

Leydig 세포 이식

연세대학교 의과대학 비뇨기과학교실

홍성준 · 최학룡 · 이무상

= Abstract =

Leydig Cell Transplantation

Sung Joon Hong, Hak Ryong Choi and Moo Sang Lee

From the Department of Urology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

It is ordinarily accepted that the synthetic testosterone administration is the choice of treatment for the primary testicular dysfunction. But recently not a few medical scientists reported that the long-standing testosterone replacement is not without side effects. For that reason, we tried to investigate a possibility of in vivo transplantation of Leydig cells as a new biologic androgen substitution therapy. The Leydig cells procured from 6 week-old male Sprague-Dawley rat were auto-transplanted and the level of testosterone secretion and histostructural changes were observed.

The results obtained are summarized as follows:

1. For the selection of transplantation sites, compared to subcutaneous or scrotal counterparts, renal subcapsular and intraperitoneal transplant showed higher levels of testosterone and the number of transplanted cells was correlated with the level of measured testosterone.
2. Furthermore, if the Leydig cells were transplanted intraperitoneally after the uptake on synthetic collagen, testosterone levels were higher than the ones simply transplanted, resulting in 2.7 times higher at 3 months.
3. The activity of ^{125}I -hCG decreased 20 to 40% at each month after transplantation compared to the normal levels, but no statistical significance was noted among different periods.
4. Histologic examination revealed neovascularized capillaries and well demarcated uptake of sheet-like group of eosinophilic Leydig cells were observed at 4 weeks. But the evidence of destructive changes such as a focal inflammation with central dystrophic ossification was noted after 3 month. On electron microscopy, the marked indentation of nucleus and presence of lipochrome pigment were seen and the number and size of smooth endoplasmic reticulum and mitochondria were reduced.

In conclusion, testosterone output could be increased to the physiologic range by increasing the number of transplant cells or collagen uptake utilizing, etc. However the decrease of testosterone production after 3 months is believed to be a result of focal inflammation and degeneration which in turn caused the decrease in number of secreting Leydig cells and reduced activity of hCG receptors. Further effort is necessary on delaying or preventing the structural and functional decrement of Leydig cells.

Key Words: Leydig cell, Transplantation, Biologic androgen substitution therapy.

서 론

고환의 Leydig세포에서는 인체에서 중요한 남성 호르몬인 테스토스테론의 대부분을 생성한다. 따라서 고환의 기능부전이나 기능저하를 보이는 경우 테스토스테론의 생성 장해를 초래하게 되고, 이의 대체를 위해 장기적인 합성 테스토스테론 주입이 필요하다. 임상적으로 원발성 성선기능저하증(primary hypogonadism)을 보이는 대표적인 예로서 Klinefelter 증후군을 들 수 있으며, 그 유병률은 남성 표현형을 보이는 경우의 0.1-0.2%를 차지하는 것으로 알려져 있다¹. 그 외 손상이나 항암화학요법^{2,3} 또는 방사선조사에 따른 Leydig세포의 기능적 장애가 있고⁴, 드물게는 신부전⁵, 척추신경손상⁶, 나병⁷, 이영양성 긴장증⁸, 겸상적혈구병⁹ 또는 비만증¹⁰의 경우에도 성기능저하가 초래될 수 있다. 이러한 여러가지 원인 질환에 대해 정상적인 남성화를 달성하거나 또는 유지하기 위해서는 적절한 시기에 부족한 남성 호르몬의 대체가 이루어져야 하며, 이를 통해 신체의 정상적인 발달과 체내 질소평형 그리고 사정액량의 회복을 기대할 수 있다¹¹.

합성 테스토스테론 주입 요법으로는 과거 testosterone propionate를 주로 이용했던 시기가 있었으나 작용 기간이 2일 정도로 짧은 단점이 있었다. 그후 에스터화된 testosterone cypionate나 enantate를 이용함으로써 작용기간을 2주까지 늘일 수 있었으며^{12,13}, 알킬화된 테스토스테론인 fluoxymesterone의 개발로 경구 복용이 가능케 되었다. 이러한 합성 테스토스테론의 장기적인 투여로 고환기능부전 및 저기능 환자에서 필요한 만큼의 충분한 대체 효과를 거둘 수 있었던 반면에 체액내 질소 정제, 적혈구 과다생성, 좌창, 심비대, 심박출량 및 신 혈류량 감소, 고혈압 및 골밀도의 변화 등¹⁴ 부작용 발생이 문제시되고 있고, 특히 사춘기 남성의 경우 정상 성인의 체격과 정신력을 갖추기까지 현재의 치료방법으로는 환자가 갖게되는 정신적 갈등과 불편감 및 성장과정 중 근골격계의 비정상적인 발달을 보이게 되므로 보다 근본적인 치료방법의 개발이 필요할 것으로 생각된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 공여자로부터 제공받은 일측 고환의 장기 이식 방법을 고려해 볼 수도 있으나 실제 장기 공여에 관련된 문제, 정자 생성 및 이에 따른 유

리적 측면에서 임상적 적용에 한계가 있기 때문에 극히 한정된 경우에만 시행이 되어 왔다^{15,16}. 따라서 이에 대한 대안으로 제시될 수 있는 것이 테스토스테론 생성 기능을 가진 소수의 Leydig세포 이식 방법이라고 생각된다.

이러한 생체내 세포이식은 이미 임상적으로 널리 시행되고 있는 골수 이식을 비롯하여¹⁷ 당뇨병에 대한 islet세포 이식¹⁸, 그외 간세포¹⁹, 갑상선세포²⁰, 부신세포²¹ 등 많은 분야에서 시도되고 있으며, 이들 대상이 된 세포는 모두 개개 세포가 기능적 단위라는 공통점을 가지고 있다. 고환의 경우 극히 적은 수이기도는 하나 몇몇 연구자들에 의해 이식가능성에 대한 긍정적인 연구 결과가 보고된 바 있다²²⁻²⁵. 그러나 이들 중 일부는 세포의 분리없이 조직의 일부를 그대로 이식에 이용하였고 이식 후 관찰 결과에서도 직접적인 테스토스테론치의 변화에 대한 비교가 없이 정낭, 전립선등 이차적 성징의 변화만을 언급하고 있으며^{22,23}, Leydig세포를 분리 이식한 경우에도 실제 이식된 세포수가 불분명하고 대상 환자의 연령이 확실치 않음을 볼 수 있다²⁴. 이에 본 연구는 이미 보고한²⁵ 고환 조직이식 경험을 토대로 흰쥐 Leydig세포의 자가이식방법을 이용하여 시기별 테스토스테론 분비능의 변화와 조직변화를 관찰함으로써 향후 생물학적 안드로젠 대체 요법으로서의 활용가능성에 대해 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 재료

실험동물로는 인체에서 발육의 가장 중요한 시기인 사춘기에 해당하는 생후 6주, 체중 170-200g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 이용하였으며, 이식시 일부 실험에서 사용한 합성 교원질(상품명 Gelfoam)은 돼지의 피부에서 추출한 미국 Upjohn사 제품을 이용하였다. 마취제는 Pyrimidinetrione(상품명 Entobar, 한림제약, 서울, 한국)을 이용하였고, 25mg/kg을 복강내에 주사하였다.

2. Leydig세포의 분리 및 이식

마취하에 음낭절개를 통해 양측 고환을 적출한 후 고환맥박을 제거하고 노출된 고환조직을 20mM-Hepes, 0.1% BSA, 100U/ml penicillin과 100μg/ml streptomycin이 포함된 Hanks Balanced Salt Solution(HBSS; Flow Laboratories,

McLean VA, USA)을 이용하여 2차례 깨끗이 세척하였다.

고환조직의 처리과정에서 분리방법에 따른 Leydig세포의 질적 및 양적 차이를 알아보기 위해 기계적 분쇄와 효소에 의한 분리를 병용한 경우와 효소에 의해서만 분리한 경우를 비교하였다. 먼저 세검자로 고환조직을 1-1.5mm 크기로 자른 후 0.25mg/ml의 collagenase type IV(Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.)가 포함된 HBSS 10ml에 담아 34°C 보온기에서 30분간 보온시킨 후, 나일론 거즈에 여과시키고, HBSS로 2-3회 반복하여 세척한 다음 여과액을 120g에서 5분간 원심분리하고 침전된 세포를 다시 2회 세척 후 HBSS로 재부유시켰다. 부유액을 다시 변형된 Kerr동²⁶의 방법에 따라 3등급의 20-50% discontinuous gradient percoll(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)을 45-ml polycarbonate 원심분리관에 준비한 후 15% percoll 10ml에 함유된 조직 분절을 상부에 위치시키고 20분간 800g, 4°C에서 원심분리하였다. Collagenase에 의한 분리만 시행한 경우는 위와 동일한 과정을 시행하되, 다만 겉자를 이용한 기계적 분쇄 과정만을 생략하였다.

이들을 각각 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)염색과 trypan blue dye exclusion test로 비교한 결과를 참조하여 실험에 이용하였으며, 준비된 세포는 26G 주사침을 통해 200 μ l의 배양액에 함유된 일정수의 Leydig세포를 각 실험별로 직접 주입방법을 이용하거나 합성 교원질에 흡수시켜 이식하였다.

3. 실험군 설정

가. 이식부위에 따른 비교

일차적으로 이식부위에 따른 Leydig세포의 기능적 활성을 비교하기 위하여 제 1군은 음낭에 가장수술을 시행한 정상 대조군, 제 2군은 거세 후 세포이식을 시행하지 않은 군, 제 3, 4, 5, 6군은 거세 후 Leydig세포 이식군으로 각각 복강내, 배부 피하, 음낭내 그리고 신피막하부 이식군으로 구분하였고, 각 실험군에 10마리씩의 흰쥐를 이용하였다. 이식 세포수는 일률적으로 1×10^6 으로 하였으며, 이를 배양액 200 μ l에 혼합하여 주입하였다. 이후 각각 1, 2 그리고 3개월에 채혈을 하여 테스토스테론을 측정하였다.

나. 이식 세포수에 따른 비교

이식된 세포의 수와 분비된 테스토스테론치

의 관계를 알아보고자 이식부위를 복강내로 지정하여 각기 다른 수의 Leydig세포 주입을 시도하였다. 실험군은 각각 1×10^6 , 3×10^6 및 5×10^6 세포를 복강내 주입한 군으로 구분하였고, 거세를 하지 않고 200 μ l의 배양액만을 주입한 군과 거세와 함께 200 μ l의 배양액을 주입한 군을 대조군으로 하였다. 각각 10마리의 흰쥐를 실험에 이용하였으며, 이식 1개월 후에 말초 혈액에서 테스토스테론을 측정 비교하였다.

다. 이식방법에 따른 비교

Van Dam동²⁷의 방법을 변형하여 $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ cm의 크기로 절단한 합성 교원질을 5cc plastic tube에 넣은 후 1×10^6 세포가 포함된 배양액 200 μ l를 약 1분간 흡수시키고, 복부에 0.5cm 길이의 절개를 통해 복강내에 위치시킨 후 복막에 고정하고 봉합하였으며, 이를 복강내 직접 주입한 경우와 비교하였다. 실험군으로 제 1군은 같은 크기의 합성 교원질에 200 μ l의 배양액만을 흡수시켜 복강에 삽입한 정상 대조군, 제 2군은 복강내 합성 교원질 삽입 후 거세한 군, 제 3군은 거세 후 3×10^6 의 Leydig세포를 복강내에 주입한 군, 제 4군은 합성 교원질에 3×10^6 의 세포를 흡수시켜 복강내에 이식한 군으로 구분하였으며, 각 군마다 20마리씩의 흰쥐를 이용하였다.

이들에서 이식 1, 2 그리고 3개월에 테스토스테론치를 측정 비교하였으며, 국소적으로 이식세포군을 형성한 것으로 생각되는 부위에서 조직을 채취, 기간별로 3개월까지 세포의 형태변화를 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였고, 또한 이식전과 이식 후 Leydig세포의 hCG 수용체의 변화 여부를 알아보기 위하여 채취된 조직을 다시 기계적 분쇄 및 collagenase처리를 통해 [¹²⁵I]labeled-hCG를 이용한 결합능을 측정하였다.

4. 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) 염색

분리된 고환구성세포내 Leydig세포의 확인은 Leydig세포내에 특징적으로 존재하면서 dehydroepiandrosterone과 androstenediol을 테스토스테론으로 전환시키는 3 β -HSD에 대한 염색을 통하여 확인하였다. 방법은 세포분리후 배양액 0.2ml에 포함된 대상 세포에 0.1ml β -nicotinic acid adenine dinucleotide(6mg/ml), 0.1ml의 5 β -androstan-3 β -ol-17 one 포화용액,

그리고 0.2ml의 nitro-blue tetrazolium(1mg/ml)을 순서대로 첨가한 다음, 34°C에서 30분간 보온시킨 후 유리 슬라이드에 한방울을 떨어뜨리고 덮개유리로 덮은 후 광학현미경하에서 세포질내 청색의 과립형 양성 반응을 확인하였다²⁸. 사용된 시약은 모두 미국 Sigma사 제품을 이용하였다.

5. 테스토스테론 측정

채취된 혈액을 실온에서 2시간 방치한 후 1500g로 30분간 원심분리하여 측정시까지 -20°C에 보관하였다. 측정은 상품화된 testosterone kit(상품명 Testosterone, ICN Biomedicals Inc. CA, USA)을 이용한 직접 방사성 면역측정법으로 감마계수기를 이용하였다.

6. [¹²⁵I]-labeled hCG 결합능의 측정

Leydig세포 이식 후 기능적 변형 여부를 알아보기 위하여 [¹²⁵I]-labeled hCG(Du Pont Co., Wilmington, USA)를 이용하여 각 시기별로 대조군의 고환내 Leydig세포와 이식된 Leydig세포의 결합능을 비교하였다. 정상대조군의 고환 조직과 교원질에 흡수 이식 후 1, 2 및 3개월에 각각 3마리씩 희생하여 복강으로부터 세포 군을 떼어낸 후 collagenase로 처리하여 얻어진 세포를 3-HSD 반응과 trypan blue dye exclusion test로 기능을 가진 Leydig세포의 비율을 확인한 후 각각 5×10^5 와 Leydig세포가 함유된 HBSS에 2×10^4 cpm의 radiolabeled hCG와 34°C에서 2시간 보온시키고, 1ml의 cold HBSS/0.2% albumin을 추가한 후 1500g로 4°C에서 10분간 3회 원심분리하여 세척하고, 상층액을 제거한 후 감마계수기로 측정하였다.

비특이성 결합의 측정은 과부하된 unlabeled hCG를 이용하였으며, 측정된 각각의 전체 cpm count를 정상 대조 세포의 측정치와 비교하여 비율을 계산하였다.

7. 조직학적 관찰

합성교원질에 흡수 이식 후 각각 1, 2, 4주 및 3개월에 일부의 흰쥐를 희생시켜 덩이리 형태의 Leydig세포를 얻은 후 일부는 formalin용액에 고정 탈수하고 파라핀 포매하여 4μm의 절편으로 절단한 다음, hematoxylin과 eosin 염색 후 정상 고환조직과의 형태학적 차이를 광학현미경하에서 관찰하였다. 또한 정상대조군

의 고환 조직과 함께 적출된 이식 조직의 일부를 0.1M cacodylate 완충액 (pH 7.4)으로 희석한 2% glutaraldehyde-2% paraformaldehyde 용액에 24시간 이상 고정한 후 0.1M cacodylate 완충액으로 두번 세척하고 0.1M cacodylate 완충액으로 희석한 1.33% osmium tetroxide에 실온에서 2시간 재고정한 다음 Epon 812에 포매하여 초박절편을 만든 후 uracyl acetate-lead citrate염색을 시행하여 두파 전자현미경(Hitachi H-500)으로 관찰하였다.

8. 통계 분석

실험 자료를 컴퓨터에 입력 후 Stat View 프로그램으로 처리하여 평균과 표준편차를 구하였다.

각 군간 측정된 테스토스테론치 그리고 [¹²⁵I]-hCG 결합능의 비교는 비모수통계검정 방법인 Mann-Whitney U test를 이용하였고, 이식 세포수에 따른 테스토스테론치의 관계는 상관계수로 표시하였으며, 각각 p값이 0.05 이하인 경우 통계적 의의가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. Leydig 세포의 분리 및 3-HSD 반응

생후 6주 전후 흰쥐의 일측 고환 중량은 평균 $1.09 \pm 0.04g$ (1.03-1.14) 이었다. 고환의 백막을 벗기고 기계적 분쇄 후 collagenase로 처리한 경우는 percoll을 이용한 분리에서 3개의 명확한 흰색세포층을 볼 수 있었고, collagenase만 처리한 경우는 이들 3개의 층에서 중간 부위에 해당하는 위치에 단일층을 나타내었다 (Fig. 1). 단일층으로 분리된 층에서 얻어진 세포를 3-HSD반응결과 Leydig세포의 세포질내에 과립형태의 진한 청색 염색을 확인할 수 있었으며 (Fig. 2), 내용적으로 collagenase만 처리한 경우에 전체적으로 분리된 Leydig세포수는 적은 반면, 고환내 다른 세포에 의한 오염이 적고, 생존세포수의 비율은 더욱 높았다. 실험을 통해 추정된 collagenase만 처리한 경우의 단일층 내 구성세포 중 Leydig세포가 차지하는 비율은 평균 $82.3 \pm 7.4\%$ 였으며, 분리된 Leydig세포수는 일측 고환에서 평균 $3.54 (\pm 0.48) \times 10^6$ 이었다 (Table 1).

따라서 본 실험에서는 Leydig세포의 분리 방법으로 collagenase만 이용하는 방법을 선택하였다.

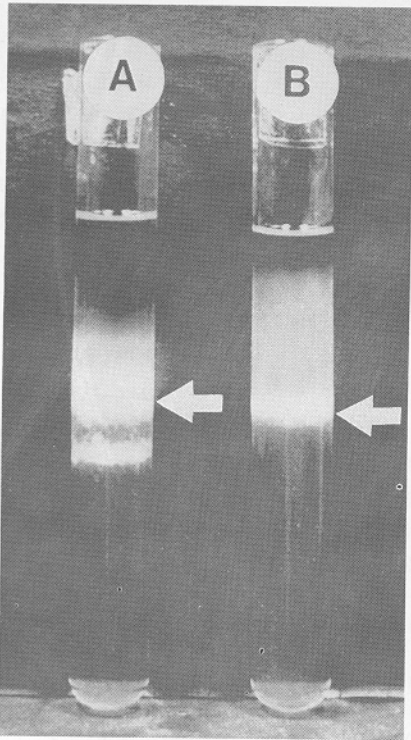


Fig. 1. Leydig cell bands isolated by discontinuous gradient percoll. A) Bands isolated after both mechanical and enzymatic digestion. B) Band isolated only after enzymatic digestion. Arrows indicate the band which contained mainly Leydig cell.

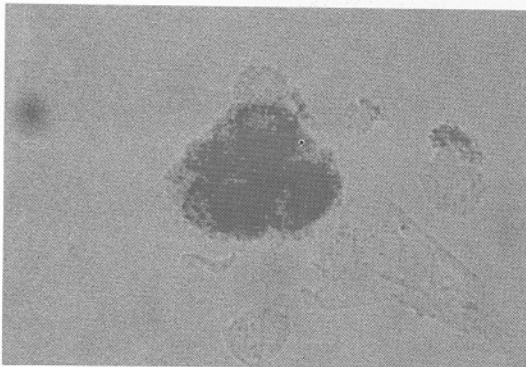


Fig. 2. The 3β -hydroxydehydrogenase reaction to isolated Leydig cell. Typical blue dots were seen in the cytoplasm of Leydig cell.

2. 테스토스테론 분비능

가. 이식 부위에 따른 차이

Collagenase와 percoll에 의해 분리된 Leydig 세포 1×10^6 개를 부위별로 이식 후 1개월째에

Table 1. Comparison of isolation method according to the number of Leydig cells

Group	A	B
Mean number of isolated cells from one rat testis	6.98 million	4.32 million
Positive reaction rate to 3β -HSD	0.59	0.82
Estimated number of functioning Leydig cells	4.12 million	3.54 million
% Trypan blue exclusion	64	83

A, mechanical+enzymatic digestion. B, Enzymatic digestion only. 3β -HSD; 3β -hydroxysteroid dehydrogenase.

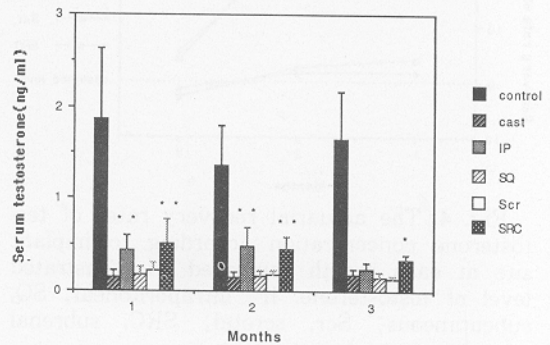


Fig. 3. The testosterone concentration according to transplant sites. cast, castration; IP, intraperitoneal; SQ, subcutaneous; Scr, scrotal; SRC, subrenal capsular transplantation. Each one million cells were implanted and data represented average $\pm$ standard deviation.

* $p < 0.05$, ** < 0.01 , compared with castrated group at each month.

측정한 혈청내 테스토스테론치는 신피막하 이식시에 가장 높은 평균 0.51ng/ml 를 나타냈고, 다음으로는 복강내 이식군의 0.43ng/ml 로 두 군 모두 거세군의 0.15ng/ml 에 비해 유의있는 증가를 보였다($p < 0.01$). 2개월째에도 마찬가지로 신피막하 이식군과 복강내 이식군은 모두 거세군에 비해 테스토스테론이 유의있게 증가된 소견을 보였다($p < 0.01$). 그러나 3개월째에는 각각 신피막하 이식군이 0.33ng/ml , 복강내 이식군이 0.23ng/ml 로 두 군 모두 2개월째에 비해 유의한 감소를 보였다($p < 0.05$) 피하 및 음낭내 이식군에서는 각 시기별로 모두 거세군에 비해 차이를 보이지 않았으며, 같은시기 정상 대조군에서 측정된 테스토스테론치는 이식

후 1, 2, 3개월에 각각 1.87, 1.36 그리고 1.65ng/ml를 보였다(Fig. 3). 이들에서 지체군의 테스토스테론치를 뺀 실질적인 테스토스테론 분비율을 보면 2개월째에 복강내 이식군이 정상대조군의 28.6%로 가장 높음을 볼 수 있으나 같은 2개월의 신피막하 이식군(27.9%)과는 차이를 보이지 않았으며, 전체적으로는 신피막하 이식군과 복강내 이식군은 1개월에 비해 2개월째에 상대적인 증가를 보이고 있으나, 3개월째에는 감소함을 보였다(Fig. 4).

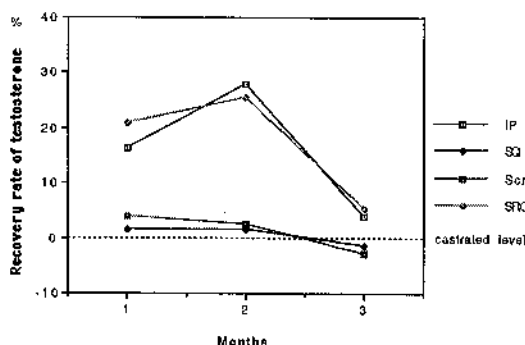


Fig. 4. The actuarial recovery rates of testosterone concentration according to implant site at each month compared with castrated level of testosterone. IP, intraperitoneal; SQ, subcutaneous; Ser, scrotal; SRC, subrenal capsular transplantation.

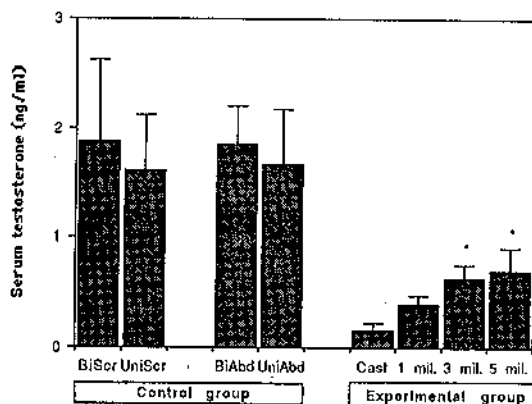


Fig. 5. Changes in testosterone secretion according to the number of Leydig cells one month after transplantation. BiSer, bilateral scrotal testis; UniSer, unilateral scrotal testis; BiAbd, bilateral abdominal testis; UniAbd, unilateral abdominal testis as control groups. Cast, castrated group; 1, 3, 5mil, each 1, 3, 5million cell transplanted group. * $p < 0.05$, compared with intraperitoneally transplanted group(1 million cell each).

나. 이식 세포수에 따른 차이

대조군에서 음낭내 양측고환과 음낭내 일측고환만 있는 경우, 그리고 복강내 양측고환과 복강내 일측고환의 경우간에 1개월 후 동계적으로 유의있는 차이는 보이지 않았다($p > 0.05$). Leydig세포를 각각 1×10^6 , 3×10^6 그리고 5×10^6 개씩 복강내에 이식 후 1개월에 측정한 평균 테스토스테론치는 0.39, 0.63 그리고 0.81ng/ml로 1×10^6 개 이식에 비해서는 3×10^6 과 5×10^6 개 이식에서 테스토스테론 분비가 유의 있게 증가하는 소견을 보였으며(각각 $p < 0.05$) (Fig. 5), 이식세포수와 테스토스테론 분비능간에는 높은 상관성($r = 0.967$, $p = 0.024$)을 보여 주었다(Fig. 6). 또한 거세시 테스토스테론치를 뺀 실제 분비량을 복강내 일측고환인 경우와 비교해보면 1×10^6 개의 이식시 16.4%, 3×10^6 시 32.9%, 5×10^6 시 43.4%를 보였다.

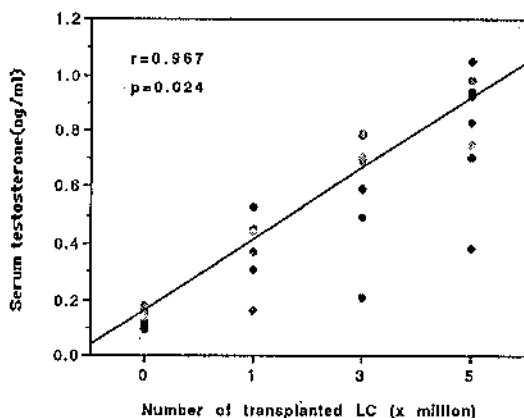


Fig. 6. Correlation between testosterone concentration and transplanted number of Leydig cell in intraperitoneal transplant.

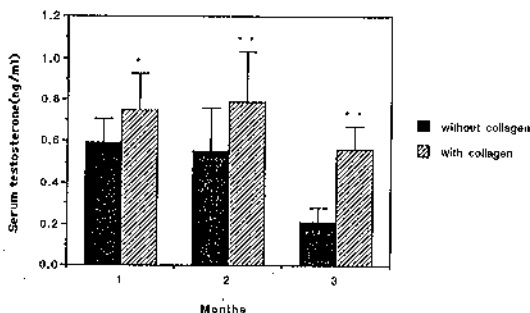


Fig. 7. Comparison of serial testosterone concentrations according to the implanted method. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with group which transplanted intraperitoneally without collagen absorption at each month.

Table 2. Comparison of serum testosterone concentration according to the implant method(ng/ml)

Group Duration	Control	Castrated	Collagen Non-absorbed	Collagen Absorbed
1 month	1.93±0.36	0.08±0.02	0.59±0.12	0.75±0.18*
2 month	1.81±0.29	0.12±0.03	0.55±0.21	0.79±0.24**
3 month	1.77±0.42	0.11±0.02	0.21±0.07	0.56±0.11**

*p<0.05, **p<0.01, compared with collagen non-absorbed group at each month.

다. 이식방법에 따른 차이

대조군과 비교한 테스토스테론치는 Table 2와 같다. 교원질에 3×10^6 개의 세포가 포함된 200 μ l의 배양액을 흡수시켜 복강내 이식한 경우와 직접 Leydig세포를 주입한 경우를 각각 1, 2, 3개월 후에 테스토스테론치로 비교해 보면 교원질에 흡수 후 이식을 한 경우 이식 1개월에 평균 27%, 이식 2개월에 43.6%까지 테스토스테론치의 증가를 보였으며, 특히 3개월째는 Leydig세포만 이식한 경우 평균 0.21ng/ml로 큰 감소를 보여, 2개월째의 38%에 해당하였다. 이에 반해 교원질에 흡수 이식시킨 경우는 평균 0.56ng/ml로, 2개월째의 약 70% 수준까지 유지되는 결과를 보였다(Fig. 7). 합성 교원질에 흡수 이식 3개월 후 보인 정낭의 정상대조군, 거세군과의 광학현미경적 소견의 비교에서 정낭 상피세포의 변화와 분비능의 감소를 볼 수 있어서 이식된 3×10^6 의 Leydig세포가 기능적으로 정상적인 이차 성징의 유지에는 부족함을 볼 수 있었다(Fig. 8).

3. 기간별 hCG 수용체 활성의 변화

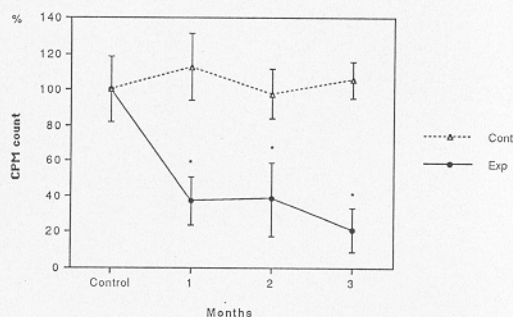


Fig. 9. Relative changes in monthly ¹²⁵I-hCG binding activity after synthetic collagen-absorbed intraperitoneal Leydig cell transplantation. Values were represented as average± standard deviation compared with the total cpm count of freshly isolated Leydig cells at the same period. *p<0.01, compared with control group at each month.

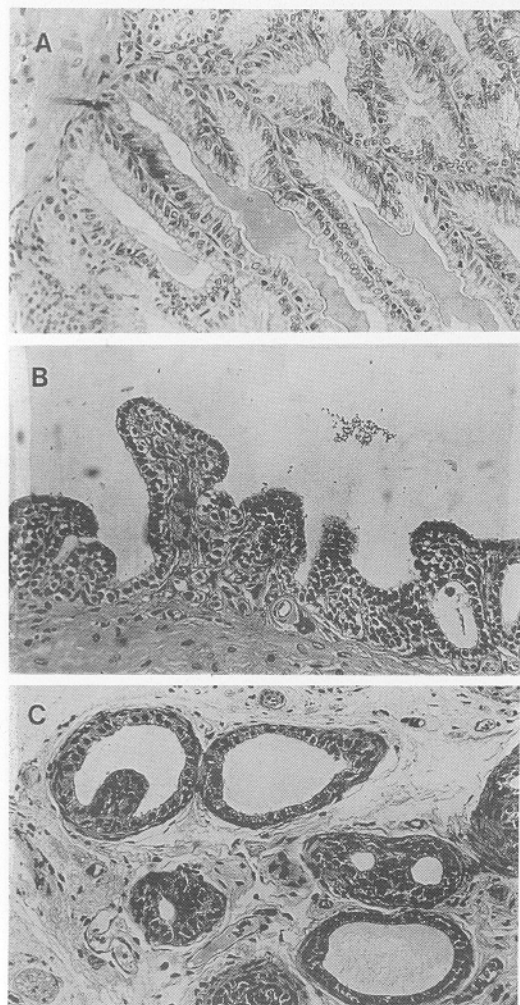


Fig. 8. Comparison of histological changes of seminal vesicle three months after synthetic collagen-absorbed intraperitoneal Leydig cell transplantation. A) control group. B) experimental group. C) castrated group. Reduced secretory activity and atrophied seminal epithelial cells were seen, but mucosal fold was maintained compared with castrated seminal vesicle(H & E, ×100).

정상 고환에서 분리한 세포 중 3β -HSD반응과 trypan blue 염색 결과 전체 세포 중 80% 정도가 기능을 가진 Leydig세포였고, 교원질에 흡수 이식 후 각각 1, 2 및 3개월에서 측정된 생능을 가진 세포의 비율은 조직에서 재분리된 세포 중 평균 55%, 69% 그리고 27%를 보였다. 각 기간별로 측정된 ^{125}I -hCG 결합능은 정

상대조군에 비해 각각 37.7%, 38.3%, 21.0%로 유의한 감소를 보였으며(각각 $p < 0.01$), ^{125}I -HCG의 결합정도는 혈청 테스토스테론치와 비례하는 추세를 보였다(Fig. 9).

4. 세포조직학적 관찰

가. 광학현미경 소견

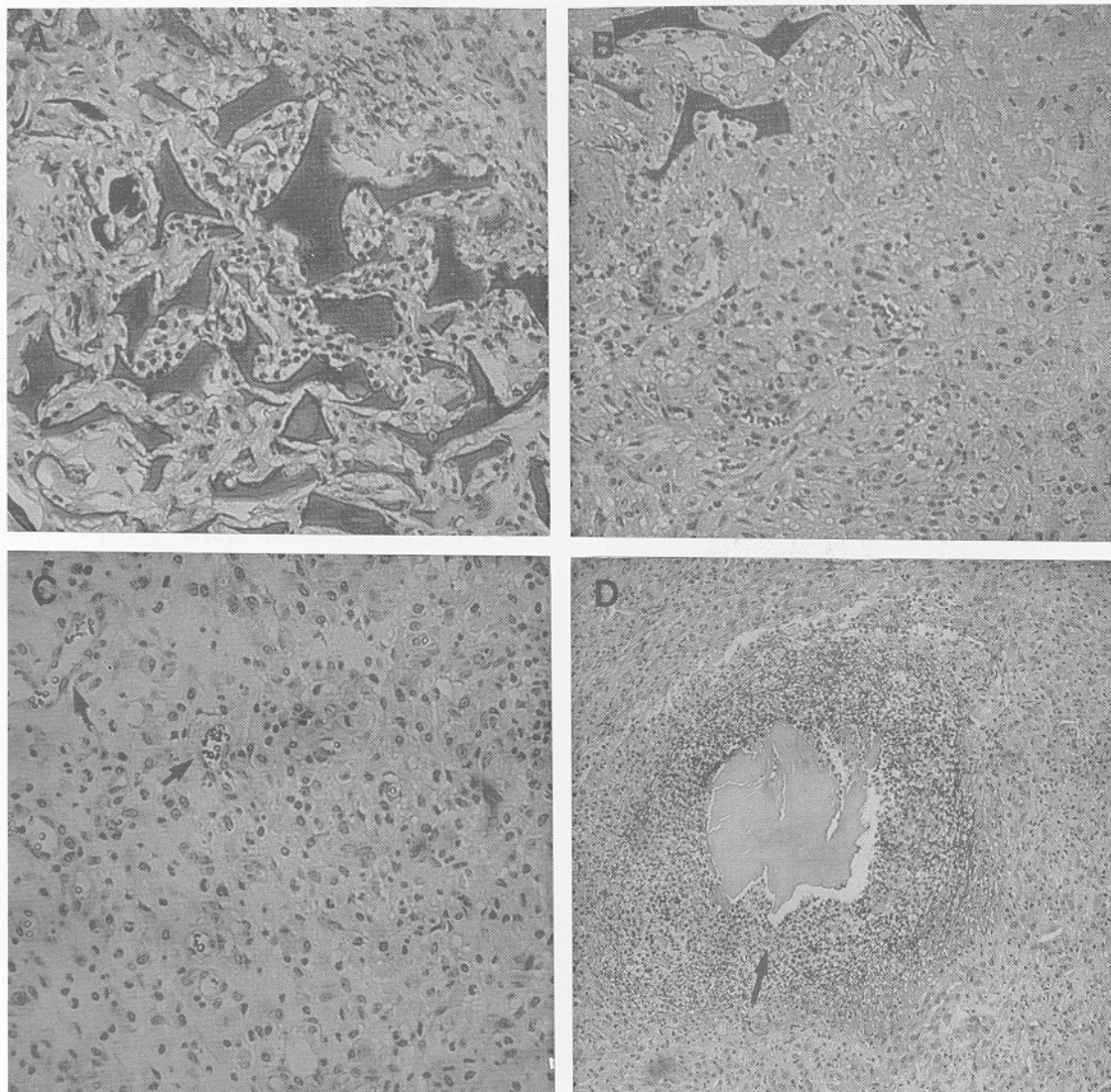


Fig. 10. The phased changes in light microscopic findings of Leydig cells intraperitoneally transplanted with collagen absorption. A) 1 week after transplantation. Non-absorbed collagens and infiltration of inflammatory cells were seen. B) 2 weeks after transplantation. Peripheral diffusion of red blood cells were seen. C) 4 weeks after transplantation. There were evident neovascularization(arrows) and existence of eosinophilic cell group presumed as aggregated Leydig cells of sheet like pattern. D) 3 months after transplantation. The collagen was entirely disappeared. Peripherally located remained eosinophilic cells were found. And dystrophic ossification(arrows) was appeared in the center (H & E, $\times 100$).

국소 주입에 의한 이식시에는 특징적인 Leydig세포군을 형성한 소견을 볼 수 없었으나, 교원질에 흡수시킨 후 이식한 경우는 비교적 주위 조직과 경계가 뚜렷한 세포군이 형성된 소견을 볼 수 있었다. 교원질에 흡수시킨 후 복강내 복벽 또는 후복막의 지방층에 고정을 시킨 경우 이식 1주에는 교원질이 용해되지 않은 상태로 보이고, 이때 조직소견은 저배율에서

미처 용해되지 않은 교원질 사이사이 이식한 Leydig세포가 허혈성 변화를 일으킨 상태로 응축되어 보였다. 2주경에는 떼어낸 조직의 중심부는 교원질이 일부 남아있고, 세포가 허혈에 의한 변화를 계속 보이는데 비해 주변부위는 정상적인 세포형태를 보이면서 각 세포가 결집되어 군을 이루고 있는 현상을 볼 수 있다. 그러나 미세혈관은 아직 형성되지 않은 상태에서

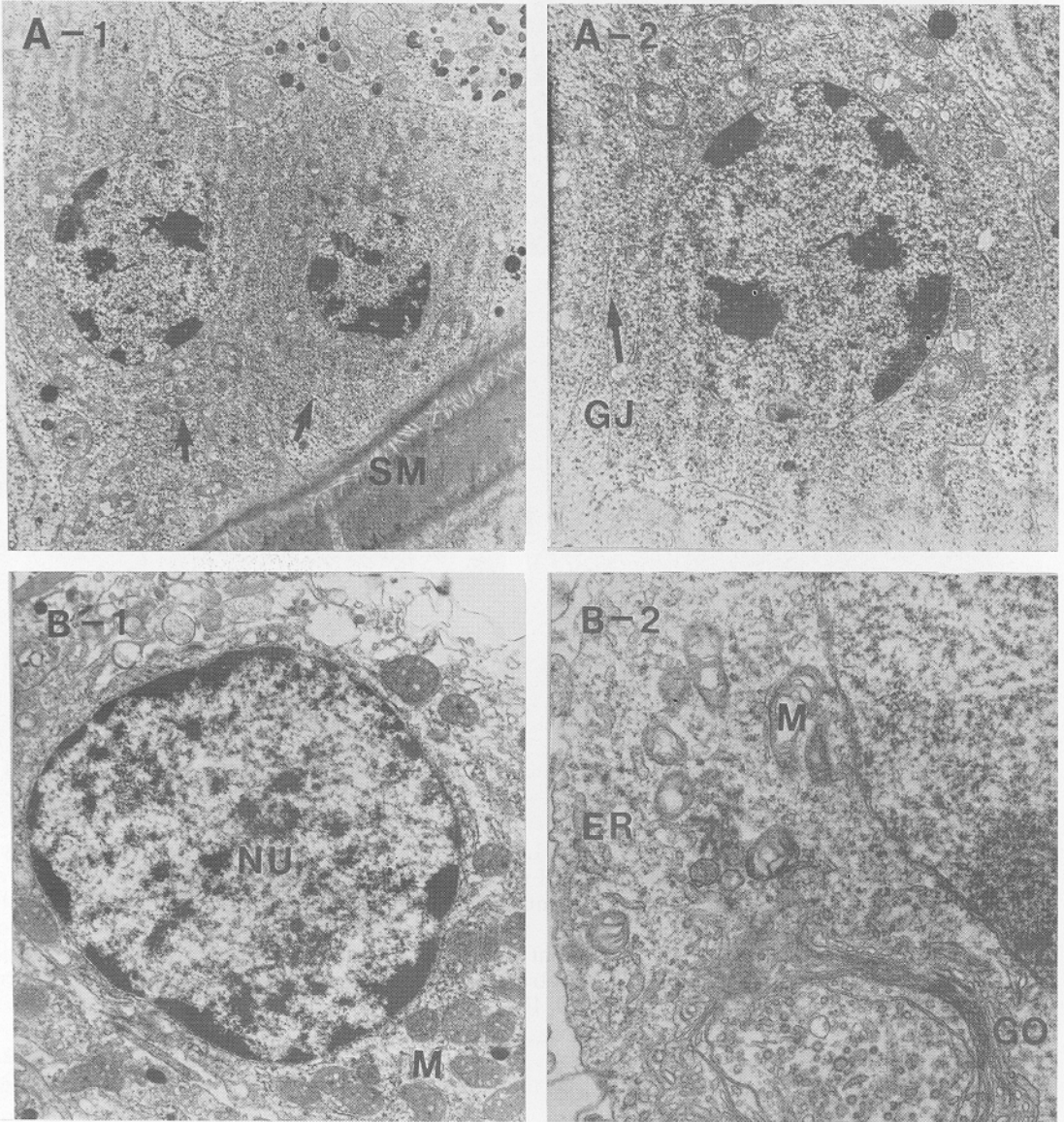


Fig. 11. The electron microscopic findings of Leydig cells from rat testis. A) Leydig cells in the interstitium. 1. SM, basement membrane of seminiferous tubule. Arrows, Leydig cells ($\times 6,000$). 2. GJ, gap junction ($\times 10,000$). B) Isolated Leydig cells. 1. NU, nucleus. M, mitochondria ($\times 14,000$). 2. GO, golgi apparatus. M, mitochondria. ER, endoplasmic reticulum ($\times 24,800$).

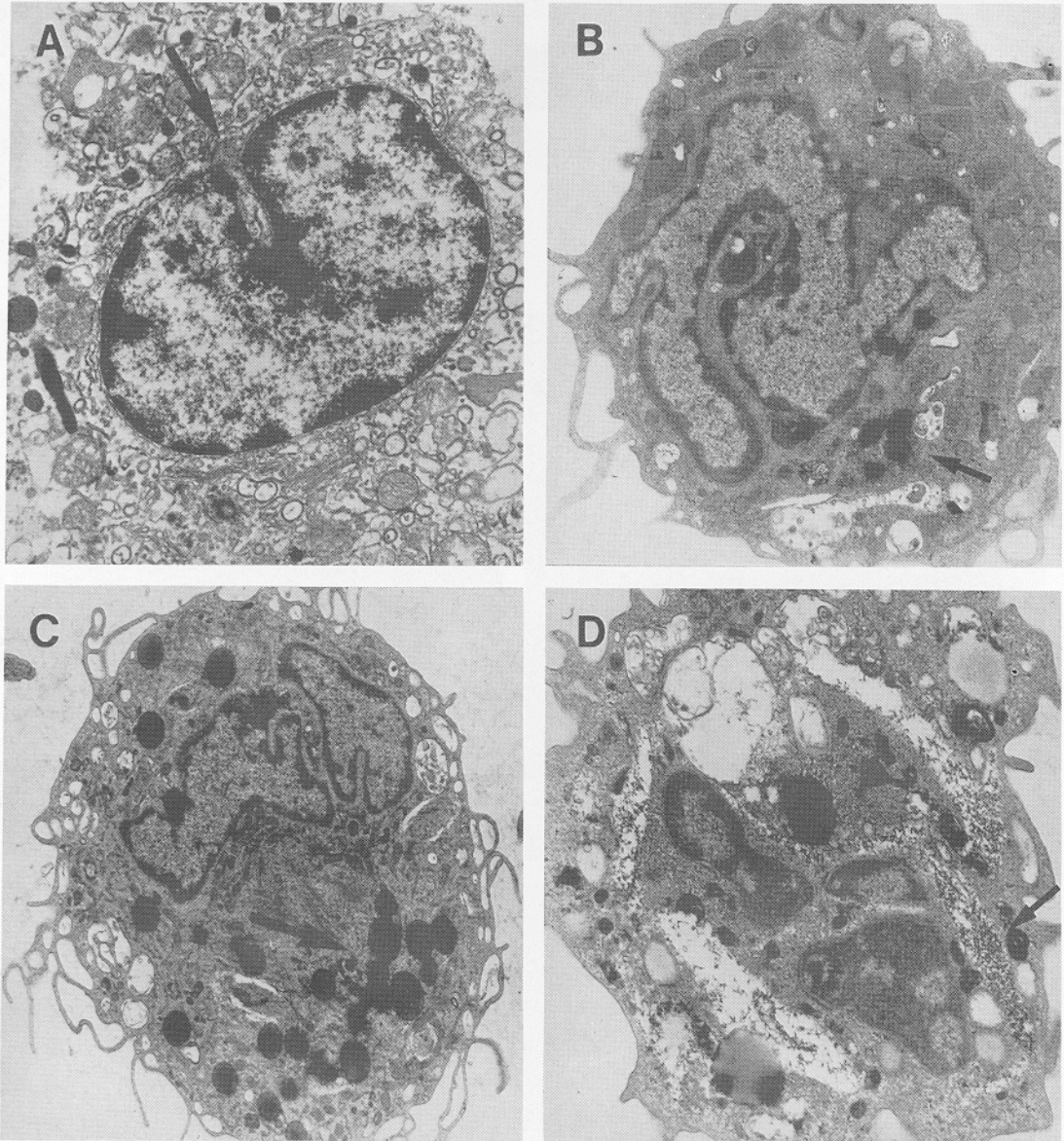


Fig. 12. The electron microscopic findings of Leydig cells recovered from collagen absorbed Leydig cell transplants 3 months later. **A)** Indentation of nucleus (arrow) was seen, but nuclear chromatin and intracytoplasmic organelles were relatively maintained ($\times 14,000$). **B)** There were multiple nuclear indentation. Intracytoplasmic organelles were not well identified. Lipochrome pigments (arrow) were partly appeared ($\times 14,000$). **C)** Increment of lipochrome pigments (arrow) and severe nuclear dysmorphism were seen ($\times 10,500$). **D)** Destruction of cellular membrane, intracellular necrosis (arrow) and nuclear atrophy were found ($\times 18,400$).

적혈구가 세포군내로 확산되어 나타나는 것을 볼 수 있어서 복강내 고정부위로부터 신생혈관이 조성되고 있음을 알 수 있다. 이후 4주경에는 완전한 신생 모세혈관이 형성되어 혈류가 공급되는 소견을 보이며, 모든 세포가 정상적인 형태를 보여주고 있다. 그러나 이식 후 3개

월에는 중심부에 이영양성 골화가 나타났으며, 염증반응을 보이고 또한 많은 세포들에서 퇴행성 변화가 일어났음을 볼 수 있었다 (Fig. 10).

나. 전자현미경 소견

정상대조군의 고환간질내에서 볼 수 있는 Leydig세포와 분리 후 전자현미경적 소견은 세

포가 장방형으로 핵이 비교적 중심에 위치하며, 핵소체가 핵의 주변부에 주로 위치하고, 세포질내 많은 내형질세망과 사립체가 존재함을 볼 수 있다(Fig. 11). 그러나 이식 3개월경에는 많은 세포에서 다시 핵의 형태가 불규칙하며, 심한 농축현상을 보였으며, 세포질내 지질색소 침착이 증가하고, 아울러 내형질세망과 사립체의 수적 감소를 보였다(Fig. 12).

고 찰

고환간질 조직의 주기능은 테스토스테론 생성과 전달에 있다. 테스토스테론은 남성의 생식기능과 이차 성징의 유지에 필수적이며, 주원천은 Leydig세포이다. Leydig세포에서의 테스토스테론 생성은 콜레스테롤을 혈장에서 취하거나 또는 내형질세망내에서 초산염이나 포도당으로부터 합성이 되면 사립체내에서 cholesterol side-chain cleavage enzyme에 의해 pregnenolone으로 바뀌게 되고, pregnenolone은 내형질세망 또는 세포질내에서 테스토스테론으로 합성된다²⁹.

이러한 기능을 가진 Leydig세포를 임상적으로 고환기능 저하증 환자에서 생물학적인 남성호르몬 대체 방법으로 이용코자 하는데에는 다음과 같은 몇가지 면에서 그 타당성이 있다. 우선 각각의 세포가 테스토스테론 생성능을 가지고 있으므로 이제까지 시도된 인체내 다른 세포 이식에서와 마찬가지로 세포단위로 이식이 가능할 것으로 생각되며, 고환내 세정관의 정자형성능이 체온의 높·낮음에 따라 영향을 받는데 비해 Leydig세포는 비교적 온도에 저항성을 가지고 있는 것으로 알려져 있어서 신체내 이식 부위의 선정에 체온분포에 따른 한계가 없을 것으로 보인다. 또한 시험관 배양에서는 1주 이상은 Leydig세포의 스테로이드 생성능이 유지되지 못한은 이미 보고된 바 있으나^{27,30} 반면 생체내 이식에서는 전체 고환용적의 10%미만을 이식한 경우에도 거세 후 일정 수준 남성화의 지속이 가능한 것으로 보고된 바 있어서^{23,24} 공여자의 일측 고환에서 쉽게 이식에 필요한 충분한 조직을 국소 마취하에 부분 절제로 얻을 수 있을 것으로 보인다. 특히 사람의 경우 성인에서 전체 고환내 Leydig세포가 차지하는 비율이 5-12%로³¹ 흰쥐의 평균 2.28%에 비해 상대적으로 높음으로서 분리 및 이용이 더욱 용이할 것으로 생각되고³², 술전 평

가를 통해 두개의 정상적인 고환기능을 가진 공여자를 선발함으로써 술후 공여자의 생식 및 성적기능에 전혀 장애를 일으키지 않을 것으로 추정된다는 점이다. 또한 무엇보다도 합성 테스토스테론 주입에 의해 야기될 수 있는 신체적 부작용을 방지하자는데 목적이 있으며, 본 실험은 이러한 배경하에 시행되었다.

이식 후 평가에서 중요한 점 중 하나는 이식된 세포가 과연 생착과 함께 테스토스테론 분비기능을 보일 수 있는가 하는 점이다. 본 연구 결과에서는 자가이식 후 4주경에 이식세포수에 비례하여 일정 수준의 테스토스테론이 생성 분비됨을 볼 수 있었으나, 이후 3개월경에는 부분적인 세포의 형태 변형과 아울러 기능적 저하현상이 나타남을 볼 수 있었다. 이와 유사한 분리된 Leydig세포이식에 관한 연구로는 무게 200g 미만의 inbred Lewis strain 흰쥐의 Leydig세포를 분리하여 신피막하 이식을 시행한 후 4개월에 측정된 테스토스테론치가 정상대조군의 약 34%에 이름을 보고한 Tai등²⁴의 연구결과와는 확인이 된 바 없다.

먼저 이식 후 생착률과 관련하여 가장 유의해야 할 점은 Leydig세포의 분리과정으로 생각된다. 분리 방법의 확립은 이식전 Leydig세포의 기능 유지에 필수적이다^{33~35}. 세포이식시 분리시간의 지연은 세포자체의 기능적 및 형태적 변형을 초래할 수 있으며, 아울러 오염 및 균 감염의 가능성이 높아지게 된다. 본 연구에서 전 실험 단계로 시도된 분리 방법의 선정에서 collagenase type IV에 의해서만 분리한 경우 평균 약 432만으로 기계적 분해를 동시에 시행한 경우에 비해 적으나 이들중 3-HSD에 의한 양성물은 각각 59%와 82%로 차이를 보임으로서 실제 이식에 이용될 수 있는 기능을 가진 Leydig세포수는 각각 평균 약 400만과 350만으로 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서 분리 방법에 있어서 효소 단독에 의한 분리가 분리 후 이식까지의 시간을 줄일 수 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 단독으로 collagenase type IV처리 후 percoll에 의한 분리 방법을 적용하였다.

이식부위로는 신피막하나 복강내 이식이 동일수의 Leydig세포이식에서 상대적으로 높은 테스토스테론치를 보임으로서 전체적으로 이식대상부위는 다르나 Boyle등²³이 조직의 일부를 이식하는 과정에서 복강내 이식이 유리함을 보고한 것과 일치함을 볼 수 있었다. 반면 음낭

내 이식이나 피하이식의 경우 동일기간 경과 후 적정량의 테스토스테론 분비가 관찰되지 않은 점으로 미루어 이식 후 생착과정에서 혈류나 복강액을 통한 영양분의 공급이 결정적인 영향을 미치는 것으로 판단된다. 실험적으로 적정이식의 선정과 관련하여 Tai등²⁴은 5×10^6 세포를 신피막하에 이식했다고 하였으나 본 실험에서의 과정을 통해 볼 때 이는 상당한 어려움이 있었을 것으로 추정된다. 본 연구에서도 단기적으로는 신피막하 이식이 더욱 유효함을 볼 수 있었으나 방법적으로 신피막하 이식은 많은 수의 Leydig세포를 이식하기에는 이식공간이 협소하여 시행이 어려우므로 이후 이식수 결정 및 합성 교원질을 이용한 이식 실험에는 복강내 이식을 시행하였다.

이식수에 따른 테스토스테론 분비능은 본 연구에서 이식수에 의의있게 비례하는 결과를 보였는데 대조군에서는 일측 복강내 교환의 경우 양측 음낭내 교환에 비해 테스토스테론치가 의미있는 감소를 보이지 않음으로서 일측 교환의 절제 후 보상작용 즉 보상성비대에 의한 Leydig세포수의 증가와 기능적 활성의 강화가 이루어졌음을 추측할 수 있다. 생후 6주의 일측 교환에는 평균 $1.0\text{--}1.3 \times 10^7$ 의 Leydig세포가 존재한다는 연구 결과를 토대로 볼 때 collagenase 단독 처리에 의한 분리 방법의 효율은 약 30% 수준이라는 것을 알 수 있다³⁶. 이식 결과에 있어서도 측정된 테스토스테론치와 이식에 이용한 Leydig세포수가 약 30%선에서 일치함을 볼 수 있으나 내용적으로는 세포의 보상성비대, 이식 후 ^{125}I -hCG결합능의 저하등 다양한 기전이 복합적으로 작용했으리라 추정된다. 따라서 이에 대한 규명은 보다 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

합성 collagen에 흡수 이식하는 방법은 일차적으로 이식 후 세포군을 형성케 함으로서 회생시 이식 부위에서 조직의 재취가 용이하고, 후에 이를 이용한 변화된 이식세포의 형태와 기능적 평가를 가능케 하며, 또한 직접 주입과 비교하여 테스토스테론 분비능의 차이여부를 알아보기 위해 시도되었다. 결과 합성 교원질에 흡수 이식하는 방법은 시기별 조직학적 소견에서 점진적인 생착과정을 잘 보여주었으며, 이식초기 허혈성 변화는 2주 이내에 주변부부터 신생혈관의 자람이 시작되고, 이에 따라 형태 및 기능적 회복이 가능함을 볼 수 있었다. 세포군의 형성은 인접한 Leydig세포간에 meta-

bolic signal의 교환을 가능케 하고³⁷, 아울러 형성된 gap junction에 주로 성선자극호르몬에 대한 수용체가 존재하는 것으로 알려져 있어서³⁸ 합성 교원질을 이용할 경우 초기 이식 세포의 세포군 형성과 생착에 잇점이 있을 것으로 생각되며, 아울러 본 실험 결과 이식후 3개월에 측정된 테스토스테론치가 같은 수의 복강내 주입에 의한 경우 보다 약 2.7배의 증가를 보임으로서 스테로이드생성에도 도움을 주는 것으로 판단된다. 그러나 전반적으로 볼 때 세포주입에 의한 이식시 이식 1, 2개월 후 대조군의 테스토스테론치에 비해 평균 약 28%, 3개월 후에는 거의 거세시 테스토스테론치로 떨어짐을 보였고, 합성 교원질을 이용한 경우에도 1개월과 2개월에는 대조군의 약 40% 수준, 3개월에는 약 30% 수준으로 떨어짐을 보임으로서 이식 후 초기 생착 및 기능 회복여부외에 언제까지 기능이 유지될 수 있는가 하는 문제는 세포 이식에 있어서 또 다른 중요성을 가진다.

합성 교원질에 흡수이식 후 3개월에 보인 조직학적 변화는 주변부가 충분한 혈류가 공급되고 있음에도 불구하고 내부에서는 열중반응과 함께 이형양성 골화의 변화, 그리고 세포의 퇴화현상을 보였고, 또 미세구조상 많은 수의 세포에서 세포질내 지방색소 침착 소견의 증가와 함께 내형질세망과 사립체수의 감소등을 보였다. 이는 실험적으로 황체호르몬에 의한 자극이 없는 경우 볼 수 있는 소견과 일치하며³⁹, 본 연구에서 실제 기능을 보이는 hCG 수용체의 활성화도는 이식초기 대조세포의 약 40% 수준에서 3개월 후에는 약 25% 수준으로 감소를 보임으로서 이러한 세포내 변화가 일부 황체호르몬의 자극저하에 의한 것이 아닌가 추정된다. 따라서 이식 3개월에 보이는 테스토스테론 분비능의 감소는 복합적인 요인에 의한 것으로 생각되고, 이외에 Leydig세포의 생주기에 대해 확실히 알려진 바는 없으나 자연 세포소멸(apoptosis)기전에 의한 변화도 고려되어야 할 것으로 생각된다⁴⁰.

향후 Leydig세포이식에서 스테로이드 생성능의 유지와 관련하여 특징적으로 다음 두가지 점이 고려되어야 할 것으로 생각된다. 그 하나는 이식에 의한 국소적 교환 인자의 소실이며, 다른 한가지는 교환 간질내에 존재할 것으로 추정되는 Leydig세포 전구세포의 존재유무와 이에 대한 자극방법이다. 국소적인 요소의 소실로서는 이식 후 교환내 타세포와의 세포간

상호작용의 차단을 들 수 있는데 이제까지의 보고를 보면 Leydig세포의 스테로이드 합성능은 뇌하수체 인자외에 뇌하수체 인자로서 주위 대식세포 및 Sertoli세포와 연관되어 inhibin, activin, 성장인자등 자가분비성 또는 타가분비성 작동불절에 의해서도 조절될 수 있음이 보고된 바 있다⁴¹.

또한 백서에서 성숙형 Leydig세포의 출현에 대해 일부에서는 초기 태아형의 Leydig세포가 서서히 2주 이후 성숙형으로 전환되는 것으로 보고하고 있으나^{42,43}, 이와는 달리 고환간질내에 존재하는 전구세포로 생각되는 미성숙 섬유아세포가 성숙형 Leydig세포로 전환되는 것이라는 이론이 있다^{31,44}. 현재로는 태아형 Leydig세포와는 별도로 간질내 미성숙 섬유아세포가 성숙형 Leydig세포로 변환된다는 이론이 대체적으로 인정을 받고 있으나 아직까지 확실한 규명은 되어있지 않다. 따라서 이러한 전구세포의 존재를 인정한다면 이식세포의 대부분을 차지할 것으로 생각되는 성숙형 Leydig세포의 이식 후 보이는 기능적 및 형태적 변형 또는 자연 세포소멸과정에서 이식시 일부 같이 포함되어 있을지도 모르는 전구세포가 이를 보상할 만한 능력이 있는가 하는 점이다. 따라서 이러한 성숙형 Leydig세포로의 변형이나 출현을 자극하는 인자가 무엇인지는 아직 확실히 알려진 바 없으나 Christensen 및 Peacock⁴⁵ 이 hCG의 부여로 전구세포에서 Leydig세포로의 변환을 증가시킬 수 있음을 보고하였고, Swerdloff 및 Heber⁴⁶는 FSH를 가능한 자극제로 제시한 바 있다. 그후 Kerr 등²⁶은 뇌하수체절제술을 시행한 흰쥐에서 LH와 함께 FSH를 동시투여시 더욱 많은 Leydig세포가 나타남을 보고한 바 있다.

따라서 전구세포로 생각되는 미성숙형의 섬유아세포 및 간질내 대식세포, Sertoli세포를 동시 이식함과 함께 이식 후 적절한 시기에 이러한 자극을 줌으로서 좋은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대되며 이의 실험적 규명을 위해서는 혼합이식과 자극여부에 따른 스테로이드 생성능의 차이와 지속 정도에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

일차적 고환기능저하증에 대한 치료로서 이용되는 합성테스토스테론 주입은 특히 사춘기에 장기간 주입 후 초래될 수 있는 체액내 절

소정체 및 골밀도 변화등 여러가지 합병증으로 인하여 최근에는 이에 대한 보완이나 또는 새로운 치료방법의 개발이 요구되고 있다. 따라서 본 연구에서는 안전하고 새로운 생물학적 안드로젠 대체요법으로서 생체내 Leydig세포이식 가능성을 알아보고자 실험적으로 사람의 사춘기에 해당하는 생후 6주의 흰쥐 고환에서 분리한 일정수의 Leydig세포를 자가이식 후 이식세포의 생존에 따른 시기별 테스토스테론 분비능의 변화와 조직형태학적 변이과정을 관찰함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 이식부위별로는 신피막하나 복강내 이식이 피하 또는 음낭내 이식에 비해 상대적으로 높은 테스토스테론치를 보였고, 이식세포수는 테스토스테론 분비와 의외있게 비례하는 상관성을 보였다. 그러나 이식 3개월 후에는 기능적 저하를 보였다.

2. 합성 교원질에 흡수 후 복강내 이식시에는 동일수의 Leydig세포를 복강내에 직접 이식한 경우에 비해 기간별로 전반적인 테스토스테론 분비능의 향상을 보였으며, 특히 이식 3개월 후 측정된 테스토스테론치는 Leydig세포만 주입한 경우에 비해 약 2.7배 높았다.

3. ¹²⁵I-hCG의 활성도는 정상대조군에 비해 이식 후 각각 1,2 및 3개월에 평균 37.7%, 38.3% 그리고 21.0%로 모두 감소하였으며, 시기별 ¹²⁵I-hCG 결합 정도와 혈청 테스토스테론치는 비례하는 성향을 보였다.

4. 이식 4주 후에는 부분적인 신생 모세혈관이 나타나 응집생착된 정상 형태의 Leydig세포군을 보였다. 3개월 이후에는 세포군내에 부분적으로 미세구조적인 피사와 퇴화 소견을 보였고 일부 세포는 핵의 농축현상과 지질색소침착의 증가를 보였으며, 골지체 및 미토콘드리아의 수적인 감소와 함께 크기도 전반적으로 작았다.

이상에서 Leydig세포는 체액이나 혈액의 공급이 원활할 경우 이식 후 4주내에 생착과 함께 기능적 회복을 보였고, 또한 이식 세포수를 늘리거나 교원질에 흡수이식하는 방법을 이용함으로써 단기간내에 테스토스테론 분비량을 체내에 필요한 최소한의 수준으로 올릴 수 있다고 생각되므로 특히 인체에서 사춘기부터 정상 성인 형태를 완성시까지 유용할 것으로 기대된다. 그러나 이식 3개월 이후에는 부분적인 퇴화 및 기능 저하를 나타내고 있어서 이에 대한 규명과 아울러 이러한 퇴행현상을 지연 또

는 방지하기 위한 보다 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

REFERENCES

1. Hsueh WA, Hsu TH, Federman DD. Endocrine features of Klinefelter's syndrome. *Medicine* 1978; 57:447-62.
2. Chapman RM, Sutcliffe SB, Rees LH, Edwards CRW, Malpas JS. Cyclical combination chemotherapy and gonadal function. *Lancet* 1979; 1:285-9.
3. Schilsky RL, Lewis BJ, Sherins RJ, Young RC. Gonadal dysfunction in patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Intern Med* 1980; 93:109-14.
4. Brauner R, Czernichow P, Cramer P, Schaison G, Rappaport R. Leydig cell function in children after direct testicular irradiation for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1983; 309:25-8.
5. Chopp RT, Mendez R. Sexual function and hormonal abnormalities on uremic man on chronic dialysis and after renal transplantation. *Fertil Steril* 1978; 29:661-6.
6. Hayes PJ, Krishnan KR, Diver MJ, Hipkin LJ, Davis JC. Testicular endocrine function in paraplegic men. *Clin Endocrinol* 1979; 11:549-59.
7. Morley JE, Distiller LA, Sagel J, Kok SH, Kay G, Carr P et al. Hormonal changes associated with testicular atrophy and gynecomastia in patients with leprosy. *Clin Endocrinol* 1977; 6:299-303.
8. Takeda R, Ueda M. Pituitary-gonadal function in male patients with myotonic dystrophy-serum luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and testosterone levels and histological damage of the testis. *Acta Endocrinol* 1977; 84:382-9.
9. Abbasi AA, Prasad AS, Ortega J, Congco E, Oberleas D. Gonadal function abnormalities in sickle cell anemia. *Ann Intern Med* 1976; 85:601-5.
10. Glass AR, Swerdorf RS, Bray GA, Dahms WT, Atkinson RL. Low serum testosterone and sexhormone binding globulin in massively obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45:1211-9.
11. Davidson JM, Camargo CA, Smith ER. Effects of androgen on sexual behavior in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48:955-8.
12. Junkmann K. Long-acting steroids in reproduction. *Rec Prog Horm Res* 1957; 13:389-94.
13. Snyder PJ, Lawrence DA. Treatment of male hypogonadism with testosterone enanthate. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51:1335-9.
14. Santen RJ, Swerdloff RS. Clinical aspects of androgen therapy. In: Workshop conference on androgen therapy: Biologic and clinical consequences. Penn State Workshop Proceedings 1990, pp40-4.
15. Kearns WM. Testicular transplantation: Successful autoplasmic graft following accidental castration. *Ann Surg* 1941; 114:886-90.
16. Silber SJ. Transplantation of a human testis for anorchia. *Fertil Steril* 1978; 30:181-7.
17. Keilhorz U, Korbiling M, Fehrentz D, Bauer H, Hunstein W. Long-term endocrine toxicity of myeloablative treatment followed by autologous bone marrow/blood derived stem cell transplantation in patients with malignant lymphohematopoietic disorders. *Cancer* 1989; 64:641-5.
18. Sima AAF, Zhang WX, Tze WJ, Tai J, Nathaniel V. Diabetic neuropathy in STZ induced diabetic rat and effect of allogeneic islet cell transplantation. *Diabetes* 1988; 37:1129-36.
19. Lowenberg B, Dicke KA, van Bekkum DW, Dooren LJ. Quantitative aspects of fetal liver cell transplantation in animals and man. *Transplant Proc* 1976; 8:527-32.
20. Watanabe H, Gould MN, Rose DP, Clifton KH. The effect of thyrotropin(TSH) levels on follicular cluster formation from grafted monodispersed rat thyroid cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983; 173:21-6.
21. Vendeira P, Magalhaes MM, Magalhaes MC. Autotransplantation of adrenal cortex:

- A morphological and autoradiographic study. *Anat Rec* 1992;232:262-72.
22. Fox M, Boyle PF, Hammonds JC. Transplantation of interstitial cells of the testis. *Br J Urol* 1973;45:696-701.
 23. Boyle PF, Fox M, Slater D. Transplantation of interstitial cells of the testis: Effect of implant site, graft mass and ischemia. *Br J Urol* 1976;47:891-8.
 24. Tai J, Johnson HW, Tze WJ. Successful transplantation of Leydig cells in castrated inbred rats. *Transplantation* 1989;47:1087-9.
 25. 홍성준, 서동환, 이무상. 자가이식된 백서 고환조직의 테스토스테론 분비능: 이식부위 및 이식량에 따른 단기간 비교. 대한남성과학회지 1993;11:1-6.
 26. Kerr JB, Robertson DM, de Kretser DM. Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testes fractionated on percoll density gradients. *Endocrinology* 1985;116:1030-43.
 27. Van Dam JH, Teerds KJ, Rommerts FFG. Transplantation and subsequent recovery of small amounts of isolated Leydig cells. *Arch Androl* 1989;22:123-9.
 28. Sharpe RM, Cooper I. Variation in the steroidogenic responsiveness of isolated rat Leydig cells. *J Reprod Fert* 1982;65:475-81.
 29. Steinberger E. Structural consideration of the male reproductive system. In: DeGroot LJ, editor. *Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 1989;pp2123-31
 30. Rommerts FFG, van Roemburg MJA, Lindh LM. The effects of short-term culture and perfusion on LH-dependent steroidogenesis in isolated rat Leydig cells. *J Reprod Fert* 1982;65:289-97.
 31. Kaler LW, Neaves WB. Attrition of human Leydig cell population with advancing age. *Anat Rec* 1978;192:513-8.
 32. Mendis-Handagama SMLC, Risbridger GP, deKretser DM. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 1987;10:525-34.
 33. Aldred LF, Cooke BA. The deleterious effect of mechanical dissociation of rat testis on the functional activity and purification of Leydig cells using percoll gradients. *Int J Androl* 1982;5:191-5.
 34. Dehejia A, Nozu K, Catt KJ, Dufau ML. Purification of rat Leydig cells: Functional and morphological evaluation. *Ann NY Acad Sci* 1982;383:204-11.
 35. Risbridger GP, de Kretser DM. Percoll-gradient separation of Leydig cells from postnatal rat testes. *J Reprod Fert* 1986;76:331-8.
 36. Zirkin BR, Ewing LL. Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: A stereological study of cell number and ultrastructure. *Anat Rec* 1987;219:157-63.
 37. Eik-Nes KB. Testicular steroids. *Handb Physiol Sect 7, Endocrinol* 1975;5:95-115.
 38. Samuels LT, Matsumoto K. Localization of enzymes involved in testosterone biosynthesis by the mouse testis. *Endocrinology* 1974;94:55-60.
 39. Dym M, Madhwa Raj HG. Early response of the testis to anti-LH serum. *Anat Rec* 1975;181:350-3.
 40. Cooke BA, Magee-Brown R, Golding M, Dix CJ. The heterogeneity of Leydig cells from mouse and rat testes-evidence for a Leydig cell cycle. *Int J Androl* 1981;4:355-66.
 41. Bhasin S, Heber D, Peterson M, Swerdloff R. Partial isolation and characterization of testicular GnRH-like factors. *Endocrinology* 1983;112:1144-6.
 42. Aoki A, Massa EM. Early response of testicular interstitial cells to stimulation by interstitial cell stimulating hormone. *Am J Anat* 1972;134:239-62.
 43. Lording DW, de Kretser DM. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fert* 1972;29:261-9.
 44. Keeney DS, Mendis-Handagama SM, Zirkin BZ, Ewing LL. Effect of longterm deprivation of lutenizing hormone on Leydig cell volume, Leydig cell number and steroidogenic capacity of rat testis. *Endocrinology*

- 1988;123:2906-15.
45. Christensen AK, Peacock KC. Increase in Leydig cell number in testis of adult rats treated chronically with excess of human chorionic gonadotropin. *Biol Reprod* 1980; 22:383-91.
46. Swerdloff RS, Heber D. Endocrine control of testicular function from birth to puberty. In: Burger H, de Kretser D, editors. *The testis*. New York: Raven Press, 1981;p107.