



Title	幼若ラット睾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	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

No. \_\_\_\_\_

幼若ラット睾丸の性細胞における testo-  
sterone の 5 $\alpha$ -reduction について

喜江俊二

## 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 かどの様に働き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 と最も密接な關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つた。

(Clermont & Harvey 1967; Steinberger & Duckett 1967; Lestroff 1969)。Primary spermatocyte の減数分裂を促進し、spermatid を形成する所に testosterone は働くことある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、長期間 active androgen であると考えられてきた testosterone

は、Active androgen ではない。これが標的組織で  
 $5\alpha$ -dihydrotestosterone は代謝されて、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 →  
 $5\alpha$ -dihydrotestosterone の過程で  $\Delta^4$ - $5\alpha$ -reductase は、  
androgenの標的組織（特に精）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 で合成され大  
testosterone の  $5\alpha$ -androstanediol, androstroneへの  
代謝による Leydig cell の catabolic actionである  
と考えられていく。（Stylianou et al, 1961; Inano &  
Tamaoki 1966; Nayfeh et al 1966; Inano et al 1967;  
Fischer & Steinberger 1968; 1971; Oshima et al 1970; Strickland  
et al 1970; Coffey et al 1971; Steinberger & Fischer 1971）。  
しかし、androgen の標的細胞であるとの  
考え方、細精管、特に germ cell の testosterone  
の  $5\alpha$ -reductionを検索した報告は、全く見当たな  
い。そこで著者等は、collagenase処理と組織  
培養法を使用する germ cell の分離法を用発し

in vitro にて、睾丸、細精管、germ cell(性細胞)。non-germ cell(非性細胞)による<sup>3</sup>H-testosterone の 5 $\alpha$ -reduction を、さすに組織培養にて  
細精管による<sup>3</sup>H-testosterone の 5 $\alpha$ -reduction を抜  
きしたので報告する。この内容のあるものは  
Yamada, Yasue & Matsu moto (1972) に発表したもの  
のである。

## 材料と実験方法

： 実験動物： Wister 系の雄ラット。著者等の実験室で飼育しているもので、二つの年令グループを用いた。幼若ラットとしては、生後 30 日～35 日のもので、 spermatogenesis is immature spermatid stage たりも遡んでいない。（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。

： 幼若ラット睾丸から、細精管、性細胞、非性細胞の分離： 幼若ラット睾丸の被膜をとり、これを 0.1% collagenase と 1 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を含む phosphate buffer (pH 7.4) 3 ml で、  $37^\circ\text{C}$ 、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、シーレに集め、冷 phosphate buffer で繰り返し、充分洗浄を行い、肉質細胞及び collagenase を洗い除く。その後、1500 rpm、10 分間遠心せらる。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にて、培養すると、性細胞は培地溶液中に浮遊し、Leydig cell を含む非性細胞は、培養フラスコの底のガラス面に密着し増殖する。Primary spermatocyte, mature spermatic, 及び Spermatogonia は、細胞培養で 3~4 回目、維持されるが、immature spermatic は、1~3 日目しか維持されない。(Steinberger & Steinberger, Steinberger et al., de Kretser et al.)

これら的事実に基いて、著者等は、寧離した細精管の培養によつて、性細胞と非性細胞を分離した。その操作を以下に示す。寧離した細精管は、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、ゆくくりと振盪する。細精管が長さで、3mm 以内の小断片になつた時は、振盪をやめ、冷 phosphate buffer (pH 7.4) で、繰り返し洗浄し、1,500 rpm, 10 分間遠心する。こうして集めた細精管は、注意深く、ゆくくりと、匕ペッティンクし、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) で resuspend する。一 瓶丸の  $\frac{1}{2}$  が相当する cell 及び cell cluster が、40 ml MEM 培地 (Eagle's minimum essential medium) (4 mM L-glutamine & 10% calf serum が添加してある。) を含む 1L 瓶の中で、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 が維持された。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底面に接着し分裂を始める。48~60 時間中には、少くとも浮遊細胞が密着した cell cluster が浮遊していく。48~60 時間培養後、培養液中に浮遊している細胞をを集め、1,500 rpm. 10 分間遠心する。この pellet は、phosphate buffer 中に resuspend。少くとも洗い、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、細胞分画として実験に供した。培養ビンに接着し、増殖した細胞は、0.02% EDTA を含む phosphate buffer (pH 7.4) 中で incubation した後、50 ペーパーライフターにて培養

ビンから 5.1はがし、1,500rpm. 10 分向遠心した。  
この pellet は phosphate buffer (pH 7.4) に resuspend  
して、1,500rpm. 10 分向遠心した。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 を非活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 が S 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-UV 行  
た。精製 <sup>3</sup>H-testosterone の純度は、非放射性  
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  
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系  
で、あることは Amberlite IRC-50 を用いた溶出クロ  
マトグラフ (Seki & Matsumoto 1967) によれば check  
した。ペーパークロマトグラム-UV は、  
Whatman NO1 口紙を用いた。collagenase & NADPH  
は Sigma Chemical Company から入手した。他薬

品は、analytical grade を用いていさ。

： 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、口器によ

り水分を除き、秤量後  $\pm 1 \leq 0.001\text{M}$  EDTA を含む

$0.25\text{M}$  sucrose 液液中で homogenate 1 mL。

の  $^3\text{H}$ -testosterone を  $2 \times 10\text{cm}$  試験管の底に沈め、 $0.02\text{mL}$

$\times 2$  1-ルで溶解する。各々の試験管へ、 $0.5 \sim$

$0.7\text{mL}$  の  $0.3\text{M}$  potassium phosphate buffer pH 7.4 ( $0.06\text{M}$  nicotinamide,  $2\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.8\text{mg}$  NADPH を含む) を加え。3。

± 5% incubation mixture の total volume が  $1.0 \sim 1.5\text{mL}$

になる様に、組織の  $10 \sim 200\text{mg}$  を含む homogenate を

$0.5 \sim 0.8\text{mL}$  加え、water bath  $\pm 2^\circ$ ,  $34^\circ\text{C}$  にて、15

分間か、あるいは 30 分間振盪する。incubation

の終りに、 $1\text{N HCl}$   $0.05\text{mL}$  を加え、Ether:  $\text{CHCl}_3$  (4:1 v/v)

と混する事により、反応を止め。

：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  $1 \sim 10\text{mg}$  を無菌的に採取し、P1 プレート中の

Eagle's minimum essential medium (4mM L-glutamine を含

at.) 2ml 1=  $\lambda$  42. CO<sub>2</sub>-incubator (90% air 10% CO<sub>2</sub>)  
 中で、37°C, 24時間 Preculture L.T.。 Preculture 後。  
 3H-testosterone (Iuci; Inmales) を含む、Eagles minimum  
 essential medium (4mM L-glutamine を含む。) 2ml を  
 交換し、更に 2~24時間培養し、培養終了後  
 tissue C medium 1= 分りて。 1N HCl & 0.2ml 加えて反  
 忔をとめた後、steroid を抽出した。

● Steroid の分離と同定： (testosterone 標的組  
 織 1= 333, testosterone の代謝模式を参考の為。)

Fig 9 1= 示してある。) Sample の incubation 後 1=  
 同様の性状とし、50~100μg の testosterone,  
 5d-androstan-3d, 17β-diol, 5d-androstan-3β, 17β-diol, androsterone  
 , androst-4-ene-3, 17-dione (androstenedione), 17β-hydroxy-  
 5d-androstan-3-one (5d-hydrotestosterone), 5d-androstan-  
 3, 17-dione (5d-androstenedione) を加え 3。この反応  
 液を 10ml の ether: chloroform (4:1 v/v) で 3 回抽出を行  
 う。その後、抽出液を 5ml の純水で逆洗する。

最初の 7 口はトトマーリーは、hexane: benzene  
 (1:1 v/v)-formamide を用いたペーパー 7 口は

トグラム一を行なう。主な放射活性は、 $\beta$ の領域に分かれ、front 領域 (b) は androsterone, androstanedione, 5d-dihydrotestosterone, 5d-androstanedione が重なる。origin 領域 (a) は、testosterone & 5d-androstanediols が重なる。 $\gamma$ 部 -  $\gamma$ をつくる。(a), (b) を分けて切り取り、10ml × 2 リール、10ml ピペットで抽出し、40°C、通気中で乾燥する。放射活性の回収率を調べる為に  $\frac{1}{10}$  の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% 以上である。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 を行なう。: hexane-formamide 系の  $80-100-70-2+7\beta-\gamma-\gamma$ , testosterone-acetate の分画と 5d-androstone-3d,  $17\beta$ -dial-dacetate + 5d-androstone-3 $\beta$ ,  $17\beta$ -dial-dacetate の分画は分離する。

(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 は  $\delta > \tau$ 。

5 $\alpha$ -androstane-dione, androsterone, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, androstanedione を、各々さきづいに分離できる。(Fig. 5 参照) Epandrosterone 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。一方、Epiandrosterone の分離は、同定は、行かなかつた。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 の結果に従つて、この中に含まれる steroid の割合に応じて分配してゆき、各 Product の產生量を算出した。最後に chromatography ごとに離されて  $^3\text{H}$ -products は 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 の同定を行つと同時に、products の產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示す。

しておく。(Fig. 7, 8 は steroid の分離、固定の概略が模式化してある。)

：組織の固定及び染色： 分離された細精管が、遠心され 10% formalin 中で固定された。そのサンプルをパラフィンで包埋され、連続切片を作成し、haematoxylin & eosin で染色された。

幼若ラット睾丸は、トルコイドで固定され、切片は切り、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 濃度の測定に用いられた。

testosterone の組織中の濃度は、competitive protein binding method of Mayes & Nugent (1968) によて行なつた。著者等の研究室に於ける本法の evaluation は Matsumoto et al (1970) に記載されてゐる。

●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 1949) を用いて測定した。組織量が少ない場合は Micro biuret method (Ruth et al 1964) 及 Cu-Folin method (Lowry et al 1951) を用いて測定した。

●less polar substance I の 70% メタノールと石油エーテルによる分配：less polar substance I は 70% MeOH 10ml と石油エーテル 4ml を加え、分液口一トに入れ。約 300 回往復盪し、二層に分かれるとまで静置する。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 加え再度分液口一トにかけ抽出する。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 の多くは non polar 物質は石油エーテル層に分配される。

●less polar substance I の ピリカリカリ加水分解：lipid の完全な加水分解を行った条件で、less polar substance I

左加水で解す。 lesspolar substance - I (lipid & S.A.)

I = cold carrier steroid & L Z, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone,

Androsterone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol

$\Delta^4$ -Androstendione, 2% 100% C<sup>14</sup> 加え。最終的に

80% MeOH, 15% KOH (w/v), total volume 2ml とし, 70°C

2.5時間, 静置してから反応させよ。(時々振盪

LZ 加す。) 反応終了後, 沈澱を 50% MeOH 溶

液に注ぎ振りあわせよ。沈殿は, 酢酸エチル 4

20ml にて 2 度抽出す。抽出液を純水 1ml にて

2 度逆洗を行ふ。この部分から水分除去

lipid を完全に水分解す。激烈な反応では

3。(酢酸エチル抽出物 steroid を抽出す 1 =

行うものである。)

## 実験結果

## ・ 細精管、性細胞、非性細胞の純度：

細精管と同質組織からなる幼若ラットの形態学的切片を Fig 1 に示した。Fig 2 より、分離された細精管中に、同質細胞が混入していく事が、連続切片によて明らかになつた。

又細精管内の細胞は、障害を受けていない。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 が、非性細胞が 5 倍、でいる。Sertoli cell, fibroblast, 血管壁細胞等の鑑別はできなかつた。本実験で、非性細胞中に trace 量の germinal element の混入が見られたか、実験結果に影響を与える程の量ではなかつた。

： 睾丸と他組織に於て、  $^{3}H$ -testosterone が 5 $\alpha$ -reduced products の生成につれて：

100mg の tissue homogenate と 1nmole の  $^{3}H$ -testosterone を 1ml とし、  $34^{\circ}\text{C}$  、 30 分間 incubation をした場合の products の生成を % で示したもののが Table 1 である。 Table 1 中で constant specific radioactivity は 一定の steroid は、最終的な結晶より換算した量以下（<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嚢よりも 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つた。前立腺、精嚢は  $^{3}H$ -testosterone と incubation するに 5 $\alpha$ -reduced products とし、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 が主に 5 $\alpha$ -androstan-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 活性に伴つて 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase の著しく高い活性がある。

事左示している。成熟ラットの細精管と睾丸は、testosteroneが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5 $\beta$ 、成熟ラットの睾丸及び細精管に於ける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C<sub>19</sub>-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、 $\pm 5$ に組織量を変化させて、<sup>3</sup>H-testosteroneが5 $\alpha$ -reduced productsの生成を異ったincubation timeで調べてみた。(Table 2) C<sub>19</sub>-steroid- $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductaseの活性は、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone + 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol + 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol + androsteroneのような全ての5 $\alpha$ -reduced productsの総和を組織量1g, incubation time 1時間当りに換算して、あらかじめ計算してある。5 $\alpha$ -reduced steroidの生成速度は、Table 2に示されていて incubation 条件のもとでは、組織量と incubation time は粗くではあるが比例している。幼若ラットの $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase

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。さすがに、幼若ラットの睾丸と前立腺の  $\Delta^4$ -5d-reductase への incubation 溫度の影響が調べられた。 $31^\circ\text{C}$ 、 $34^\circ\text{C}$ 、 $37^\circ\text{C}$ 。1 時間、5d-reductase の活性は、前立腺では、3.8, 3.8, 3.4, nmoles/g tissue/hr であり。睾丸では、各々 73.1, 83.9, 93.0 nmoles/g tissue/hr であった。ここで、 $\Delta^4$ -5d-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 組織当たり 0.02 nmole 以下であった。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 は、1nmole/ml で加え大時、持ち込み testosterone は、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。成熟

ラット睾丸に於ては、待ち速く testosterone 合量  
が、 radioactive substrate を充分含取する程、高い  
可能性がある。そのため Table 1 にて示す如き  
成熟ラット睾丸の  $^3\text{H}$ -testosterone が 5% 5d-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 5d-reduced products 生成への colla-  
genase 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 处理によつて分離した。だから  
testosterone が 5% 5d-reduced products の生成への colla-  
genase 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  $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は、全く  
あるまい。ほとんど影響を受けなかつた。(Table  
3) 加うるに、 collagenase 处理によつて分離  
された細精管は、 incubation の前に繰り返し、  
何度も洗滌を行つた。細精管内の細胞を Fig. 2  
で見られる様に、正常で、何ら障害が見られ  
ない。そのため、細精管の  $\Delta^4$ -5d-reductase への

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

そして、肉質組織の 5d-reductase 活性は、collagenase 处理により、ほとんど失なわれてしまふ。collagenase 处理による細精管分離操作中に、collagenase による影響を受けた肉質細胞が  $\Delta^4$ -5d-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、 $^{3}H$ -testosterone からの 5d-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 steroid  $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は、Table 4 に示す様に、睾丸の  $\frac{1}{10}$  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、良い一致を示していた。 $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は、100mg タンパク質、incubation time 1 時間当たりに生成された 5d-reduced steroid の nmoles を表示している。

5d-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

る。性細胞の  $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は、非性細

胞及ぶ前立腺の活性より、やすかに、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 5 の主な 5d-

reduced steroid は 5d-dihydrotestosterone と一緒。

5d-androstan-3d, 17 $\beta$ -diol と 5d-androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol

が、あたかもこのは意味深い。(Table 4)

この事は、性細胞と非性細胞は、 $\Delta^4$ -5d-

reductase と同様に 5d-androstan-3d-, & -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 3H-testoste-

rone 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 of testosterone

の 5d-reduction がおこりえる事を示唆した。

しかし、in vivo で、この現象が起つて

いふ事を示すものではない。従つて, *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, 肌を実験方法に記載してある様に調製し. organ culture にて,  $^3\text{H}$ -testosterone を加え, 2 時間と 6 時間 incubation した。結果を Table 6 に示す。5d-reduced product の形成は, 培地分画及ぶ組織分画を合計させて, 全体として計算している。生後 31 日幼若ラット細精管の 5d-reduced product の形成は, 前立腺とは同じ order である。androgen non-responsive tissue である筋では、5d-reduced product の形成は非常に弱く, 前立腺, 細精管の約  $\frac{1}{100}$  の order しかない。生後 21 日幼若ラット細精管を 2 時間, 6 時間, 24 時間に organ culture で反応させたところ, 矢張り 5d-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  $5\text{t} 1311$  にて, 5d-reduced product を生成している。さうして生後 21 日幼若ラット細精管, 前立腺, 肌の 5d-reduced product の生成を

調べてみた。(Table 8) 基質濃度を Table 8 の様に変化させ、それを 1 件の 5 $\alpha$ -reduced product の形成量とし 3, 0.2 nmoles/2 ml medium ~ 1 n mole/2 ml medium の範囲では、大体ではあるが、基質濃度 1 に比例して代謝が行なわれている。しかし、1 n mole/2 ml medium と 5 nmoles/2 ml medium の間では、5 $\alpha$ -reduced product の形成は、余り変化なく、恐らくプラッ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、ほぼ同一 order であるか、androgen non-responsive tissue である筋では、5 $\alpha$ -reduced product の形成は、1% 以上低い order でしかない。5 $\alpha$ -reduced products の組成は、細精管では圧倒的に 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol が多いのが特徴であり、R 1 = androsterone & 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone 多く存在する。しかし、前立腺では 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone が多く、5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol は細精管で多くない。Robel (1971) は、ラット前立腺で、5 $\alpha$ -dihydrotestosterone が増殖を抑制するのに対して、5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol は、分裂を促進すると云う。Ohno et al (1971) は、5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol

が特異的で、マウス腎の alcohol dehydrogenase と  $\beta$ -glucuronidase を inducere 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て、5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 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は 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 生成について：

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、達心により、組織

分画と培地分画に分け、各々引々 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、比例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。) たゞ、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、ほとんど影響を及ぼさず、培地分画の steroid 組成にはほほ近い値が 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  $^3\text{H}$ -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引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) を比較してみて分る事は、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- $3\beta$ ,  $10\beta$ -diol が主な産物で

前立腺では、細精管よりも 5d-dihydrotestosterone  
が多く、5d-androstan-3d,17 $\beta$ -diol を存在している。  
androgen non-responsive tissue である筋肉は、5d-reduced steroid は、ほとんど生成しておらず、基質の testosterone のままで存在している。すなはち (A), (B) とよく比較すると、less polar substance I と記載した欄の値が、組織分画と培地分画で大きく異っていき。androgen non-responsive tissue である筋肉では、less polar substance I の組成は (A), (B) にて、ほとんどつかつかしないが、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 less polar substance I が多く存在する事を示している。Table 12 (A) にて、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. Bauer (1968) が、前立腺に認められたのと類似のものと考える。Table 11 (A) 参照) less polar substance I は、前述の Amberlite IRC-50 column chromatography で (A),

lipid 分画に溶出してくる。(Fig 11 参照)

• less polar substance I の定位分析について:

幼若ラット 細精管の organ culture によって  $^{3}H$ -testosterone 代謝を行ふと、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 と石油エーテルに上り分配したところ、石油エーテル層 (lipid 層) は 87% が、70% MeOH 層 (steroid 層) は 13% が分配された。(この時回収率は 98% である。) 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、 $70^{\circ}\text{C}$ , 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 5.5 秒のピーカーの位置に溶出する。) column is charge L

たサン<sup>70</sup> IL は、 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol 分画 I = 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、 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol の純度を調べたところ、 83% と高い値を示した。故に、 lesspolar substance I は、 上記 PCL カリ加水分解によって、 主に 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol が、 遊離すると云える。以上の事が、 幼若ラット細精管中の lesspolar substance I は、 主に 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol が、 何か他のものと結合し、 nonpolar 物質とはして存在していると考えられる。その結合は、 上記 PCL カリ加水分解で切る事が出来、 その結果、 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol が遊離する。組織分画中の steroid は PCL 化して nonpolar 物質を生成する事が考えられる。 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol-diacetate を、 前述の Amberlite IRC-50 の column chromatography にて、 滤出したところ、 lesspolar substance I 分画と同位置に回収された。そこで  $^3\text{H}$  15mg の cold 5d-androstan-3d, $\alpha\beta$ -diol-diacetate を lesspolar substance I に加え、 再結晶法により調べたところ、 cold の

5d-androstan-3d, 17 $\beta$ -diol-diacetate の結晶中 I = 1% less-polar substance I 由来の放射活性が入る。purity は 0 % である。 (Table 14) 以上の事から lesspolar substance I は 5d-androstan-3d, 17 $\beta$ -diol と何か他のもの (13.1 % は lipid のような物) と結合して nonpolar 物質であると考えられる。

## 考案

Spermatogenesis は、androgen の germinal epithelium の直接作用によって維持される事が、T. 及び  $\Delta^{4}$  た。（Dvaskin 1944；Ludwig 1950；Clarmont & Harvey 1967；Steinberger & Duckett 1967；Katra & Prasad 1967；Lostroh 1969）そして、C<sub>19</sub>-steroid  $\Delta^{4}$ -5 $\alpha$ -reductase は、androgen target cell にて、ばらばらに存在している。（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 を有する事が分った。故に、性細胞は、androgen responsive tissue の特徴を持つていると考えられる。Fig 9 は Testosterone の 5 $\alpha$ -reduction の模式を示すが、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る。又、androstane diols の形成を認められた。Table 1, 3, 4, 6, 7, 8 にて、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

か増強に關係するのに対し, 5d-androstanediols は、分泌を促進すると云う。Ohno et al (1971) は, 5d-androstan-3d, 17 $\beta$ -diol が特異的にマウス睪の alcohol dehydrogenase 及び  $\beta$ -glucuronidase を induce すると言ふ。この様に 5d-androstanediols が specific な作用を示す事は珍らしくない。5d-androstan-3d, 17 $\beta$ -diol が spermatogenesis と強い關係がある可能性が考えられる。

幼若ラットでは, testosterone 在血中に分泌される事なく, 5d-androstanediol となり, 男性二液性徵を亢進させずには spermatogenesis に促進効果を及ぼしている可能性がある。

細精管の  $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は, 端丸の  $\frac{1}{10}$  の order である, 大きく (Table 4) 向貿細胞の重量は, 細精管の重量の約 7% しか相当しない (Christensen & Mason 1965) 故に, 向貿組織の  $\Delta^4$ -5d-reductase の比活性は, 細精管より約 100 倍強い。この考え方を支持するに, 細精管の  $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は, 向貿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ると, 2 性細胞と非性細

胞（向質細胞が混入した場合、非性細胞中  
1=Leydig cell を含む。）に分離された。（Steinberger et al  
1967）：性S性細胞の  $\Delta^{4}$ -5d-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)，細精管及公性細胞は、前立腺と同程  
度の  $\Delta^{4}$ -5d-reductase活性を持つ事が結論として云え  
る。主に microsome中に局在するラット睾丸の  $\Delta^{4}$ -5d-redu  
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、それ以後は活性が、急速に  
減少する。(Inano et al 1967; Fischer & Steinberger 1971) 上  
記研究者等は、 $\Delta^{4}$ -5d-reductase活性が、主に向質組  
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向質細胞の 5d-  
reductaseは、前立腺よりはるかに強く、性細胞の  
それは、前立腺と同じ程度と云える。

細精管は前述したcollagenase処理によつて、向質細  
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  
りすこ簡単にである。細精管の形態及び酵素活

性は collagenase

處理 I = より、全く影響を及ぼさなかつたが、

Leydig cell は破壊され、これの  $\Delta^4$ -Sd-reductase 活性は、洗浄等により、かなり失われた。(Table 3)

従つて、本法は、Leydig cell の分離、検索には、不適当である。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 I = より、性細胞を floating cell として、attaching cell である非性細胞と分け出す事が出来た。Steinberger et al (1967), Dufau et al (1971) は、germinal element は、floating cell として、attaching cell は、向質細胞を含めて、non-germinal element が 5% あり、増殖すると報告している。著者等も floating cell としては、向質細胞様の細胞を認めたが、たゞ。

$\Delta^4$ -reduced steroid の生成速度は、粗く酵素濃度と incubation time (Table 2, 3, 4, 6, 7, 8) = 5E 181 L T 113。このような条件下では、 $\Delta^4$ -Sd-reductase 活性的比較は、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  $\Delta^4$ -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 SDS 酶系量が、より多量 (= 用いる) 時 (Table 3, 4) は、△ $\Delta$  5 $\alpha$ -reductase 活性は、必ずか = 低い値を示す。tissue homogenate 中の SDS による testosterone の影響は、幼若ラットでは、除去できるけれど、△ $\Delta$  5 $\alpha$ -reductase 活性は、tissue homogenate 中に含まれる androgen binding protein によって、又 testosterone 以外の  $\Delta$ -steroid によって、又他の因子によって、影響を受けるかも知れない。されば、性細胞を、比較的多量 (= 得る事が困難な) 1 nmole/ml と、比較的低い基質濃度を使用している。又最適の incubation condition の検索も十分にはされていない。しかし、本研究では、詳細な酵素活性の比較は必要でなく、前立腺と同様 order の 5 $\alpha$ -reductase が、性細胞に存在するといつた様な事実問題にしているので、著者等の使用した実験条件は、十分なものであると考える。

築丸 (= 精原細胞) に於ける androgen の產生細胞は、Leydig cell

であると、長々向信で5つてきだ。しかし、細精管も pregnenolone と progesterone が5. 十分な量の androgen 合成を行なう事が、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 ; Pufau et al 1971 )

著者等は、さすに性細胞自身でも progesterone → C<sub>19</sub>-steroid をおこす事を見出した。( Yamada M., Yagihara S. & Matsumoto 1973 ) Cholesterol は、細精管中に、ほとんどの入るが、 pregnenolone, progesterone と testosterone は、blood-testis barrier を通つて、すみやかに細精管中に入る。( Galjaard et al 1970 ; Parvinen et al 1970 ) それ故に、細精管、性細胞が、 pregnenolone 及び progesterone が5 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 が5 分泌され、それから、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

1=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、前立腺細胞クロマチンと同様に、睾丸クロマチンと強く結合する事が見つけられた。(Stoggs 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  $^{3}H$ -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 100 mg protein/hr) の 5d-reduced products の総和の生成速度は、前立腺 (2 ~ 4 nmoles/g tissue/hr) の約 20 倍の order である。幼若ラットが 5 分産出した 細精管、性細胞、非性細胞 (各々 7 ~ 10, 11 ~ 13, 5 ~ 7 nmoles/100 mg protein/hr) の C<sub>19</sub>-steroid  $\alpha$ -5d-reductase 活性は、前立腺とはほぼ同じ order である。一方 androgen non-responsive tissue である前立腺では、 $\Delta^4$ -5d-reductase 活性は、ほとんどなが、た。組織培養系の場合は、幼若ラット 細精管、前立腺の 5d-reduced products の形成は、ほぼ同じ order である。(各々 3 ~ 17, 4 ~ 20 nmoles/100 mg protein/hr) androgen non-responsive tissue である前立腺では、 $\Delta^4$ -5d-reduced products の形成は、ほとんどみつけなか、た。以上のように、組織培養系と in vitro 系の結果は、良く一致しており、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 $\beta$ -, & -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 活性を有してゐる事が分った。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 を蓄積する。これは、主に 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol など、何か他のもの (13 $\beta$  位に 1:pid のよろたもの) や、結合して、less polar 物質になつてゐる事が分った。細精管は、collagenase 及び蛋白分解酵素で分離される。そして、性細胞は、非性細胞が 5, 34°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。

以上の事が、幼若ラット睾丸の性細胞は、androgen responsive tissue の特徴をもつてゐる事が示唆された。

## 謝辞

以上の研究をすとに際して、予備知識の浅い僕に対して、一方ならぬ御指導、御助言をして下さいました共同研究者の、医学部第二病理の松本圭太先生、微生物病研究所細菌部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並びに、色々御教示下さいた、微研細菌部ルス部門の松代義三先生、西京義武先生はじめ、教室の皆様方、医学部第二病理の教室の皆様方に、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.
- Brachovsky 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 Kretser D. M. & Hudson B.: Endocrinology 88 (1971) 825.
- Duoskin S.: Amer. J. Anat. 75 (1944) 289.
- Fischer M. & Steinberger E.: Steroids 12 (1968) 491.
- Fischer 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. & Fawcett H. L.: Endocrinology 21 (1937) 611.
- Hall P. F., Irby D. C. & De Kretser D. M.: Endocrinology 84 (1969) 488.
- Inano H., Hori Y. & Tamaoki 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. & Tamaki B.-I.: Endocrinology 79 (1966) 579.
- Kalra S. P. & Prasad M. R. N.: Endocrinology 81 (1970) 965.
- Lacy D. & Pettitt A. J.: Brit. med. Bull. 26 (1970) 87.
- Lostroh A. J.: Endocrinology 85 (1969) 438.
- Lowry O. H., Rosebrough N. S., Faw 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.
- Matsu moto K., Takeyasu 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) 1081.
- Oshima H., Sarada T., Ochiai K. & Tamaki B.-I.: Endocrinology 86 (1970) 1215.
- Pärvinen M., Hurme P. & Niemi M.: Endocrinology 87 (1970) 1082.
- Rath F., Itzhaki R. & Gill D. M.: Analyt. Biochem. 9 (1968) 401.
- Seki T. & Matsumoto K.: J. Chromatog. 27 (1967) 423.
- Shimazaki J., Matsushita I., Furuya N., Yamamoto H. & Shida K.: Endocr. Jap. 16 (1969) 453.
- Smith P. E.: Amer. J. Anat. 45 (1930) 205.

[20 × 20]

SPARTA

Stegges A. W., Spelsberg T. C., Glasser S. R. & O'Malley B. W.: Proc. Nat Acad. Sci. U.S.A. 68 (1971) 1479.

Steinberger E. & Duckett 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., Torchelli 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.

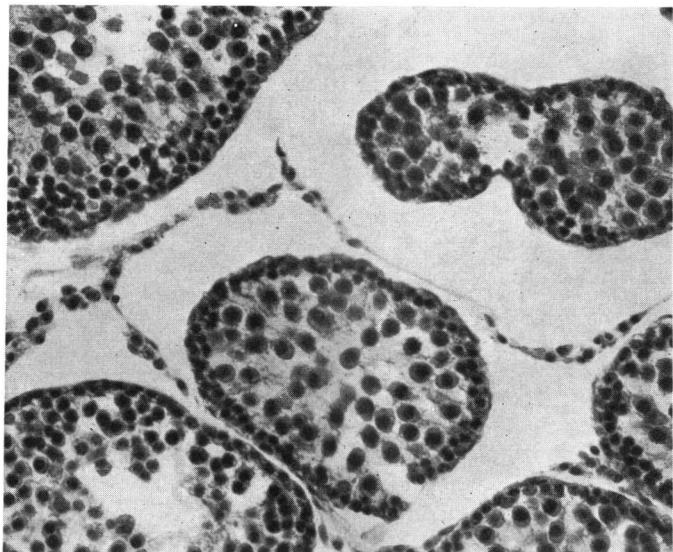


Fig. 1.

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

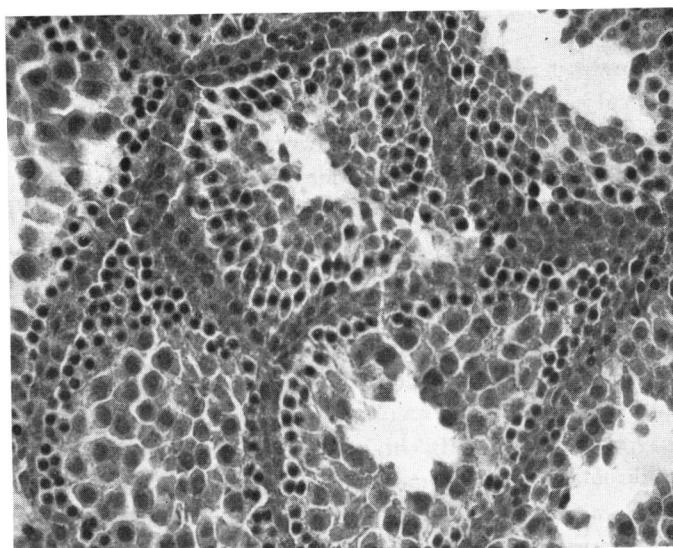


Fig. 2.

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.

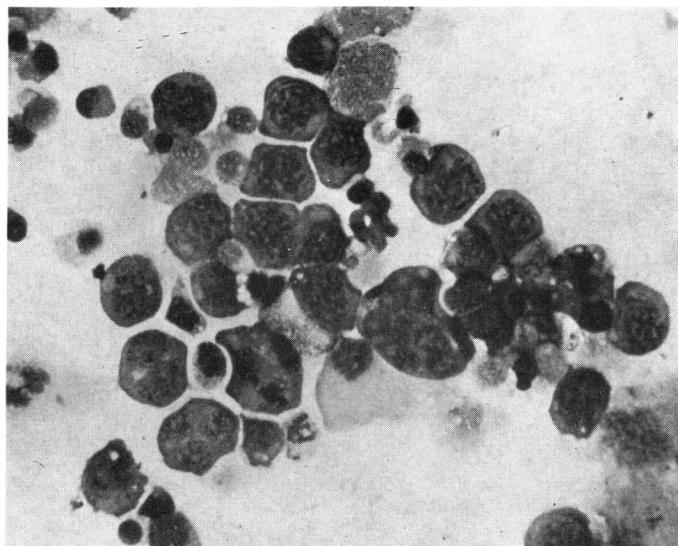


Fig. 3.

Microphotograph (420  $\times$ , 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.

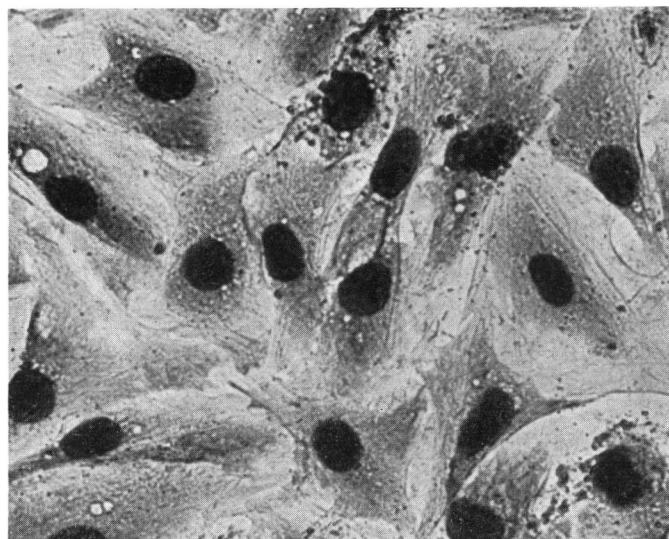


Fig. 4.

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

Fig 5

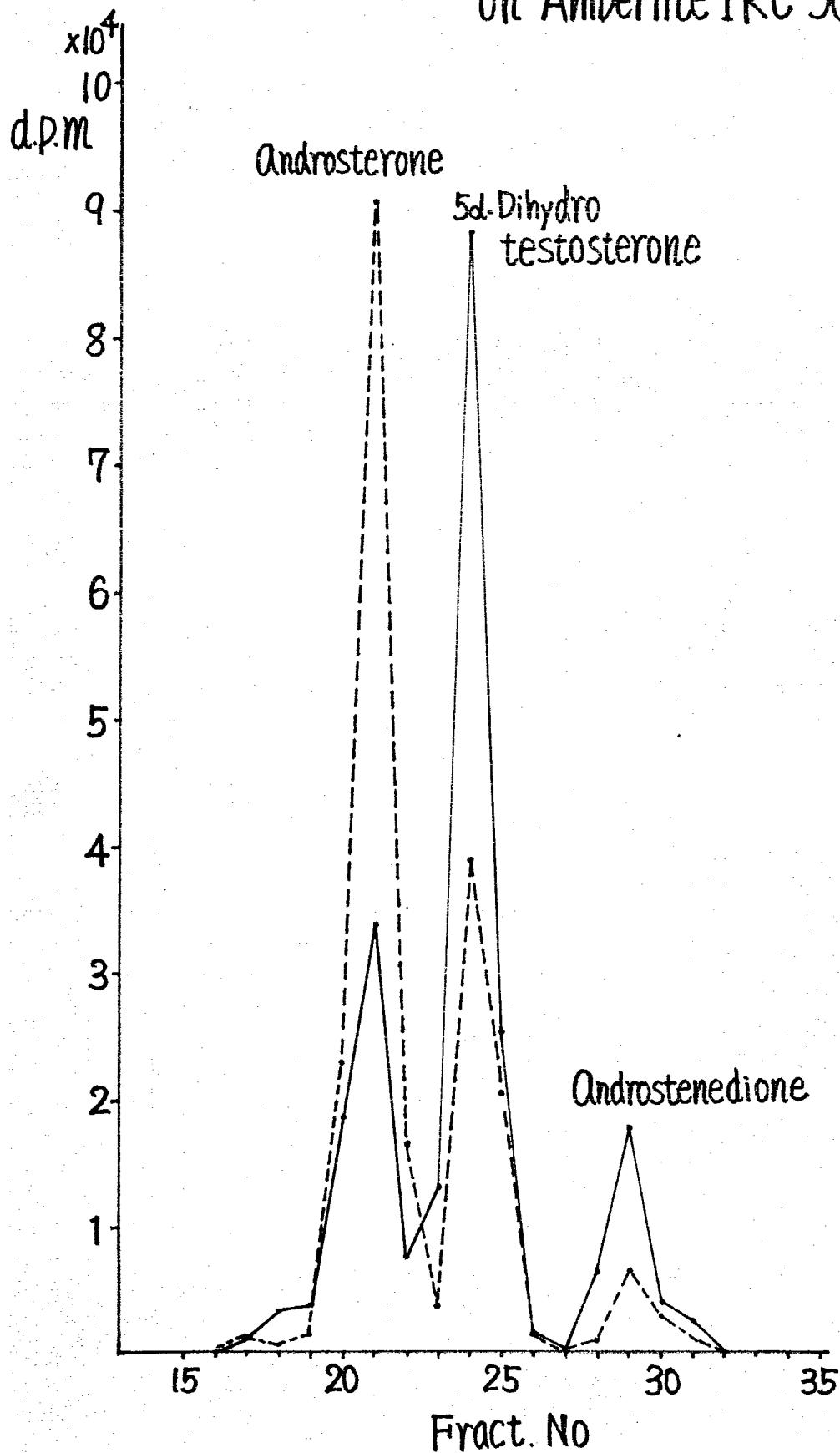
Elution pattern from elution chromatography  
on Amberlite IRC-50

Fig 6

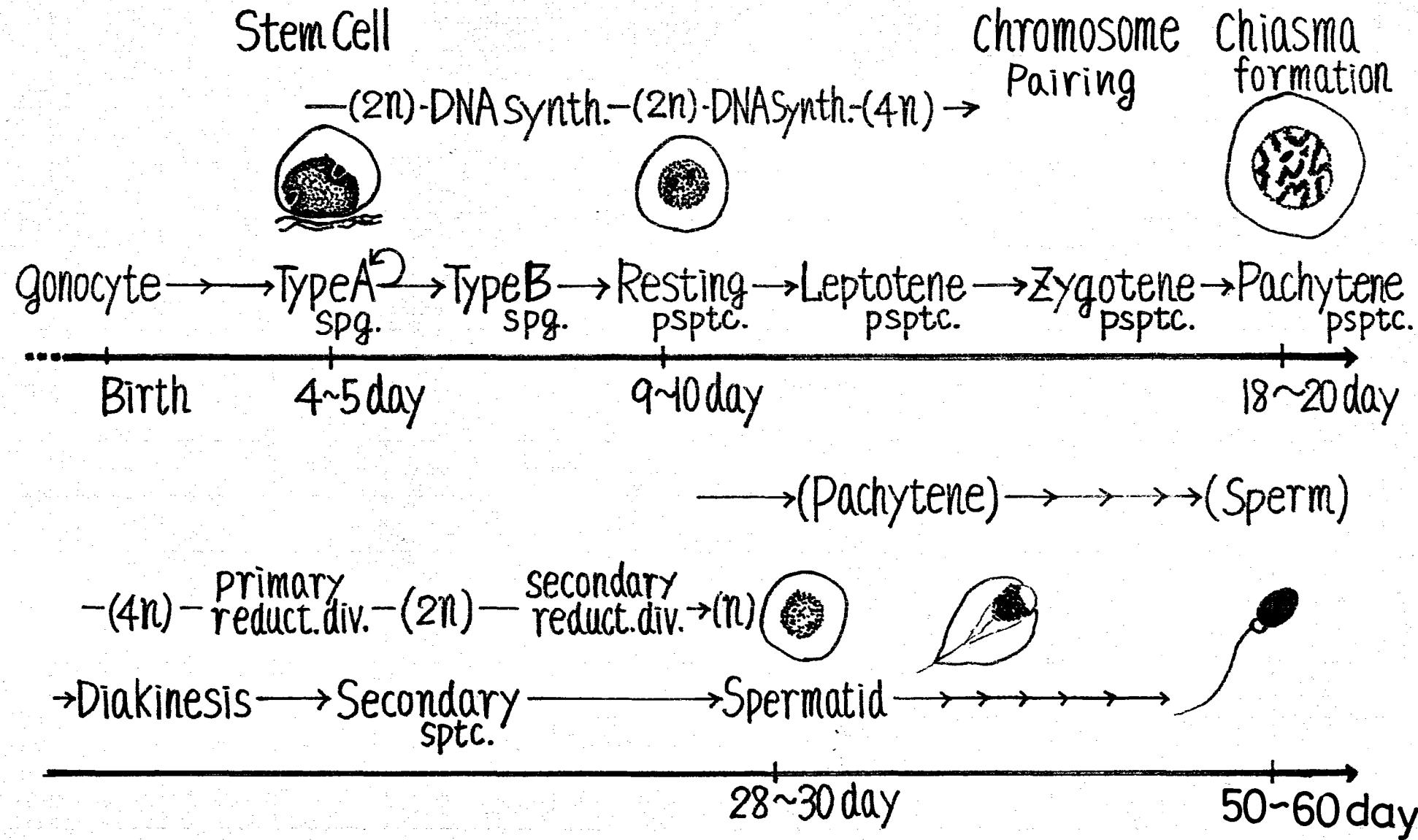
Spermatogenesis in Rat

Fig 7  
Identification of Steroids

Extract from Homogenate

$\text{H} \diagup \text{B} / \text{F}$

$\Delta^4\text{-An}$

5DT

And

andione

Acetylation

$\text{H} \diagup \text{F}$

5DF-ac

Andione

$\Delta^4\text{-An}$

And-ac

Recry.

(EtOH : Benzene : Cyclohexane : H<sub>2</sub>O)

25 : 50 : 225 : 1

Test

$3\alpha,17\beta\text{ diol}$

$3\beta,17\beta\text{ diol}$

Acetylation

$\text{H} \diagup \text{F}$

$3\alpha,17\beta\text{ diol-diac}$

$3\beta,17\beta\text{ diol-diac}$

Test-ac

Recry.

Recry.

$\Delta^4\text{-An}$

Recry.

5DT

Recry.

and

Recry.

Fig 8  
Recrystallization Method

Eluted Sample

from Paper or Column Chromat.

Add an authentic Steroid

Solubilize with MeOH (several drops)

1~2drops

dry up

MeOH 2.0ml  
(1.0)

mix

0.2ml	1.8ml
for O.D	for L.S.C
(mg)	(dpm)

Origin

residue ←

dry up

Solubilize with Solvent

Preserved in freezer for 1 day

1st recrystallization

Mother liquor

dry up

crystal

dry up

Part

residue

Fig 9  
Metabolism of Testosterone in Target Tissue

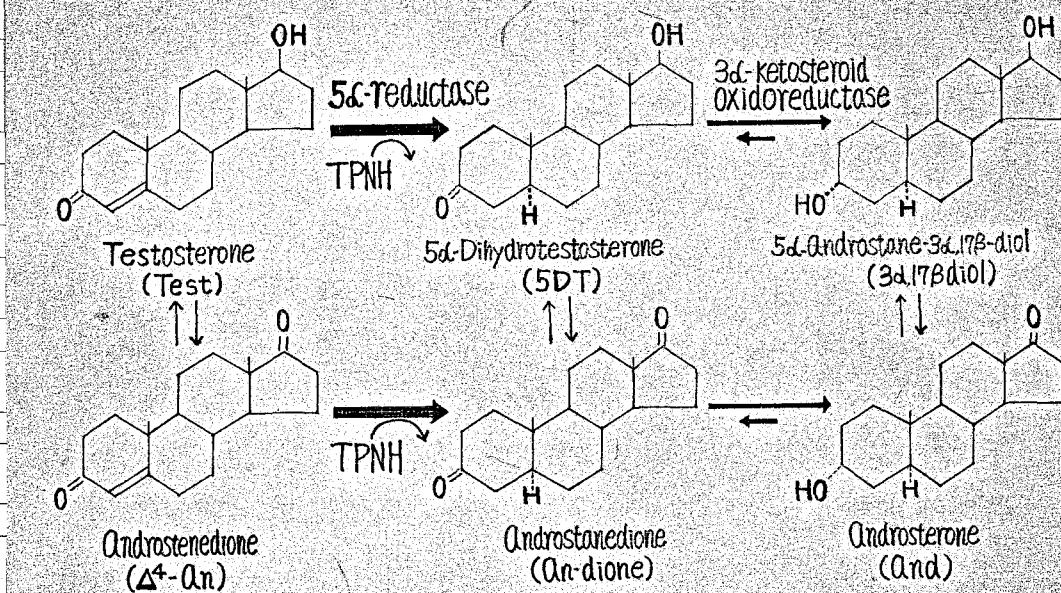
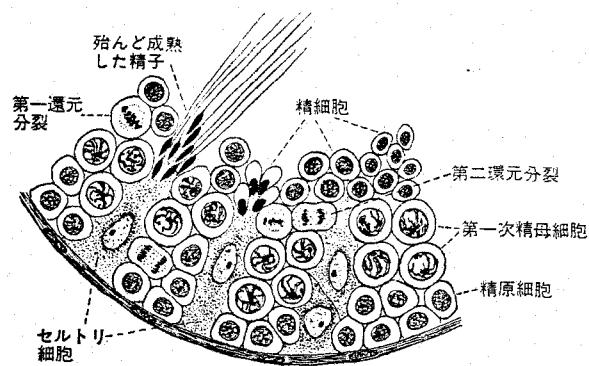
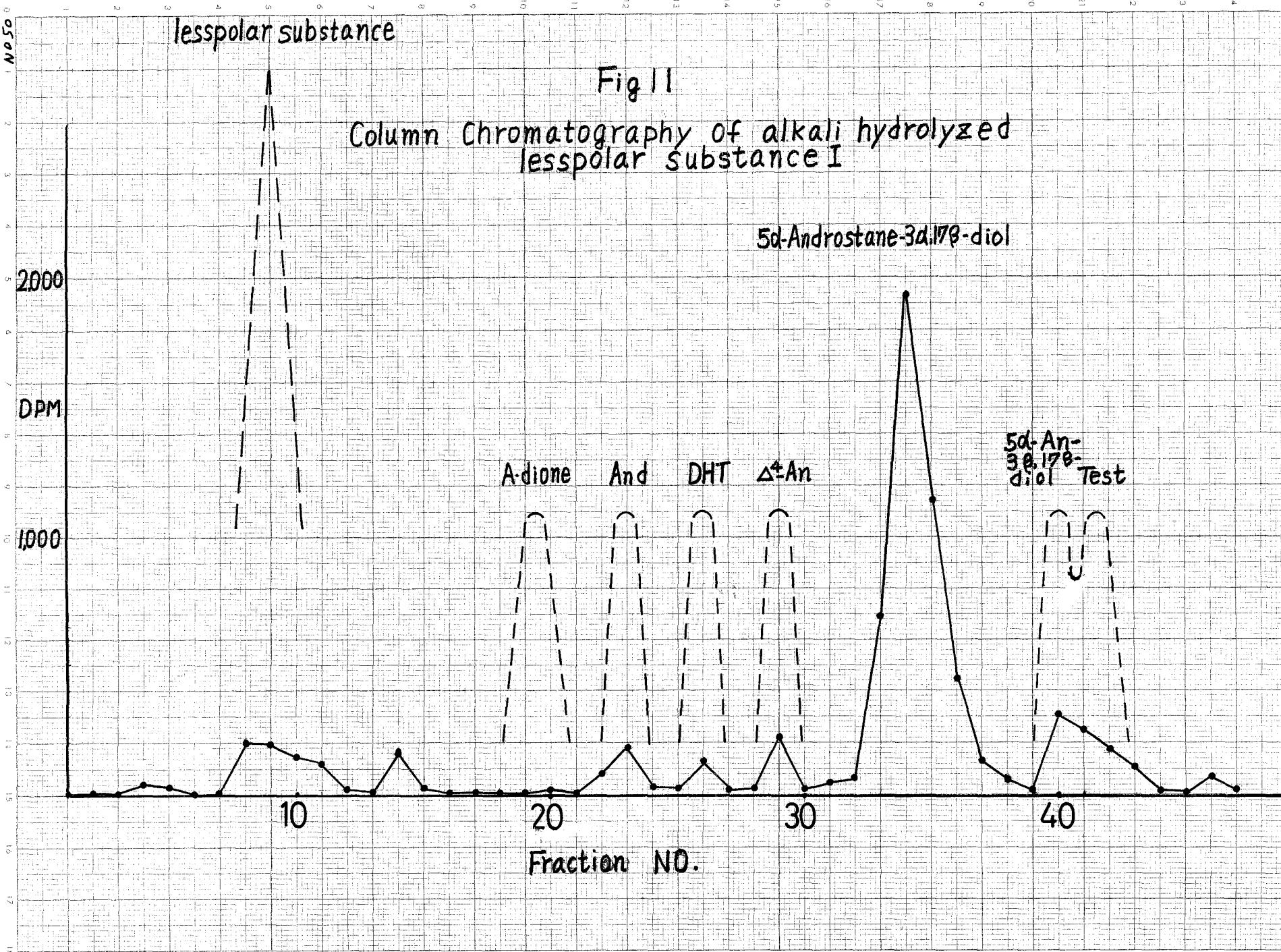


Fig 10

## 糸状精管の部分模式図





Tissue	5α-Dihydro-testosterone	5α-Androstane-3α,17β-diol	5α-Androstane-3β,17β-diol	5α-Androstanedione	Androsterone	Androstenedione	Testosterone unchanged
<b>Immature rat</b>							
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
<b>Adult rat</b>							
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 μCi/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	$\Delta^{4-5\alpha}\text{-Reductase}^1)$	
		Testes	Prostate
(mg)		(min)	
25	15	(nmoles/g tissue/h)	
25	30	59.2	
50	15	55.2	
50	30		1.9
100	15		1.6
100	30		1.4
200	15		1.3
			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  $\mu\text{Ci}/1$  n mole) was incubated at 34°C in 1.5 ml under air.

Values were obtained after re-crystallization.

Tissue	Amount of tissue (mg)	Collagenase in incubation mixture (%)	Activity of the $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase (nmoles/100 mg protein/h)	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 %
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

[<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.

1) Interstitial tissue accompanied by 10 or 20 mg tubules.

Values were obtained after re-crystallization.

Tissue	Amount of tissue (mg)	Activity of the $\Delta^4$ -5 $\alpha$ -reductase (nmoles/100 mg protein/h)	Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product				
			5 $\alpha$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone	Androsterone	Androstanedione
			%				
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 n mole) 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.

1) 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		$5\alpha$ -Androstan- $3\alpha,17\beta$ -diol diacetate	$5\alpha$ -Androstan- $3\beta,17\beta$ -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 [ $^3\text{H}$ ] 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 (nmoles/100 mg protein/hr)	Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product		
			5 $\alpha$ -Androstan-5 $\alpha$ ,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

[ $^3\text{H}$ ]Testosterone ( $1 \mu\text{Ci}/1\text{mole}$ ) was incubated at  $37^\circ\text{C}$  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 (hrs)	Formation of 5 $\alpha$ -reduced product	Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product		
		n moles/100 mg protein/hr	5 $\alpha$ -Androstan-5 $\alpha$ ,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 ( $\mu$ Ci/1nmole) was incubated at 37°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 [ $^3\text{H}$ ]testosterone by tubules, prostate and muscle of the 21 days old immature rat in organ culture

Tissue	Incubation time (hrs)	$^3\text{H}$ -testosterone cont. (n moles)	Formation of 5 $\alpha$ -reduced product nmoles/100mg protein/hr	Percentage of each 5 $\alpha$ -reduced product				
				5 $\alpha$ -Androstanediol	3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone	Androsterone	Androstanediol
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	—

[ $^3\text{H}$ ]Testosterone ( $1\mu\text{C}_4/\text{O}_2$ , 1.0 and 5 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 μCi/1 nmoles) was incubated at 37°C for 2 and 6 hrs in 2 ml MEM medium.

Table 10

Distribution of [<sup>3</sup>H]radioactivity between medium and tissue after organ culture of each tissue from 21 days old rat.

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

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

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

Table II (A)

Tissue fraction

Tissue	Incubation time (hrs)	Lesspolar substance I	5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ -one	Androsterone	Androstanedione	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 (1 $\mu$ C./1mole) 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 11 (B)

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

Tissue	Incubation time (hrs)	Lesspolar substance I	5 $\alpha$ -Dihydro-testosterone	5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ -one	Androsterone	Androstanedione	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 (1uC:/1mole) 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 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-5 $\beta$ -Androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ -one	Androsterone	Androstene-dione	Testosterone unchanged
Tubules	2	13.6	1.5	27.6	<0.91	0.0	3.3	<1.2
Tubules	6	18.5	1.5	48.9	<1.5	0.0	4.3	<1.7
Tubules	24	38.9	0.5	42.1	<1.6	<0.6	4.6	<0.5

Medium fraction  
(B)

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

[<sup>3</sup>H]Testosterone (1 $\mu$ Ci./1mole) 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 | 3  
Distribution of 5 $\alpha$ -reduced steroid after alkali hydrolysis of lesspolar substance I

Steroid	(%) Total
Lesspolar substance I	9.8
Androstanedione	0.0
Androsterone	3.7
5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	2.0
4 $\beta$ -Androstenedione	0.0
5 $\alpha$ -Androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	71.3
5 $\alpha$ -Androstan-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 dpm/mg
Starting material	403
1st crystal	85
2nd crystal	38
3rd crystal	0