

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——

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎教授）

藤 井 光 正

TESTICULAR TESTOSTERONE CONCENTRATION OF THE REBOUND PHENOMENON WITH TESTOSTERONE IN ADULT MALE RATS

Mitsumasa Fujii

From the Department of Urology, Yamaguchi University, School of Medicine

(Director: Prof. J. Sakatoku)

To examine the endocrinological aspects of the rebound phenomenon induced after testosterone administration, 0.3 mg of testosterone propionate (TP) was administered to adult male rats daily for 39 days.

It was shown that serum LH, FSH and testosterone (T) regulated each other by negative feedback reactions. Pituitary LH and FSH levels underwent almost the same change as the serum level. Serum levels of LH, FSH and T were all at each level of the controls when the rebound phenomenon was recognized, while testicular T concentration remained at a higher level (about 2-fold of the control group).

Consequently, it was concluded that the rebound phenomenon was caused by the high concentration of the testicular T. And it was suggested that the reason for the high T concentration in the testicular tissue was that the testis had become more sensitive to LH.

緒 言

正常成人男子にテストステロン（以下Tと略す）を長期間投与した後に起こる睾丸造精機能の一過性のはねかえり現象の発見、およびこれを男子不妊症の治療に利用することは30年前より始められ^{1,2)}、比較的良好な成績をみとめた。しかしながら一部の症例において、T投与後にはねかえり現象が起こらずに無精子状態の持続するものがみとめられたことから^{3,4)}、この治療法は一時期あまり用いられなくなった。しかしその後も男子不妊症に対する治療に関して決定的な方法が発見されないことから、近年その治療効果が再び注目され始めた⁵⁻⁸⁾。しかしながら現在もなお、はねかえり現象の起こらない症例に関してその原因は勿論、はねかえり現象のメカニズムについても不明な点が多い。メカニズムに関してこれまでは、多量のT投与により間

脳性中枢は抑制されるがしばらくすると高濃度のTに対して慣れが起こり、感受性が低下する。そしてこのことが、T投与中止による抑制解除後に下垂体ホルモンの分泌過剰反応を引き起こすために生ずる現象であると説明されてきた^{9,10)}。しかしながらはねかえり現象が発現した時期において、造精機能と最も関係の深い睾丸内の変化に関する報告は非常に少ない。わずかに那須¹¹⁾がラットに0.3 mgのTを39日間連日投与し、投与終了後72日目にはねかえり現象を起こした時期において、睾丸内精上皮細胞のうち、pachytene spermatocyte および step 7 spermatid の数が対照群よりも増加していたことを報告した。今回、著者は同じ実験系において、T投与終了時からはねかえり現象を起こした時期までの内分泌学的動態を、睾丸内T濃度の変化を中心としてこれに加えて下垂体組織内

LH, FSH 濃度および血清 LH, FSH, T 濃度の変化を観察し、各種ホルモン濃度の変化と造精機能の関係を検討したので報告する。

材料および方法

生後10~12週の Wistar 系成熟雄性ラット46匹を無処置群 24匹、処置群 22匹に分け、処置群ラットに testosterone propionate (以下 TP と略す) 0.3 mg を 0.2 ml のオリーブ油に溶解したものを 39 日間連日、ラット大腿部に皮下注射した。

屠殺はまず TP 投与開始日に無処置群のみ 2 匹行ない、その後は両群ともに 2 匹ずつ、投与終了 2 日前、終了日、終了後 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 64 日目に行なった (Fig. 1)。

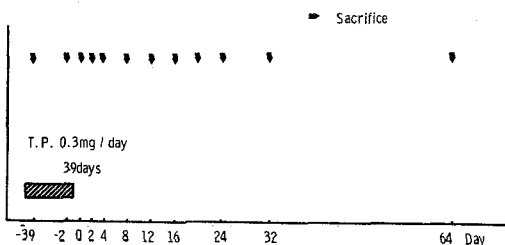


Fig. 1

標本採取

エーテル麻酔下に各ラットの体重測定の後開復して腹部大動脈より採血した後ただちに開頭して下垂体を摘出、蒸留水 5 ml を加え、氷水中にてホモジネートした後、4°C, 3,000 rpm, 30 分間遠心分離後の上清を採取して、測定まで -20°C にて冷凍保存した。次に睾丸を摘出し、両側ともに wet weight を測定した後、睾丸白膜を除いた睾丸組織を採取して重量を測定した後、蒸留水を加え氷水中にてホモジネート後、4°C, 3,000 rpm, 30 分間遠心分離した後の上清を採取して測定まで -20°C にて冷凍保存した。また採取した血液も遠心分離後の血清を同様に冷凍保存した。

測定方法

1) LH および FSH 濃度

血清 LH, FSH 濃度は NIH 提供の NIAMD anti-rat serum を用い、RIA 法にて 2 重測定した。なお測定に使用した緩衝液および標識 LH, FSH は栄研イムノケミカル研究所より提供されたものを使用した。

下垂体組織内 LH, FSH 濃度の測定は、ホモジネ

ートにより得られた上清を測定時さらに LH は 100 倍、FSH は 10 倍に緩衝液にて希釈して測定した。

2) 血清 T 濃度

血清 T 濃度の測定は龍原¹²⁾の方法に準じ、RIA 法にて 2 重測定した (Fig. 2)。なお血清 T 濃度の測定に際してクロマトグラフィーの必要の有無について検討するため、実験に用いたラット血清 10 検体を用いておのおのを 2 つに分け、一方をクロマトグラフィーを使用、他方は使用せずに測定して両者の T 濃度を比較

Flow sheet of the method for the determination of plasma Testosterone

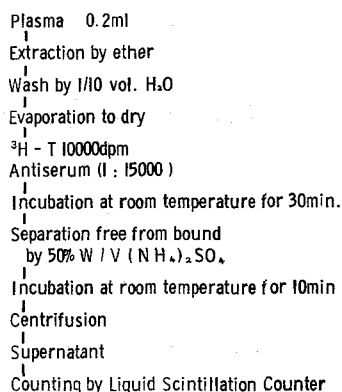


Fig. 2. Flow sheet of the method of measuring serum testosterone concentration

した結果、相関係数 $r = 0.86$ と良好な相関をみとめたため、血清 T 濃度の測定はクロマトグラフィーを使用せずに行なった。

3) 睾丸内 T 濃度

睾丸内 T 濃度の測定は木下¹³⁾の方法に準じ、Sephadex LH-20 (hexan:benzen:methanol=80:15:5) にて、マイクロカラムクロマトグラフィーを用い、RIA 法にて 2 重測定した (Fig. 3)。

結 果

1) 睾丸重量

各ラットにおける睾丸重量に左右差はみとめられず、また体重増加による変化もみとめなかった。対照群ラットの睾丸重量は実験を通してほぼ一定であり、その値は 1.67 ± 0.09 g (平均値 $\pm$ 標準偏差) であった。TP 投与群の睾丸重量は投与終了時、0.9 g と対照群の 1/2 に減少したが、16 日目より増加し始め、64 日目には対照群の睾丸重量を上まわって 1.89 g となり、は

Flow sheet of the method for determination
of testicular tissue Testosterone

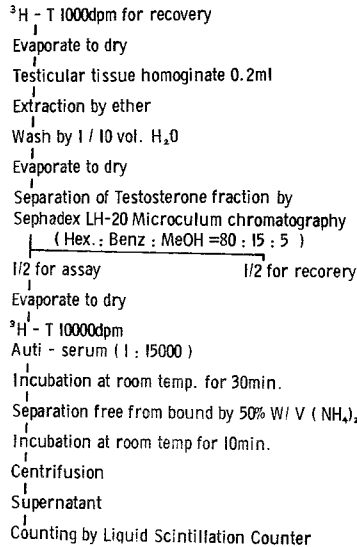


Fig. 3. Flow sheet of the method of
measuring testicular testosterone
concentration

ねかえり現象を起こしたことを確認した (Fig. 4).

2) LH 濃度

a) 血清 LH 濃度

TP 投与群血清 LH 濃度は、投与終了時 19.4 ng/ml

と対照群に比較して 1/3 以下の低濃度に減少していたが 2 日目より増加し始め、さらに 8 日目からは急峻な増加を示して対照群を上まわり、20 日目に対照群の 2 倍の高濃度となってピークとなり、その後は漸減して 64 日目には対照群と同じ濃度となった (Fig. 5).

b) 下垂体組織中 LH 濃度

TP 投与群 LH 濃度は、投与終了時 10 μ g/pituitary と対照群に比較して 1/30 以下と著明に減少したが、8 日目より増加し始め、16 日目からは急激な増加を示して 32 日目には対照群をわずかに上まわってピークとなり、その後漸減して 64 日目には対照群と同じ濃度となった (Fig. 5).

3) FSH 濃度

a) 血清 FSH 濃度

TP 投与群 FSH 濃度は、投与終了時 353 ng/ml と対照群の 573 ng/ml に比較して 2/3 に減少したが 8 日目より増加し始めて、12 日目に対照群と同じ濃度に達した後は 64 日目まで変化をみとめずほぼ一定の濃度を持続した (Fig. 6).

b) 下垂体組織中 FSH 濃度

TP 投与群 FSH 濃度は、投与終了時 62.5 μ g/pituitary と対照群の 80 μ g/pituitary に比較してわずかに減少していたが、8 日目より増加し始めて 16 日目には 119.4 μ g/pituitary となって対照群をわずかに上まわってピークとなり、その後は漸減して 64 日目には 54

Testicular weight

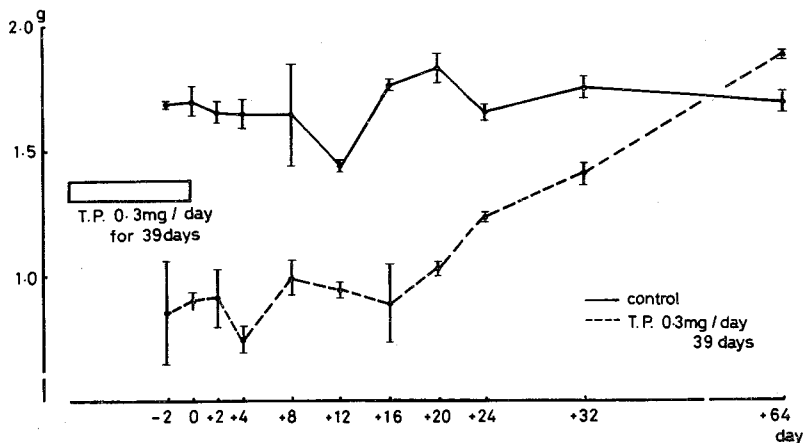


Fig. 4. Effect of testosterone propionate on mean testicular weight

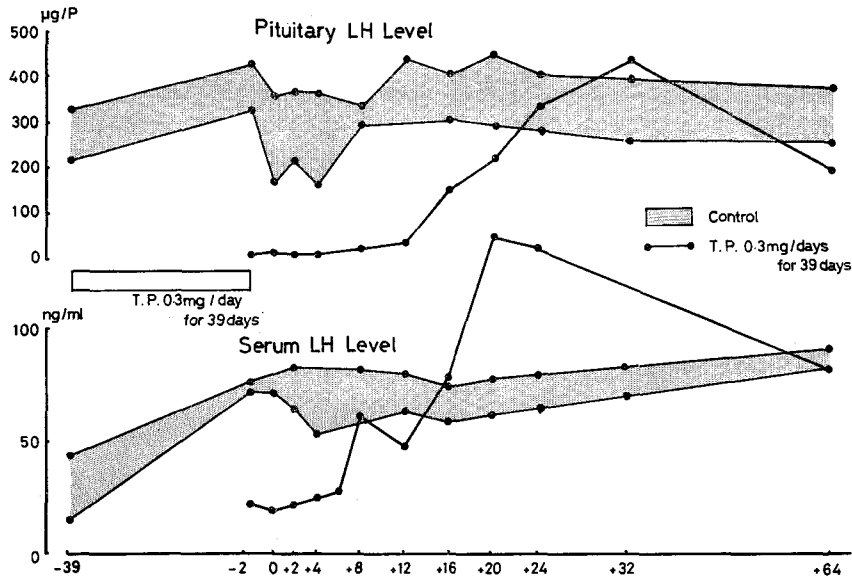


Fig. 5. Effect of testosterone propionate on pituitary and serum LH level

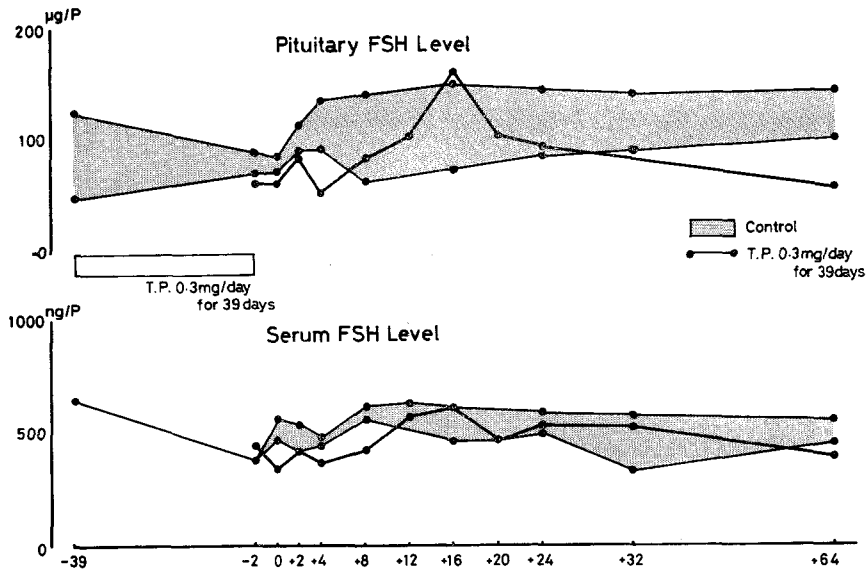


Fig. 6. Effect of testosterone propionate on pituitary and serum FSH level

µg/pituitary と対照群と同じ濃度となった (Fig.6).

4) T 濃度

a) 血清 T 濃度

RIA 法による血清 T 濃度測定において, 10 検体測定による回収率は 96.0 ± 5.07 (平均値 $\pm$ 標準偏差) %, within assay における変動係数は 18%, 同一検体を 5

回測定した測定間変動係数は 23% であった.

TP 投与群 T 濃度は, 投与終了 2 日前, 1.56 ng/ml 終了時 0.92 ng/ml と外因性 T のために対照群よりも高濃度を示したが, その後急激に減少して 4 日目には 0.25 ng/ml の低濃度となったが 8 日目より増加し始めて 24 日目には 1.03 ng/ml と対照群をわずかに上まわ

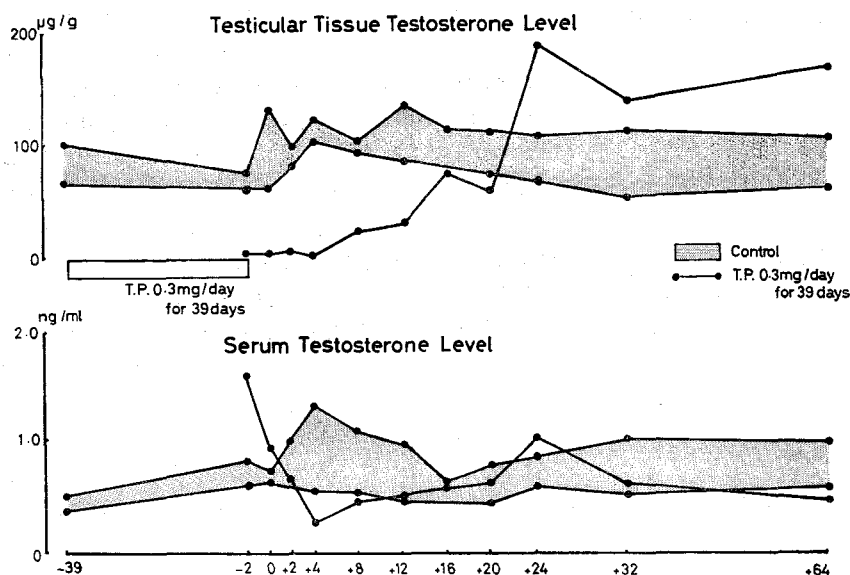


Fig. 7. Effect of testosterone propionate level

ってピークとなった後は漸減して64日目には対照群と同じ濃度となった (Fig. 7).

b) 睾丸内 T 濃度

マイクロカラムクロマトグラフィーを用いた RIA 法による睾丸内 T 濃度測定において、10検体測定による回収率は 77.4 ± 8.20 (平均値 $\pm$ 標準偏差) %, within assay における変動係数は 18%, 同一検体 5 回測定における測定間変動係数は 23% であった。

TP 投与群睾丸内 T 濃度は、投与終了時 6.6 ng/g と対照群の 98.2 ng/g に比較して 1/10 以下と著明に減少していたが、8 日目より漸次増加し始めて 24 日目には 190.5 ng/g と対照群の 2 倍の高濃度を示した。そしてその後も減少することなく、32 日目に、142.0 ng/g、64 日目に 170.4 ng/g と高濃度を維持した (Fig. 7)。

考 察

成人男子に T を投与した後に起こる造精機能の一過性のはねかえり現象に関して、内分泌学的にはこれまで下垂体 gonadotropin と T の negative feedback 反応によって起こる現象であると考えられていた^{8,10)}。動物実験において持田⁹⁾は、はねかえり現象が起こった時期において下垂体 gonadotropin 力価が対照群のそれを上まわったことが、はねかえり現象を起こしたと報告した。また志田¹⁰⁾も、この現象は T 投与中止による間脳性中枢の抑制解除後に下垂体ホルモンの分

泌過剰反応が起こるために生ずる現象であると述べている。

一方、T 投与に対する LH および FSH の反応に関しては必ずしも一致した結果は得られていない。すなわち T 投与により、LH、FSH とともに分泌抑制されるという報告^{14~16)}と、LH のみ分泌抑制され、FSH は抑制されないという報告である^{17~19)}。著者の実験においては、T 投与により LH ほど反応は著明ではなかったものの、T 投与終了時 FSH 濃度も明らかに有意の差をもって対照群に比較して低下していた。また血清 T 濃度が低下している時期においては逆に LH および FSH 濃度の増加をみとめたことも、LH および FSH と T がたがいに negative feedback により調節されていることを示していると思われる。ただし T に対する感受性は LH と FSH では異なり、FSH に比較して LH の方が高い感受性を有するものと考えられる。

LH および FSH の血清濃度と下垂体組織濃度の関係については、実験を通して両者ともにほぼ平行に推移し、下垂体内産生および分泌が同じ変化をすることが示された。その場合に血清濃度の変化が下垂体組織濃度の変化に対して常に先行していた事実は、血清濃度の調節が下垂体内濃度のそれに優先することを示しているものであると思われる。

以上 LH および FSH と T との関係については、著者の実験結果はこれまで報告されたものとほぼ同様

の結果であったが、そのなかでこれまでの報告とは明らかに異なる事実もみとめられた。すなわち、先に述べたごとくこれまでの報告では、はねかえり現象の起こった時期においてはいずれも下垂体 gonadotropin が高濃度となっていると報告されているが、著者の実験においてはT投与終了後はねかえり現象の起こる以前の比較的早期に高濃度となってピークを示すものの、その後は漸減して実際にはねかえり現象の起こった時期においては血清 LH, FSH および T 濃度はいずれも対照群と同じ濃度に低下し、睪丸内 T 濃度のみが対照群の2倍の高濃度を維持していた。このことは下垂体 gonadotropin の増加が直接はねかえり現象を引き起こすのではなく、gonadotropin 増加により引き起こされた睪丸内 T 濃度の増加およびその高濃度の維持がはねかえり現象を惹起した可能性が強いと考えられる。

そこで以下、T と睪丸造精機能との関係について検討を行なった。すなわち T 投与が造精機能に与える影響については、T の投与量によりその効果が大きく異なることが動物実験により明らかにされている。つまり、投与する T 量が少量の場合には T の下垂体 gonadotropin 分泌抑制効果が強く、そのため睪丸は萎縮し、造精機能は低下する。これに対して、T 量が多い場合に睪丸に対する T の直接効果が強いので造精機能は逆に亢進する。^{20,21)} さらに T の睪丸造精機能への直接効果を検討した動物実験において、T を含むペレットを睪丸内に移植したところ、ペレット含有濃度が高いほど、またペレットに近接した部位ほど造精機能が亢進している現象がみとめられ、睪丸内 T 濃度と造精機能が正の相関を示すことが明らかとなっている。²⁰⁻²⁴⁾ このことはその後 E. Steinberger により6歳の睪丸間質細胞腫において、T 産生腫瘍周囲の睪丸組織の造精機能が著明に亢進していることが報告され、^{25,26)} また Morse ら²⁷⁾ は正常成人男子に少量の T を1カ月間連日投与することにより造精機能が著明に低下した時期において、血清 T 濃度は低下していないのに睪丸内 T 濃度は著明に低下していることを報告し、ヒトにおいても動物実験と同様に睪丸内 T 濃度と造精機能が相関することが示された。さらにこれらの結果をもとに Oshima ら、²⁸⁾ Fahim ら²⁹⁾ は、T 含有ペレットあるいは T 結晶を男子不妊症患者の睪丸内に移植し、これまでは治療困難であった無精子症や強度の乏精子症例においても高率に精液性状の改善および妊娠をみとめている。

以上より、正常な造精機能の維持には高い睪丸内 T 濃度が必要な条件であり、また睪丸内 T 濃度を高くすることにより造精機能を促進することが可能となる

と考えてもよいようである。これに対して、著者の実験においてはねかえり現象が起こった時期に睪丸内 T 濃度のみが対照群に比較して2倍以上の高濃度を維持していた事実は、はねかえり現象がこれまで述べられてきたような単なる睪丸一下垂体系の negative feedback 反応によるものではなく、睪丸内 T 濃度が高濃度に維持されるために起こる現象であるということを示していると思われる。

睪丸内 T 濃度が高くなった原因に関して、T 産生の主要な部位である Leydig cell の変化については、睪丸組織中の Leydig cell 数が多い場合には造精機能の状態には関係なく睪丸内 T 濃度は高濃度となることは報告されているが³⁰⁾、著者の実験系においては、組織学的にはねかえり現象の起こった時期の TP 投与群と対照群の睪丸を比較したところ、Leydig cell の数および形態に関して差異をみとめなかった。またこの時期における血清 LH 濃度も正常域であったことから、はねかえり現象の起こった時期においては Leydig cell の LH に対する感受性が高くなっている可能性が強いと考えられる。

はねかえり現象の起こった時期における血清 T 濃度と睪丸内 T 濃度との不一致に関して、Morse²⁷⁾ Oshima²⁸⁾ Schiff³¹⁾ らも両者の増加減少が必ずしも一致しないことを報告している。その原因は明らかではないが、睪丸内から血中への T の分泌調節は LH のみによるものではなく、睪丸自身にも存在する可能性を示唆しているものと思われる。

結 語

成熟雄性ラットに testosterone propionate 0.3 mg を39日間連日投与し、投与終了時からはねかえり現象を起こした時期における内分泌学的動態を、睪丸内 T 濃度を中心としてこれに加えて下垂体組織内、LH, FSH 濃度および血清 LH, FSH, T 濃度の変化を観察して以下の結果を得た。

- 1) TP 投与群睪丸重量は、投与終了時対照群に比較して1/2に減少したが16日目より再び増加し始めて64日目には対照群の睪丸重量を上まわった。
- 2) 血清 LH および FSH 濃度は TP 投与終了時対照群に比較して低濃度となっていたが、その後再び増加して対照群を上まわってピークとなった後は漸減して64日目には対照群と同じ濃度となった。ただし血清は、対照群濃度域に達した後は46日目まで変化をみとめず、ほぼ一定の濃度を維持した。
- 3) 血清 T 濃度は TP 投与終了時高濃度となっていたが、その後漸減して4日目に最底となった後は再び

増加して24日目にピークとなった後は漸減して64日目には対照群と同じ濃度となった。

すなわち LH および FSH と T はその増加・減少が逆に変化し、両者がたがいに negative feedback 反応により調節されていることが示された。

4) 下垂体組織内 LH, FSH 濃度は両者ともに血清濃度とはほぼ平行に推移し、下垂体内産生と分泌が同じ変化をすることが示された。

5) TP 投与群睾丸内 T 濃度は投与終了時、対照群の1/10以下に減少していたが、その後再び増加し始めて24日目に対照群の2倍の高濃度となった後は減少することなく64日目までその高濃度を維持した。

すなわち、はねかえり現象は睾丸内 T 濃度が高濃度となったために起こった現象であると思われる。また睾丸内 T 濃度が高くなった原因としては Leydig cell の LH に対する感受性が高くなったためであると考えられる。

稿を終るに臨み、終始御指導ならびに御校閲を賜った恩師酒徳治三郎教授に深謝致します。また本研究にあたり御指導いただきました本学第三内科、小林勝昌先生ならびに横浜市立大学泌尿器科、穂坂正彦先生、自治医大産婦人科玉田太朗教授に深謝致します。さらに御指導、御協力下さった山口大学泌尿器科学教室の諸先生方に深謝致します。また下垂体ホルモンの RIA にあたり御協力いただいた栄研 ICL に深謝致します。

なお本論文の要旨は1979年10月、第52回、日本内分泌学会秋季大会において発表した。

文 献

- Heller GG, Nelson WO, Hill IB, Henderson E: Improvement in spermatogenesis following depression of the testis with testosterone. *Fertil Steril* 1: 415~422, 1950
- Heckel NJ, Rosso WA, Kestel L: Spermatogenic rebound phenomenon after administration of testosterone propionate. *J Clin Endocrinol* 11: 235~245, 1951
- 酒徳治三郎・北山太一・蛭多量令・吉田 修・高山秀則・小松洋輔：造精機能障害の診断と治療—Rebound phenomenon の応用を中心として—産婦人科治療 15: 687~693, 1967
- Joel Ch A: The spermatogenic rebound phenomenon and its clinical significance. *Fertil Steril* 11: 384~391, 1960
- Lamensdorf H, Compere D, Begley G: Testosterone rebound therapy in the treatment of male infertility. *Fertil Steril* 26: 469~472, 1975
- Charny CW, Gordon JA: Testosterone rebound therapy: a neglected modality. *Fertil Steril* 29: 64~68, 1978
- Rowley MJ, Heller CG: The testosterone rebound phenomenon in the treatment of male infertility. *Fertil Steril* 23: 498~504, 1972
- Mauss J: Effect of long-term testosterone oenanthate administration on male reproductive function: clinical evaluation, serum FSH, LH, Testosterone, and seminal fluid analysis in normal men. *Acta Endocri* 78: 373~384, 1975
- 持田 豊：男性ホルモンの中枢作用に関する実験的研究. 日医大誌 19: 3353~3367, 1960
- 志田圭三・茅原礼七・吉沢信雄・内藤正之・吉田富佐男：男子不妊症の臨床. ホルモンと臨床 8: 917~924, 1960
- 那須誉人：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
- 瀧原博史：特発性男子不妊症患者に対する Testosterone-Clomiphene 投与療法. 日本不妊学会雑誌 25: 101~111, 1980
- 木下裕三・穂坂正彦・西村隆一・高井修道：[Radioimmunoassay による睾丸組織中 Testosterone 濃度の測定. ホルモンと臨床 25: 1039~1044, 1977
- Lee PA: Regulation of human gonadotropins. VIII. Suppression of serum LH and FSH in adult males following exogenous testosterone administration. *J Clin Endocrinol Metab* 35: 636~641, 1972
- Schally AV et al: Hypothalamic regulatory hormones. *Science* 179: 341~350, 1973
- Schally AV: Effect of sex steroids on pituitary responses to LH- and FSH-releasing hormone in vitro. *Endocrinology*, 93: 893~902, 1973
- Peterson JR NT: Regulation of human gonadotropins. III. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in sera from adult males. *J Clin Endocr* 28: 1473~1478, 1968
- Steinberger E, Chowdhury M: Control of pituitary FSH in male rats. *Acta Endocr* 73: 235~241, 1973
- Chowdhury M, Steinberger E: Differences of the effects of the testosterone propionate on the production of LH and FSH. *Acta Endocr* 82: 683~690, 1976

- 20) Ludwig DJ: The effect of androgen on spermatogenesis. *Endocri* **46**: 453~481, 1950
- 21) 志田圭三・茅原礼七・小林修・横川正之・北沢豊吉・中野渡亀夫: Spermatogenic steroid ホルモンと臨床 **8**: 5~16, 1960
- 22) Hohlweg W, Dorner G, Kopp P: Über die wirkung intratestikularer testosternimplantaten auf sexualverhalten und fertilitat ostrogenbebn-delter rattenmannchen. *Acta Endocrinologica* **36**: 299~309, 1961
- 23) Ewing LL, Stratton LG, Desjardins C: Effect of testosterone polydimethylsiloxane implants upon serum production, libido and accessory sex organ function in rabbits. *J Reprod Fert* **35**: 245~253, 1973
- 24) Berndtson WE, Desjardins C, Ewing LL: Inhibition and maintenance of spermatogenesis in rats implanted with polydimethylsiloxane capsules containing various androgens. *J Endocr* **62**: 125~135, 1974
- 25) Root A, Steinberger E, et al: Isosexual pseudo-precocity in a 6-year-old boy with a testicular interstitial cell adenoma. *The Journal of Pediatrics* **80**: 264~268, 1972
- 26) Steinberger E: The role of androgens in the inhibition of spermatogenesis in man. *J Clin Endocrinol Metab* **37**: 746~751, 1973
- 27) Morse HC: Testosterone concentration in testes of normal men: Effects of testosterone propionate administration. *J Clin Endocrinol Metab* **37**: 882~886, 1973
- 28) Oshima H, Negishi T, Yokwa M, Ochi-Ai K: Clinical evaluation of testosterone pellet implantation in the testis as a treatment of male infertility. *The Testis in Normal and Infertile Men*. p.561~565, Raven Press, New York, 1977
- 29) Fahim MS: Local male hormonal therapy in male infertility, A preliminary report. *Arch Andrology* **3**: 181~184, 1979
- 30) Pirke KM, Vogt H-J, Lehnig W, Sintermann R: Intratesticular testosterone concentration in patients with disturbed fertility. *Andrologia* **11**: 320~325, 1979
- 31) Schiff I: Testicular testosterone concentration following testicular vein ligation. *Fertil Steril* **31**: 76~78, 1979

(1981年6月5日迅速掲載受付)