

## 組織培養系を用いた幼若家兎代償性睪丸肥大の実験的考察

長崎大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 斉藤 泰教授)

実 藤 健\*

TISSUE CULTURE STUDIES ON COMPENSATORY  
TESTICULAR HYPERTROPHY OF THE YOUNG  
RABBIT AFTER HEMICASTRATION

Takeshi SANEFUJI

*From the Department of Urology, Nagasaki University School of Medicine  
(Director: Prof. Y. Saito)*

The regulation of compensatory testicular growth after hemicastration using prepubertal rabbits (less than 1000 g) was analyzed by weight increase of the remaining testis. At the 4th week postoperatively, the testis of hemicastrated rabbits weighed about 0.453 mg/g (testis weight/body weight) while the testis of sham operated rabbits weighed about 0.258 mg/g (testis weight/body weight). Thus, the testis of hemicastrated young rabbits developed compensatory growth up to about twice the size of control rabbit testis. This was further confirmed by the histological analysis of testes, in which the number of seminiferous tubules of hemicastrated rabbits was doubled as compared with the sham operated animal.

The rabbit testicular cells obtained from the above operated testis could be cultured in monolayer form. These cultured monolayered cells were synchronized by culture in serum-free minimum essential medium (MEM) for 24 hrs. These primary rabbit testicular cells synthesized more DNA and RNA when cultured in a medium that contained hemicastrated rabbit serum, than in that containing normal serum. Stimulation of  $^3\text{H}$ -thymidine and  $^3\text{H}$ -uridine incorporation reached the maximum on the 4th day postoperation and thereafter DNA synthesis decreased rapidly whereas RNA synthesis decreased gradually. However, these cells cultured in MEM containing sham operated serum showed no significant increase in  $^3\text{H}$ -thymidine or  $^3\text{H}$ -uridine incorporation. Thus, the hemicastrated serum must contain a testis growth stimulating factor(s).

Primary monkey testicular cells and primary rat testicular cells were treated with hemicastrated rabbits serum. The testicular cells of these animal species were insensitive to growth stimulation by the hemicastrated serum, which suggests that the testicular growth stimulation is species specific. Furthermore, the growth of primary rabbit skin fibroblasts was not stimulated by the hemicastrated rabbit serum. Therefore, it may be concluded that the growth stimulating factor(s) in hemicastrated serum is organ specific.

**Key words:** Compensatory hypertrophy, Tissue culture, Testicular growth factor(s)

## 緒 言

幼若動物の片側臓器を摘出後、反対側臓器が代償性に肥大することはよく知られている。Ribbert<sup>1)</sup>は、幼若動物を用いて片側睪丸摘出後に反対側睪丸の代償性肥大 (compensatory testicular hypertrophy) を認めたと初めて報告した。この代償性肥大発生の機序としては FSH および testosterone の関与が強く

示唆されているが<sup>2-4)</sup>、これらの growth factor(s) の細胞レベルでの研究はあまりない。

そこで、著者は幼若家兎の睪丸細胞を培養し、睪丸摘出後の血清中のいわゆる growth factor(s) を添加させ、睪丸細胞の DNA および RNA 合成能を詳細に検討した。さらに、この factor(s) の持つ種特異性、臓器特異性についても興味深い知見を得たので報告する。

## 対象および方法

\* 現: 徳山記念病院泌尿器科

## I. 対象

生後40~60日目の幼若家兔を対象とした。これらの家兔を7羽ずつ二群に分けた。

(A) Hemicastration group (体重 868.3 gr.)

(B) Sham operation group (体重 1,107.5 gr.)

(実験途中に両群家兔それぞれ一羽死亡)

## II. 辜丸摘出および術前・術後採血, 辜丸重量の計測

両群家兔の術前採血を施行, 4°C で1日静置後, 3,000 rpm 15分間遠沈にて血清分離後, 0.45 μm millipore filter を通し各群別に -20°C にて凍結保存した。

(A)群家兔に hemicastration, (B)群家兔に sham operation を施行した。両群家兔は同じ飼育室にて同様の固型飼料および水道水を与えながら飼育した。

術後2, 3, 4, 6, 9, 14, 21日目に家兔の定期的術後採血を行った。これらの血液はいずれも前述のごとく血清分離後 millipore filter を通し, 各群別に凍結保存し後の検査に供した。

術後28日目に両群の反対側辜丸を摘出し, それぞれの辜丸重量を測定した。測定はすべて wet weight で行った。同時に家兔の体重を測定し, 体重あたりの辜丸重量を算出し両群間での比較検討を行った。

## III. 組織培養系を用いた DNA および RNA 合成能の測定

### 1) 組織培養

#### ① 家兔辜丸組織の培養

摘出した家兔辜丸組織の一部を無菌的に0.25% trypsin で処理し培養を行った<sup>5)</sup>。使用した medium は10% fetal bovine serum (FBS) (Microbiological, Bethesda, Maryland) を添加した minimal essential medium (MEM) (日本製薬社製, cat No. 05900) で, 37°C 5% CO<sub>2</sub> 存在の incubator を用いて培養した。

こうして増殖させた primary babbit testes (以下 PRT と略す) を用いて辜丸細胞の DNA および RNA 合成能の測定を行った。

#### ② 家兔皮膚繊維芽細胞, サル辜丸細胞, ラット辜丸細胞組織の培養

primary rabbit skin fibroblast (以下 PRSF と略す) は組織片培養法を, primary monkey testicular cell (以下 PMT と略す) (大日本製薬01-233, ミドリザル) と primary rat testicular cell (以下 PRtT と略す) は PRT と同様に0.25% trypsin 処理法にて培養を行った。

### 2) DNA, RNA 合成能の測定

Culture bottle 内に培養増殖した PRT に, 0.1% trypsin および 0.15% ethylenediaminetetraacetic

acid (EDTA) を用いて剝離浮遊させたのち petri dish (35×10 mm) (Lux Scientific Corporation) に  $1 \times 10^5$  cells/dish になるよう調節した。これを10% FBS を添加した MEM で5日間培養し, confluent になった cell ( $4 \times 10^5$  cells/dish) を, DNA および RNA 合成能測定に用いた。

予備実験として, 辜丸細胞の増殖能についての time course を検討した。すなわち, 血清添加後どの時期に最大の細胞増殖能を有するかを知る目的で, DNA および RNA 合成能を経時的に Fig. 1 のごとく<sup>6)</sup> に測定した。confluent になった細胞を phosphate buffered saline (PBS) にて3回洗滌することにより, serum free の状態として MEM のみで24時間 incubate した。この細胞に10% normal rabbit serum を添加し, 一定時間後再び PBS を用いて3回洗滌,  $1 \mu\text{Ci/ml}$  の <sup>3</sup>H-thymidine (specific activity, 19.3 Ci per mM, Amersham, Arlington Height, Illinois) を加えた MEM で80分間 incubate した。この細胞を再び PBS にて3回洗滌, 1N NaOH を加えて細胞を溶解した。これに10% trichloro acetic acid (TCA) を加えたのち, 0.45 μm millipore filter を通し, acid insoluble component に取り込まれた <sup>3</sup>H-thymidine を scintillation vial に採取した。scintillant (Amersham scintillant) 10 cc を添加し2時間後に, Scintillation counter (アロカ社製) を用いて各時間ごとの <sup>3</sup>H-thy-

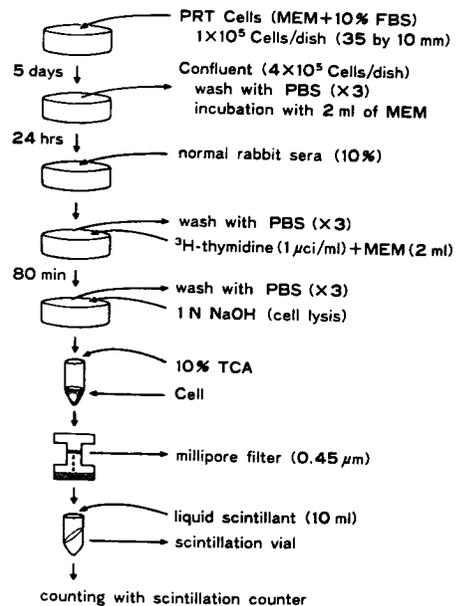


Fig. 1. Standard assay for stimulation of DNA synthesis.

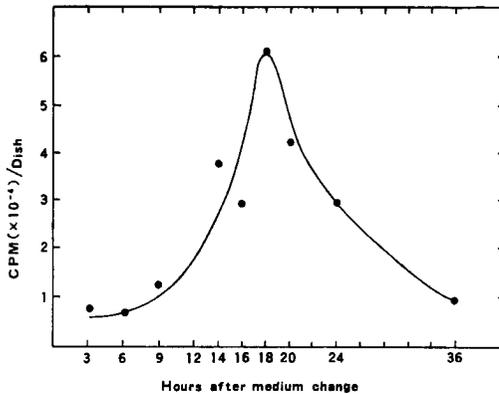


Fig. 2. Time course study of <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into DNA of primary rabbit testes cells in the presence of 10% fetal bovine serum 24 hrs after starvation in a serum-free medium. Confluent monolayer cells were used ( $4 \times 10^5$  per plate).

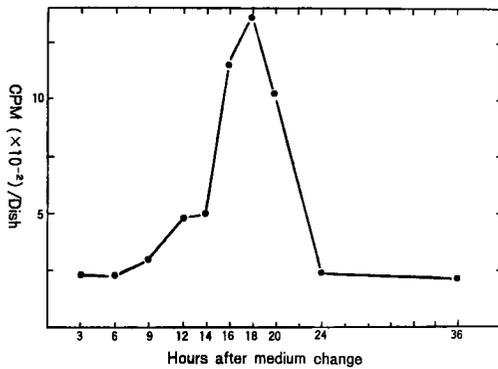


Fig. 3. Time course study of <sup>3</sup>H-uridine incorporation into RNA of primary rabbit testicular cells in the presence of normal rabbit serum 4 hrs after starvation in a serum-free medium.

midine 量 (CPM) を測定し DNA 合成能の指標とした。

同様に、 $1 \mu\text{Ci/ml}$  の <sup>3</sup>H-uridine を加えた MEM を用いて RNA 内に取り込まれた uridine 量を測定することにより、RNA 合成能の指標とした。これらの assay はすべて重複させ、その平均値をとって測定値とした。

Fig. 2 に示すように 10% FBS 添加後経時的に DNA 合成能を測定した結果、14時間目より上昇し始め、18時間後に DNA 合成能は peak に達した後、以後は急速に下降した。

また Fig. 3 に示すように RNA 合成能も DNA

合成能とほぼ同様の動態を示し、18時間後に peak を有することが明らかとなった。したがって、血清添加後最も細胞の増殖能が顕著である 18時間後の thymidine および uridine の取り込み量を計測し、testicular cell の DNA および RNA 合成能を比較検討することとした。

#### IV. Growth factor(s) の種および臓器特異性について

生後 2~3 日目の rabbit より採取培養した PRSF、体重 100 gr. の rat より摘出培養した PRtT、および PMT の 3 種類の初代培養細胞を用い、前記実験方法Ⅲの 2) に示した方法で各細胞の DNA、RNA 合成能の比較検討を行った。

#### V 睾丸の組織学的検討

28 日後に摘出した 睾丸組織の一部は H.E. 染色し鏡検することにより、両群家兔睾丸の形態学的特徴を観察比較した。

## 結 果

### I. 対側睾丸の重量

術後 28 日目に採取した hemicastration 施行群の対側睾丸の平均重量は  $0.453 \text{ mg/gr}$  であり、一方 sham operation group の対側睾丸の平均重量は  $0.258 \text{ mg/gr}$  であった。約 1.8 倍の重量増加を認め、統計学的に検定を行うと、 $p < 0.001$  となり明らかに有意な差を認めた (Fig. 4)。

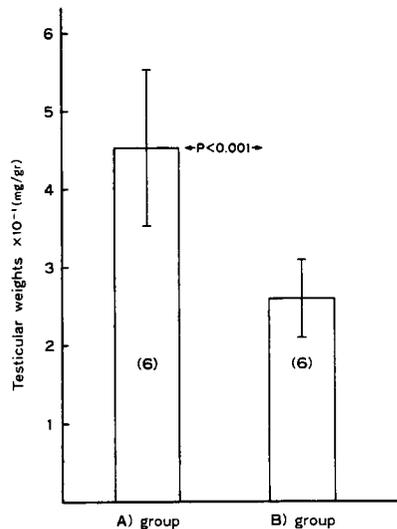


Fig. 4. Testicular weights in hemicastration group (A) and sham operation group (B). Each bar represents the mean  $\pm$  SE testis weight per body weight (mg/gr).

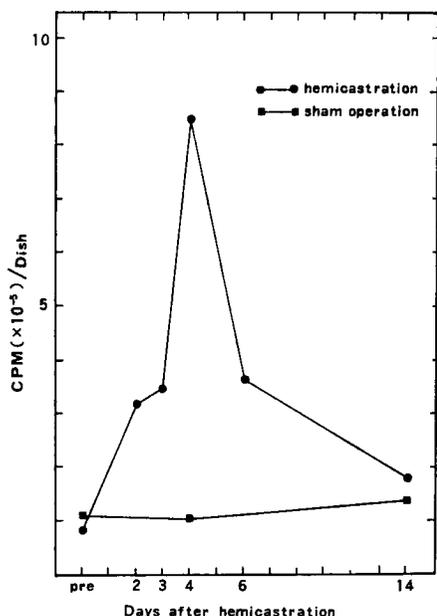


Fig. 5. Incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into DNA of primary rabbit testicular cells in the presence of pre- and postcastrated rabbit sera.

●—● MEM+10% hemo-castrated sera.  
■—■ MEM+10% sham-operated sera.

## II. 片側睾丸摘出家兎血清の PRT に及ぼす影響

片側睾丸摘出家兎血清を PRT に添加すると Fig. 5 のように、術後2日目の血清添加により DNA 合成能の上昇がみられ、術後4日目の血清添加で合成能は最高値 ( $8.42 \times 10^{-5}$  CPM/dish) を示した。6日目の血清添加では DNA 合成能は急速に減少し、術後14日目の血清添加では術前の DNA 合成能とほぼ同じ値を示した。一方 B) 群の sham operation を行った家兎血清添加では、DNA 合成能には全く変化を認めなかった。

同様に RNA 合成能について検討した。Fig. 6 で示すように、術後4~6日目の血清添加で最高値を示したが、DNA 合成能と異なり術後21日目の血清でも術前値には戻らず、 $7.13 \times 10^{-3}$  CPM/dish を示した。B) 群血清では DNA 合成能と同様に変化はみられなかった。

## III. 片側睾丸摘出家兎血清の testicular growth factor(s) の種および臓器特異性について

片側睾丸摘出家兎血清中に含まれる testicular growth factor(s) の種および臓器特異性について PRSF, PMT および PRtT を用いて検討した。すなわち前記術後4日目の家兎血清を、各培養細胞に

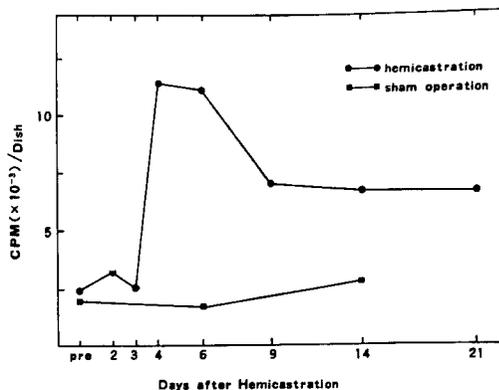


Fig. 6. Incorporation of  $^3\text{H}$ -uridine into RNA of primary rabbit testicular cells in the presence of pre- and postcastrated rabbit sera.

●—● MEM+10% hemo-castrated sera.  
■—■ MEM+10% sham-operated sera.

添加して DNA および RNA 合成能について測定したところ、いずれの細胞も合成能の上昇はみられず (Table 1), この factor(s) はきわめて高い種および臓器特異性を有しているものと考えられる。

## V. 組織学的検討

術後28日目に摘出した hemo-castrated rabbit および sham operated rabbit の組織像について検討した (Fig. 7 (A),(B)). A 群 (hemo-castration) では B 群 (sham operation) に比して断面積が4.1倍と増加しているために、一見精細管の数そのものが減少しているようにみえるが、単位面積あたりの精細管の占める面積は1.6倍に、さらに精細管の成す管腔の短径は1.8倍と増殖し、個々の精細管内の細胞数も増加していた。

## 考 察

両側性臓器の一侧に何らかの原因で機能障害が生じると、反対側臓器に代償性肥大が生じる現象は、動物や人間において多くの報告があり、その mechanism については、血清中への growth factor(s) の放出の増量が論議されてきている<sup>7-10)</sup>。

一方、幼若動物を用いた代償性睾丸肥大の報告においては、Ribbert ら<sup>11)</sup>が最初の報告をして以来約一世紀が経過し、その間にいくつかの報告が散見され、また臨床例においても Laron ら<sup>11,12)</sup>が、思春期前の停留睾丸児童において compensatory testicular hypertrophy (CTH) の存在を証明し報告している。

今回著者は、幼若家兎睾丸の初代培養細胞を用いて、初めて組織培養系による CTH の証明に取り組

Table 1. Effect of hemicastrated rabbit serum on DNA and RNA synthesis of confluent monolayer cultures of various cell type<sup>a)</sup>

Serum in MEM	PRT	PRSF	PMT	PRtT
pre-hemicastrated sera	♣ 8398 ♣♣ (2246)	10066 (466)	2198 (250)	3504 (280)
hemicastrated sera <sup>b)</sup>	♣ 72400 ♣♣ (11843)	11639 (356)	3464 (219)	2296 (415)

♣:DNA  
♣♣:RNA  
PRT:Primary rabbit testicular cell  
PRSF:Primary rabbit skin fibroblast  
PMT:Primary monkey testicular cell  
PRtT:Primary rat testicular cell

a)Values are expressed as counts per minute of <sup>3</sup>H-thymidine and <sup>3</sup>H-uridine per plate

b)Serum was obtained from rabbits 4days after castration

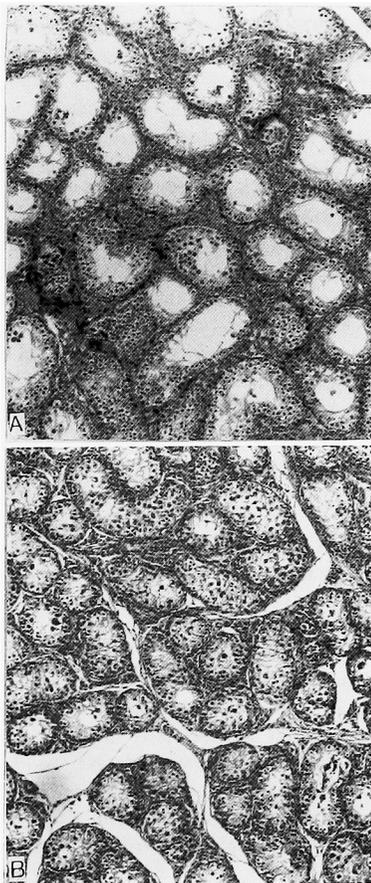


Fig. 7. Photomicrographs (×40) of the testis from 4th week cryptorchid (A), and sham-operated (B), rabbits.

んだ。つまり PRT が合成する DNA および RNA 量を <sup>3</sup>H-thymidine と <sup>3</sup>H-uridine の取り込み量を測定することで、比較検討した。すでにこの assay 方法を用いて、金武<sup>13)</sup>、山田<sup>14)</sup>は一側腎摘後の血清中に代償性肥大を引き起こす growth factor(s) が存在することを証明している。

著者はまず辜丸重量を実際に測定比較することにより、幼若家兔の CTH の存在を証明した。組織学的には精細管の増生が顕著に認められ、このことが結果として CTH を引き起こしたものと考えられ、Putra<sup>15)</sup>と同様の所見であった。さらにその CTH を引き起こす物質は、一側辜丸摘出後血中へ遊出してくることを明らかにした。この物質の血中濃度は、辜丸摘出後4日目には最大となり、2週間後にほぼ術前値に戻ることもわかった。この物質によって辜丸実質細胞の DNA 合成能が刺激を受け、それに伴い RNA 合成能が増大し、蛋白や酵素の合成能も高まるものと想定される。

以前より、思春期前には pituitary-gonadal control system の存在が証明されている<sup>15,17)</sup>。この時期に一側辜丸を摘出したたり障害を与えたりすると、血清中の testosterone 濃度が減少し、そのために feedback mechanism の働きで pituitary よりの gonadotropine の過剰産生が起こり、その結果 CTH が引き起こされるといわれている<sup>15,19)</sup>

ところが、この時期の血清中の testosterone 濃度は必ずしも減少するとはいえず、一定の傾向がみられていない<sup>20)</sup> したがって従来の feedback mechanism だけでは説明できない点がある。この点に

関して Mizunuma ら<sup>21)</sup>は、さらに中脳の hypothalamus に着目した。すなわち一側睪丸摘出に伴って hypothalamus より gonadotropine releasing hormone が遊離し、その結果 gonadotropine が分泌増加することを示唆し、この system が現在一般的に支持されている。

さて今回の実験結果から、CTH を引き起こす growth factor(s) は一定時間後に血中に放出され、その物質には種特異性および臓器特異性があることが証明された。さらに adult rabbit を用いた同様の実験結果を検討すると、睪丸重量測定で control 群と変化なく、また growth factor assay でも DNA および RNA 合成には両群間に有意差がなく、CTH は幼若家兔のみにみられる現象である(データ未発表)。Mingishi ら<sup>22)</sup>はすでに、FSH には種特異性があることを報告しており、これらの事実から CTH の growth factor(s) は FSH の可能性も考えられる。

## 結 語

幼若家兔を用いた代償性睪丸肥大の発生、およびその mechanism における growth factor(s) に対して、組織培養系を用いた細胞レベルでの考察を加え、以下の結果を得た。

1. 幼若家兔の一側睪丸摘出後4週間経過した対側睪丸重量の平均値は、0.453 mg/gr (睪丸重量/体重)であり、対照群(0.258 mg/gr)に比し統計学的有意差( $p < 0.001$ )を持って増量していた。

2. 摘出睪丸の初代培養細胞に、定期的に採取した血清を作用させて DNA および RNA 合成能を測定したところ、摘出後4日目の血清添加により合成能は最大となった。

3. 睪丸摘出4日目の血清中に存在すると思われる growth factor(s) はサルおよびラットの睪丸細胞、ならびに幼若家兔の皮膚線維芽細胞に対しては全く影響を持たず、きわめて高い種および臓器特異性を有していた。

4. 組織学的には精細管の増生が顕著であり、growth factor(s) としては FSH の可能性が考えられる。

稿を終えるにあたり、深甚なる御指導、御校閲を賜りました恩師齊藤 泰教授に心より感謝いたします。実験に関して御指導を頂いた米国 Hahnemann 医科大学微生物学教室山本信人教授、当教室金武洋講師に深謝いたします。また病理組織に対して多大なる御援助をいただいた大分医科大学中検病理横山繁生博士に深謝いたします。なお本論文の要旨は第70回日本泌尿器科学会総会にて発表した。

## 文 献

- 1) Ribbert H: Uber die compensatorische Hypertrophie der Geschlechtsdrusen, Virchows Arch **120**: 247-272, 1890
- 2) Ojeda SR and Ramirez VD: Plasma level of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. Endocrinol **90**: 466-472, 1972
- 3) Ramirez VD and Sawyer CH: A sex difference in the rat pituitary FSH response to unilateral gonadectomy as revealed in plasma radioimmunoassays. Endocrinol **94**: 475-482, 1974
- 4) Lingren S, Damber JE and Carsten H: Compensatory testosterone secretion in unilaterally orchietomized rats. Life Sci **18**: 1203-1206, 1976
- 5) Gallagher JG: Preparation of primary cultures. In Tissue Culture: Methods and Applications, P.F. Kruse and M.K. Patterson (Editors), p. 102, Academic Press, New York, 1973
- 6) Gospodarowicz D and Moran JS: Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cell populations by a fibroblastic growth factor, dexamethasone, and insulin. Proc Natl Acad Sci USA **71**: 4585-4588, 1974
- 7) Bury HPR, Crane WAJ and Dutta LP: Cell proliferation in compensatory renal growth. Br J Urol **37**: 201-210, 1965
- 8) Johnson HA and Roman JMV: Compensatory renal enlargement. Am J Pathol **49**: 1-13, 1966
- 9) Lowenstein LM and Stern A: Serum factor in renal compensatory hyperplasia. Science **142**: 1479-1480, 1963
- 10) Preuss HG, Terry EF and Keller AI: Renotropic factor(s) in plasma from uninephrectomized rats. Nephron **7**: 459-470, 1970
- 11) Laron Z, Dickerman Z, Prager-Lewin R, Keret R and Halabe E: Plasma LH and FSH response to LRH in boys with compensatory testicular hypertrophy. J Clin Endocrinol Metab **40**: 977-981, 1975
- 12) Laron Z, Dickerman Z, Ritterman I and Kaufman H: Follow-up of boys with unilateral compensatory testicular hypertrophy. Fert and Ster **33**: 297-301, 1980
- 13) Kanetake H and Yamamoto N: Studies on the mechanism of compensatory renal hypertrophy and hyperplasia in nephrectomized animal model. I. Evidence for a renotropic growth stimulating factor in uninephrectomized rabbit using tissue culture. Invest Urol **18**: 326-330, 1981
- 14) Yamada J, Kanetake H, Saito Y, Kondo A

- and Yamamoto N: Renotropic growth factor found in cancer patient sera after removal of cancer-bearing kidney. *Kidney Int* **23**: 632-634, 1983
- 15) Putra DKH and Blackshaw AW: Morphometric studies of compensatory testicular hypertrophy in the rat after hemicastration. *Aust J Biol Sci* **35**: 287-293, 1982
- 16) Byrnes WW and Mayer RK: The inhibition of gonadotrophic hormone secretion by physiological doses of estrogen. *Endocrinol* **48**: 133-136, 1951
- 17) Jacobson D and Morgren A: Early effects of testosterone propionate injected into 5 day old rats. *Acta Endocrinol* **49**: 453-465, 1965
- 18) Goldman BG, Grazia YR, Kamberi IA and Porter JC: Serum gonadotropin concentrations in intact and castrated neonatal rats. *Endocrinol* **88**: 771-776, 1971
- 19) Gupta D, Rager K, Zarzycki J and Eichner M: Levels of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, testosterone and dihydrotestosterone in the circulation of sexually maturing intact male rats and after orchectomy and experimental bilateral cryptorchidism. *J Endocrinol* **66**: 183-193, 1975
- 20) Berger M, Jean-Fancher Ch, Turckheim MD, Veysiere G and Jean Cl: The effect of unilateral castration on plasma and testicular testosterone in rabbits from birth to 60 days. *Arch Int Physiol Bioch* **86**: 799-808, 1978
- 21) Mizunuma H, Palatis LR and McCann SM: Effect of unilateral orchidectomy on plasma FSH concentration: evidence of a direct neural connection between testes and CNS. *Neuroendocrinol* **37**: 291-296, 1983
- 22) Minegishi T, Mizunuma H, Igarashi M, and Wakabayashi K: Species specificity of radio-receptor assay and radiomunoassay for rat FSH. *Endocrinol Jpn* **28**: 369-373, 1981

(1987年3月25日受付)