

〔原著〕

ラット睪丸の発育における自律神経の役割

村 野 俊 一*

(昭和58年12月20日受付)

要 旨

生体のホメオスターシスを保つ機構は内分泌系ならびに神経系の調節が主たるものと考えられる。睪丸の発育には既に視床下部-下垂体-性腺系のホルモンによる調節機構が知られているが、自律神経との関連については不明の点が多い。本研究では睪丸の発育における自律神経の役割について検討した。生後13日齢のラット片側睪丸へ分布する神経を外科的に、もしくは 6-Hydroxydopamine を用いることにより化学的に切断すると、6~10週齢での処置側睪丸重量は対照とした対側睪丸重量に比して有意に減少した。この効果は処置の時期が遅くなるほど減少した。組織学的検討により、睪丸重量の減少は精細胞の減少によることが明らかになった。精細胞に比し、間質の Leydig 細胞はよく保持されていた。この神経作用の機序を用らかにする目的で、生後13日齢のラット睪丸に各種自律神経遮断剤処置を行ない、21日齢での睪丸重量を検討した。睪丸重量は Propranolol, Atropine 処置で減少し、Phenoxybenzamine 処置で増加した。従って睪丸の発育には交感神経の β 作用と副交感神経が促進的に、交感神経の α 作用が抑制的に働いていると考えられた。Testosterone には生殖器官の発育を促進する作用があることから、自律神経作用、睪丸の発育、Testosterone 代謝の三者の関連についても検討した。その結果、睪丸の発育に対する自律神経の作用には一部 Testosterone 代謝が介在している可能性が見出された。

Keywords: Testicular development, Testosterone metabolism, Autonomic nervous system, 6-Hydroxydopamine.

略語一覧: 6-OHDA; 6-Hydroxydopamine, Androstandione; 5 α -Androstan-3,17-dione, Dihydrotestosterone; 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one, Androstandiol; 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol, Androstenedione; 4⁴-Androsten-3,17-dione, Testosterone; 17 β -Hydroxy-3-oxo-4-androstene, 17 β -Dehydrogenase; 17- β -Hydroxysteroid: NAD 17- β -Oxidoreductase, 5 α -Reductase; 4⁴-3-Ketosteroid 5 α -oxidoreductase, 3 α (β)-dehydrogenase; 3 α (β)-Hydroxysteroid: NAD(P)⁺oxidoreductase.

はじめに

生体内での中枢神経系の重要な役割の一つは生体各部位で行われている数多くの代謝を直接に調節したり、あるいはそれらを統合したりして生体全体としてのホメオスターシスを維持していくことである。中枢神経系からの情報の伝達は主として神経系と内分泌系を通じて行われ、末梢諸臓器の代謝はこの2つの系の影響をうけて変動する。しかしながらこれら2つの系の相互の関連につ

いては不明の点が多い。睪丸は生殖ならびに内分泌機能を有しており、種の維持や性の分化に重要な役割を果す臓器である。睪丸では個体の発育、成長に伴って精子形成や Testosterone 分泌等の機能が発現していくが、その過程で著明な代謝の変動がみられる¹⁾。従来よりこれらの代謝変動には視床下部-脳下垂体-性腺系の内分泌支配が関与することが知られてきた^{1,2)}。一方神経系による支配については Kunz ら^{3,4)}により睪丸に分布する交感神経の切断が精細胞の変性と減少を伴う睪丸の

* 千葉大学医学部第2内科学教室

Shunichi MURANO: The Role of Autonomic Nervous System on Development of Rat Testis.
The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University.
Received for publication, December 20, 1983.

萎縮を引き起こすことが報告されており、自律神経が睾丸に対して何らかの調節機能を有していることが推測される。私共は幼若ラットの睾丸に分布する上・中精神経を切断すると睾丸の発育が阻害されることを見出して既に報告した⁵⁾。しかし、この交感神経の作用が α -, β -adrenergic receptor のいずれを介して発揮されるのか、また、副交感神経がどのように関与するのかについてはいまだ明らかではない。そこで本研究では一方ではこれら種々の自律神経遮断剤を用いてその睾丸の発育に対する影響を解析し、他方では睾丸における Testosterone 代謝酵素活性の変動を指標として自律神経による代謝調節の機構および自律神経と内分泌作用との連関について検討を加えた。

実験動物ならびに材料

動物：ウイスター系雄性ラットを用いた。

試薬：6-Hydroxydopamine (6-OHDA), D-glucose-6-phosphate monosodium salt, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-reduced form (NADP-H⁺), 5 α -Androstan-3, 17-dione (Androstandione), 5 α -Androstan-17 β -ol-3-one (Dihydrotestosterone), 5 α -Androstan-3 α , 17 β -diol (Androstandiol), 4^A-Androsten-3, 17-dione (Androstenedione), 17 β -Hydroxy-3-oxo-4-androstene (Testosterone) および Atropine は Sigma 社, Glucose-6-phosphate-dehydrogenase は Boehringer Mannheim 社, *p*-Anisaldehyde, L-Ascorbic acid, DL-Propriolol Hydrochloride および Phenoxybenzamine hydrochloride は 半井化学工業 K.K., 2,5-Diphenyloxazole (DPO) および 2,2'-*p*-Phenylene-bis (5-phenyloxazole) 1,4-bis [2- (5-phenyl)-oxazolyl] benzene 3-(4-phenyl-2-pyridyl)-5, 6-diphenyl-1, 2, 4-triazine (POPOP) は和光純薬工業 K.K. よりそれぞれ購入した。Sesame oil は山桂産業 K.K., Silica Gel 60 は Merck 社の製品を使用した。

実験方法

飼育条件：明暗12：12時間周期(明期08:00～20:00), 24 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C の恒温室内で飼育し、自由摂食、摂水とした。

外科的神経切断：密栓したガラス容器中にてエチルエーテルによる吸入麻酔を施した後ラットを取り出して開腹し、先細ピンセットを用いて顕微鏡下に右側の上および中精神経を精巣動脈に沿って存在する結合織と共に睾丸より近位5mmの部位で剝離、切断した (Fig. 1) 後に腹膜、腹壁を二層に閉じた。尚反対側の睾丸には偽手術を行ない対照とした。

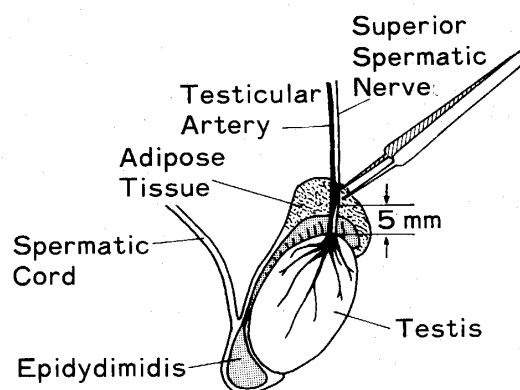


Fig. 1. Scheme of surgical denervation

化学的神経遮断：

(1) 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) 処置：エチルエーテル吸入麻酔後開腹し、実験条件により 6-OHDA を 4～80 μ g/g 体重になるよう 8 μ l の 0.01% アスコルビン酸に溶解後ただちに睾丸被膜下に注入した。対側の睾丸には同量の 0.01% アスコルビン酸のみを注入して対照とした。腹膜、腹壁はそれぞれ二層に分けて縫合して閉じた。

(2) Propranolol, Phenoxybenzamine, Atropine 処置：各薬剤の用量は 32 μ g/g 体重とし、Propranolol, Phenoxybenzamine は 8 μ l の Sesame oil に懸濁し、Atropine は 8 μ l の Ethanol-sesame oil 混液 (1:3, vol./vol.) に懸濁して睾丸被膜下に注入した。対側には溶媒のみを注入し、対照とした。

組織標本の作製：ラットを屠殺後睾丸を摘出し、Bouin 液で固定した後パラフィン包埋し、得られた切片に Hematoxylin-Eosine 染色を施した。

Testosterone 代謝酵素活性の測定：

(1) 17- β -Hydroxysteroid: NAD 17- β -Oxidoreductase (1, 1, 1, 63) (以下 17 β -Dehydrogenase と略) 活性の測定：酵素液はラット睾丸をテフロンガラスホモジナイザーを用いて 0.25M Sucrose-5mM Tris-HCl Buffer (pH 7.4) 中で 10% ホモジネートとして調製したものをを用いた。150 μ l の酵素液に 50 μ l の反応液 {組成：6mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 20mM Glucose-6-phosphate (G-6-P) monosodium salt, 100 μ g/ml G-6-P dehydrogenase, 10mM MgCl₂, 2mM NADP⁺, 20 μ M [³H] Androstenedione (0.075 μ Ci/tube)} を添加して 30 $^{\circ}$ C, 20 分間反応させた後 1 ml のクロロホルム-メタノール混液 (2:1, vol./vol.) を加えて反応を停止した。その後 1,000g, 5 分間の遠心を行ない、二相に分配された試料の上層 (水層) を吸引除去し、下層 (クロロホルム層) の 0.1ml をとり、窒素ガスにより蒸発乾固

させた。本試料に各ステロイドの Carrier および指標物質として, Androstenedione, Testosterone, Dihydrotestosterone, Androstandiol, Androstandione をおのの $5\mu\text{g}$ 含んだクロロホルム溶液 $20\mu\text{l}$ を加えて溶解し, シリカゲル薄層クロマトグラフ板に吸着させベンゼン-アセトン混液 (4 : 1, vol./vol.) にて展開した。各ステロイドのスポットは Anisaldehyde reagent で発色させて確認した後, 基質 (Androstenedione), 反応産物 (Testosterone, Dihydrotestosterone, Androstandiol, Androstandione) に分けて削りとり, 得られた試料にメタノール $30\mu\text{l}$ を加えた後にトルエンシンチレーター (0.4% DPO, 0.04% POPOP) を 5ml 添加して放射活性を測定した。液層分配での各ステロイドのクロロホルム層への移行率はすべて98%以上であった。酵素活性 (pmoles/20min/mg タンパク質) は $1,000$ (pmoles/tube) $\times$ d.p.m. (反応産物) $\div$ d.p.m. (基質+反応産物) $\div$ タンパク濃度 (mg/tube) で算出した。

(2) $4\text{-}3\text{-Ketosteroid } 5\alpha\text{-oxidoreductase}$ (1, 3, 1, 4) (以下 $5\alpha\text{-Reductase}$ と略) 活性の測定; $17\beta\text{-Dehydrogenase}$ 活性に準じた方法で測定した。ただし, 反応液は $20\mu\text{M}$ [^3H] Androstenedione のかわりに $2\mu\text{M}$ [^3H] Testosterone ($0.075\mu\text{Ci/tube}$) を基質として含んだものを用いた。薄層クロマトグラフィーはまずクロロホルム-アセトン混液 (4 : 1, vol./vol.) を用いて2分の1の高さまで展開し, 更にベンゼン-アセトン混液 (4 : 1, vol./vol.) を使用して二段階に展開した。各ステロイドのスポットは反応産物 (Dihydrotestosterone, Androstandiol) とその他の部分に分けて削りとり, 放射活性を測定した。酵素活性 (pmoles/20min/mg タンパク質) は 100 (pmoles/tube) $\times$ d.p.m. (反応産物) $\div$ d.p.m. (反応産物+その他) $\div$ タンパク濃度 (mg/tube) で算出した。

(3) $3\alpha(\beta)\text{-Hydroxysteroid : NAD(P)}^+ \text{ oxidoreductase}$ (1, 1, 1, 50および1, 1, 1, 51) (以下 $3\alpha(\beta)\text{-Dehydrogenase}$ と略) 活性の測定; $17\beta\text{-Dehydrogenase}$ 活性に準じた方法で測定した。ただし, 反応液は $20\mu\text{M}$ [^3H] Androstenedione のかわりに $20\mu\text{M}$ [^3H] Dihydrotestosterone ($0.075\mu\text{Ci/tube}$) を基質として含んだものを用いた。薄層クロマトグラフィーで分離後各ステロイドのスポットを反応産物 (Androstandiol) とその他に分けて削りとり, 放射活性を測定した。酵素活性 (pmoles/20min/mg タンパク質) は $1,000$ (pmoles/tube) $\times$ d.p.m. (反応産物) $\div$ d.p.m. (反応産物+その他) $\div$ タンパク濃度 (mg/tube) で算出した。

睪丸組織の Testosterone および Dihydrotestosterone

Table 1. Weight of Testis in 13 day-old and 6 week-old Rats (g)

	right	left
13 day-old (n=6)	0.025 ± 0.001	0.026 ± 0.001
6 week-old (n=9)	0.75 ± 0.04	0.73 ± 0.03

Mean $\pm$ S.E.M.

の測定: Testosterone/Dihydrotestosterone RIA kit (RCC, Amersham, Buckinghamshire, England) を用いてラジオイムノアッセイ法で測定した。本法では酸化法を用いて Testosterone と Dihydrotestosterone を分離測定することができる。

タンパク量の測定: 牛血清アルブミンを標準として, Micro-Biuret 法⁹⁾で測定した。

結 果

(1) 無処置ラットの睪丸重量: 13日齢および16週齢のラットの睪丸重量には左右差は認められなかった (Table 1)。

(2) 外科的神経切断による睪丸重量の変化: 13日齢, 19日齢, 21日齢でそれぞれ手術を施したラットを6~10週齢で屠殺して睪丸重量を測定すると術側睪丸重量は著しく低下し, その対照側睪丸重量に対する比は13日齢が0.14, 19日齢が0.49, 21日齢が0.83 (いずれも平均値) であり, 早期に手術が行われた群ほど低下していた (Table 2)。

(3) 6-OHDA 処置による化学的交感神経遮断の睪丸重量への影響:

(a) 6-OHDA 用量の検討; 13日齢のラットの右側睪丸に体重 (g) あたり $4\mu\text{g}$, $8\mu\text{g}$, $16\mu\text{g}$, $32\mu\text{g}$, $80\mu\text{g}$ の 6-OHDA をそれぞれ投与し, 6週齢で屠殺して睪丸重量を測定した (Table 3)。いずれの用量でも処置側の睪丸重量は対照 (左) 側睪丸重量に比較して減少していた。処置側睪丸重量の対照側睪丸重量に対する比をとると 6-OHDA の用量が増加するにつれてそれぞれ 0.88, 0.76, 0.64, 0.28, 0.24 (いずれも平均値) と低下していた。

(b) 6-OHDA 投与時期の検討; 13日齢, 17日齢, 21日齢のラット右側睪丸に 6-OHDA ($16\mu\text{g/g}$ 体重) を投与し, 6週齢で屠殺して睪丸重量を測定した。いずれの群でも対照側に比較して処置側睪丸重量の減少が認められた (Table 4)。また, 処置側睪丸重量の対照側睪丸重量に対する比は処置の時期が早い程低下していた (Table 4)。

(4) Propranolol, Phenoxybenzamine, Atropine に

Table 2. Effect of Surgical Denervation on Weight of Testis

Time of Operation	Time of Sacrifice	Body Weight (g)	Weight of Testis (g)		Ratio (right/left)
			right (Cut)	left (Sham)	
13 day-old	10 week-old	355± 7 (n=10)	0.25±0.13	1.74±0.06	0.14
19 day-old	6 week-old	177± 1 (n= 6)	0.38±0.16	0.78±0.05	0.49
21 day-old	9 week-old	297±20 (n= 7)	1.23±0.09	1.49±0.05	0.83

*: p<0.05, **: p<0.01, Mean±S.E.M.

Table 3. Dose Effect of 6-Hydroxydopamine on Weight of Testis

Dose of 6-OHDA	Body Weight (g)	Wight of Testis (g)		Ratio right/left
		right† (6-OHDA)	left†† (Sham)	
4μg/g B.W. (n=6)	160± 9	0.77±0.02	0.88±0.01	0.88
8μg/ gB.W. (n=3)	190±24	0.76±0.05	1.00±0.03	0.76
16μg/g B.W. (n=3)	190± 4	0.76±0.06	1.18±0.03	0.64
32μg/g B.W. (n=3)	178± 8	0.31±0.03	1.12±0.08	0.28
80μg/g B.W. (n=5)	191± 2	0.24±0.05	1.02±0.03***	0.24

Mean±S.E.M. *; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001

† 6-OHDA treatment, †† Sham operation

Table 4. Effect of Time of 6-Hydroxydopamine Administration on Weight of Testis

Time of Administration	Time of Sacrifice	Boby Weight(g)	Weight of Testis (g)		Ratio (right/left)
			right (6-OHDA)	left(Sham)	
13 day-old	6 week-old	167± 4	0.54±0.04	0.84±0.02	0.64
17 day-old	6 week-old	180± 5	0.77±0.02	0.97±0.02	0.79
21 day-old	6 week-old	173±13	0.81±0.08	0.90±0.09	0.90

***: p<0.001, Mean±S.E.M.

よる化学的神経遮断の睾丸重量への影響：生後13日齢で Propranolol, Phenoxybenzamine または Atropine を 睾丸被膜下に注入したラットを生後21日齢で屠殺して睾丸重量を測定し、対照側を1として睾丸の重量比を計算すると、Propranolol, Atropine 処置でそれぞれ0.88±

0.02, 0.55±0.08 (Mean ± S.E.M.; n = 5) でいずれの場合も減少していた。しかし、Phenoxybenzamine 処置では1.14±0.05と逆に増加が認められた。

(5) 外科的神経切断ならびに 6-OHDA 処置 睾丸の組織学的検討：Fig. 2 は13日齢で外科的神経切断を行

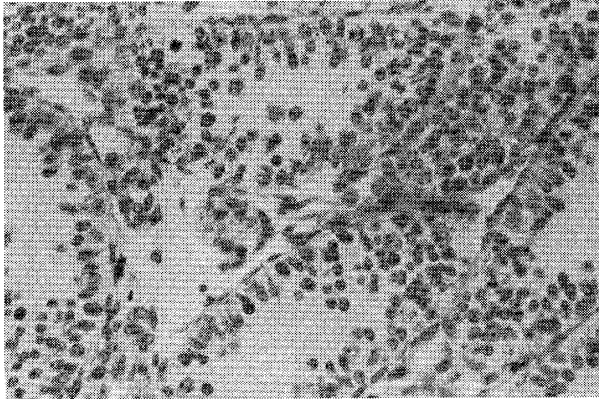


Fig. 2. 外科的に神経切断を施したラット睾丸の組織像 (×400; Hematoxylin & Eosine)
13日齢の時点で外科的神経切断を行なったラットの6週齢の睾丸組織の光学顕微鏡像。Fig. 3の対照ラットの睾丸像に比較して、精細管の変形、精細胞の変性と減少がみられる。間質組織の変化は少なく、対照との差は認められない。

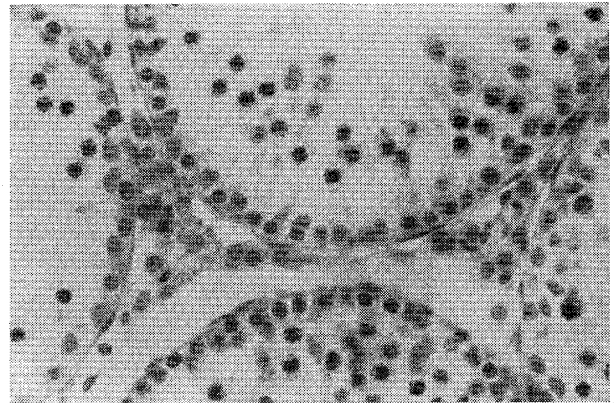


Fig. 4. 6-OHDA 処置を施したラット睾丸の組織像 (×400; Hematoxylin & Eosine)
13日齢の時点で 6-OHDA 処置を行なったラットの6週齢の睾丸組織の光学顕微鏡像。Fig. 2に比べて、精細管の変形はみられないが、精細胞の変性と減少が認められる。

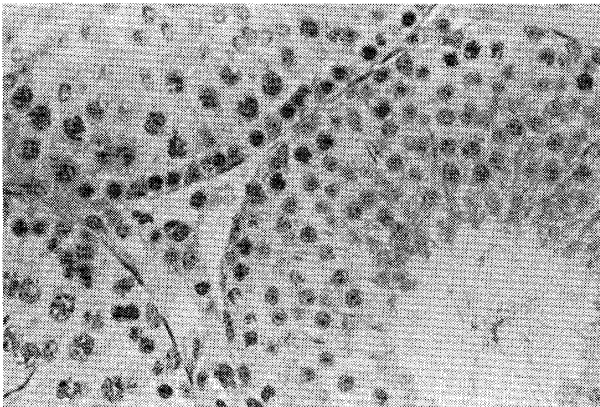


Fig. 3. 正常対照ラットの睾丸の組織像 (×400; Hematoxylin & Eosine)
Fig. 2と同一週齢の無処置の対照ラットの睾丸組織の光学顕微鏡像。精細管の内部に重層した精細胞を認め、精子形成も認められる。

なったラットの6週齢における睾丸組織の光学顕微鏡像である。Fig. 3の対照ラット睾丸の像に比較して精細管の変形、精細胞の変性と減少が認められる。精細管内には精子形成は認められない。一方 Leydig 細胞を含む間質の変化は少なく、対照との差は認められなかった。13日齢で 6-OHDA 処置を行ない 6週齢で屠殺したラットの睾丸組織についても、程度の差はあるものの外科的神経切断と同様に精細胞の変性と減少が認められた (Fig. 4)。

(6) 幼若ラットの睾丸における Testosterone 代謝の検討: 13日齢, 17日齢, 21日齢, 8週齢, 25週齢のラットの睾丸それぞれについて 17β -Dehydrogenase, 5α -Reductase, $3\alpha(\beta)$ -Dehydrogenase の活性を測定した。お

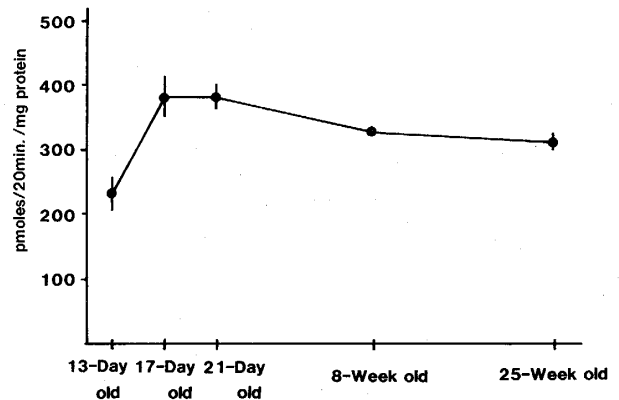


Fig. 5. Development and 17β -Dehydrogenase Activity in Rat Testis (Mean $\pm$ SEM)

のこの酵素の睾丸タンパク質あたりの活性はほぼ21日齢で最大値を示した (Fig. 5, 6, 7)。

(7) 外科的神経切断および化学的神経遮断の Testosterone 代謝酵素活性に及ぼす影響: 13日齢で外科的神経切断あるいは化学的神経遮断 (6-OHDA, Phenoxybenzamine, Propranolol, Atropine による。)を施したラットを生後21日齢で屠殺し、睾丸の 17β -Dehydrogenase, 5α -Reductase, $3\alpha(\beta)$ -Dehydrogenase 活性を測定した (Table 5)。6-OHDA 処置では対側に比べ 5α -Reductase 活性の有意な低下 ($p < 0.01$), Phenoxybenzamine 処置で 5α -Reductase, $3\alpha(\beta)$ -Dehydrogenase 両活性の有意な低下 ($p < 0.05$) が認められた。

(8) 外科的神経切断および 6-OHDA 処置を行なった睾丸の蛋白質, Testosterone, Dihydrotestosterone

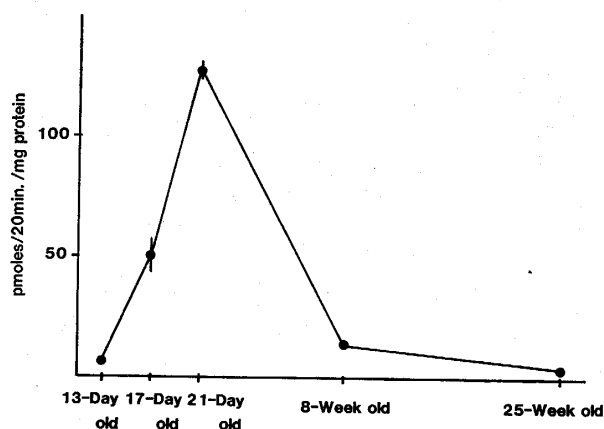


Fig. 6. Development and 5α -Reductase Activity in Rat Testis (Mean $\pm$ SEM)

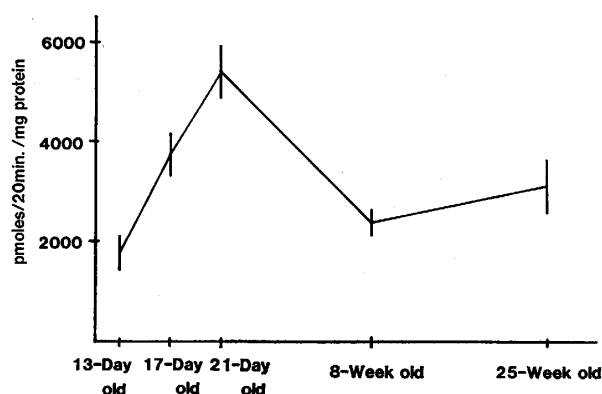


Fig. 7. Development and $3\alpha(\beta)$ -Dehydrogenase Activity in Rat Testis (Mean $\pm$ SEM)

含量：辜丸あたりの蛋白質含量は外科的神経切断，6-OHDA 処置を行なった辜丸で対照側に比べて有意な低下 ($P < 0.01$) が認められた (Table 6)。Testosterone 含量は外科的神経切断で対照側に比較して有意の低下 ($P < 0.01$) が認められ，6-OHDA 処置でも有意ではないが低下の傾向が認められた。両処置群ともに対照側辜丸の Testosterone 含量が正常対照ラット(6週齢)の辜丸 Testosterone 含量を上回っていた (Table 6)。Dihydrotestosterone 含量は対照側に比べて外科的神経切断で有意の低下 ($P < 0.05$) が認められ，6-OHDA 処置でも低下する傾向が認められた (Table 6)。Dihydrotestosterone は正常対照とした13日齢，6週齢のラットの辜丸では認められなかった。Testosterone 含量をタンパク質あたりに換算すると，外科的神経切断，6-OHDA 処置でもやや上昇する傾向が認められたが，有意差は認められなかった (Table 7)。Dihydrotestosterone 含量はタンパク質あたりでも外科的神経切断で対照側に比べて有意に低下 ($P < 0.01$) していた。

Table 5. Effects of Various Treatments on Testosterone Metabolism

	Testicular Weight (mg)		17β -Dehydrogenase (pmoles/20min/mg prot.)		5α -Reductase (pmoles/20min/mg prot.)		$3\alpha(\beta)$ -Dehydrogenase (pmoles/20min/mg prot.)	
	left	right	left	right	left	right	left	right
Nerve Cut	84.8 $\pm$ 4.9	71.6 $\pm$ 4.6	0.89 $\pm$ 0.08	1.05 $\pm$ 0.11	162.6 $\pm$ 32.1	181.4 $\pm$ 17.0	6960 $\pm$ 1279	5766 $\pm$ 521
6-Hydroxydopamine (16 μ g/g B.W.)	130.1 $\pm$ 4.8	83.1 $\pm$ 10.6	0.76 $\pm$ 0.08	0.72 $\pm$ 0.05	152.8 $\pm$ 26.8	90.8 $\pm$ 16.9	6390 $\pm$ 1271	4490 $\pm$ 387
Phenoxybenzamine (32 μ g/g B.W.)	90.0 $\pm$ 3.6	103.1 $\pm$ 8.1	0.80 $\pm$ 0.11	1.27 $\pm$ 0.20	142.5 $\pm$ 26.3	102.0 $\pm$ 22.2	5493 $\pm$ 471	4412 $\pm$ 256
Propranolol (32 μ g/g B.W.)	96.4 $\pm$ 5.0	84.6 $\pm$ 3.2	0.83 $\pm$ 0.20	0.69 $\pm$ 0.15	131.6 $\pm$ 10.1	104.6 $\pm$ 18.1	6253 $\pm$ 231	6392 $\pm$ 222
Atropine (32 μ g/g B.W.)	117.1 $\pm$ 4.8	63.2 $\pm$ 8.8	0.80 $\pm$ 0.26	0.80 $\pm$ 0.14	162.5 $\pm$ 34.9	127.5 $\pm$ 23.1	7127 $\pm$ 548	5545 $\pm$ 1276

* ; $p < 0.05$, ** ; $p < 0.01$, Mean $\pm$ S.E.M.

Table 6. Effects of Nerve Cut and 6-Hydroxydopamine on Rat Testicular Contents of Protein, Testosterone and Dihydrotestosterone (Total Content)

Operation	Sacrifice	Protein (mg/testis)		Testosterone (ng/testis)		Dihydrotestosterone (ng/testis)	
		left	right	left	right	left	right
Normal Control	13day-old (n=5)	2.67±0.067	2.89±0.085	0.46±0.08	0.51±0.09	n. d.	n. d.
	6week-old (n=4)	112.0 ±6.8	115.5 ±9.5	1.05±0.10	1.03±0.11	n. d.	n. d.
Nerve Cut	13 day-old	193.8 ±6.1	31.2 ±13.3	3.41±0.17	0.70±0.43	0.62±0.14	0.02±0.02
	10week-old (n=5)						
6-OHDA	13 day-old	129.6 ±5.7	43.1 ±24.9	5.61±0.83	2.46±0.66	1.26±0.32	0.61±0.36
	6week-old (n=3)						

n.d.: not detectable. * : p<0.05 ** : p<0.01, Mean±S.E.M.

考 察

睾丸に分布している自律神経の役割について、Kuntz はイヌを用いて、その睾丸に分布する交感神経を除去すると精細胞の変性と減少を伴う睾丸の萎縮が起こることを報告している⁹⁾。同様の知見がネコ⁴⁾やラット⁹⁾についても得られていることから、自律神経が睾丸の発育・成長の維持に何らかのかかわりをもっていることが推測される。本実験では幼若ラットの睾丸の発育に対する自律神経の役割と内分泌系との関連を中心に検討を行なった。ラット睾丸に分布する神経を外科的に切断すると、対照側に比べて睾丸重量が著しく減少し (Table 2), 精細胞の変性, 減数を中心とした組織所見が得られた (Fig. 2)。神経切断によるこの効果は処置の時期が早い程その効果が著しかった (Table 2)。6-OHDA は交感神経末端を破壊する薬物として知られている^{10,11)}。そこで、この薬物を用いて化学的に交感神経末端を遮断し、外科的神経切断の結果と比較した。6-OHDA の用量による睾丸重量の減少効果を検討すると、Table 3 に示すごとく、処置側睾丸重量は対照側に比べて本実験で用いたどの用量でも常に減少していた。ラットの発育には生下時ならびに授乳期の同胞の数および母ラットの栄養状態等が影響する。この影響を除いて各用量の効果を比較するために個々のラットで処置側睾丸と対照側睾丸の重量比をとって検討すると、その比は 6-OHDA 用量の増加に伴って低下しており、6-OHDA に対しての用量依存性のあることが認められた (Table 3)。6-OHDA を 8 µg/g B.W. 以上投与した群の対照側睾丸重量は同じ 6 週齢の無処置のラットの睾丸重量 (Table 1) ならびに 6-OHDA 4 µg/g B.W. 投与したラットの対照側睾丸重量に比べて有意に大きく、このことは片側の交感神経遮断によって対側の睾丸が代償性に肥大したことを示唆している。Gerendai ら¹²⁾は同様の現象を卵巢でも認めており、その機序に交感神経が関与していることを報告している。次に 6-OHDA の処置時期についても検討したが、その効果は外科的神経切断の効果と同様に処置の時期が早い程著しかった (Table 2, 4)。これらの結果は、ラット睾丸の正常な発育には生後 12 日目頃に交感神経の関与の必要な時期があることを示唆している。Bercu ら¹³⁾は抗 Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) 抗体を用いた実験からラット睾丸の正常な発育には生後第 1 日目から第 15 日目頃までの間の LHRH による刺激が不可欠であることを見出し、この時期にラットの睾丸発育の決定期 (Critical Period) があると報告している。本実験の結果からみると、この

Table 7. Effects of Nerve Cut and 6-Hydroxydopamine on Rat Testicular Contents of Protein, Testosterone and Dihydrotestosterone (Relative Content)

	Operation	Sacrifice	Testosterone (pg/mg protein)		Dihydrotestosterone (pg/mg protein)	
			left	right	left	right
Normal Control	—	13 day-old (n=5)	170±28	176±34	n.d.	n.d.
		6 week-old (n=4)	8.2±0.7	8.8±0.5	n.d.	n.d.
Nerve Cut	13 day-old	10 week-old (n=5)	17.7±0.8	34.7±15.5	3.2±0.6	0.3±0.3
6-OHDA	13 day-old	6 week-old (n=3)	43.1±5.5	61.5± 3.4	9.7±2.2	12.4±6.0

** : $p < 0.01$, Mean $\pm$ S.E.M.

LHRH の決定期に重複して自律神経刺激によるラット睾丸発育の決定期といったものが存在しているように考えられる。睾丸重量の減少は組織学的な検討により主として精細胞の成熟、増殖が阻害されることにより引き起こされていることが判明したが、外科的神経切断と 6-OHDA 処置により得られた睾丸の組織像にはともに精細胞の変性と減少が認められ、間質の組織所見にはほとんど傷害の認められないこと (Fig. 2, 3, 4) から外科的神経切断の効果は主として交感神経を切断したことによってもたらされたものと推測された。ゴナドトロピンの欠乏による低ゴナドトロピン型の類宦官症では精細胞, Leydig 細胞は共に未熟であるといわれ、ムンプスウイルスによる睾丸炎の睾丸組織所見でも精細胞と共に間質細胞にも変化がみられるといわれる¹⁴⁾。また染色体異常による Klinefelter 症候群では精細管は硝子化し、Leydig 細胞は塊状の形態をとるといわれている¹⁴⁾。本研究で観察された外科的ならびに化学的神経遮断による睾丸組織の変化は間質組織の変化がほとんど観察されなかったということでこれらの内分泌性、炎症性、遺伝性の睾丸萎縮をきたす代表的な疾患群とは異なっていた。外科的神経切断のなされた睾丸の組織学的な所見については Kuntz や Clark らが本実験と同様に間質への変化が少ないということを報告している⁴⁾。しかしながら、精細胞は Leydig 細胞に比べて放射線に対して感受性が高く、低エネルギーの放射線照射によって精細胞のみが傷害されるような組織像が得られること¹⁴⁾から、間質の傷害のないことが神経遮断に特異的な変化であるとまでは言い難い。次に神経遮断による睾丸の発育障害の機序を更に詳しく検討する目的でそれぞれ交感神経の α , β 作用および副交感神経の作用を遮断する薬剤である Phenoxybenzamine, Propranolol, Atropine を用いての実験を行なった。その結果、Phenoxybenzamine 処

置の睾丸は対照に比較して重量が増大し、Propranolol, Atropine 処置の睾丸ではその重量が減少していた。これらの結果は、この時期に睾丸の正常な発育、すなわち精細胞の成熟を伴う生理的な増殖には、交感神経の β -Adrenergic 作用と副交感神経作用により促進され、 α -Adrenergic 作用によって抑制されるといった自律神経系による調節機構が存在していることを示唆している。これらの薬剤の効果を議論するにあたっては、更にそれぞれの組織学的な検討が必要であると考えられる。ところで、自律神経がいかなる機構を介して睾丸の発育を制御しているのかについては現在のところ不明といわざるをえない。脾においては、インスリンの分泌が α -Adrenergic 作用によって抑制され、 β -Adrenergic 作用および副交感神経によって促進される自律神経・内分泌腺関連といった機構が存在している¹⁵⁾。更にインスリンが脂肪組織等にとっては trophic に作用するホルモンであることから、自律神経がインスリンというホルモンの作用を介してこれらの組織の発育を制御しているといった機構をも想定することができる。これと同様の機構を今、自律神経と睾丸組織の発育との間に想定してみると、自律神経作用と睾丸の発育との間に睾丸より分泌される trophic なホルモンである Androgen が介在する可能性が考えられた。Androgen は睾丸の Leydig 細胞より分泌されるが、この Leydig 細胞の周辺には自律神経末端が分布していることが報告されており¹⁶⁾、上記の仮説は検討してみるに値するものと考えられた。ラットの性成熟は生後20日目から100日目の間に完成され、それに一致して睾丸の Testosterone の分泌が生後50日目頃より急増してくる¹⁷⁾。未成熟ラットの睾丸では 5α -還元経路が主流をなし、 C_{21} - 5α -Reductase の働きにより Progesterone より Testosterone を経由せずに Androsterone や Androstandiol といった 5α -reduced C_{19} steroid が

産生されている¹⁸⁾。性成熟に至る過程でこの経路は変換されて Testosterone 産生の経路が主流となる¹⁹⁾。17 α -hydroxyprogesterone, Androstenedione, Testosterone 等を基質とする 5 α -Reductase 活性についても生後20日目頃より急激にその活性が上昇し、40日目頃には最大の活性を示すに至るが、その後また60日目頃までには殆んどその活性が認められないまでに低下してしまうということが報告されている¹⁹⁾。これらの酵素は Progesterone を Pregnandione には変換できないことから, C₂₁-5 α -Reductase とは異なった酵素であると考えられるが、ともあれ、これら 5 α -Reductase 群の活性の上昇が幼若期の Testosterone の産生を抑制し、また、産生された Testosterone についてはこれを速かに代謝し、Testosterone の作用の発現を適当な時期まで抑制しているものと考えられる。本研究でも、Testosterone を基質とした 5 α -Reductase 活性はほぼ同様の経時変動を示し (Fig. 6)、本酵素作用により産生される Dihydrotestosterone を 5 α -Androstan-3 α (β), 17 β -diol に代謝する 3 α (β)-Dehydrogenase 活性もこれと平行して増減することが認められ (Fig. 7)、幼若期にはこれら強力な生理活性を有する Androgen の作用を抑制する機構が存在することが確認された。以上の事実もまた睾丸の成長と Testosterone の代謝との密接な関連を示唆するものと考えられた。そこで次に、睾丸の成長に影響を及ぼした各種の自律神経遮断処置と Testosterone の代謝に関与する 17 β -Dehydrogenase, 5 α -Reductase, 3 α (β)-Dehydrogenase 活性との関連について検討を加えた (Table 5)。酵素活性は基礎検討の結果 (Fig. 5, 6, 7) から、これらの三つの酵素活性がほぼ最大活性を示した生後21日目の時点を選んで測定した。その結果、6-OHDA 処置睾丸で 5 α -Reductase 活性, Phenoxybenzamine 処置睾丸で 5 α -Reductase, 3 α (β)-Dehydrogenase 活性の有意な低下が認められた。このことは、これらの酵素活性の調節には交感神経の α 作用が関与することを示唆しており、交感神経の α 作用による刺激は幼若期ラット睾丸で 5 α -Reductase, 3 α (β)-Dehydrogenase 活性を高め、Androgen による睾丸早熟化を抑制しているのではないかと考えられた。神経切断ではこれらの酵素の変動が認められなかったことは、神経切断には6-OHDA 効果に加えて、他の何らかの要素が含まれていることを示唆している。また Propranolol, Atropine 処置では統計学的に有意な変動がみられなかったことにより、交感神経の β -作用および副交感神経の作用点は Testosterone 代謝以外にあることが示唆されるが、さらに薬物の投与量、投与方法を変えての検討が必要と考えられる。神経切断、6-OH-

DA 処置を施した睾丸で Testosterone 含量を検討した結果 (Table 6, 7) は、タンパク質量あたりの Testosterone 含量が両処置で高値を示し、対照側睾丸の Testosterone 含量も同週齢の正常無処置ラットに比して高値を示した。このことは、神経遮断による睾丸の発育障害に対応して両側性に Testosterone の増加を促すような中枢性の刺激が引き起こされていることを示唆している。Dihydrotestosterone 含量についてもほぼ同様の結果が認められており、これらの現象により対照側睾丸にみられた代償性肥大をよく説明しうるものと考えられる。しかしながら、生後21日齢で測定した酵素活性の変動と6週齢以後の時点で測定した Androgen 含量の結果を比較検討するためには更に詳細な両指標の経時的な測定が必要であると考えられる。以上述べたごとく、自律神経が睾丸の発育に及ぼす影響に関して、その一部ではあるが自律神経が Testosterone 代謝酵素活性の変動を介して睾丸の生育を制御している可能性が考えられた。自律神経によりその機能を調節される酵素の存在は Simazu らの肝 Phosphoenolpyruvate carboxykinase の報告²⁰⁾をはじめとし、肝の 5 α -Reductase の活性についても言われており²¹⁾、自律神経が酵素活性の変動を通じて末梢臓器の機能を制御するという機構は生体調節の本来の機構の一つであると考えられる。しかしながら、これらの機構の存在に関しての報告はいまだ僅少であり、その異常による病態としても僅かに脂肪肝や Lipodystrophy などが想定されているにすぎない。今後更に多くの代謝の制御に対する自律神経の関与が明らかにされ、それによって解明される病態も少なくないものと考えられる。自律神経作用と睾丸の発育制御の間に介在する機構としては他に血管床の拡張、収縮を介した血液成分の供給の多寡による調節などが考えられ、神経遮断時の睾丸循環血流量やゴナドトロピン濃度、ゴナドトロピン受容体などの検討により、本実験で観察された Testosterone 代謝の変動などについてもその意義が更に明確になるものと期待される。

おわりに

生体の正常な発育、成長には体内諸臓器の均衡のとれた発達が必要である。その均衡は内分泌系ならびに神経系などの情報伝達機構により保持され、統御されており、生体内では常にこれら二つの系が協調的あるいは補完的に働いているものと考えられる。本研究ではこれらの二つの系の影響が重複して観察できる臓器として睾丸をとり上げ、発育、成長に伴うこれら二つの系の変動と連関について検討した。その結果、従来内分泌系に比較

して軽視されがちであった自律神経の役割が明らかになり、更に神経系と内分泌系の作用が Testosterone の代謝を要として辜丸の発育を制御する機構の存在が示唆された。今後は更に、ホメオスターシスの均衡が保てなくなる状態、例えば老化などの病態についても同様に神経・内分泌相関の観点から検討することによりその病像の理解を深め、臨床の場に役立てていくことが出来ると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行の御指導を賜った恩師、千葉大学医学部第二内科学教室、吉田尚教授ならびに富山医科薬科大学、熊谷朗副学長（前千葉大学医学部第二内科教授）に深甚の謝意を表します。更に御助言ならびに技術的御指導を賜った愛媛大学医学部第二医化学教室、奥田拓道教授、大阪大学蛋白質研究所代謝部門、中川八郎教授、永井克也助教授、愛媛大学医学部第一解剖学教室、絹谷政江助教授、千葉大学第二内科学教室、斎藤康講師に深く感謝の意を表すると共に研究遂行にあたって格別の御協力を賜った千葉大学医学部第二内科学教室、愛媛大学医学部第二医化学教室、大阪大学蛋白質研究所代謝部門の方々に感謝致します。尚本論文は審査学位論文であります。

SUMMARY

Little is known about the role of the nervous system in metabolism or development of testis. We observed that testicular denervation in infant rats inhibited testicular development and degenerated seminiferous epithelial cells. In order to clarify this mechanism, the effects of surgical denervation were compared with those of chemical denervation with various blocking agents of the autonomic nerve. Chemical denervation using 6-hydroxydopamine (6-OHDA), propranolol (PR) or atropine (AT) inhibited the testicular development. On the contrary, phenoxybenzamine (PZ) enhanced it. It is known that testosterone has a trophic effect on sexual organs and its metabolism was changed dramatically during development of the testis. We, therefore, examined the metabolism of testosterone in such denervated testes. 5α -Reductase activity was decreased by chemical denervation using 6-OHDA or PZ. $3\alpha(\beta)$ -Dehydrogenase activity was decreased by treatment with PZ. Testosterone concentration in the testis was increased either in surgically denervated or 6-OHDA-treated testis. From these results, it was suggested that part of the effects of the autonomic nervous system on testicular development is mediated by the

changes in testosterone metabolism.

文 献

- 1) 矢内原巧：思春期と性腺因子。代謝 16, 529-554, 1979.
- 2) Yanaihara, T. and Oshima, H.: The role of luteinizing hormone-releasing hormone on androgen biosynthesis in sexual maturation of the male rats; Enhancement of 5α -reductase in testis; Acta Endocrinol. (Kbh) [Suppl.], 212, 29, 1977.
- 3) Kuntz, A.: Experimental degeneration in the testis of the dog. Anat. Rec. 17, 221-234, 1919.
- 4) King, A. B. and Langworthy, O. R.: Testicular degeneration following interruption of the sympathetic pathway. J. Urol. 44, 74-82, 1940.
- 5) Nagai, K., Murano, S., Minokoshi, H., Okuda, H. and Kinutani, M.: Effects of denervation and local 6-hydroxydopamine injection on testicular growth in rats. Experimentia 38, 592-594, 1982.
- 6) Moore, R. J. and Wilson, J. D.: Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate: Δ^4 -3-Ketosteroid 5α -Oxidoreductase (Rat Ventral Prostate); In: Method in Enzymology, vol. 36, O'Malley, B. W., Hardman J, G. eds. pp. 466-474, 1975.
- 7) Testosterone/Dihydrotestosterone RIA Kit (Product Information); The Radiochemical Centre Ltd. Amersham, Bucks. England, May 1978 (Revised September 1979)
- 8) Itzhaki, R. F. and Gill, D. M.: A Micro-Biuret method for estimating proteins. Anal. Biochem. 9, 401-410, 1964.
- 9) Khodorovski, G. I.: Effect of removal of lateral sympathetic trunks on structure and function of testes and prostate, Sechenov Physiol. J. USSR 51, 1123-1127, 1965.
- 10) Thoenen, H.: Surgical, immunological and chemical sympathectomy. Their application in the investigation of the physiology and pharmacology of the sympathetic nervous system; In: Handbook of Experimental Pharmacology, New Series. Blaschko, H. and Muscholl, E., eds. vol 33, pp 813-844, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1972.
- 11) Malmfors, T. and Sachs, C.: Degeneration of adrenergic nerves produced by 6-Hydroxydopamine. Eur. J. Pharmacol. 3, 89-92, 1968.
- 12) Gerendai, I., Marchetti, B., Maugeri, S., Amico Roxas, M. and Spagnini, U.: Pre-

- vention of compensatory ovarian hypertrophy by local treatment of the ovary with 6-OH-DA; *Neuroendocrinology* **27**, 272-278, 1978.
- 13) Bercu, B. B., Jackson, I.M.D., Sawin, C. T., SaFall, H. and Reichlin, S.: Permanent impairment of testicular development after transient immunological blockade of endogenous luteinizing hormone releasing hormone in the neonatal rat. *Endocrinology* **101**, 1871-1879, 1977.
- 14) Bardin C. W. and Paulsen C. A.: The testes; In: *Textbook of Endocrinology*, 6th ed. Williams, R. H. ed. Chapter 6, pp 293-354, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London and Toronto, 1982.
- 15) Porte, D. Jr. and Halter, J. B.: The endocrine pancreas and diabetes mellitus; In: *Textbook of Endocrinology*, 6th ed. Williams, R. H. ed. Chapter 15, pp 716-843, W. B. Saunders Company, Philadelphia, London and Toronto, 1982.
- 16) Hooker, C. W.: The intertubular tissue of the testis; In: *The testis*, vol. 1, Johnson, A. D., Gomes, W. R. and Vandemark, N. L., eds. Chapter 8, pp 483-550, Academic Press, New York and London, 1970.
- 17) 大島博幸: ステロイドホルモン生成に関する生化学的調節; 日本比較内分泌学会編: ステロイドホルモンの生物化学. pp 93-129, 学会出版センター, 東京, 1978.
- 18) Yamada, M and Matsumoto, K.: Pathway from Progesterone to 5 α -Reduced C₁₉ Steroids Not Involving Androstenedione and Testosterone in Immature Rat Testes *in Vitro*. *Endocrinology* **94**, 777-784, 1974.
- 19) Inano, H., Hori, Y. and Tamaoki, B.: Effect of age on testicular enzymes related to steroid bioconversion. *Ciba Found Colloq. Endocrinology* **16**, 105-119, 1967.
- 20) Shimazu, T. and Ogasawara, S.: Effects of hypothalamic stimulation on gluconeogenesis and glycolysis in rat liver. *Am. J. Physiol.* **228**, 1787-1793, 1975.
- 21) 野村純一, 鳩谷 龍, 久松憲二, 東村輝彦, 神谷重徳: 脳肝機能連関についての臨床的, 実験的研究. *ホと臨床* **30**, 1323-1327, 1982.