾丸組織内 DNA 量分布から行ない“はねかえり現象”発現時の造精機能を検討した。

- 1) “はねかえり現象”は、spermatid の増加により TP 投与終了後52日目あたりから発現する。
- 2) “はねかえり現象”は、TP 投与終了後52日目から78日目に著明に発現し104日目では対照群と同等となっていることから、発現期間は約2~2.5カ月間と考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導並びに御校閲を賜った恩師酒徳治三郎教授に深甚なる謝意を捧げます。また御指導並びに御助言いただきました山口大学医学部第2病理学教室の高橋学教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) 酒徳治三郎・蛭多量令・北山太一・吉田 修：男子不妊症の統計的観察（附 妊娠に関する予後調

査結果）。泌尿紀要 11：109~114, 1965

- 2) 清水芳幸・永田一夫・越戸克和：男子不妊症の統計的観察および妊娠に関する追跡予後調査。泌尿紀要 25：1293~1296, 1979
- 3) 磯山理一郎・馬場良和・原田宏行・川井修一・清水芳幸・藤井光正・瀧原博史・越戸克和・酒徳治三郎：男子不妊症の統計的観察および妊娠に関する追跡予後調査（その2）。泌尿紀要 30：175~182, 1984
- 4) Heller CG, Nelson WO, Hill IB, Henderson E, Maddock WO, Jungck EC, Paulsen CA and Mortimore GE : Improvement in spermatogenesis following depression of the human testis with testosterone. Fertil Steril 1: 415~422, 1950
- 5) Heckel NJ, Rosso WA and Kestel L: Spermatogenic rebound phenomenon after administration of testosterone propionate. J Clin Endocrinol 11: 235~245, 1951
- 6) 酒徳治三郎：男性ホルモンによる「はねかえり現象」Rebound Phenomenon について。京都医誌 9：133~137, 1958
- 7) Lamensdorf H, Compere D and Begley G : Testosterone rebound therapy in the treatment of male infertility. Fertil Steril 26 : 469~472, 1975
- 8) 瀧原博史：特発性男子不妊症患者に対する Testosterone-Clomiphene 投与療法。日不妊会誌 25: 101~111, 1980
- 9) 那須善人：Testosterone Propionate 投与後のラット睾丸における組織学的ならびに組織動態論的研究。泌尿紀要 25：345~354, 1979
- 10) 藤井光正：Testosterone 投与後の“はねかえり現象”に関する実験的研究—特に睾丸組織内 Testosterone 濃度について—。泌尿紀要 27：1171~1178, 1981
- 11) 清水芳幸：Testosterone 投与後の“はねかえり現象”に関する実験的研究—睾丸内ステロイド合成における酵素活性の変化—。日内分泌会誌 59：1168~1180, 1983
- 12) Clausen OPF and Hansson V : Application of micro-flow fluorometry to studies of meiosis in the male rat. Biol Reproduc 17: 555~560, 1977
- 13) 橋本 治：Flow Cytometry (FCM) によるラット睾丸 DNA 量の測定。西日泌尿 46：533~

- 539, 1984
- 14) 川井修一: Flow cytometry による睾丸内精子形成能の評価判定. 第1報: ヒト睾丸組織内 DNA 量分布測定の基礎的検討. 泌尿紀要 **30**: 1021~1027, 1984
- 15) 川井修一: Flow cytometry による睾丸内精子形成能の評価判定. 第2報: 男子不妊症患者の精子形成能の評価. 泌尿紀要 **31**: 87~95, 1984
- 16) Baisch H, Göhde W and Linden WA: Analysis of PCP-Data to determine the fraction of cells in the various phase of cell cycle. Rad Environm Biophys **12**: 31~39, 1975
- 17) Clausen OPF and Åbyholm T: Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cells in the investigation of male infertility. Fertil Steril **34**: 369~374, 1980
- 18) Joël CA: The spermiogenetic rebound phenomenon and its clinical significance. Fertil Steril **11**: 384~391, 1960
- 19) Charny CW: The use of androgens for human spermatogenesis. Fertil Steril **10**: 557~570, 1959
- 20) Berndtson WE, Desjardins C and Ewing LL: Inhibition and maintenance of spermatogenesis in rats implanted with polydimethylsiloxane capsules containing various androgens. J Endocr **62**: 125~135, 1974
- 21) Ludwig DJ: The effect of androgen on spermatogenesis. Endocrinol **46**: 453~481, 1950
- 22) Percy B, Clermont Y and Leblond CP: The wave of seminiferous epithelium in the rat. Amer J Anat **108**: 47~77, 1961
- 23) Clausen OPF, Parvinen M and Kirkhus B: Stage-related variations in DNA fluorescence distribution during rat spermatogenic cycle measured by flow cytometry. Cytometry **2**: 421~425, 1982

(1985年9月30日受付)