

토끼에서 고환 사이질조직의 출생 후 성 성숙에 이르는 변화

태현진, 김인식

전북대학교 생체안전성연구소, 수의과대학 해부학교실

(2011년 11월 30일 접수, 2011년 12월 22일 수정접수, 2012년 1월 20일 게재승인)

간추림 : 토끼에서 출생 후부터 성 성숙에 이르는 시기까지 고환 사이질조직의 변화를 알아보기 위하여 출생 후 1, 7, 21, 35, 49, 70, 105, 147, 196 및 252일령 ($n=8$ 마리/일령)의 토끼를 이용하였다.

토끼의 고환을 2.5% glutaraldehyde를 이용하여 전신 관류고정하고 조직 처리과정을 거쳐 Epon-araldite에 포매하였다. 초박절편기를 사용하여 $1\mu\text{m}$ 로 절편한 다음 methylene blue로 염색하여 고환사이질조직을 이루고 있는 각 구조물의 일반적인 변화상과 형태계측학적인 방법을 적용하여 고환 사이질조직의 변화를 관찰하였다.

1일령의 토끼에서 고환 사이질조직은 고환실질의 66.3%를 나타내었고 성장하면서 점차적으로 감소하여 252일령에 11.8%를 나타내었다. 성숙 사이질세포는 7일령에 처음 관찰되었고 이 시기에 용적치밀도는 0.001%이었으며 성장하면서 증가하여 252일령에는 2.6%에 도달하였다. 사이질세포, 중간엽세포, 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 근육모양세포의 절대용적은 출생 후부터 252일령까지 증가하였다 ($P<0.05$). 고환조직 당 혈관내피세포, 혈관 주위세포, 근육모양세포, 성숙 사이질세포 및 중간엽세포의 총 숫자는 일령에 따라서 점진적으로 증가하였고 출생 후부터 252일령까지 성숙 사이질세포의 생성률이 중간엽세포의 생성률보다 높게 나타났다 ($P<0.05$). 중간엽세포의 평균용적은 1일령부터 70일령까지 증가하였으며 70일령에 최고치를 나타내었다. 성숙 사이질세포의 평균용적은 1, 7, 21 및 35일령에는 유의성이 없었으나 이 후 점차적으로 계속 증가하여 196일령과 252일령에는 3배 증가하였다 ($P<0.05$). 고환내 총 정자생성과 1일 정자생성은 105일령부터 252일령까지 유의성 있게 증가하였다 ($P<0.05$).

이러한 결과는 토끼에서 출생 후부터 성 성숙 시기까지 고환 사이질조직을 이루고 있는 각종 세포의 용적치밀도, 절대용적, 평균용적 및 고환내 총 숫자의 변화는 정자발생과 밀접한 연관이 있음을 확인하였다.

찾아보기 낱말 : 토끼, 고환, 사이질조직, 출생 후 변화, 형태계측

서 론

고환(testis)은 다양한 세포의 종류들로 구성된 수컷 생식기관으로서 주로 정자형성을 담당하는 곱슬정세관(semiferous tubules)과 내분비기능을 담당하는 사이질세포를 포함한 사이질조직(interstitium)으로 이루어져 있고(Russell 등 1995, Ariyaratne와 Mendis-Handagama 2000, Kim 등 2002), 사이질조직은 사이질세포(Leydig cell), 중간엽세포(mesenchymal cells), 근육모양세포(myoid cell), 림프공간(lymphatic spaces), 혈관(blood

vessels), 혈관내피세포(vascular endothelial cell) 및 혈관주위세포(pericytes)로 구성되어 있다(Ewing과 Zirkin 1983, Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Kim 등 2001, 2002)

고환을 이루고 있는 각 구성 조직의 구조적인 특징을 규명하는 방법은 광학현미경(Kerr 1988, Sanchez 등 1993, Gottreich 등 1995)과 전자현미경(Gondos 등 1973, Connell과 Christensen 1975, Gondos 등 1977, Prince 1984, Rune 등 1991)에 의한 관찰뿐만 아니라 형태계측학적인 기법을 적용하여 사이질조직을 이루고 있는 각기 다른 유형의 세포들의 형태와 기능의 상호 연관성에 관한 연구가 사담(Nistal 등 1986), 개(Zirkin 등 1980), 흰쥐(Ichihara 등 1993, Kim 등 2002), 생쥐(Blackburn 등 1973), 원숭이(Russel 등 1990, Rey 등 1996), 햄스터(Sinha-Hikim 등 1989)와 돼지(Franca 등

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.

저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.

교신저자 : 김인식(전북대학교 수의과대학 해부학교실)

전자우편 : iskim@chonbuk.ac.kr

2000) 등에서 보고되어 있다.

출생 후 성장 단계별 고환 발달에 관한 많은 연구는 주로 흰쥐(Lording과 de Krester 1972, Ewing과 Zirkin 1983, Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Ariyaratne와 Mendis-Handagama 2000)에서 보고되었으나 이들 연구와 토끼(Lipsett과 Tullner 1965, Gondos 등 1976, 1977, Castro 등 2002)에서의 연구를 살펴보면 출생 후부터 성 성숙 시기까지 성장단계별로 고환 사이질조직을 구성하고 있는 각각 세포의 절대용적, 평균세포 용적 및 고환내 총 숫자 등의 변화는 사이질세포 분화의 역학, 고환 발달정도, 정자발생과 사이질조직의 상호관계, 사이질조직의 구조와 기능의 유연관계를 이해하는데 중요하지만 포유동물류에서 이러한 연구내용은 극히 적다. 특히, 흰쥐를 포함한 기타 포유동물류에서 출생 후부터 성 성숙 시기까지 일정한 단계별로 고환 사이질조직을 이루고 있는 모든 세포유형의 양에 대한 상세한 연구 보고가 없다.

따라서 다른 실험동물에 비하여 고환 사이질조직 및 사이질세포의 구조와 기능에 관하여 명확하게 밝혀지지 않은 토끼를 대상으로 출생 후부터 성 성숙 시기(Hafez, 1973)까지 형태계측학적 방법과 일반조직학적인 방법을 적용하여 출생 후 토끼 고환에서 고환 사이질조직을 이루고 있는 각종 세포의 용적치밀도(volume density), 절대용적(absolute volume), 평균용적(average volume), 고환내 총숫자(total number per testis) 등을 확인하고 고환 발생동안 중간엽세포와 성숙사이질세포 사이의 상호연관성 이해 및 정자발생시기 등을 성장단계별로 알아보기 위하여 이 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물

전주근교 실험동물센터(Hanil Animal Laboratory Co.)에서 7~8월경에 출생 후 1일, 7일, 21일, 35일, 49일, 70일, 105일, 147일, 196일 252일령($n=8/\text{group}$)의 수컷토끼(New Zealand white)를 구입하여 사료와 물을 자유급식 시키는 조건으로 사육하면서 전북대학교 실험동물 윤리위원회의 승인을 거쳐 실험에 사용하였다.

2. 조직표본제작

고환조직을 관류고정($n=4/\text{group}$)하기 위하여 실험동물을 ketamine (1.5 mL/Kg)으로 마취한 후 체중을 측정

하고 관류고정(perfusion fixation)시 혈액이 응고하는 것을 방지하기 위하여 heparin (Sigma, 100,000 Unit) 150 IU/Kg를 배안에 주입하고 15분 후에 배안을 절개하고, 고환의 용적을 측정하기 위하여 오른 고환을 적출하여 chemical balance로 무게를 측정하였다. 이 후 원심실을 절개하여 cutdown tube를 오름대동맥에 삽입하고 오른 심방귀를 절개하여 방혈을 시킨 후 0.9% 생리식염수를 사용하여 전신의 혈관을 1~2분 동안 세척하였고 2.5% glutaraldehyde로 대체하여 약 40분 동안 관류 고정하였다. 고환의 고정 후 용적을 측정하기 위하여 고환을 적출한 후 chemical balance로 무게를 측정하고 sucrose를 사용하여 부양법(flotation method)으로 비중(specific gravity)을 측정하여 고정 후의 고환용적을 산출하였다(고환용적=고환무게/고환비중). 조직표본 제작을 위하여 고환을 2~3 mm로 세절하여 2.5% glutaraldehyde로 4°C에서 12시간 동안 고정한 후 1% osmium tetroxide로 2시간 동안 고정한 후 alcohol로 탈수하고 Epon-812로 포매하여 각 개체 당 블록 20개씩을 제작하였다(Kim 등 2001, 2002).

3. 광학현미경관찰

초박절편기(ultramicrotome, Leica ultracut-s, Austria)를 이용하여 1 μm 로 절편을 제작하고 1% methylene blue-azure II로 염색, canada balsam으로 봉입하여 고환 사이질조직을 구성하고 있는 사이질세포, 중간엽세포, 림프공간, 혈관, 혈관주위세포, 혈관내피세포 및 근육모양세포를 광학현미경(Leica, DMRBE, Germany)에서 관찰하고 사진을 촬영하였다.

4. 형태계측(Morphometry)

1) 고환 사이질조직 구성물의 용적치밀도

(volume density; volume per unit volume):

Point Counting (Weibel 1969, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2001, 2002) 법을 적용, 121 point ocular grid를 장착한 광학현미경을 이용하여 point와 만나는 각 구조물(사이질세포, 혈관, 중간엽세포, 근육모양세포, 혈관내피세포, 혈관주위세포 및 림프공간)의 수를 네 모서리와 가운데, 즉 5부위를 측정하였으며 각 개체 당 최소 50부위에서 최대 100부위를 중복되지 않게 측정하였다. 이것을 전체 point (121×5)로 나누어 각 고환사이질조직 구조물의 용적치밀도(Vv%)를 구하였다.

Vv% of a component

$$= \frac{\text{number of points on the component} \times 100}{\text{total number of points on the testis tissue}}$$

2) 고환 사이질조직 구성물의 절대용적 (absolute volume) 용적치밀도 (volume density)와 고환용적 (fresh testis volume)을 이용해서 절대용적 (absolute volume)을 다음과 같은 공식에 의해서 구하였다 (Mori와 Christensen 1980, Mendis-Handagama 등 1987, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2001, 2002)

Absolute volume of testicular component

$$= \text{volume density of the component} \times \text{fresh testis volume}$$

3) 고환 단위용적 당 세포의 수 (numerical density;

Nv, defined as the number of cells per unit volume of testis)

Floderus (1944) 방정식 ($Nv = Na / (T + D - 2h) \times (1 - S_T)$)을 적용하여 numerical density를 계산하였다. 이 공식에서 Na는 단위면적 당 각 세포핵의 숫자 (단위면적 = $48520.8 \mu\text{m}^2$), D는 평균 핵 직경, T는 평균 절편 두께, S_T (total shrinkage = histologic correction factor)는 총 고환조직의 고정 전, 고정 후, 표본제작 후의 총 수축량, h는 가장 작다고 생각되는 핵의 높이이며 이는 보통 평균 핵 직경의 10% 정도이다 (Mori와 Christensen, 1980, Wing과 Christensen 1982). 단위면적 당 각 세포핵의 숫자와 핵의 크기는 조직 표본에서 5부위를 중복되지 않도록 선택하여 영상분석기 (image analyzer system, Leica Q500MC, Germany)를 이용하여 측정하였다. 고환 당 각 세포의 총 숫자 (total number)는 단위 용적 당 세포의 수에 각 고환의 용적을 곱하여 구하였다 (total number = numerical density \times fresh testis volume) (Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2001, 2002)

4) 사이질조직내 각 세포의 평균 용적 (average volume)

사이질세포를 포함한 각 세포의 평균용적 (average volume)은 용적치밀도 (volume density)를 단위용적 당 세포의 수 (numerical density)로 나누어 구하였다 (Mendis-Handagama 등 1987, 1988, Mendis-Handagama와 Ewing 1990, Kim 등 2001, 2002).

Average cell volume

$$= \text{volume density} / \text{numerical density of each cell type}$$

5. 정자생성 (sperm production)

조직표본에서 정자가 관찰되기 시작하는 105일령부터 왼쪽 고환을 적출하고 무게를 측정 후 백색막 (tunica albuginea)을 제거하고 0.05% Triton X-100과 0.25 M thimerosal (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)이 혼합된 50 mL 0.9% 생리식염수에서 homogenizer를 이용하여 2분간 균질화시켰다 (Amann과 Lambiase 1969; Amann 1970). 균질화시킬 때 토끼 곱슬정세관의 stage VI ~ VIII인 정자세포는 파괴되지 않고 남아있다 (Amann 1969). 정자생성은 이 용액 0.2 mL을 4% trypan blue가 혼합된 0.8 mL 생리식염수에 희석하여 10 μL 를 혈구계 (hemocytometer)를 사용하여 광학현미경하에서 평균 5회 측정하였다. 이러한 방법으로 얻어진 수치에서 고환 조직 당 총 정자수를 계산하였다. 1일정자생성 (daily sperm production)은 총 정자수를 stage VI ~ VIII의 평균 생존기간인 3.43으로 나누어 구하였다 (Amann 1970).

6. 곱슬정세관의 직경 측정 (average diameter of seminiferous tubules)

곱슬정세관의 직경은 일령에 따라서 10~20개 원형의 정세관을 택하여 image analyzer (Leica, Germany)을 이용하여 측정하였다.

7. 통계처리

본 실험에서 얻어진 자료에 대한 통계학적 유의성은 SAS package의 General Linear Model (GLM) Procedure (SAS Ver. 6.12, SAS Institute, 1998)를 ANOVA로 통계처리 후 유의성은 Duncan's multiple range test에 의하여 검정하였으며 $P < 0.05$ 이하의 유의성을 통계학적 차이로 인정하였다.

결 과

1. 토끼 고환조직의 광학현미경적 관찰

출생 후 1일령의 토끼 고환 사이질조직은 세포질이 적고 방추형의 핵을 갖고 있는 중간엽세포 (짧은 화살표)들로 주로 구성되어 있었고 이 세포는 곱슬정세관 주위에 동심원적으로 배열되어 있었으며 혈관과 혈관 사이에 극히 적은 수의 태아시기에 존재하는 태아 사이질세포 (긴 화살표), 곱슬정세관 주위에 있는 근육모양세포, 혈관과 림프공간을 덮고 있는 혈관내피세포 및

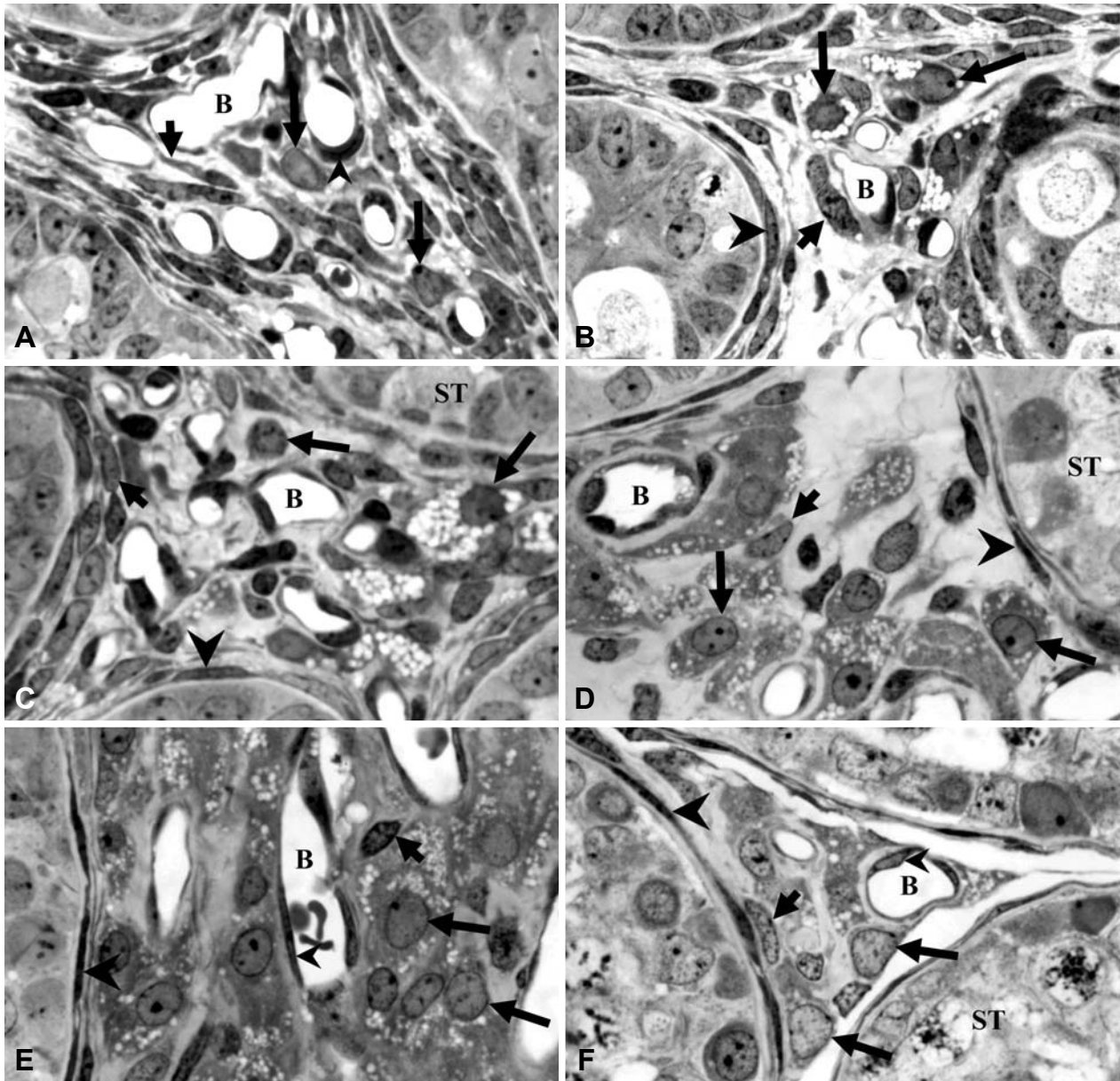


Fig. 1. Representative light micrographs showing the testis of rabbits at postnatal ages 1 (A), 14 (B), 35 (C), 105 (D), 196 (E), and 252 (F) days. All figures were of the same magnification ($\times 1,000$, methylene blue-azure II stain). ST, Seminiferous tubules; B, Blood vessel; Long arrows, Leydig cells; Small arrows, mesenchymal cells; Large arrow heads, myoid cells; Small arrow heads, pericytes.

초승달 모양인 혈관주위세포(작은 화살표 머리)가 관찰되었다(Fig. 1A).

출생 후 14일령 토끼의 고환 사이질조직은 중간엽세포(짧은 화살표), 세포질에 많은 수의 지방방울을 함유하고 있는 발달이 미숙한 성숙사이질세포(immature adult Leydig cells)(긴 화살표)가 소수 관찰되기 시작하였고 그 이외의 세포형태는 1일령과 유사하였다(Fig. 1B).

출생 후 35일령 토끼의 고환 사이질조직은 14일령의 고환에 비하여 중간엽세포(짧은 화살표)의 크기가 증가되어 있고 부분적으로 분화되고 있는 세포(긴 화살표)의 수가 증가되어 있었고 이 세포는 중간엽세포에 비하여 핵의 외형이 난원형 또는 방추형으로 보다 규칙적이며 또한 세포질과 핵의 비율이 증가되어 있으며 세포질에 많은 수의 지방방울(lipid droplets)을 함유하고 있고 혈관주위에 주로 자리하고 있었다. 곱슬정세관

Table 1. Changes in testis weight, sperm production, daily sperm production, and diameter of seminiferous tubules in the postnatal rabbits from birth to 252 days of age (mean \pm SEM)*

Parameter	Days after birth (n=8/group)									
	1	7	21	35	49	70	105	147	196	252
Testis volume (cm ³)	0.0073 (0.004) ^a	0.016 (0.002) ^b	0.037 (0.002) ^c	0.049 (0.001) ^d	0.28 (0.01) ^e	1.34 (0.03) ^f	2.15 (0.05) ^g	2.88 (0.2) ^h	3.46 (0.05) ⁱ	3.93 (0.3) ^j
Diameter of seminiferous tubule (μ m)	34.7 (5.6) ^a	47.5 (5.3) ^a	61.5 (9.6) ^b	64.7 (8.4) ^b	133.2 (17.4) ^c	158.1 (16.4) ^d	192.5 (27.4) ^e	224.7 (22.5) ^e	227.4 (37.4) ^e	254.2 (19.4) ^e
Sperm production ($\times 10^6$)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	45.3 (7.4) ^a	120.3 (19.5) ^b	167.1 (34.5) ^c	366.2 (58.4) ^d
Daily sperm production ($\times 10^6$)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13.2 (2.3) ^a	35.1 (5.4) ^b	48.7 (7.8) ^c	106.7 (9.4) ^d

*In each row, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).
ND: not detected.

주위에 방추형의 핵을 갖고 있는 근육모양세포(큰 화살표 머리)가 치밀하게 배열되어 있고 혈관주위세포와 혈관내피세포(짧은 화살표 머리)는 14일령과 변화가 없었다(Fig. 1C).

출생 후 70일령 토끼의 고환 사이질조직은 혈관 주위에 원형의 핵과 많은 부피를 차지하고 있는 세포질을 갖고 있는 성숙 사이질세포(adult Leydig cell, 긴 화살표)가 주로 관찰되었고 이 세포는 이웃하여 위치하고 있었다. 중간엽세포(짧은 화살표)는 미분화된 상태로 남아있어 분화중인 중간엽세포는 관찰되지 않았고 근육모양세포(큰 화살표 머리), 혈관(B), 혈관주위세포(작은 화살표 머리), 혈관내피세포의 변화는 없었다(Fig. 1D).

출생 후 196 및 252일령 토끼의 고환 사이질조직의 대부분은 주로 완전히 발달한 성숙사이질세포(긴 화살표)가 전반적으로 고르게 분포되어 있었고 중간엽세포(짧은 화살표)는 미분화된 상태로 남아 있으며 근육모양세포(큰 화살표 머리), 혈관(B) 및 혈관내피세포(작은 화살표 머리)가 관찰되었다(Fig. 1E, F).

2. 고환용적과 곱슬정세관의 직경

토끼의 고환용적은 출생 1일령과 252일령에 각각 0.0073 cm³과 3.93 cm³이었으며 일령에 따라 유의성($P < 0.05$) 있게 증가하였다(Table 1). 곱슬정세관의 직경은 정자가 관찰되기 직전인 49일령부터 급격하게 증가하여 105일령부터 252일령까지 높게 유지되었다(Table 1).

3. 고환내 총정자생성과 1일 정자생성

토끼에서 정자가 발생하는 시기는 105일령이었다. 고

환내 정자생성은 105일령, 147일령, 196일령과 252일령에서 각각 45.3×10^6 , 120.3×10^6 , 167.1×10^6 과 366.2×10^6 으로 이 시기에는 일령이 증가함에 따라서 유의성 있게 ($P < 0.05$) 증가하였다. 고환내 정자생성을 elongated spermatids의 평균생존 기간인 3.43으로 나눈 고환내 일일 정자생성은 105일령, 147일령, 196일령과 252일령에서 각각 13.2×10^6 , 35.1×10^6 , 48.7×10^6 과 106.7×10^6 으로 유의성 있게 ($P < 0.05$) 증가하였다(Table 1).

4. 고환조직 구성물의 용적치밀도

고환조직을 이루고 있는 각종 구성물에 대한 용적치밀도는 Table 2에 나타나 있다. 곱슬정세관의 용적치밀도는 출생 후 1일령에 33.7%로 관찰되었고 점차적으로 증가하였으며 곱슬정세관에 정자가 관찰되기 직전 시기인 70일령에 급격하게 증가하여 79.4%를 나타낸 후 252일령에는 88.2%로 관찰되었다. 사이질조직의 용적치밀도는 1일령에 66.3%이었으며 출생 후 성장과정 동안 점진적으로 감소하여 252일령에는 11.8%이었다. 혈관, 혈관내피세포 및 혈관주위세포에 대한 용적치밀도는 일령에 따라서 많은 차이를 나타내었고 1일령과 252일령에 각각 1.9%와 1.7%, 0.5%와 0.5%, 0.4%와 0.04%이었다. 림프공간에 대한 용적치밀도는 1일령에 45.1%로 나타났고 점차 감소되어 252일령에 4.6%를 나타내었다. 중간엽세포의 용적치밀도는 1일령부터 35일령까지는 유의성이 없었으나 49일령부터 유의성 있게 감소되었고 ($P < 0.05$) 105일령부터 252일령까지는 낮은 수치로 관찰되었다($P > 0.05$). 근육모양세포의 용적치밀도는 일령에 따라서 많은 차이를 나타내었고 사

Table 2. Volume density (v : v%) of testicular components in postnatal rabbits from birth to 252 days of age (mean \pm SEM)*

Parameter	Days after birth (n=8/group)									
	1	7	21	35	49	70	105	147	196	252
Seminiferous tubule	33.7 (2.7) ^a	36.7 (1.6) ^a	39.3 (3.2) ^{ab}	47.9 (1.9) ^b	60.3 (2.3) ^c	79.4 (1.1) ^d	84.4 (0.8) ^e	86.2 (2.1) ^e	87.8 (3.2) ^e	88.2 (3.1) ^e
Interstitial	66.3 (2.7) ^a	63.3 (2.8) ^{abc}	60.7 (5.1) ^c	52.1 (3.4) ^d	37.65 (2.4) ^e	20.6 (1.3) ^f	15.6 (1.2) ^g	13.8 (0.9) ^{gh}	12.2 (1.1) ^{gh}	11.8 (1.7) ^{gh}
Blood vessels	1.9 (0.2) ^a	1.3 (0.2) ^{ab}	0.9 (0.04) ^b	1.5 (0.1) ^{ab}	1.7 (0.2) ^a	1.8 (0.1) ^a	1.4 (0.2) ^{ab}	1.4 (0.2) ^{ab}	1.8 (0.2) ^a	1.7 (0.2) ^a
Lymphatic spaces	45.1 (3.2) ^a	42.3 (2.8) ^{ab}	39.6 (1.7) ^b	33.4 (2.4) ^c	24.1 (1.1) ^d	11.9 (0.4) ^e	9.7 (0.3) ^{ef}	7.5 (0.2) ^f	5.9 (0.5) ^g	4.6 (0.2) ^g
Mesenchymal cells	15.6 (1.4) ^a	14.8 (0.6) ^a	16.6 (1.2) ^a	14.3 (1.9) ^a	8.9 (0.8) ^b	3.7 (0.2) ^c	1.5 (0.3) ^d	1.6 (0.3) ^d	1.2 (0.2) ^d	1.3 (0.1) ^d
Endothelial cells	0.5 (0.06) ^a	0.4 (0.05) ^{ab}	0.3 (0.03) ^{cd}	0.2 (0.01) ^d	0.2 (0.02) ^d	0.3 (0.03) ^{cd}	0.3 (0.05) ^{cd}	0.4 (0.07) ^{bc}	0.4 (0.04) ^{bc}	0.5 (0.04) ^{ab}
Pericytes	0.4 (0.04) ^a	0.4 (0.05) ^a	0.2 (0.03) ^b	0.2 (0.04) ^b	0.2 (0.07) ^b	0.06 (0.01) ^{bc}	0.07 (0.02) ^c	0.05 (0.02) ^c	0.04 (0.01) ^c	0.04 (0.01) ^c
Myoid cells	2.9 (0.2) ^b	4.1 (0.3) ^a	2.9 (0.1) ^b	1.9 (0.2) ^c	1.7 (0.1) ^c	1.1 (0.2) ^{cd}	0.9 (0.1) ^d	0.6 (0.06) ^e	0.5 (0.03) ^e	1.1 (0.1) ^{cd}
Leydig cells	0.006 (0.0001) ^b	0.001 (0.0001) ^a	0.2 (0.01) ^c	0.6 (0.03) ^d	1.1 (0.1) ^e	1.8 (0.3) ^f	2.1 (0.2) ^f	2.3 (0.1) ^f	2.4 (0.4) ^f	2.6 (0.2) ^f

*In each row, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)**Table 3.** Absolute volume (mm³) of testicular components in postnatal rabbits from birth to 252 days of age (mean \pm SEM)*

Parameter	Days after birth (n=8/group)									
	1	7	21	35	49	70	105	147	196	252
Seminiferous tubule	2.5 (0.08) ^a	4.4 (0.3) ^b	12.2 (2.1) ^c	21.6 (2.3) ^d	169 (11.3) ^e	984.6 (25.7) ^f	1781.7 (48.3) ^g	2430.8 (39.6) ^h	3125.6 (69.5) ⁱ	3466.3 (84.3) ^j
Interstitial	4.8 (0.2) ^a	7.6 (1.9) ^b	18.82 (3.0) ^c	23.5 (3.4) ^d	105.4 (6.4) ^e	255.4 (13.3) ^f	328.3 (19.2) ^g	389.2 (10.9) ^g	434.3 (29.0) ^{gh}	463.7 (26.7) ^h
Blood vessels	0.1 (0.01) ^a	0.2 (0.01) ^a	0.3 (0.02) ^b	0.7 (0.01) ^c	4.7 (0.2) ^d	22.4 (2.2) ^e	29.3 (3.5) ^e	38.4 (3.4) ^f	62.7 (5.4) ^g	64.9 (4.3) ^g
Lymphatic spaces	3.3 (0.2) ^a	5.1 (0.2) ^b	12.3 (0.2) ^c	15.0 (1.6) ^c	67.3 (4.3) ^d	147.2 (10.9) ^e	197.5 (12.0) ^{ef}	212.6 (16.7) ^f	211.5 (15.3) ^f	182.0 (12.4) ^f
Mesenchymal cells	1.1 (0.07) ^a	1.8 (0.09) ^a	5.2 (1.6) ^b	6.4 (1.1) ^b	25.0 (4.5) ^c	45.3 (3.6) ^e	32.5 (2.6) ^d	44.84 (5.4) ^e	42.4 (6.0) ^e	50.0 (4.4) ^e
Endothelial cells	0.04 (0.01) ^a	0.05 (0.02) ^a	0.09 (0.02) ^a	0.09 (0.03) ^a	0.5 (0.07) ^b	3.5 (0.2) ^c	5.5 (0.3) ^c	10.2 (2.5) ^d	13.5 (1.6) ^d	18.1 (2.2) ^e
Pericytes	0.03 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.07 (0.02) ^a	0.08 (0.01) ^a	0.5 (0.03) ^b	0.7 (0.02) ^b	1.5 (0.08) ^c	1.4 (0.04) ^c	1.4 (0.02) ^c	1.6 (0.03) ^c
Myoid cells	0.2 (0.04) ^a	0.5 (0.03) ^a	0.9 (0.04) ^a	0.9 (0.1) ^a	4.9 (0.5) ^b	13.9 (1.0) ^c	17.7 (2.5) ^c	16.4 (2.3) ^c	17.1 (1.9) ^c	44.4 (3.2) ^d
Leydig cells	0.0012 (0.0001) ^b	0.0043 (0.0001) ^a	0.062 (0.01) ^c	0.25 (0.01) ^d	2.66 (0.3) ^e	22.44 (1.7) ^f	44.3 (3.0) ^g	65.42 (3.0) ^h	85.79 (2.4) ⁱ	102.9 (2.8) ^j

* In each row, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

이질세포의 용적치밀도는 1일령에 0.006%이었으나 49 일령까지 유의성 있게 증가하여 70일령에는 1.8%를 나타내었고 이후 252일령까지 유의성이 관찰되지 않았다 (Table 2).

Table 4. Total number (10^6 cells/testis) of different cells in the interstitium of the testis in the postnatal rabbit from birth to 252 days of age (mean \pm SEM)*

Cell type	Days after birth (n=8/group)									
	1	7	21	35	49	70	105	147	196	252
Mesenchymal cells	1.7 (0.02) ^a	2.1 (0.3) ^a	5.3 (0.3) ^b	7.6 (1.2) ^b	12.4 (1.1) ^c	15.6 (2.4) ^{cd}	20.3 (1.4) ^d	24.3 (3.7) ^d	35.3 (3.2) ^e	40.2 (2.6) ^e
Myoid cells	0.3 (0.01) ^a	1.1 (0.09) ^a	3.3 (0.2) ^b	4.2 (0.2) ^b	7.8 (0.5) ^c	9.4 (0.3) ^c	11.2 (0.7) ^{cd}	14.8 (1.8) ^{de}	16.5 (1.4) ^{ef}	21.2 (1.6) ^f
Endothelial cells	0.04 (0.01) ^a	0.09 (0.02) ^a	0.4 (0.02) ^a	1.5 (0.03) ^a	3.2 (0.07) ^b	3.8 (0.2) ^c	4.5 (0.3) ^c	7.2 (2.5) ^d	12.5 (1.6) ^d	16.1 (2.2) ^e
Pericytes	0.03 (0.01) ^a	0.07 (0.02) ^a	0.2 (0.02) ^b	0.5 (0.02) ^c	1.4 (0.2) ^d	2.3 (0.2) ^e	2.8 (0.1) ^{ef}	3.5 (0.2) ^{fg}	4.0 (0.3) ^{gh}	4.9 (0.3) ^h
Leydig cells	0.002 (0.001) ^a	0.004 (0.001) ^b	0.08 (0.02) ^c	0.3 (0.1) ^d	2.1 (0.3) ^e	13.36 (2.7) ^f	23.3 (3.0) ^g	36.2 (4.5) ^h	41.2 (6.5) ⁱ	50.5 (8.3) ^j

*In each row, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

5. 고환조직 구성물의 절대용적

고환조직을 이루고 있는 각종 구성물에 대한 용적치 밀도에 고환용적을 곱하여 얻어진 각각의 구성물에 대한 절대용적은 Table 3에 표시되어 있다. 곱슬정세관과 사이질조직의 절대용적은 1일령에 각각 2.5 mm^3 , 4.8 mm^3 이었으나 일령이 증가함에 따라서 이 수치가 유의성 있게 증가하여 252일령에 각각 3466.3 mm^3 , 463.7 mm^3 이었다. 1일령에 각각의 구조물에 대한 절대용적은 혈관(0.1 mm^3), 림프공간(3.3 mm^3), 중간엽세포(1.1 mm^3), 혈관내피세포(0.04 mm^3), 혈관주위세포(0.03 mm^3), 근육모양세포(0.2 mm^3)이었으며 일령의 증가와 더불어 252일령까지 점진적 또는 급격하게 증가하였다. 사이질세포의 절대용적은 1일령에 0.0012 mm^3 이었으며 일령이 증가함에 따라서 유의성 있게 ($P < 0.05$) 증가하였다 (Table 3).

6. 고환조직 당 사이질조직내 각 세포의 총 숫자

고환 단위용적 당 세포 수에 고환용적을 곱하여 얻어진 고환조직 당 각 세포의 총 숫자에 대한 결과는 Table 4와 같다. 근육모양세포의 고환내 총 숫자는 1일령에 0.3×10^6 이었고 점차 증가하여 252일령에 21.2×10^6 이었다. 1일령에 혈관내피세포의 총 숫자는 0.04×10^6 , 혈관주위세포는 0.03×10^6 이었으며 이들 세포 숫자의 변화 양상은 근육모양세포의 변화 추이와 유사하였다. 중간엽세포와 사이질세포의 숫자는 1일령에 각각 1.7×10^6 , 0.002×10^6 이었으며 중간엽세포는 유의성이 관찰되지 않는 일령이 있는 반면에 사이질세포는 전 일령에

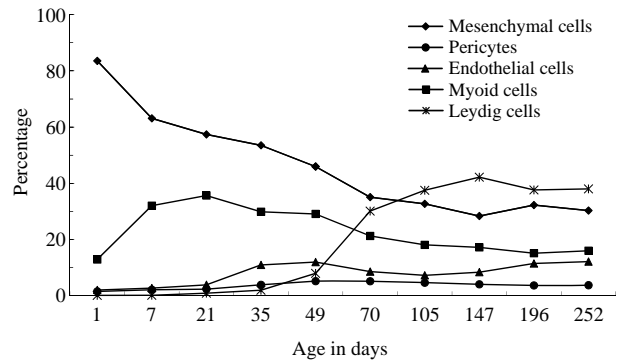


Fig. 2. Numbers of different cells in the interstitium of the testis as a percentage of the total cell number in the interstitium of the testis in postnatal rabbits from birth to 252 days of age.

걸쳐서 유의성 있는 결과를 관찰하였다. 중간엽세포와 사이질세포의 총 숫자의 증가 추이를 관찰한 결과 사이질세포의 증가의 폭이 훨씬 크게 관찰되었다 (Table 4). 고환조직 당 총 사이질조직세포의 숫자에서 각각 세포 유형이 차지하고 있는 숫자를 퍼센트로 나타낸 결과 중간엽세포의 총 숫자가 차지하고 있는 비율은 1일령부터 147일령까지 점진적으로 감소한 후 큰 변화가 없었다. 이와는 달리 사이질세포의 숫자가 차지하고 있는 비율은 35일령부터 147일령까지 점진적으로 증가한 후 196일령과 252일령에서는 변화가 없었다. 근육모양세포 총 숫자비율은 중간엽세포의 양상과 유사하였으며 혈관주위세포와 혈관내피세포가 차지하고 있는 총 숫자 비율은 낮게 유지되었고 일령에 따라서 변화하지 않았다 (Fig. 2).

Table 5. Average volume (μm^3) of mesenchymal and Leydig cells in the postnatal rabbit testis (mean \pm SEM)*

Cell type	Days after birth (n=8/group)									
	1	7	21	35	49	70	105	147	196	252
Mesenchymal cells	610 (35) ^a	674 (65) ^a	691 (17) ^a	756 (53) ^a	848 (23) ^{cd}	951 (49) ^d	716 (59) ^{ab}	796 (62) ^b	679 (69) ^a	753 (28) ^{ab}
Leydig cells	706 (32) ^a	722 (29) ^a	795 (53) ^a	925 (93) ^a	1,248 (68) ^b	1,679 (159) ^c	1,899 (116) ^{cd}	1,807 (136) ^{cd}	2,080 (153) ^d	2,038 (183) ^d

*In each row, values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$)

7. 중간엽세포와 사이질세포의 평균용적

중간엽세포의 평균세포 용적은 1일령부터 35일령까지 낮게 유지되었고 49일령과 70일령에만 약간 증가한 후 낮게 유지되었다(Table 5). 사이질세포의 평균용적은 1일령부터 21일령까지는 유의성이 없이 낮게 관찰되었고 ($P > 0.05$), 35일령부터 유의성 있게 증가하기 시작하여 252일령에서는 $2,038 \mu\text{m}^3$ 이었다 ($P < 0.05$) (Table 5).

고찰

고환을 구성하고 있는 곱슬정세관과 사이질조직에 관한 형태계측학적인 연구는 흰쥐 (Wing과 Christensen 1982, Ariyaratne와 Mendis-Handagama 2000), 생쥐 (Vergouwen 등 1993), 햄스터 (Sinha-Hikim 등 1989), 기니픽 (Mendis-Handagama 등 1988), 말 (Johnson과 Neaves 1981), 돼지 (Franca 등 2000), 토끼 (Castro 등 2002), 낙타 (Zayed 등 1995) 및 당나귀 (Neves 등 2002) 등 각종 동물에서 폭넓게 연구되었으나 본 연구에서 실험 대상으로 한 토끼 고환의 곱슬정세관, 혈관, 중간엽세포와 사이질세포를 비롯한 주요세포의 용적치밀도와 절대용적, 중간엽세포, 혈관주위세포, 근육모양세포, 사이질세포 및 혈관내피세포의 고환내 총 숫자, 중간엽세포와 사이질세포의 평균용적에 관한 결과는 처음이며, 이러한 결과는 출생 후 짧은 기간에 정자발생이 이루어지는 흰쥐, 생쥐와는 여러 가지 차이를 나타내었으며 특히, 사이질세포의 형태계측학적인 결과가 다른 동물과 많은 차이가 있음을 알 수 있었고 비교해부학적인 면에서 향후 고환의 형태 및 기능과 관련된 각종 연구에 기초자료로 활용할 수 있는 결과로 생각된다.

토끼 (Gondos 등 1976, 1977)와 사람 (Nistal 등 1986)에서 출생 후 사이질세포의 발생에 관한 연구에서 태아사이질세포 (fetal Leydig cells), 1주령부터 6주령에서 관찰되는 부분적으로 분화된 세포 (partially differentiated cells) 및 완전히 분화된 사이질세포 (fully differenti-

ated Leydig cells)라는 용어로 기술되고 있으나 이들 세포의 형태를 비교해 보면 부분적으로 분화된 세포도 지방방울의 크기와 핵의 형태에 있어서 약간의 차이만을 뿐 성숙사이질세포와 유사하기 때문에 최근에 흰쥐 (Ariyaratne와 Mendis-Handagama 2000, Mendis-Handagama와 Ariyaratne 2001)와 원숭이 (Rey 등 1996)에서 적용하고 있는 것과 같이 partially differentiated cells은 immature adult Leydig cells로, fully differentiated Leydig cells은 mature adult Leydig cells로 바꾸어 사용하는 것이 더 적절하다고 생각되며, 본 연구에서도 흰쥐에서 적용되고 있는 용어를 채택하여 발달이 미숙한 성숙사이질세포 (immature adult Leydig cells)와 완전히 발달된 성숙사이질세포 (mature adult Leydig cells)로 구분하여 다른 연구와 비교하여 고찰하였고 형태계측에서는 두 유형을 구분하지 않고 성숙사이질세포로 간주하였다.

흰쥐에서 고환조직 당 혈관이 차지하고 있는 절대용적은 일령에 따라서 증가한다 (Ichihara 등 1993, Mendis-Handagama와 Gelber 1995). 그러나 3개월령의 흰쥐에서는 혈관의 내강이 100% 완전히 열려 있으나 6개월령부터 혈관 벽의 두께 증가로 인하여 혈관의 내강이 부분적으로 폐쇄되고 (71%) 사이질세포의 평균부피 감소 및 테스토스테론 분비능 감소 등이 관찰되어 흰쥐에서 6개월령부터 노화가 관찰된다고 처음으로 보고하였다 (Mendis-Handagama와 Gelber 1995). 본 연구에서는 252일령 (9개월)까지 혈관의 절대용적은 증가하였으나 내강이 폐쇄된 혈관은 관찰되지 않았고 사이질세포의 형태계측결과 노화가 관찰되지 않았다. 따라서 이러한 결과의 차이에 비추어 보아 토끼는 흰쥐에 비하여 노화가 늦게 나타남을 알 수 있었다.

성숙 사이질세포 숫자의 증가는 사이질세포 자체의 세포분열과 중간엽세포의 분화에 기인하는 것으로 알려져 왔으나 사이질세포 자체의 세포분열 빈도가 희박한 것으로 밝혀져 최근에는 일반적으로 사이질세포는 중간엽세포로부터 분화되는 것으로 받아들여지고 있다 (Gondos 1977, Kerr 1988, Ariyaratne와 Mendis-Handa-

gama 2001). 토끼에서 1주령부터 14주령까지 성 성숙 이전까지의 고환 사이질세포의 분화에 관한 연구에 의하면 5~7주령의 고환 사이질조직에는 많은 세포분열이 관찰되고 이후에는 세포분열률이 감소함에도 사이질세포의 상대 숫자는 증가하였다. 사이질세포 숫자의 증가는 7~10주령 사이에 중간엽세포 숫자의 감소와 밀접한 관련이 있음을 근거하여 토끼 고환 사이질세포는 중간엽세포로부터 분화되는 것으로 보고하였다 (Gondos 등 1976, 1977). 그러나 이 연구는 사이질조직에는 많은 종류의 세포가 존재하고 있으나 단순하게 중간엽세포와 사이질세포의 상대 숫자만을 측정하여 다른 종류의 세포 숫자의 변화와 연관성을 찾을 수 없다. 본 연구에서는 최근에 고환에서 흔히 적용하고 있는 형태계측학적인 기법을 적용하여 사이질조직을 구성하고 있는 중간엽세포, 근육모양세포, 혈관내피세포, 혈관주위세포, 사이질세포의 총 숫자를 측정한 다음 각각의 세포가 차지하고 있는 숫자의 비율을 관찰한 결과 출생 후부터 252일령까지 혈관내피세포, 혈관주위세포, 근육모양세포가 차지하고 있는 비율은 변화가 없었다. 그러나 중간엽세포는 전체 고환 사이질조직중에서 1일령에 83%를 차지하고 있었고 점진적으로 감소하여 252일령에 39%를 차지하고 있는 반면에 사이질세포는 1일령에 0.001%를 차지하다가 49일령부터 급격히 증가하기 시작하여 252일령에는 45%를 차지하고 있었다. 이러한 결과를 비교할 때 본 연구가 Gondos 등(1976, 1977)의 보고보다 더 신뢰할 수 있으며 토끼 사이질조직의 각 세포 숫자의 변화 양상을 통해 사이질세포가 중간엽세포에서 분화된다는 증거를 좀 더 구체적으로 제시하였다.

토끼에서 정자발생은 7~8주 사이에 시작되고 (Gondos 등 1973), 16~28주 사이에 성 성숙 (puberty)이 이루어진다 (Hafez 1973). 본 실험에서 정조세포 (spermatogonia)가 정모세포 (spermatocytes)로 분화되기 시작하는 정자발생의 개시는 10주에서 관찰되었고 이 시기에 고환내에는 많은 완전히 발달한 성숙 사이질세포가 관찰되었다. 이러한 사실은 사이질세포에서 분비되는 테스토스테론이 정자발생의 개시에서 중요한 기능이 있음을 알 수 있었다. 또한 15주부터 고환내 정자가 관찰되기 시작하여 일령이 증가함에 따라서 증가되어 36주령에는 최고치를 나타내어 366×10^6 이었다. 따라서 토끼에서 성 성숙은 15주령부터 시작되어서 36주령까지 계속됨을 확인하였고 수컷을 번식용으로 이용할 때에는 20주령 이상의 건강한 개체를 이용하여야 만이 양호한 수정 능력을 획득할 것으로 생각된다.

출생 후 고환 발달동안 전구세포는 사이질조직을 이

루고 있는 세포 중에서 긴방추형의 세포 (elongated spindle-shaped cells)가 사이질세포의 전구세포 (precursor)로 알려져 있다 (Mendis-Handagama 등 1987, Kerr와 Knell 1988, Ariyaratne와 Mendis-Handagama 2000). 그러나 사이질조직에서 근육모양세포, 혈관내피세포, 중간엽세포 및 혈관주위세포 등이 모두 이러한 형태를 갖고 있기 때문에 방추형의 세포가 사이질세포의 전구세포라는 보고에 대하여 견해 차이를 나타내고 있다. 본 연구에서는 토끼 고환 사이질조직에서 관찰되는 모든 방추형의 세포의 숫자가 일령에 따라서 계속적으로 증가하였으며 이러한 결과는 일령이 증가함에 따라서 고환용적의 증가와 고환 사이질조직의 확장에 부합되기 위하여 방추형의 세포 숫자와 용적의 증가가 필요하기 때문에 합리적인 결과로 생각된다.

고환 사이질조직에서 방추형 세포 숫자의 일령에 따른 변화 양상은 김과 양(1999) 및 Ari와 Mendis-Handagama (2000)와의 결과와는 일치하였으나 Hardy 등 (1989)의 결과와는 중간엽세포를 제외한 기타 세포 숫자의 변화는 일치하였다. 본 연구와 Ari와 Mendis-Handagama (2000)의 결과에 의하면 중간엽세포의 숫자는 출생 후부터 성 성숙 시기까지 계속적으로 증가하였으나 Hardy (1989) 등의 결과는 4주부터 8주까지 고환조직 당 중간엽세포의 숫자가 50% 감소를 나타내었다. 더욱이 Hardy (1989) 등은 사이질세포와 중간엽세포의 상대적인 숫자의 비율에 근거하여 고환 발달 동안 중간엽세포는 감소하고 사이질세포는 증가함을 제시하였다. 그러나 이와 달리 본 연구결과에서 나타난 고환조직 당 절대적인 세포 수 관찰에 근거해 볼 때 본 연구에서는 중간엽세포와 사이질세포 모두가 일령에 따라서 점진적으로 증가하였으며 사이질세포 숫자의 증가 폭이 중간엽세포의 증가 폭보다 크게 나타났다.

결론적으로, 토끼에서 출생 후 고환 사이질조직을 이루고 있는 각종 세포의 용적치밀도, 절대용적, 평균용적, 고환내 총 숫자의 변화는 정자발생과 밀접한 연관이 있음을 확인하였고 특히, 중간엽세포는 일령에 따라서 지속적으로 증가하여 고환 발달에 관여하는 중요한 세포로 여겨지며 사이질세포가 중간엽세포에서 분화된다는 증거를 좀 더 구체적으로 제시하였다.

참 고 문 헌

Amann RP : The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production

- as sperm output. *Fertil Steril* 21: 662-672, 1970.
- Amann RP, Lambiase JT : The male rabbit. III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J Anim Sci* 28: 369-374, 1969.
- Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC : Changes in the testis interstitium Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62: 680-690, 2000.
- Blackburn WR, Chung KW, Bullock L, Bardin CW : Testicular feminization in the mouse: Studies of Leydig cell structure and function. *Biol Reprod* 9: 9-23, 1973.
- Castro AC, Berndtson WE, Cardoso FM : Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz J Med Biol Res* 35: 493-498, 2002.
- Connell CJ, Christensen AK : The ultrastructure of the canine testicular interstitial tissue. *Biol Reprod* 12: 368-382, 1975.
- Ewing LL, Zirkin BR : Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res* 39: 599-632, 1983.
- Floderus S : Untersuchungen über den Bau der menschlichen Hypophyse mit besonderer Berücksichtigung der quantitativen mikromorphologischen Verhältnisse. *Acta Pathol Microbiol Scand* 5: 1-276, 1944.
- Franca LR, Silva VA, Chiarini-Garcia H, Gracia SK, Debeijuk L : Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 63: 1629-1636, 2000.
- Gondos B, Morrison KP, Renston RH : Leydig cell differentiation in the prepubertal rabbit testis. *Biol Reprod* 17: 745-748, 1977.
- Gondos B, Paup DC, Ross J : Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the fetal and postnatal hamster testis. *Anat Rec* 178: 551-556, 1974.
- Gondos B, Renston RH, Conner LA : Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. *Am J Anat* 136: 427-440, 1973.
- Gondos B, Renston RH, Goldstein DA : Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat* 145: 167-182, 1976.
- Gottreich A, Hammel I, Yohev L, Terkel J : Quantitative microscopic changes in the mole rat testes during an annual cycle. *Anat Rec* 243: 195-199, 1995.
- Hafez ESE. Rabbits. In : Hafez ESE (eds). *Reproduction and breeding techniques of laboratory animals*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp 273-298, 1973.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL : Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124: 762-770, 1989.
- Ichihara I, Kawamura H, Pelliniemi LJ : Ultrastructure and morphometry of testicular Leydig cells and the interstitial components correlated with testosterone in aging rats. *Cell Tissue Res* 27: 241-255, 1993.
- Johnson L, Neaves WB : Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. *Biol Reprod* 24: 703-712, 1981.
- Kerr JB, Knell CM : The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103: 535-544, 1988.
- Kerr JB : A light microscopic and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. *Anat Embryol* 177: 341-348, 1988.
- Kim IS, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC : Changes in the testis interstitium of Brown Norway rats with aging and effects of luteinizing and thyroid hormones on the aged testes in enhancing the steroidogenic potential. *Biol Reprod* 66: 1359-1366, 2002.
- Kim IS, Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC : Effects of continuous and intermittent exposure of lactating mothers to Aroclor 1242 on testicular steroidogenic function in the adult male offspring. *Tissue Cell* 33: 169-177, 2001.
- Kim IS, Yang HH : Morphometric study of the testicular interstitium of the rat during postnatal development. *Korean J Anat* 32: 849-858, 1999.
- Lipsett MB, Tullner WW : Testosterone synthesis by the fetal rabbit gonad. *Endocrinology* 77: 273-277, 1965.
- Lording DW, de Krester DM : Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fert* 29: 261-269, 1972.
- Mendis-Handagama SMLC, Ariyaratne HBS : Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65: 660-671, 2001.
- Mendis-Handagama SMLC, Ewing LL : Sources of error in the estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes. *J Microsc* 59: 73-82, 1990.
- Mendis-Handagama SMLC, Risbridger GP, de Krester DM : Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10: 525-534, 1987.
- Mendis-Handagama SMLC, Gelber SJ : Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months age. *Tissue Cell* 27: 689-699, 1995.
- Mendis-handagnma SMLC, Zirkin BR, Ewing LL : Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion hamster, rat, and guinea pig testes perfused in vitro. *Am J Anat* 188: 12-22, 1988.
- Mori H, Christensen AK : Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 84: 340-354, 1980.

- Neves ES, Chiarini-Garcia H, Franca LR : Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod* 67: 274-255, 2002.
- Nistal M, Paniagua R, Regadera J, Santamaria L, Amat P : A quantitative morphological study of human Leydig cells from birth to adulthood. *Cell Tissue Res* 246: 229-236, 1986.
- Prince FP : Ultrastructure of immature Leydig cells in the human. *Anat Rec* 209: 165-176, 1984.
- Rey RA, Nagle CA, Chemes H : Morphometric study of the testicular interstitial tissue of the monkey *Cebus apella* during postnatal development. *Tissue Cell* 28: 31-42, 1996.
- Rune GM, Souza DE, Merker HJ : Ultrastructural and histochemical characterization of marmoset (*Callithrix jacchus*) Leydig cells during postnatal development. *Anat Embryol* 183: 179-191, 1991.
- Russell LD, Franca LR : Building a testis. *Tissue Cell* 27: 129-147, 1995.
- Russell LD, Ren HP, Sinha-Hikim I, Schulze W, Sinha-Hikim AP : A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am J Anat* 188: 21-30, 1990.
- Sanchez B, Pizarro M, Garcia P, Flores JM : Histological study of Leydig cells in the cat from birth to sexual maturity. *J Reprod Fert* 47: 349-353, 1993.
- Sinha-Hikim AP, Amador AG, Russell LD : Structure/function relationship in active and inactive hamster Leydig cells: A correlative morphometric and endocrine study. *Endocrinology* 125: 1844-1856, 1989.
- Vergouwen RPFA, Huiskamp R, Bas RJ, Roepers-Gajadien HL, Davids JA, de Rooij DG : Postnatal development of testicular cell populations in mice. *J Reprod Fert* 99: 479-485, 1993.
- Weibel ER : Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 26: 235-301, 1969.
- Wing TY, Christensen AK : Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 165: 13-25, 1982.
- Zayed AE, Hifny A, Abou-Elmagd A, Wrobel WH : Seasonal changes in the intertubular tissue of the camel testis (*Camelus dromedarius*). *Ann Anat* 177: 199-212, 1995.
- Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N : Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107: 1868-1874, 1980.

Changes in the Testis Interstitium of Rabbits from Birth to Sexual Maturity

Hyun-Jin Tae, In-Shik Kim

Department of Veterinary Anatomy, College of Veterinary Medicine and Bio-Safety Research Institute, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

Abstract : Changes in the testis interstitium from birth to adulthood were studied in New Zealand white rabbits of 1, 7, 21, 35, 49, 70, 105, 147, 196, and 252 days (n=8 per group) of age.

Testes of rabbits were fixed by whole body perfusion using a fixative containing 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, processed and embedded in Epon-araldite. Using 1 μ m sections stained with methylene blue-azure II, qualitative and quantitative (stereological) morphological studies were performed. Sperm production was measured by routine technique.

The volume density of the interstitium represents 66.3% of the testicular parenchyma at day 1. Adult Leydig cells initially detected at day 7 (0.001%), increased progressively to reach a volume density of 2.6% by day 252. The absolute volume of mesenchymal cells, endothelial cells, pericytes, and myoid cells increased from birth to 252 days. The number of endothelial cells, pericytes, and myoid cells per testis increased gradually with age. The absolute numbers of adult Leydig cells and mesenchymal cells per testis increased linearly from birth to 252 days. The rate of production of adult Leydig cells was greater than that of mesenchymal cells in the postnatal rabbit testis through 252 days. The average volume of a mesenchymal cell increased from day 1 to day 70 and declined thereafter; the highest value was at day 70. Total sperm production and daily sperm production per testis increased significantly from 105 to 252 days of age.

These results clarified the pattern of changes in the testis interstitium in rabbits from birth to adulthood and correlation these events with spermatogenesis.

Keywords : Rabbit, Testis, Interstitium, Postnatal changes, Stereology