

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 幼若ラット辜丸の性細胞におけるtestosteroneの5 $\alpha$ -reductionについて                             |
| Author(s)    | 安江, 俊二  |
| Citation     | 大阪大学, 1973, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/2301">https://hdl.handle.net/11094/2301</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

幼若ラット睾丸の絨細胞におけるtestosteroneの5 $\alpha$ -reductionについて

伊江俊二

## 序論

Smith等(1930)及び Greep & Fevold(1937)等の研究以来、脳下垂体が精子形成を維持する為に必要である事は、よく知られてきた。しかし、その為にFSHとLHを介するandrogenがどの様に関与するかについては多くの議論が行われてきたが結論は得られていない。一般的にはFSHがspermatogenesisと最も密接な関係を有すると考えられてきたが、一方では、大量のandrogenが脳下垂体摘出動物に投与された場合に、spermatogenesisが保たれる事も知られていた。この作用は、androgenの細精管に対する直接作用であると考えられる様になった。(Clermont & Harvary 1967; Steinberger & Duckett 1967; Lostroh 1969)。Primary spermatocyteの減数分裂を促進し、spermatidを形成する所に、testosteroneは働くであろう事を示唆する実験成績も示されている。

最近のAnderson & Liao(1968), Baulieu et al(1968), Bruchovsky & Wilson(1968)等の研究により、長い間active androgenであると考えられてきたtestosterone

は、Active androgen ではなく、これが標的組織で  
 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone に代謝され、初めて活性化  
 されて、receptor と結合し、作用を示す様にな  
 る事が明らかにされた。この testosterone  $\rightarrow$   
 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone をおこす  $\Delta^5$ -5 $\alpha$ -reductase は、  
 androgen の標的組織(特に核)に、特異的に強  
 い活性がある。この C<sub>19</sub>-steroid-5 $\alpha$ -reductase は、  
 幼若ラット睾丸に、強く存在する事が報告さ  
 れているが、これは Leydig cell で生合成された  
 testosterone の 5 $\alpha$ -androstanediol, androsterone への  
 代謝による Leydig cell での catabolic action である  
 と考えられている。(Stylianou et al, 1961; Inano &  
 Tamaaki 1966; Nayfeh et al 1966; Inano et al 1967;  
 Ficher & Steinberger 1968; 1971; Oshima et al 1970; Strickland  
 et al 1970; Coffey et al 1971; Steinberger & Ficher 1971)。  
 しかし、androgen の標的細胞であることの  
 考えから、細精管、特に germ cell の testosterone  
 の 5 $\alpha$ -reduction を検索した報告は、全く見られな  
 い。そこで著者等は、collagenase 処理と組織  
 培養法を使用する germ cell の分離法を南苑し

in vitro 系で、睾丸、細精管、germ cell (性細胞) . non-germ cell (非性細胞) による  $^3\text{H}$ -testosterone の 5 $\alpha$ -reduction を、さしに組織培養系で細精管による  $^3\text{H}$ -testosterone の 5 $\alpha$ -reduction を探索したので報告する。この内容のあるものは Yamada, Yasue & Matsumoto (1972) に発表したのである。

## 材料と実験方法

：実験動物： Wistar系の雄ラット。著者等の実験室で飼育しているもので、二つの年齢グループを用いた。幼若ラットとしては、生後30日～35日のもので、spermatogenesisは、immature spermatid stageよりも進んでいない。(ラットの精子形成の概略をFig 6に示す。) 成熟ラットとしては、生後80日のものを用いた。

：幼若ラット睪丸から、細精管、性細胞、非性細胞の分離： 幼若ラット睪丸の被膜をとり、これを0.1% collagenaseと1mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を含むphosphate buffer (pH 7.4) 3mlで、37°C、30分間、ゆくりと振盪する。細精管が充分ほぐれたらば、振盪をやめ、シャーレに集め、冷phosphate bufferで線り返し、充分洗淨を行い、肉質細胞及びcollagenaseを洗い除く。その後、1500rpm、10分間遠心させる。このpelletを細精管分画として実験に用いた。(Fig 10に成熟ラット細精管中の横断面図の一部を示す。)

ラット睾丸細胞の Suspension を、2~3 日間、静置培養フラスコ中で、培養すると、性細胞は培地溶液中に浮遊し、Leydig cell を含め非性細胞は、培養フラスコの底のガラス面に密着し増殖する。Primary spermatocyte, mature spermatid, 及び spermatogonia は、細胞培養で3~4週間、維持されるが、immature spermatid は、1~3 日間しか維持されない。(Steinberger & Steinberger, Steinberger et al. de Kretser et al.)

これらの事実に基づいて、著者等は、単離した細精管の培養によって、性細胞と非性細胞を分離した。その操作を以下に示す。単離した細精管は、再び 0.1% collagenase と 1mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O を含む phosphate buffer (pH 7.4) 3ml 中で、37°C 30 分間、ゆっくと振盪する。細精管が長さで、3mm 以内の小断片になつたときは、振盪をやめ、冷 phosphate buffer (pH 7.4) で、繰り返し洗浄し、1500rpm, 10 分間遠心する。こうして集めた細精管は、注意深く、ゆっくと、ピペッティングし、長さで 0.5mm 以内の cell cluster

にし、1,500 rpm、10分間、遠心する。この pellet を、培養液 (pH 7.3) に resuspend する。一管丸の  $\frac{1}{2}$  に相当する cell 及び cell cluster が、40 ml MEM 培地 (Eagle's minimum essential medium) (4 mM L-glutamine と 10% calf serum が添加してある。) を含む 1 瓶中で、静置状態、34°C で 48~60 時間培養された。この培養液は、pH 6.9~7.3 に維持された。培養開始後、24 時間中に cell cluster のほとんど、及び細胞の一部は培養ビンの表面に密着し分裂を始める。48~60 時間中に、いくつかの浮遊細胞が密着した cell cluster から遊離してくる。48~60 時間培養後、培液中に浮遊している細胞を集め、1,500 rpm、10分間遠心する。この pellet は、phosphate buffer 中に resuspend し、ゆっくりと洗い、1,500 rpm、10分間遠心する。この操作を 2 回繰り返す。こうして得た pellet を、性細胞分画として実験に供した。培養ビンに密着し、増殖した細胞は、0.02% EDTA を含む phosphate buffer (pH 7.4) 中で incubation した後、ヒペリチニドによって培養



ピンから5.はかし, 1500rpm. 10分間遠心した。  
この pellet は, phosphate buffer (pH 7.4) 中に resuspend  
して, 1,500rpm, 10分間遠心した。この操作  
は洗浄の為のもので, 2度繰り返して行う。  
この pellet を非性細胞として実験に供した。

● 化学薬品 ● [1,2-<sup>3</sup>H] Testosterone は, Radiochemical  
Center, Amersham から得たもので, 精製は, hexane:  
benzene (1:1 v/v) - formamide 系 (Zaffaroni & Burton 1951) を  
用いたペーパークロマトグラフィーによって行っ  
た。精製 <sup>3</sup>H-testosterone の純度は, 非放射性的,  
testosterone 15mg を加えて, 再結晶法にて調べた  
ところ, 97% である事が分かった。非放射性的  
steroid は, Steraloids, INC. から入手した。それ  
らの純度は, Zaffaroni のペーパークロマトグラフィー  
系, あるいは, Amberlite IRC-50 を用いた溶出クロ  
マトグラフィー (Seki & Matsumoto 1967) によつて check  
した。ペーパークロマトグラフィーには,  
Whatman NO1 口紙を用いた。collagenase と NADPH  
は, Sigma Chemical Company から入手した。他薬

品は、analytical gradeを用いている。

： cell free系のincubation条件： 睾丸， 細精管，  
性細胞， 非性細胞及び他の組織を， 口紙によ  
り水分を除き， 秤量後すぐに0.001M EDTAを含む  
0.25M sucrose 溶液中でhomogenateにした。 /nmole  
の<sup>3</sup>H-testosteroneを2x10cm試験管の底に決め， 0.02ml  
メタノールで溶解する。 各々の試験管へ， 0.5~  
0.7mlの0.3M potassium phosphate buffer pH7.4 (0.06M nico-  
tinamide, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.8mg NADPHを含む。)を加える。

さきにincubation mixtureのtotal volumeが1.0~1.5ml  
になる様に， 組織の10~200mgを含むhomogenateを  
0.5~0.8ml加え， water bath中で， 34°Cにて， 15  
分間か， あるいは30分間振盪する。 incubation  
の終りに， 1NHCl 0.05mlを加え， Ether: CHCl<sub>3</sub> (4:1 v/v)  
と混する事により， 反応をとめる。

： 組織培養系のincubation条件： 前述の方法  
で得た幼若ラット睾丸の細精管， 前立腺， 筋肉  
の1~10mgを無菌的に採取し， P1シール中の，  
Eagle's minimum essential medium (4mM L-glutamineを含む

ぬ。2ml に入れ、CO<sub>2</sub>-incubator (90% air 10% CO<sub>2</sub>)  
 中で、37°C、24時間 Preculture した。Preculture 後、  
 3H-testosterone (1μCi; 1nmol/L) を含む、Eagle's minimum  
 essential medium (4mM L-glutamine を含む。) 2ml と  
 交換し、更に 2~24 時間培養し、培養終了後  
 tissue と medium に分けて、1N HCl を 0.2ml 加えて反  
 応をとめた後、steroid を抽出した。

⋮ Steroid の分離と同定 ⋮ (testosterone 標的組  
 織に於ける、testosterone の代謝様式を参考の為、  
 Fig 9 に示してある。) Sample の incubation 後に  
 非放射能担体として、50~100μg の testosterone,  
 5α-androstane-3α,17β-diol, 5α-androstane-3β,17β-diol, androsterone  
 , androst-4-ene-3,17-dione (androstenedione), 17β-hydroxy-  
 5α-androstan-3-one (5α-dihydrotestosterone), 5α-androstane-  
 3,17-dione (5α-androstamedione) を加える。この反応  
 液を 10ml の ether:chloroform (4:1 v/v) で 3 回抽出を  
 行った後、抽出液を 5ml の純水で逆洗する。

最初のフロマトグラフは、hexane:benzene  
 (1:1 v/v)-formamide 系を用いたペーパー  
 フロマト

トグラフーを行う。主な放射活性は、二つの帯域に分かれ、front側(b)に androsterone, androstenedione, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -diol が重なり、origin側(a)には、testosterone と 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ -diol が重なり、ピークをつくる。(a), (b) を分けて切り取り、10ml x 2 ノール、10ml ペトンで抽出し、40°C、通気中で乾燥する。放射活性の回収率を調べる為に10 $\mu$ g 液体シンチレーションカウンター、トルエン系でカウントする。一般的に、(a)分画と(b)分画の放射活性の和は、ペーパーにスポットしたサンプルの放射活性の90%以上であり、よい回収率を示す。(a)分画は、トリジン:無水酢酸(5:1 v/v)中で室温にて、24時間 acetylation を行う。これを hexane-formamide 系のペーパークロマトグラフーで、testosterone-acetate の分画と 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol-diacetate + 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol-diacetate の分画に分離する。(b)分画は、eluent として ethanol: benzene: cyclohexane: water (25:50:225:1 v/v) を用いた Amberlite IRC-50 column chromatography によって、

5 $\alpha$ -androstenedione, androsterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, androstenedione を、各々きれいに分離できる。(Fig. 5 参照) Epiandrosterone は、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone 分画に溶出するが、本実験では、trace 量しか検出されなかつた。たゞ、Epiandrosterone の分離、同定は、行われなかつた。最初の chromatography 上で各々の分画に含まれる放射活性の割合を%で算出し、この各分画の%を次の chromatography の結果に従って、この中に含まれる steroid の割合に応じて分配してゆき、各 Product の産生量を算出した。最後に chromatography で分離された  $^3\text{H}$ -products に 15 mg の non-radioactive standard steroids を加え、再結晶を行い、specific activity を constant にすることにより、products の同定を行うと同様に、products の産生量を正確に算出した。最後の2度の結晶の specific radioactivity が  $\pm 5\%$  of the mean である事を最低条件とした。表中に示される、全ての  $^3\text{H}$ -steroid は、再結晶法によつて、constant specific activity で同定された。Table 5 に再結晶のデータのいくつかを例示

しておく。(Fig 7.8 に steroid の分離, 同定の概略が図式化してある。)

### ：組織の固定及び染色： 分離された細精管

が、遠心させ 10% formalin 中で固定された。そのサニフォルをパラフィンで包埋させ、連続切片を作成し、haematoxylin & eosin で染色された。

幼若ラット睾丸は、ホルマリンで固定され、切片に切り、haematoxylin & eosin で染色された。

性細胞、非性細胞は、メタノールで固定され、Giemsa's solution で染色された。

### ：組織内の testosterone の定量： 幼若ラットの睾丸、細精管、筋、腎臓、前立腺が水中で homogenize され、10~50mg の組織を含む homogenate の 1ml が、testosterone 濃度の測定に用いされた。

testosterone の組織中の濃度は、competitive protein binding method of Mayes & Nugent (1968) により行われた。

著者等の研究室に於る本法の evaluation は、Matsumoto et al (1970) に記載されている。

● タンパク質の定量 ● 各々の組織のタンパク

質含量は、the biuret reagent (Gornal et al 1979) を

用いて測定した。組織量が少ない場合には

、Micro biuret method (Ruth et al 1964) と、Cu-Folin

method (Lowry et al 1951) を用いて測定した。

● less polar substance I の 70% x タノールと石油エー

テルによる分配 ● less polar substance I に 70% MeOH

10ml と石油エーテル 4ml を加え、分液漏斗に

入れ、約 300 回程度振盪し、二層に分かれるまで

静置する。次に、石油エーテル層と 70% MeOH

層を分け、70% MeOH 層に新たに石油エーテルを 4ml

加え再度分液漏斗に於り抽出する。石油

エーテル層と 70% MeOH 層への less polar substance I の

分配を調べる。普通、steroid は、70% MeOH 層

に分配され、lipid の様には non polar 化合物は石油

エーテル層に分配される。

● less polar substance I の アルカリ加水分解 ● lipid の

完全な加水分解を行う条件で、less polar substance I

を加水分解する。 less polar substance - I (lipid 成分) 1 = cold carrier steroid と し、 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone, Androsterone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol,  $\Delta^4$ androstenedione, を各 2 100 $\mu$ g ずつ加え、最終的に 80% MeOH, 15% KOH (w/v), total volume 2ml とし、70 $^{\circ}$ C 2.5 時間、静置により反応させる。(時々振盪してやる。) 反応終了後、純水で 50% MeOH 溶液になった後に希釈する。次に、酢酸エチル 20ml にて 2 度抽出する。抽出液を純水 1ml で 2 度逆洗を行う。このプルカリ加水分解は、lipid を完全に加水分解する激しい反応である。(酢酸エチル抽出は steroid を抽出する為に行うものである。)



## 実験結果

● 細精管, 性細胞, 非性細胞の純度 ●

細精管と肉質組織からなる幼若ラット<sup>睾丸</sup>の形態学的切片を Fig 1 に示した。 Fig 2 より、分離された細精管中に、肉質細胞が混入してゐない事が、連続切片によつて明らかになつた。

又細精管内の細胞は、障害を受けてゐない。細精管を培養した場合の floating cell、及び培養ビンの底面に密着し、増殖する attaching cell を Fig 3 と Fig 4 に示す。 floating cell は、 Fig 3 の様に、immature spermatids, spermatocytes, spermatogonia を含む germinal element である。性細胞の viability は約 50% であつた。 attaching cell は、 Fig 4 の様に fibroblast 様、非性細胞からなつてゐる。 Sertoli cell, fibroblast, 血管壁細胞等の鑑別はできなかった。本実験で、非性細胞中に trace 量の germinal element の混入が見られたが、実験結果に影響を与へる程の量ではなかつた。

: 睾丸と他組織に於る,  $^3\text{H}$ -testosterone から 5 $\alpha$ -  
 reduced products の生成について :  
 100mg の tissue homogenate と 1nmole の  $^3\text{H}$ -testosterone  
 を 1ml 中で,  $34^\circ\text{C}$ , 30 分間 incubation した場合の  
 products の生成を % で示したものが Table 1 であ  
 る。 Table 1 中で constant specific radioactivity を示  
 さなかった steroid は, 最終的な結晶より換算し  
 た量以下 (くの印をつけてある。) とした。  
 幼若ラットの細精管, 睾丸は, androgen 標的細  
 胞である前立腺や精囊よりも, 5 $\alpha$ -reduced products の  
 生成が多い。一方 androgen non-responsive tissue  
 である筋や脾臓では, 5 $\alpha$ -reduced products はほとん  
 ど生成されなかった。前立腺, 精囊を  $^3\text{H}$ -test-  
 osterone と incubation すると 5 $\alpha$ -reduced products とし  
 て, 主に 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone を生ずるが, 幼若  
 ラットの睾丸及び細精管は, testosterone から主に  
 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol と androsterone を生ずる。  
 この事は, 幼若ラットの睾丸と細精管中に高  
 い  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性に伴った 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ -  
 hydroxysteroid dehydrogenase の著しく高い活性がある

事を示している。成熟ラットの細精管と睾丸は、testosteroneから5 $\alpha$ -reduced productsの生成に於て、幼若ラット睾丸に見られるのと同様の独特のパターンを示す。しかし乍ら、成熟ラットの睾丸及び細精管に於る5 $\alpha$ -reductionの生成速度は、幼若ラットの睾丸と細精管に比較して、非常に低い事がTable 1より分る。Table 1に示した結果は、幼若ラット睾丸のC19-steroid- $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductaseの活性が、前立腺よりも高い事を示唆しているので、さらに組織量を変化させて、 $^{3H}$ -testosteroneから5 $\alpha$ -reduced productsの生成を異なったincubation timeで調べてみた。(Table 2) C19-steroid- $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductaseの活性は、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone + 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol + androsteroneのような全ての5 $\alpha$ -reduced productsの総和を組織量/g, incubation time 1時間当りに換算して、あわせて示されている。5 $\alpha$ -reduced steroidの生成速度は、Table 2に示されているincubation条件のもとでは、組織量とincubation timeに反比例してはあるか比例している。幼若ラットの $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -

reductase の活性は、前立腺の 20 倍高い order を  
 示している事が以上の事から分った。さ  
 に、幼若ラットの睾丸と前立腺の  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase へ  
 の incubation 温度の影響が調べられた。31°C、  
 34°C、37°C に於る、5 $\alpha$ -reductase の活性は、前立腺で  
 は、3.8, 3.8, 3.4, n moles/g tissue/hr であり、睾  
 丸では、各々 73.1, 83.9, 93.0 n moles/g tissue/hr  
 であつた。ここでも、 $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、  
 幼若ラット睾丸の方が、前立腺よりも高い値を  
 示している。

### ● 組織内の testosterone 濃度 ●

幼若ラットの睾丸、細精管、前立腺、腎、筋  
 中の testosterone 濃度は、100mg 組織当り 0.02 n moles  
 以下であつた。本実験では、1ml medium 中に  
 100mg 以下の組織量を用いたので、incubation mixture  
 中の  $^3\text{H}$ -testosterone を、1 n mole/ml で加えた時、持  
 ち込み testosterone によつて 2% 以下しか希釈され  
 ない。しかし乍ら、成熟睾丸の持ち込みの  
 testosterone 含量は、まだ調べてない為、成熟

ラット睾丸に於ては、持ち込み testosterone 含量が、radioactive substrate を充分供給する程、高い可能性がある。それ故に Table 1 に示された成熟ラット睾丸の  $3H$ -testosterone から、5 $\alpha$ -reduced products の生成は、低く見すぎているかも知れない。

● 幼若ラット睾丸の 5 $\alpha$ -reduced products 生成への collagenase の影響について ●

細精管は、実験方法のところで述べた様に、collagenase 処理によって分離した。だから testosterone から 5 $\alpha$ -reduced products の生成への collagenase の影響を調べてみた。incubation mixture に 0.01% と 0.1% の collagenase を加えて反応させてみたが、睾丸の  $\Delta^5$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、全く、あるいは、ほとんど影響を受けなかった。(Table 3) 加うるに、collagenase 処理によって分離された細精管は、incubation の前に繰り返し、何度も洗滌を行った。細精管内の細胞も Fig 2 で見られる様に、正常で、何ら障害が見られない。それ故に、細精管の  $\Delta^5$ -5 $\alpha$ -reductase への

collagenase 処理の影響は、除去する事ができると考えられる。Table 3 から、細精管中の  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、睾丸の  $10^1$  order である。

そして、肉質組織の 5 $\alpha$ -reductase 活性は、collagenase 処理により、ほとんど失われてしまう。collagenase 処理による細精管分離操作中に、collagenase に影響を受けた肉質細胞から、 $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性が消失されてゆく。

● 幼若ラットの睾丸、細精管、非性細胞、性細胞による、 $^3\text{H}$ -testosterone から 5 $\alpha$ -reduced products の生成について ●

幼若ラットの細精管、性細胞、非性細胞の C<sub>19</sub>-steroid  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、Table 4 に示す様に、睾丸の  $10^1$  の order である事が分った。同じ条件のもとでの 3 回の実験結果の平均値を Table 4 に示しておいた。各々の実験結果は、度い一致を示していた。 $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、100mg 92107 質、incubation time 1 時間当りに生成された 5 $\alpha$ -reduced steroid の n moles で表示してある。

5 $\alpha$ -reduced steroidの生成速度は、用いた酵素濃度へ、粗くではあるが比例している。(Table 4)

使用した性細胞のviabilityは、約50%であった。ために、性細胞の $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase活性は、非性細胞及び前立腺の活性より、わずかに、より高い値を示すかも知れない。細精管、性細胞、非性細胞によるtestosteroneからの主な5 $\alpha$ -reduced steroidは5 $\alpha$ -dihydrotestosteroneと一緒に、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolと5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diolがあげられるのは、興味深い。(Table 4)

この事は、性細胞と非性細胞に於て、 $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductaseと同様に5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ - & -3 $\beta$ -hydroxy-steroid dehydrogenaseの高い活性を示唆している。

● 幼若ラット細精管の組織培養に於る3H-testosterone代謝について ●

以上のin vitroの実験は、幼若ラット細精管、性細胞では、androgen target tissue orderのtestosteroneの5 $\alpha$ -reductionがおこりえる事を示唆した。

しかし、in vivoで、この様な反応が起こって

いる事を示すものではない。従って, *in vitro*  
*incubation* よりも, *in vivo* の状態に近いと考えら  
 れる組織培養 (organ culture) で testosterone の代  
 謝を調べてみた。生後 31 日幼若ラットの細  
 精管, 前立腺, 筋を実験方法に記載してある  
 様に調製し, organ culture 系で,  $^3\text{H}$ -testosterone を加  
 え, 2 時間と 6 時間 *incubation* した。結果を  
 Table 6 に示す。5 $\alpha$ -reduced product の形成は, 培  
 地分画及び組織分画を合わせて, 全体として  
 計算している。生後 31 日幼若ラット細精管の  
 5 $\alpha$ -reduced product の形成は, 前立腺とほぼ同じ order  
 である。androgen non-responsive tissue である筋では  
 5 $\alpha$ -reduced product の形成は非常に弱く, 前立腺,  
 細精管の約  $\frac{1}{100}$  の order でしかない。生後 21 日  
 幼若ラット細精管を 2 時間, 6 時間, 24 時間と  
 organ culture で反応させたところ, 矢張り 5 $\alpha$ -reduced  
 product の強い形成を示した。(Table 7) 組織培  
 養にしては, 時間にも割合よく比例して, 5 $\alpha$ -reduced  
 product を生成している。さすに生後 21 日幼  
 若ラット細精管, 前立腺, 筋の 5 $\alpha$ -reduced product の生成を



調べてみた。(Table 8) 基質濃度を Table 8 の様に变化させ、それに伴う 5 $\alpha$ -reduced product の形成をみたところ、0.2  $\mu$ moles / 2 ml medium ~ 1  $\mu$ mole / 2 ml medium の範囲では、大体ではあるが、基質濃度按比例して代謝が行われている。しかし、1  $\mu$ mole / 2 ml medium と 5  $\mu$ moles / 2 ml medium の間では、5 $\alpha$ -reduced product の形成は、余り変化なく、恐らくプラトーに達していると考えられる。各基質濃度に於ける細精管と前立腺の 5 $\alpha$ -reduced product の形成は、ほぼ同じ order であるが、androgen non-responsive tissue である筋では、5 $\alpha$ -reduced product の形成は、14% 以上低い order ではない。5 $\alpha$ -reduced products の組成は、細精管では圧倒的に 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol が多いのが特徴であり、次に androsterone と 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone が多く存在する。しかし、前立腺では、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone が多く、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol は細精管程多くない。Robel (1971) は、ラット前立腺で、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone が増殖に関係するのに対し、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol は、分泌を促進すると言う。Okano et al (1971) は、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol

が特異的に、マウス腎の alcohol dehydrogenase  
 と  $\beta$ -glucuronidase を induce すると云う。このよ  
 うに 5 $\alpha$ -androstane diol が specific な作用を示す事  
 を示唆する成績が示されているので、5 $\alpha$ -androsta-  
 ne-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol が spermatogenesis と強い関係がある可  
 能性が考えられる。幼若ラットでは、testosterone  
 が血中に分泌される事なく、5 $\alpha$ -androstane diol と  
 なり男性二次性徴を亢進させずに spermatogenesis  
 に促進効果を及ぼしている可能性がある。

Table 6, 7, 8 の結果は、本質的には、in vitro  
 系の結果と良い一致を示している。組織培  
 養系では、細精管に於て、5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol  
 が生成しないのに、in vitro で生成するのは、  
 興味ある事だが、何故であるかは良く分らな  
 い。

● 幼若ラット細精管、前立腺、筋の organ culture  
 に於る、 $^3\text{H}$ -testosterone 代謝後の組織中及び培地  
 中の steroid 組成について ●

幼若ラット細精管、前立腺、筋の organ culture  
 に於る  $^3\text{H}$ -testosterone 代謝後、遂心により、組織

分画と培地分画に分け、各々別々に steroid 分析を行った。放射活性の各分画への分配は Table 9, 10 に示す様に、圧倒的に培地分画に回収された。(Table 9, 11(A),(B)の結果と, Table 6の結果は同じ実験からえたものである。Table 10, 12(A),(B)の結果と, Table 7の結果は、同じ実験からえたものである。) 따라서、組織分画と培地分画を合わせて total の分画として steroid 組成を出す場合、組織分画は、ほとんど影響を与えず、培地分画の steroid 組成にほぼ近い値が total の steroid 組成となる。生後 21 日と 31 日幼若ラット細精管、前立腺、筋の organ culture による 3H-testosterone 代謝後、組織分画と培地分画に分けて steroid 組成を各々の分画で別々に百分率で示したデータが、Table 11(A)(B), 12(A)(B), である。(A)が組織分画、(B)が培地分画中の各 steroid の組成を示している。(A),(B)を比較してみると分る事は、steroid 組成の傾向は、組織分画も培地分画大体同じである。前述の如く、細精管では、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol が主な産物で

前立腺では、細精管よりも  $5\alpha$ - $\Delta^4$ -hydrotestosterone  
 が多く、 $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol を存在している  
 。 androgen non-responsive tissue である筋では、 $5\alpha$ -red-  
 uced steroid は、ほとんど生成しておらず、基底  
 の testosterone のまま存在している。さらに  
 (A)、(B) をよく比較すると、less polar substance I と記  
 載した値の値が、組織分画と培地分画で大きく  
 異なっている。 androgen non-responsive tissue であ  
 る筋では、less polar substance I の組成は、(A)、(B)  
 にて、ほとんどかわらないが、細精管、前立  
 腺とも、組織分画中の値が培地分画中の値よ  
 り圧倒的に高い。これは、組織中に特異的  
 に less polar substance I が多く存在する事を示して  
 いる。 Table 12 (A) より、生後 21 日幼若マウスでは  
 、時間とともに増加し、24 時間 incubation では、  
 組織分画中の 38.9% が less polar substance I となる  
 。 この less polar substance I は、E. E. Baulieu (1968)  
 が、前立腺に認められたものと類似のものと考  
 えている。(Table 11 (A) 参照) less polar substance I は  
 、前述の Amberlite IRC-50 column chromatography に

lipid 分画に溶出してくる。(Fig 11 参照)

● less polar substance I の定性分析について ●

幼若ラット細精管の organ culture によって  $^3\text{H}$ -testosterone 代謝を行うと、組織分画中に less polar substance I が生成する。(Table 11(A), 12(A) 参照) この細精管に生成する less polar substance I を、実験方法のところに記載してある様に、70% MeOH と石油エーテルにより分配したところ、石油エーテル層 (lipid 層) に、87% が、70% MeOH 層 (Steroid 層) に 13% が分配された。(この時回収率は 98% であった。) この事から放射活性を持つ物質が lipid と何らかの結合をしている可能性が考えられる。そこで、実験方法に記載してある lipid の加水分解を、15% KOH (w/v), 80% MeOH (v/v) 中で、70°C, 2.5 時間、反応を行った。反応終了後 steroid を抽出し、Amberlite IRC-50 column chromatography (Fig 5 参照) にて分析した。Fig 11 がその溶出カーブである。(less polar substance I は初めの 5 線のピーク的位置に溶出する。) column に charge し

たサニ70ルは、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol分画に71%近く回収された。各steroidの組成はTable 13に示してある。再結晶法により、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolの純度を調べたところ、83%と高い値を示した。故に、less polar substance Iは、上記アルコール加水分解によって、主に5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolが、遊離すると云える。以上の事から、幼若ラット細精管中のless polar substance Iは、主に5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolが、何か他のものと結合し、non polarな物質となって存在していると考えられる。その結合は、上記アルコール加水分解で切る事が出来、その結果、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diolが遊離する。組織分画中のsteroidはアシル化してnon polarな物質を生成する事が考えられる為、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-diacetateを、前述のAmberlite IRC-50のcolumn chromatographyにて、溶出したところ、less polar substance I分画と同じ位置に回収された。そこで15mgのcold 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-diacetateをless polar substance Iに加え、再結晶法により調べたところ、coldの

5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-diacetate の結晶中には、less-polar substance I 由来の放射活性が入らず、purity は 0% であった。(Table 14) 以上の事から、less-polar substance I は、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-diacetate ではなく、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol と、何か他のもの (例えば lipid のようなもの) と結合した nonpolar な物質であると考えられる。

## 考察

spermatogenesis は、androgen の germinal epithelium への直接作用によって維持される事が、示唆された。(Dvaskin 1944; Ludwig 1950; Clermont & Harvery 1967; Steinberger & Duckette 1967; Kalra & Prasad 1967; Lostroh 1969)

そして、C<sub>19</sub>-steroid  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase は、androgen target cell にも、やはり局在している。(Anderson & Liao 1968; Baulieu et al 1968; Bruchovsky & Wilson 1968)

本実験において、幼若ラット睾丸の性細胞の  $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase 活性が前立腺と同じ order である事が分った。それ故に、性細胞は、androgen responsive tissue の特徴を持っていると考えられる。Fig 9 に Testosterone の 5 $\alpha$ -reduction の図式を示す。

前立腺では、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone が主産物で、この steroid が活性を主に示すものと考えられている。又、androstenediols の形成も認められる。(Table 1, 3, 4, 6, 7, 8) これに対して、幼

若ラット細精管では、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diols が主産物であると考えられる。(Table 1, 3, 4, 6, 7, 8)

Robel (1971) は、ラット前立腺で、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone



が増進に関係するのに対し, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol は、  
 分泌を促進すると言う。Okano et al (1971) は、5 $\alpha$ -andro-  
 stane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol が特異的にマウス腎の alcohol dehydrogenase と  
 $\beta$ -glucuronidase を induce すると言う。この様に 5 $\alpha$ -  
 androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol が specific な作用を示す事を示唆する成  
 績が示されているので、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol が spermato-  
 genesis と強い関係がある可能性が考えられる。  
 幼若ラットでは、testosterone が血中に分泌される事な  
 く、5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol となり、男性二次性徴を促進さ  
 せずに spermatogenesis に促進効果を及ぼしている  
 可能性がある。  
 細精管の  $\Delta^5$ -3 $\alpha$ -reductase 活性は、睾丸の  $\frac{1}{10}$  の order で  
 あ、た (Table 4) 肉質細胞の重量は、細精  
 管の重量の約 7% にしか相当しない (Christensen &  
 Mason 1965) 故に、肉質組織の  $\Delta^5$ -3 $\alpha$ -reductase の比活  
 性は、細精管より約 100 倍強い。この考えか  
 らすると、細精管の  $\Delta^5$ -3 $\alpha$ -reductase 活性は、肉質組  
 織の混入による可能性が存在する。本実験  
 に於て、細精管は、前述した様に、単離した  
 細精管の組織培養法によ、て性細胞と非性細

胞 ( 肉質細胞が混入した場合、非性細胞中  
 に Leydig cell を含む。 ) に分離される。 ( Steinberger et al  
 1967 ) この性細胞の  $\Delta^5\text{-sd-reductase}$  活性は、非性細  
 胞分画より、わずかに高い活性を有するので  
 ( Table 4 )、細精管及女性細胞は、前立腺と同程  
 度の  $\Delta^5\text{-sd-reductase}$  活性を持つ事が結論として云え  
 る。主に microsomes 中に局在するラット睾丸の  $\Delta^5\text{-sd-redu}$   
 $\text{ctase}$  活性は、生後 10~30 日に増加し、40 日迄同じ  
 レベルを維持し、それ以降は活性が、急速に  
 減少する。 ( Inano et al 1967 ; Ficher & Steinberger 1971 ) 上  
 記研究者等は、 $\Delta^5\text{-sd-reductase}$  活性が、主に肉質組  
 織に関連している事を述べているが、本実験  
 も同じ結果を示している。 ( Table 3, 4 ) 本実験の  
 結果から考えると幼若ラット睾丸の肉細胞の  $\text{sd-}$   
 $\text{reductase}$  は、前立腺よりはるかに強く、性細胞の  
 それとは、前立腺と同程度の程度と云える。

細精管は前述した collagenase 処理によつて、肉質細  
 胞から分離される。本法は、顕微鏡下で細精  
 管を分離する Christensen & Mason 1965 ; Hallet al 1969 ) の方法よ  
 り、と簡単である。細精管の形態及女性酵素活

性は. collagenase

✓ 処理により、全く影響を受けなかつたが、  
 Leydig cell は破壊され、この  $\Delta^5$ -SD-reductase 活性  
 は、洗滌等により、かなり失われた。(Table 3)  
 従つて、本法は、Leydig cell の分離、検索に  
 は、不適當である。本研究の様に、細精管  
 性細胞を研究対象にする場合には、適当な  
 方法である。この細精管の cell culture により  
 性細胞を floating cell として、attaching cell であ  
 る非性細胞と分ける事が出来た。Steinberger  
 et al (1967), Dufau et al (1971) は、germinal element  
 は、floating cell として、attaching cell は、肉質細胞  
 を含めて、non-germinal element かと、増殖  
 すると報告している。著者等も floating cell  
 としては、肉質細胞様の細胞を認めなかつた。  
 .  
 $\Delta^5$ -reduced steroid の生成速度は、粗く酵素濃度  
 と incubation time (Table 2, 3, 4, 6, 7, 8) に比例してゐる  
 。このような条件下では、 $\Delta^5$ -SD-reductase 活性  
 の比較は、可能であると考えられる。in vitro  
 系の本実験に於てえられた、前立腺の  $\Delta^5$ -SD-

reductase 活性は、以前に報告 (Gloyna & Wilson  
 1969; Shimazaki et al 1969) されたものと近似であ  
 る。しかし乍ら酵素量が、より多量に用い  
 される時 (Table 3.4) は、 $\Delta^5$  5 $\alpha$ -reductase 活性は、  
 わずかに低い値を示す。tissue homogenate 中の  
 持込み *testosterone* の影響は、幼若ラットに於て  
 は、除去できるけれど、 $\Delta^5$  5 $\alpha$ -reductase 活性は、  
 tissue homogenate 中に含まれる androgen の binding  
 protein によつて、又 *testosterone* 以外の  $\Delta^4$ -steroid  
 によつて、又他の因子によつて、影響を受ける  
 かも知れない。さらに、性細胞を、比較的  
 多量に得る事が困難な為、1nmole/ml と、比較的  
 低い基質濃度を使用している。又最適の  
 incubation condition の探索も十分にたされていな  
 い。しかし、本研究では、詳細な酵素活性  
 の比較は必要でなく、前立腺と同じ order の 5 $\alpha$ -  
 reduction が、性細胞に存在するといった様な事  
 を問題にしているので、着者等の使用した、  
 実験条件は、十分なものであると考える。

章丸に於る androgen の産生細胞は、Leydig cell

であると、長し向信じられてきた。しかし、  
 細精管も pregnenolone と progesterone から、十分  
 な睾丸 androgen 合成を行う事が、in vitro と組織  
 培養の実験によって見つけられた。(Christensen  
 & Mason 1965; Hall et al 1969; Lacy & Pettite 1970; Dufau  
 et al 1971)  
 著者等は、さらに性細胞自身でも progesterone  
 → C<sub>19</sub>-steroid をおこなう事を見出した。(Yamada M.,  
 Yasue S. & Matsumoto 1973) Cholesterol は、細精管  
 中に、ほとんど入らないが、pregnenolone, progest-  
 erone と testosterone は、blood-testis barrier を通っ  
 て、すみやかに細精管中に入る。(Galjaard et al  
 1970; Parvinen et al 1970) したが故に、細精管  
 、性細胞が、pregnenolone 及び progesterone から C<sub>19</sub>-  
 steroid を生成する事は、細精管中の、適当な  
 androgen 濃度を保つ為に、重要であると考え  
 られる。低い生物学的活性を示す pre-hormone  
 が、Leydig cell から分泌され、それが、適当な  
 局在場所(例えば、性細胞)で、testosterone や  
 5 $\alpha$ -reduced steroid の様な、より活性の高い androgen

に代謝される事が考えられる。

前立腺の細胞質分画から調製した 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone-receptor複合体が、前立腺細胞ウロマチンと同様に、睾丸ウロマチンと強く結合する事が見つけられた。(Steggles A.W et al 1971)

この事実も、又、睾丸自体が androgen target tissueである事を示唆している。

以上の結果から、幼若ラット性細胞は、androgen target tissueであると考えられる。

## 要旨

NADPH存在下で tissue homogenate と  $^3\text{H}$ -testosterone の incubation 実験により、生後 30 日 幼若 ラット 睾丸 (50 ~ 100 nmoles / g tissue or 100mg protein / hr) の 5 $\alpha$ -reduced products の総量の生成速度は、前立腺 (2 ~ 4 nmoles / g tissue / hr) の約 20 倍の order であった。幼若 ラット から分離した 細精管、性細胞、非性細胞 (各々 7 ~ 10, 11 ~ 13, 5 ~ 7 nmoles / 100mg protein / hr) の  $\text{C}_{19}$ -steroid  $\Delta^5$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、前立腺とほぼ同じ order であった。一方 androgen non-responsive tissue である筋、脾臓では、 $\Delta^5$ -5 $\alpha$ -reductase 活性は、ほとんどなかった。組織培養系の場合も、幼若 ラット 細精管、前立腺の 5 $\alpha$ -reduced products の形成は、ほぼ同じ order であった。(各々 3 ~ 17, 4 ~ 20 nmoles / 100mg protein / hr) androgen non-responsive tissue である筋では、 $\Delta^5$ -5 $\alpha$ -reduced products の形成は、ほとんどみられなかった。以上の様に、組織培養系と in vitro 系の結果は、よく一致しており、細精管、性細胞が testosterone の target tissue である事が、強く示唆された。

幼若ラット睾丸の各組織（細精管，性細胞，  
 非性細胞）は，前立腺よりも高い 5 $\alpha$ -androstane-  
 3 $\alpha$ -, & 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を有してい  
 る事が分った。組織培養系で，細精管，前  
 立腺組織分画中に，特異的に less polar substance が  
 蓄積する。これは，主に 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol  
 と，何か他のもの（例えば lipid のようなもの  
 ）が，結合して，less polar な物質になっている  
 事が分った。細精管は，collagenase 処理によ  
 り分離される。そして，性細胞は，非性細  
 胞から，34 $^{\circ}$ C，2日間の細精管細胞の cell culture  
 によって分離する事ができた。

以上の事から，幼若ラット睾丸の性細胞は，  
 androgen responsive tissue の特徴をもっている事が  
 示唆された。



## 謝辞

以上の研究を遂行に際して、予備知識の浅い僕に対して、一方ならぬ御指導、御助言を下さいました共同研究者の、医学部第二病理の松本圭史先生、微生物病研究所細菌学ウイルス部門の山田盛男先生に、最大級のお礼を申し上げます。又、discussion並みに、色々と御教示下さった、微研細菌ウイルス部門の松代愛三先生、西京義武先生をはじめ、教員の皆様方、医学部第二病理の教員の皆様方に、厚くお礼申し上げます。

## 文献

Anderson K. M. & Liao S.: *Nature (Lond.)* 219 (1968) 277.

Baulieu E. E., Lasnitzki I. & Robel P.: *Nature (Lond.)* 219 (1968) 1155.

Bruchovsky N. & Wilson J. D.: *J. biol. Chem.* 243 (1968) 2012.

Christensen A. K. & Mason N. R.: *Endocrinology* 76 (1965) 646.

Clermont Y. & Harvey S. C. In: Wolstenholme G. E. W. and O'Connor

M., Eds. *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*, vol 16, J.

& A. Churchill, London (1967) p. 173.

Dufau M. L., De Kratser D. M. & Hudson B.: *Endocrinology* 88 (1971) 825.

Duaskin S.: *Amer. J. Anat.* 75 (1964) 289.

Ficher M. & Steinberger E.: *Steroids* 12 (1968) 491.

Ficher M. & Steinberger E.: *Acta endocr (Kbh.)* 68 (1971) 285.

Galjaard J. H., Van Gaasbeek J. H., De Bruyn H. W. & Van der Molen

H. J.: *J. Endocr* 48 (1970) 1.

Gloyna R. E. & Wilson J. D.: *J. clin. Endocr.* 29 (1969) 970.

Gornal A. G., Bardawill C. S. & David M. M.: *J. biol Chem.* 177 (1949) 751.

Greep R. O. & Fouold H. L.: *Endocrinology* 21 (1937) 611.

Hall P. F., Irby D. C. & De Kratser D. M.: *Endocrinology* 84 (1969) 488.

Inano H., Hori Y. & Tamaok: B.-I. In: Wolstenholme G. E. W. and

O'Connor M., Eds. *Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology*,

vol. 16, J. & A. Churchill, London (1967) p. 103.

Inano H. & Tamaoki B. - I.: *Endocrinology* 79 (1966) 579.

Kalra S. P. & Prasad M. R. N.: *Endocrinology* 81 (1967) 965.

Lacy D. & Pettitt A. J.: *Brit. med. Bull.* 26 (1970) 87.

Lostron A. J.: *Endocrinology* 85 (1969) 438.

Lowry O. H., Rosebrough N. S., Farr A. L. & Randall R. J.: *J. Biol Chem.*

193 (1951) 265.

Ludwig D. J.: *Endocrinology* 46 (1950) 453.

Mainwaring W. I. P.: *J. Endocr.* 44 (1969) 323.

Matsumoto K., Takayasu K., Mizutani S., Hamanaka Y. & Uozumi T.:

*Acta endocr. (Kbh)* 65 (1970) 11.

Mayes D. & Nugent C. A.: *J. Clin. Endocr.* 28 (1968) 1169.

Nayfeh S. N., Barefoot S. W., Jr. & Baggett B.: *Endocrinology* 78 (1966) 1041.

Oshima H., Sarada T., Ochiai K. & Tamaoki B. - I.: *Endocrinology* 86 (1970) 1215.

Parvinen M., Hurme P. & Niemi M.: *Endocrinology* 87 (1970) 1082.

Rath F., Itzhaki & Gill D. M.: *Analyt. Biochem.* 9 (1968) 401.

Seki T. & Matsumoto K.: *J. Chromatog.* 27 (1967) 423.

Shimazaki J., Matsushita I., Furuya N., Yamanaka H. & Shida K.:

*Endocr jap.* 16 (1969) 453.

Smith P. E.: *Amer. J. Anat.* 45 (1930) 205.

Steinberger E. & Duckert G. E.: *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 2 (1967) 75.

Steinberger E., Steinberger A., Vilar O., Salamon I. I. & Sud B. In:

Wolstenholme G. E. W. and O'Connor M., Eds. *Ciba Foundation*

*Colloquia on Endocrinology*, vol. 16, J. & A. Churchill, London

(1967) p. 56.

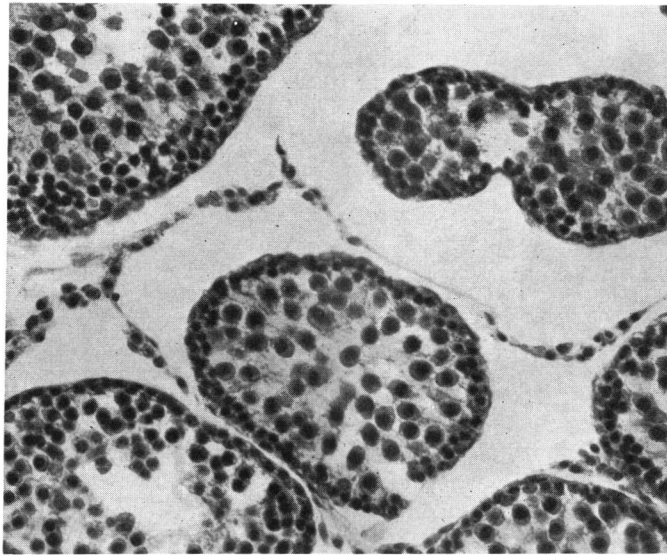
Stylianou M., Forchielli E. & Dorfman R. I.: *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 1318.

Yamada M., Yasue S. & Matsumoto K.: *Acta endocr. (Kbh)* 71 (1972) 393.

Yamada M., Yasue S. & Matsumoto K.: *Endocrinology* (1973) in press

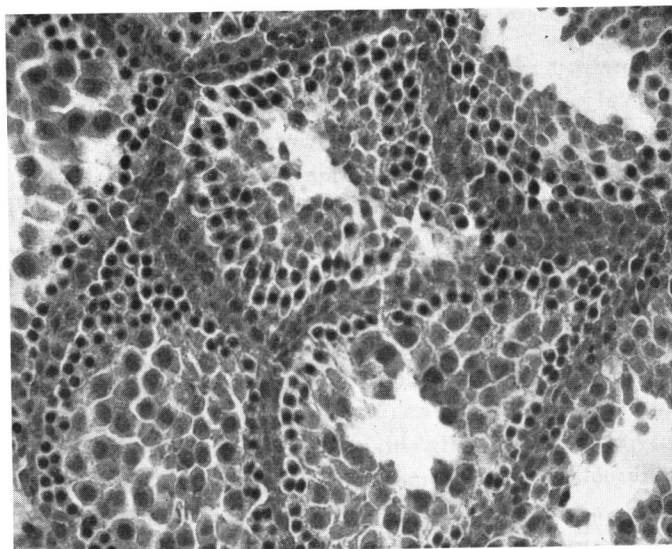
Walsh E. L., Cuyler W. K. & McCullagh D. R.: *Amer. J. Physiol.* 107 (1934) 508.

Zaffaroni A. & Burton R. B.: *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 749.



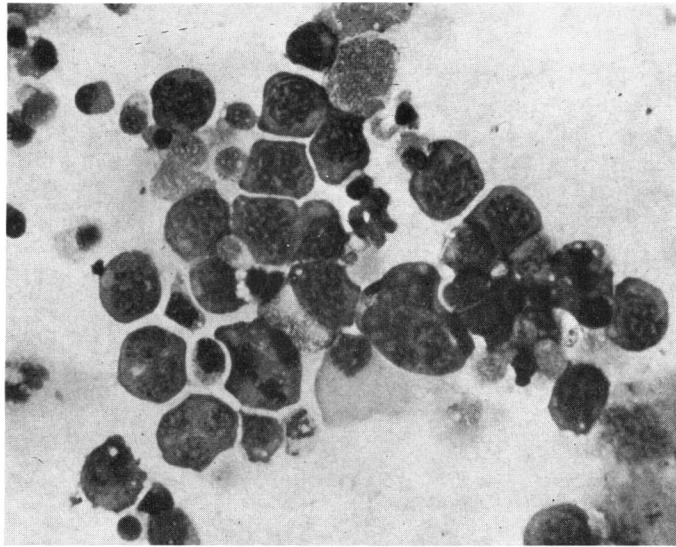
*Fig. 1.*

Microphotograph (280  $\times$ , H & E) of a section from immature rat testis. The section is composed of the seminiferous tubules and the interstitial tissue.



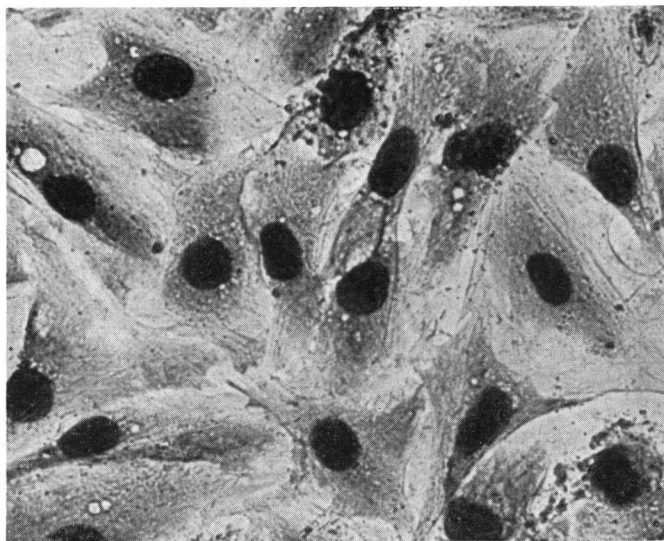
*Fig. 2.*

Microphotograph (280  $\times$ , H & E) of a cross-section from serial sections of the isolated seminiferous tubules. The lamina propria forming the boundary of the tubules is free of interstitial cells.



*Fig. 3.*

Microphotograph (420 X, Giemsa's stain) of floating cells by culture. The cells are seen to be predominantly germinal elements some of which fuse into a multinucleated mass.



*Fig. 4.*

Microphotograph (420 X, Giemsa's stain) of the attached cells by culture. Cells resembling fibroblasts are composed of the tubular non-germ cells.

Fig 5

Elution pattern from elution chromatography  
on Amberlite IRC-50

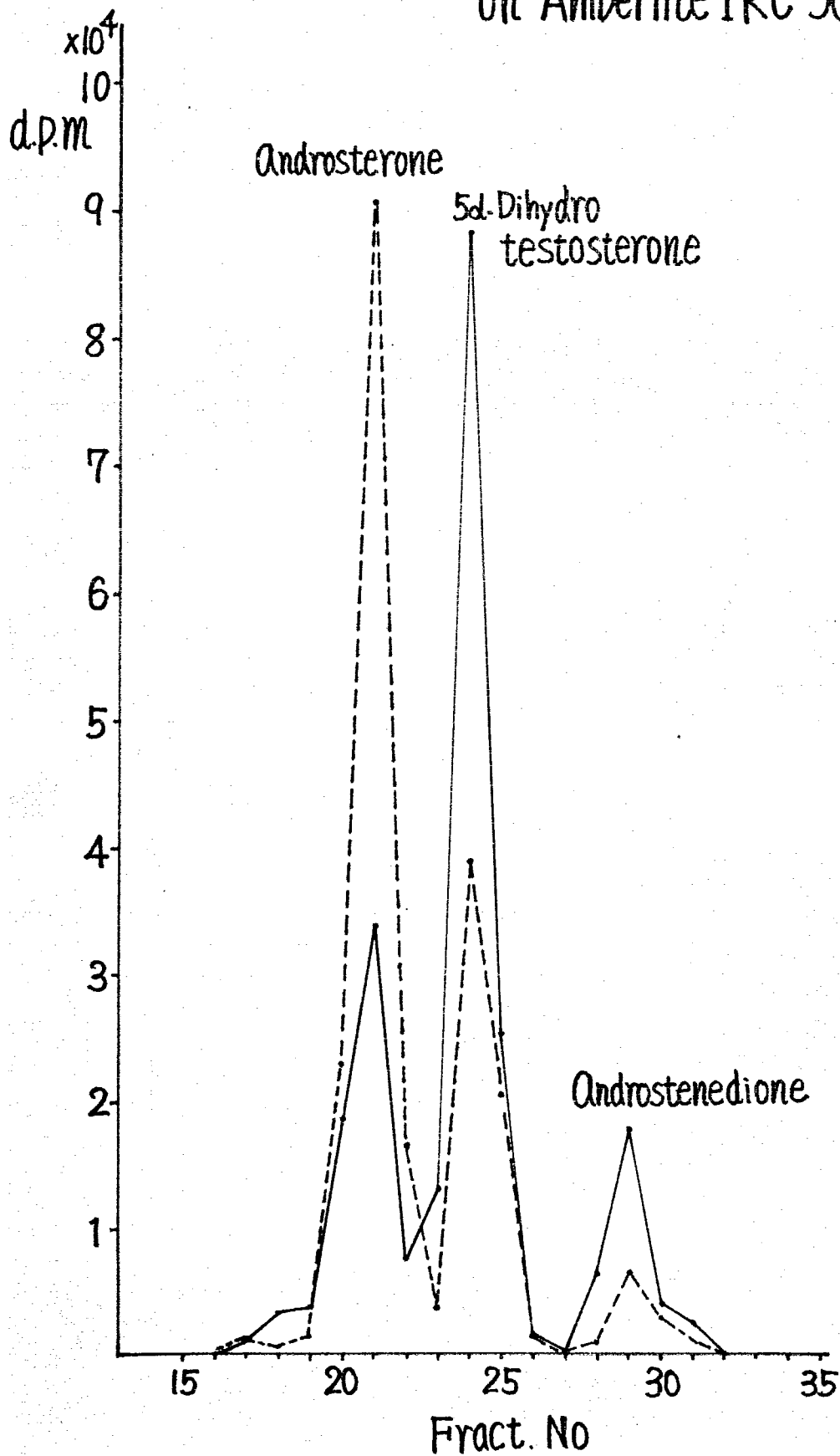
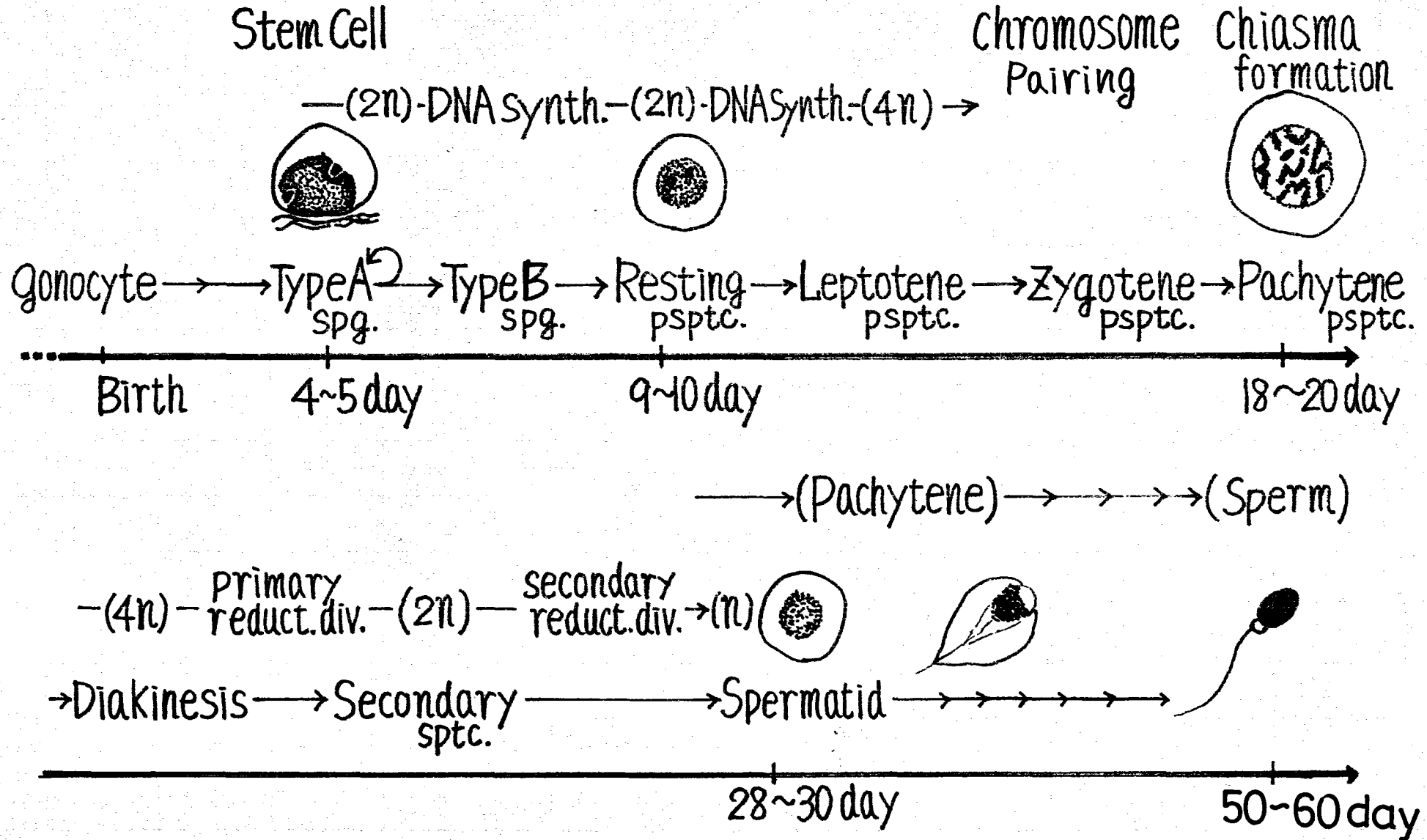


Fig 6

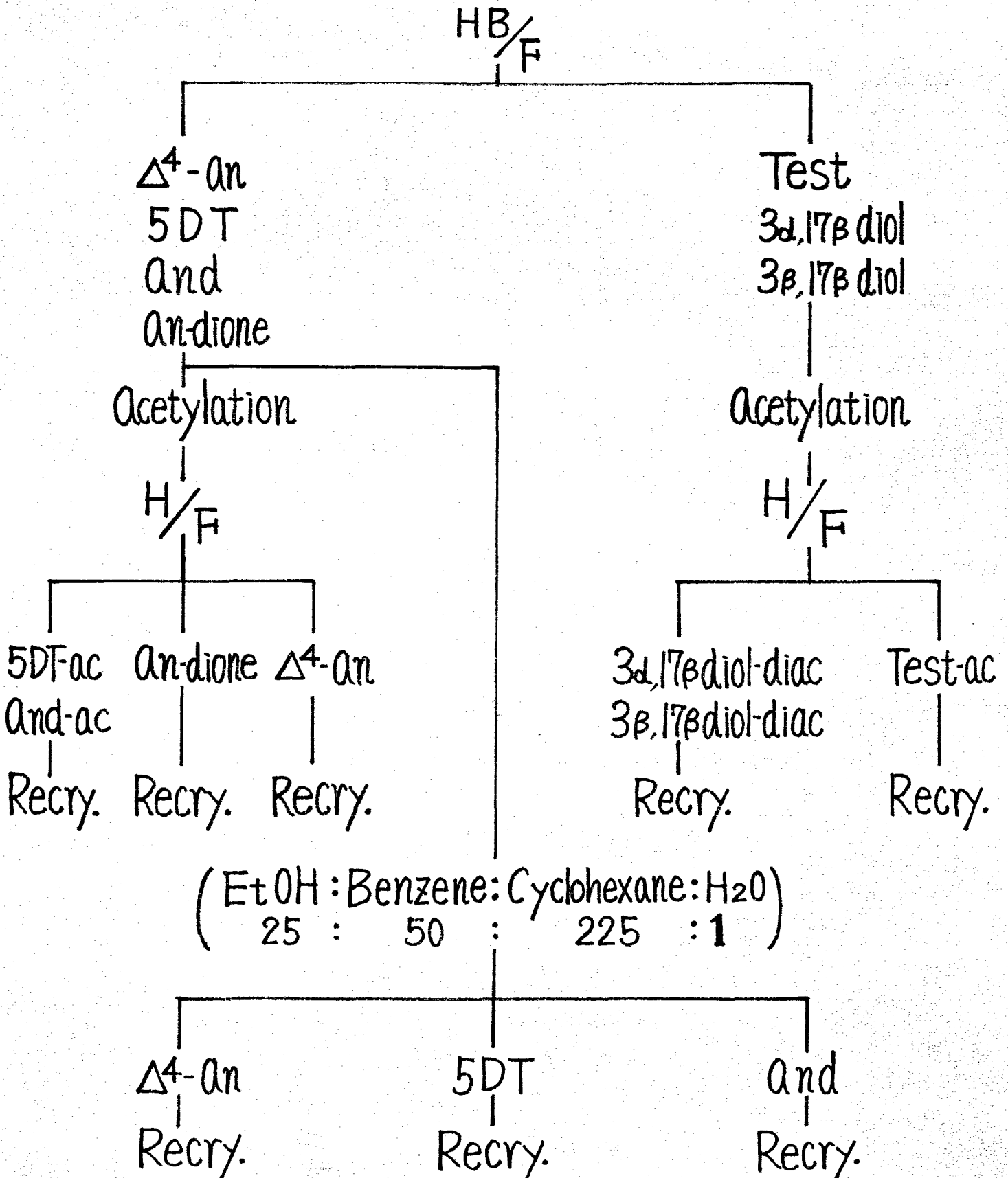
# Spermatogenesis in Rat





# Fig 7 Identification of Steroids

Extract from Homogenate



# Fig 8 Recrystallization Method

Eluated Sample

from Paper or Column Chromat.

add an authentic Steroid

Solubilize with MeOH (several drops)

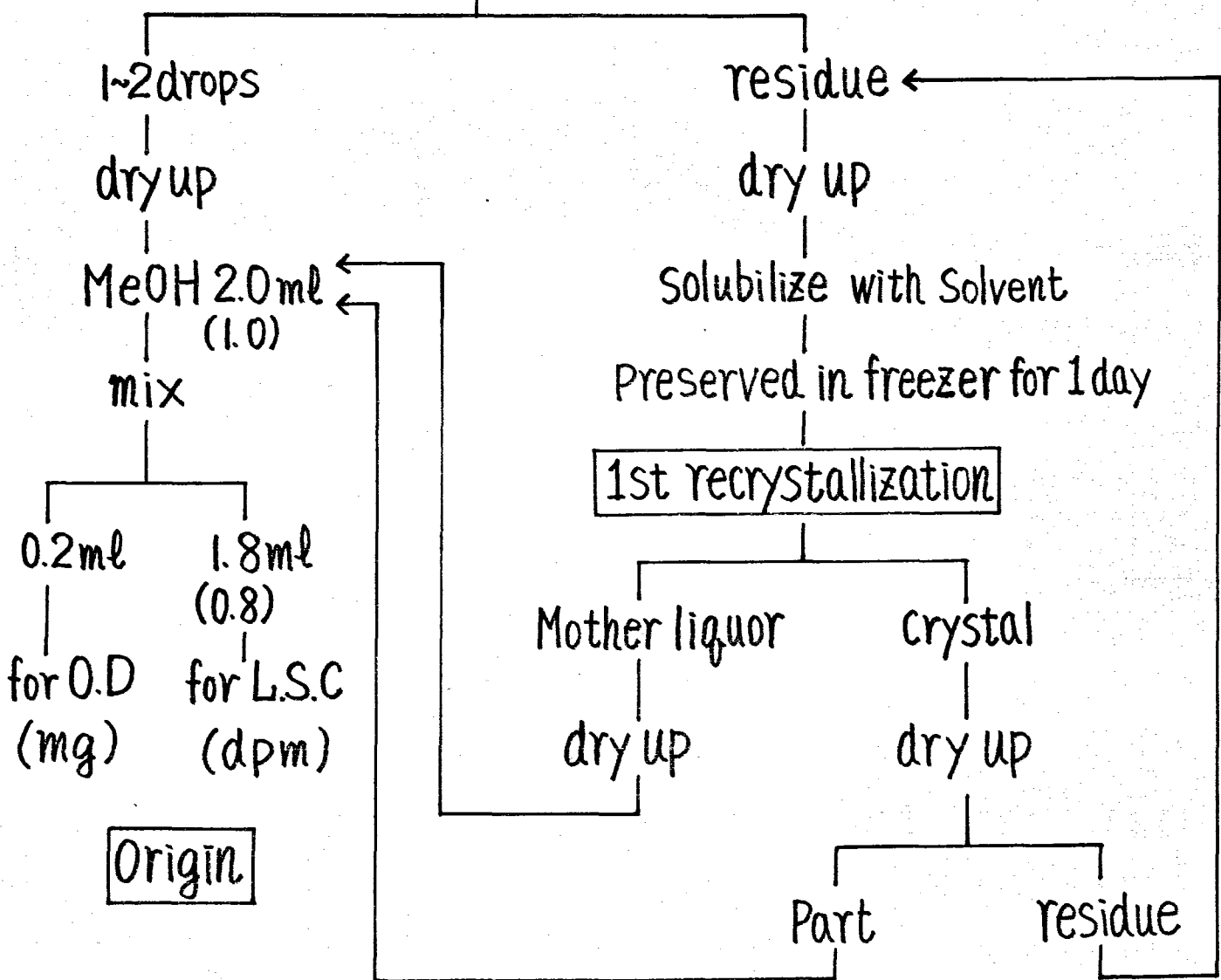


Fig 9  
Metabolism of Testosterone in Target Tissue

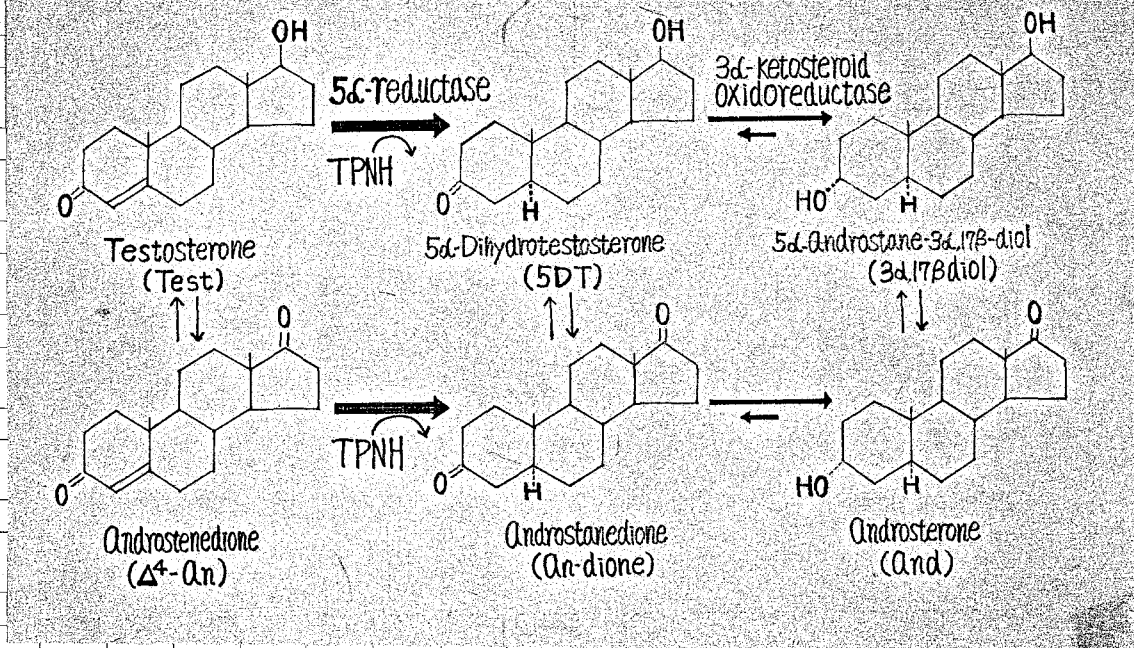
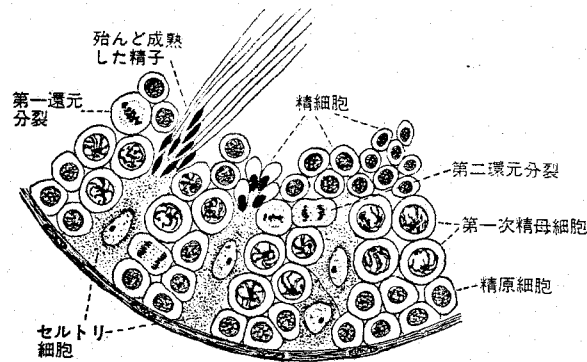
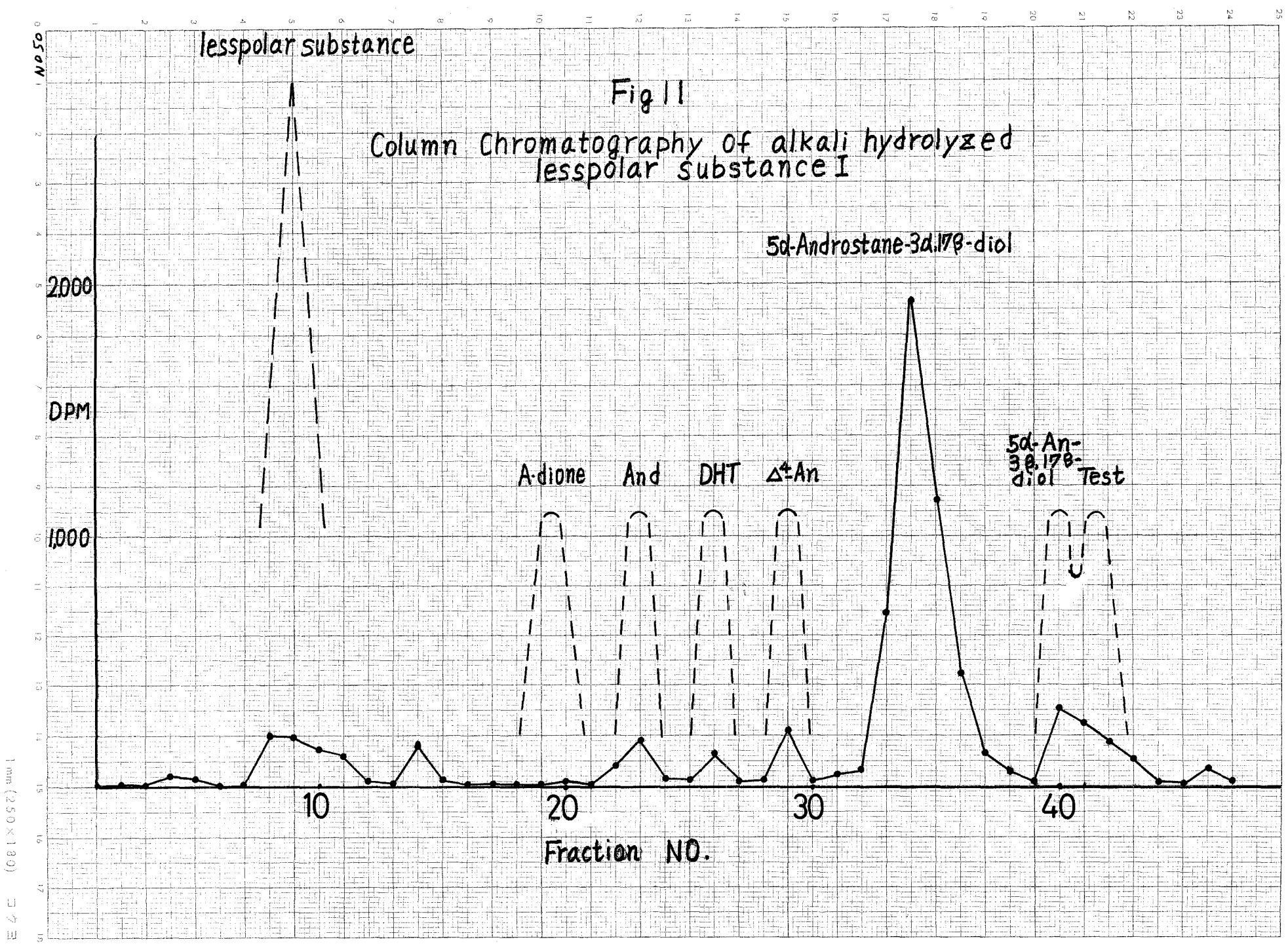


Fig 10

細精管の部分模式図





1 mm (250 x 180) コウロ

Table 1.  
Percentage formation of steroids from [<sup>3</sup>H] testosterone by tissue homogenates.

| Tissue          | 5 $\alpha$ -Dihydro-<br>testosterone | 5 $\alpha$ -Androstane-<br>3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-<br>3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Andro-<br>stanedione | Androsterone | Androst-<br>enedione | Testosterone<br>unchanged |
|-----------------|--------------------------------------|---|--|----------------------------------|--------------|----------------------|---------------------------|
| Immature rat    |                                      |   |  |                                  |              |                      |                           |
| Testes (whole)  | 6.4                                  | 33.0  | 1.9  | 1.5                              | 12.7         | 6.6                  | 13.4                      |
| Tubules         | 5.2                                  | 34.8  | 3.8  | 1.5                              | 14.7         | 2.0                  | 8.7                       |
| Prostate        | 7.7                                  | 3.1   | < 0.1  | < 0.5                            | < 1.0        | 4.5                  | 76.5                      |
| Adult rat       |                                      |   |  |                                  |              |                      |                           |
| Testes (whole)  | < 0.4                                | 4.3   | < 0.3  | < 0.5                            | 0.7          | 11.8                 | 72.6                      |
| Tubules         | < 0.4                                | 3.6   | < 0.3  | < 0.5                            | 0.7          | 11.3                 | 72.5                      |
| Prostate        | 15.6                                 | 2.9   | < 0.3  | < 0.5                            | < 0.1        | 0.9                  | 74.3                      |
| Seminal vesicle | 8.1                                  | 1.8   | < 0.3  | < 0.5                            | < 0.3        | 0.2                  | 83.8                      |
| Kidney          | 3.2                                  | 0.4   | < 0.3  | 1.3                              | < 0.5        | 22.4                 | 65.9                      |
| Muscle          | 0.5                                  | 0.6   | < 0.3  | < 0.5                            | < 0.5        | 0.5                  | 86.9                      |
| Spleen          | 0.9                                  | < 0.4   | < 0.3  | < 0.5                            | < 0.5        | 1.5                  | 86.5                      |

[<sup>3</sup>H] Testosterone (1  $\mu$ Ci/1 nmole) was incubated at 34°C for 30 min with 100 mg tissue in 1.2 ml. Concentration of buffer and co-factor and conditions of incubation are given under methods. Tubules were obtained by collagenase treatment.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.

*Table 2.*  
Formation of  $5\alpha$ -reduced products from [ $^3\text{H}$ ] testosterone by varying amounts of testes and prostate from immature rats at different incubation times.

| Amount of tissue | Incubation time | $\Delta^4$ - $5\alpha$ -Reductase <sup>1)</sup> |          |
|------------------|-----------------|---|----------|
|                  |                 | Testes  | Prostate |
| (mg)             | (min)           | (nmoles/g tissue/h)                             |          |
| 25               | 15              | 79.2  |          |
| 25               | 30              | 55.2  |          |
| 50               | 15              | 59.0  | 1.9      |
| 50               | 30              |   | 1.6      |
| 100              | 15              |   | 1.4      |
| 100              | 30              |   | 1.3      |
| 200              | 15              |   | 1.7      |

1) nmoles  $5\alpha$ -reduced products<sup>2)</sup> formed/g tissue/h.

2)  $5\alpha$ -Dihydrotestosterone +  $5\alpha$ -androstane- $3\alpha,17\beta$ -diol +  $5\alpha$ -androstane- $3\beta,17\beta$ -diol + androsterone.

[ $^3\text{H}$ ] Testosterone (1  $\mu\text{Ci}/1$  nmole) was incubated at  $34^\circ\text{C}$  in 1.5 ml under air.

Values were obtained after re-crystallization.

Table 3.  
Effect of collagenase on the formation of 5 $\alpha$ -reduced products by the immature rat testes.

| Tissue                           | Amount of tissue | Collagenase in incubation mixture | Activity of the 4 <sup>4</sup> -5 $\alpha$ -reductase | Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product      |  |                                  |
|----------------------------------|------------------|-----------------------------------|---|---|--|----------------------------------|
|                                  |                  |                                   |   | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone |
|                                  | (mg)             | (%)                               | (nmoles/100 mg protein/h)                             | %   |  |                                  |
| Testes (whole)                   | 10               | 0.001                             | 114   | 26.8  | 44.9   | 28.3                             |
| Testes (whole)                   | 10               | 0.1                               | 77.7  | 22.8  | 26.2   | 51.0                             |
| Testes (whole)                   | 10               | —                                 | 101   | 24.2  | 42.1   | 33.7                             |
| Testes (whole)                   | 20               | —                                 | 78.3  | 36.6  | 41.7   | 21.7                             |
| Tubules                          | 30               | —                                 | 7.2   | 24.7  | 23.3   | 52.0                             |
| Tubules                          | 60               | —                                 | 6.5   | 35.0  | 23.4   | 41.6                             |
| Tubules + interst. <sup>1)</sup> | 10 + 0.7         | —                                 | 17.8  | 21.0  | 23.3   | 55.6                             |
| Tubules + interst. <sup>1)</sup> | 20 + 1.4         | —                                 | 16.2  | 27.0  | 34.1   | 38.9                             |

402

[<sup>3</sup>H] Testosterone (1  $\mu$ Ci/1 nmole) was incubated at 34°C for 15 min in 1 ml in air.

Tubules and interstitial tissue were separated after incubation with 0.1% collagenase for 30 min at 37°C. They were washed repeatedly with phosphate buffer. Before homogenation, whole testes were pre-incubated for 30 min at 37°C.

<sup>1)</sup> Interstitial tissue accompanied by 10 or 20 mg tubules.

Values were obtained after re-crystallization.

Table 4.  
Formation of 5 $\alpha$ -reduced products from [ $^3$ H] testosterone by whole testes, tubules, germ cells and tubular non-germ cells of the immature rat. (Means of 3 experiments).

| Tissue         | Amount of tissue | Activity of the $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase | Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product      |  |                                  |              |                  |
|----------------|------------------|---|---|--|----------------------------------|--------------|------------------|
|                | (mg)             | (nmoles/100 mg protein/h)                         | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | Androsterone | Androstane-dione |
|                |                  |   | %   |  |                                  |              |                  |
| Testes (whole) | 10               | 101   | 27.6  | 44.6   | 27.8                             | < 0.5        | < 0.3            |
| Testes (whole) | 20               | 79.6  | 38.8  | 39.1   | 22.1                             | < 0.5        | < 0.3            |
| Tubules        | 10               | 10.7  | 20.4  | 21.3   | 58.3                             | < 0.5        | < 0.3            |
| Tubules        | 20               | 10.1  | 26.8  | 26.4   | 46.8                             | < 0.5        | < 0.3            |
| Germ cells     | 10               | 13.3  | 11.4  | 14.1   | 74.5                             | < 0.5        | < 0.3            |
| Germ cells     | 20               | 11.9  | 11.1  | 18.4 <sup>1)</sup>                                 | 70.5 <sup>1)</sup>               | < 0.5        | < 0.3            |
| Non-germ cells | 10               | 6.5   | 14.7  | 10.4   | 74.9                             | < 0.5        | < 0.3            |
| Non-germ cells | 20               | 5.1   | 14.1 <sup>1)</sup>                                  | 15.8   | 70.1 <sup>1)</sup>               | < 0.5        | < 0.3            |

[ $^3$ H] Testosterone (1  $\mu$ Ci/1 nmole) was incubated at 34°C for 15 or 30 min in 1 ml under air.

Tubules were obtained by the collagenase treatment. Germinal elements and non-germinal elements in the tubules were separated by the cell culture technique. Conditions of the separation are given under Methods.

<sup>1)</sup> Crystallization data are shown in Table 5.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.



*Table 5.*  
 Recrystallization of the 5 $\alpha$ -reduced products shown in Table 4 to constant specific activity.

|                   | 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone |                | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol diacetate | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol diacetate |
|-------------------|---------------------------------|----------------|---|--|
|                   | Germ cells                      | Non-germ cells | Non-germ cells  | Germ cells   |
|                   | (DPM/mg)                        |                |   |  |
| Starting material | 3670                            | 3240           | 890   | 734  |
| 1st crystal       | 3800                            | 3330           | 692   | 394  |
| 2nd crystal       | 3450                            | 3260           | 543   | 346  |
| 3rd crystal       | 3670                            | 3140           | 465   | 338  |
| 4th crystal       |                                 |                | 401   | 343  |
| 5th crystal       |                                 |                | 395   |  |

### Table 6

Formation of 5 $\alpha$ -reduced products from [ $^3$ H]testosterone by tubules, prostate and muscle of 31 days old immature rat in Organ culture.

| Tissue   | Incubation time (hrs) | Formation of 5 $\alpha$ -reduced product (n moles protein / 100 mg hr) | Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product      |                                  |              |
|----------|-----------------------|--|---|----------------------------------|--------------|
|          |                       |  | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | Androsterone |
| Tubules  | 2                     | 3.83   | 67.4  | 8.4                              | 24.2         |
| Tubules  | 6                     | 3.12   | 76.9  | 3.2                              | 19.9         |
| Prostate | 2                     | 6.93   | 44.3  | 52.6                             | 3.1          |
| Prostate | 6                     | 6.03   | 49.1  | 47.3                             | 3.6          |
| Muscle   | 2                     | 0.06   | 57.2  | 14.2                             | 28.6         |
| Muscle   | 6                     | 0.07   | 69.2  | 23.1                             | 7.7          |

[ $^3$ H]Testosterone (1  $\mu$ Ci / 1 nmole) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 2 & 6 hrs in 2ml MEM medium. Tubules were obtained by collagenase treatment.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity. Conditions of incubation are given under methods.

### Table 7

Formation of 5 $\alpha$ -reduced products from [ $^3$ H]testosterone by tubules, prostate muscle of the 21 days old immature rat in organ culture

| Tissue  | Incubation time<br>(hrs) | Formation of 5 $\alpha$ -reduced product<br>n moles protein / 100 mg hr | Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product     |                                  |              |
|---------|--------------------------|---|--|----------------------------------|--------------|
|         |                          |   | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | Androsterone |
| Tubules | 2                        | 9.18  | 83.2   | 6.3                              | 10.5         |
| Tubules | 6                        | 7.30  | 87.0   | 2.1                              | 10.9         |
| Tubules | 24                       | 5.22  | 89.8   | 0.1                              | 10.1         |

[ $^3$ H] Testosterone ( $1\mu\text{Ci}/1\text{nmole}$ ) was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2, 6 and 24 hrs in 2ml MEM medium.

Tubules were obtained by collagenase treatment.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.

Conditions of incubation are given under method.

Table 8

Formation of 5 $\alpha$ -reduced products from [ $^3$ H]testosterone by tubules, prostate and muscle of the 21 days old immature rat in organ culture

| Tissue   | Incubation time (hrs) | $^3$ H-testosterone cont. (nmoles) | Formation of 5 $\alpha$ -reduced product (nmoles/100mg protein/hr) | Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product     |   |                                  |              |                 |
|----------|-----------------------|------------------------------------|--|--|---|----------------------------------|--------------|-----------------|
|          |                       |                                    |  | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | Androsterone | Androstenedione |
| Tubules  | 3                     | 0.2                                | 2.52   | 78.5   | —   | 9.0                              | 12.5         | —               |
| Tubules  | 3                     | 1.0                                | 17.40  | 73.8   | —   | 14.2                             | 12.0         | —               |
| Tubules  | 6                     | 0.2                                | 2.07   | 81.5   | —   | 4.2                              | 14.3         | —               |
| Tubules  | 6                     | 1.0                                | 9.34   | 80.5   | —   | 6.5                              | 13.0         | —               |
| Tubules  | 6                     | 5.0                                | 12.30  | 74.8   | —   | 15.5                             | 9.7          | —               |
| Prostate | 6                     | 0.2                                | 3.59   | 15.3   | 5.2   | 74.4                             | —            | 5.1             |
| Prostate | 6                     | 1.0                                | 20.30  | 11.1   | 5.1   | 75.6                             | —            | 8.2             |
| Muscle   | 6                     | 0.2                                | 0.09   | 70.8   | —   | 28.6                             | 0.6          | —               |
| Muscle   | 6                     | 1.0                                | 0.30   | 78.6   | —   | 20.5                             | 0.9          | —               |

[ $^3$ H]Testosterone ( $1 \mu\text{Ci}/0.2, 1.0$  and  $5 \text{ nmoles}$ ) was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 3 and 6 hrs in 2ml MEM medium.

Tubules were obtained by collagenase treatment.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.

Table 9

Distribution of [<sup>3</sup>H]radioactivity between medium and tissue after organ culture of each tissue from the 31 days old rat.

| Tissue   | Incubation time (hrs) | Medium fraction (%) / Total | Tissue fraction (%) / Total |
|----------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Tubules  | 2                     | 89.6                        | 10.4                        |
| Tubules  | 6                     | 81.8                        | 18.2                        |
| Prostate | 2                     | 88.6                        | 11.4                        |
| Prostate | 6                     | 82.4                        | 17.6                        |
| Muscle   | 2                     | 86.2                        | 13.8                        |
| Muscle   | 6                     | 84.4                        | 15.6                        |

[<sup>3</sup>H]Testosterone (1  $\mu$ Ci / 1 n moles) was incubated at 37°C for 2 and 6 hrs in 2 ml MEM medium.

Table 10

Distribution of  $^3\text{H}$  radioactivity between medium and tissue after organ culture of each tissue from 21 days old rat.

| Tissue  | Incubation time (hrs) | Medium fraction |       | Tissue fraction |       |
|---------|-----------------------|-----------------|-------|-----------------|-------|
|         |                       | (%)             | Total | (%)             | Total |
| Tubules | 2                     | 97.3            |       | 2.7             |       |
| Tubules | 6                     | 96.7            |       | 3.3             |       |
| Tubules | 24                    | 94.9            |       | 5.1             |       |

$^3\text{H}$  Testosterone ( $1\mu\text{Ci}/1\text{nmole}$ ) was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2, 6 and 24 hrs in 2 ml MEM medium.

Table II (A)  
 Percentage formation of steroid from [<sup>3</sup>H] testosterone by each tissue of the 31 days old rat.  
 Tissue fraction

| Tissue   | Incubation time (hrs) | Lesspolar substance I | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-dione | Androsterone | Androstene-dione | Testosterone unchanged |
|----------|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|---|--|------------------------------|--------------|------------------|------------------------|
| Tubules  | 2                     | 4.1                   | 1.7                              | 32.0  | <1.1   | <0.5                         | 10.1         | 1.4              | 39.2                   |
| Tubules  | 6                     | 7.6                   | 1.3                              | 43.6  | <1.9   | <0.3                         | 10.3         | 1.1              | 28.0                   |
| Prostate | 2                     | 4.6                   | 27.9                             | 48.9  | <1.1   | 0.8                          | <0.4         | <0.4             | 10.3                   |
| Prostate | 6                     | 8.7                   | 22.2                             | 55.8  | <1.3   | 0.9                          | <0.4         | <0.2             | 3.8                    |
| Muscle   | 2                     | 0.8                   | 1.8                              | 1.6   | <0.03  | <0.2                         | 2.1          | <0.4             | 86.7                   |
| Muscle   | 6                     | 1.9                   | 3.1                              | 6.8   | <0.15  | <0.3                         | 3.6          | <0.5             | 79.0                   |

[<sup>3</sup>H]Testosterone ( $\mu\text{Ci}/\text{nmole}$ ) was incubated at 37°C for 2 and 6 hrs in 2 ml MEM medium.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.

Table II (B)

Percentage formation of steroid from [<sup>3</sup>H]testosterone by each tissue of the 31 days old rat.  
Medium fraction

| Tissue   | Incubation time (hrs) | Less polar substance I | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-dione | Androsterone | Androstene-dione | Testosterone unchanged |
|----------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|---|--|------------------------------|--------------|------------------|------------------------|
| Tubules  | 2                     | 0.3                    | 1.6                              | 10.5  | <0.8   | 0.6                          | 4.0          | 2.8              | 77.1                   |
| Tubules  | 6                     | 0.6                    | 1.1                              | 22.9  | <1.4   | 0.4                          | 6.1          | 4.3              | 59.5                   |
| Prostate | 2                     | 0.2                    | 8.0                              | 3.4   | <0.3   | 0.4                          | 0.4          | <0.04            | 84.2                   |
| Prostate | 6                     | 0.2                    | 17.4                             | 10.9  | <1.1   | 1.3                          | 0.9          | <0.06            | 61.4                   |
| Muscle   | 2                     | 0.0                    | 0.0                              | 0.3   | <0.02  | 0.0                          | <0.2         | 0.0              | 98.2                   |
| Muscle   | 6                     | 0.0                    | 0.2                              | 0.9   | <0.08  | 0.0                          | <0.2         | 0.0              | 97.0                   |

[<sup>3</sup>H]Testosterone (1  $\mu$ Ci/1 nmole) was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 2 and 6 hrs in 2 ml MEM medium.  
Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.



Table 12  
Percentage formation of steroid from [<sup>3</sup>H]testosterone by seminiferous tubules of the 21 days old rat.  
Tissue fraction  
(A)

| Tissue  | Incubation time (hrs) | Less polar substance I | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-dione | Androsterone | Androstene-dione | Testosterone unchanged |
|---------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|---|--|------------------------------|--------------|------------------|------------------------|
| Tubules | 2                     | 13.6                   | 1.5                              | 27.6  | <0.91  | 0.0                          | 3.3          | <1.2             | 44.7                   |
| Tubules | 6                     | 18.5                   | 1.5                              | 48.9  | <1.5   | 0.0                          | 4.3          | <1.7             | 18.6                   |
| Tubules | 24                    | 38.9                   | 0.5                              | 42.1  | <1.6   | <0.6                         | 4.6          | <0.5             | 2.9                    |

Medium fraction  
(B)

| Tissue  | Incubation time (hrs) | Less polar substance I | 5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol | 5 $\alpha$ -Androstane-dione | Androsterone | Androstene-dione | Testosterone unchanged |
|---------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|---|--|------------------------------|--------------|------------------|------------------------|
| Tubules | 2                     | 0.5                    | 0.7                              | 9.0   | <0.4   | 0.2                          | 1.2          | 2.5              | 82.2                   |
| Tubules | 6                     | 0.8                    | 0.7                              | 27.9  | <1.2   | 0.2                          | 3.5          | 3.3              | 57.9                   |
| Tubules | 24                    | 0.7                    | 0.2                              | 66.5  | <5.1   | 0.1                          | 7.4          | 0.9              | 12.6                   |

[<sup>3</sup>H]Testosterone (1 $\mu$ Ci/1nmole) was incubated at 37°C for 2, 6 and 24 hrs in 2ml MEM medium.

Values were obtained after re-crystallization to constant specific activity.

Table 13  
 Distribution of 5 $\alpha$ -reduced steroid after alkali  
 hydrolysis of lesspolar substance I

| Steroid   | (%)<br>Total |
|---|--------------|
| Lesspolar substance I                               | 9.8          |
| Androstenedione                                     | 0.0          |
| Androsterone  | 3.7          |
| 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone                     | 2.0          |
| $\Delta^4$ -Androstenedione                         | 0.0          |
| 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol | 71.3         |
| 5 $\alpha$ -Androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol  | 9.3          |
| Testosterone  | 3.9          |
| Total   | 100.0        |
| Recovery  | 82%          |

Table 14  
Re-crystallization of the less polar substance I  
with cold. 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol-diacetate

| Crystal           | Specific radioactivity<br>dpm/mg |
|-------------------|----------------------------------|
| Starting material | 403                              |
| 1st crystal       | 85                               |
| 2nd crystal       | 38                               |
| 3rd crystal       | 0                                |

