Studies on Effects of Dehydroepiandrosterone-injection at Day 1 of age on Sexual Function in Female Rats

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8478

金沢大学十全医学会雑誌 第102巻 第6号 698−713 (1993)

新生仔期のデヒドロエピアンドロステロン・アセテート投与の雌ラット生殖機能に及ぼす影響に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座（主任：西田悦郎教授）
生 水 真紀夫

デヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone-acetate, DHA-Ac) を1日齢の雌ラットに投与し，その生殖機能に及ぼす影響をテストステロン・プロピオネート (testosterone propionate, TP) 投与の場合と比較検討した．DHA-Ac (1.0, 2.0, 2.5mg) 投与群では，投与量の増加に応じて膣開口日日齢の早発化・初回発情日日齢の早発化・軽度の膣口狭窄・発情周期の周期性低下が認められた．DHA-Ac 2.5mg 投与群では，成熟後に膣スメアが連続発情像を示して持続性無排卵状態となった．また，成熟後の体重・卵巣の相対重量・子宮の相対重量・膣の相対重量は油溶媒投与対照群より軽く，卵巣は黄体の欠如した多嚢胞性卵巣像を呈した．これらの生殖機能の変化は，膣口狭窄と体重増加の程度を除き，1日齢に TP 0.5mg を投与した雌ラットにおける変化と一致するものであった．DHA-Ac 2.5mg 投与群の血中性ホルモン値を対照発情周期のラットの値と比較したところ，黄体化ホルモン (luteinizing hormone, LH) 値の周期性分泌の欠如とプロラクチン (prolactin, PRL) 値の上昇とが認められた．妊馬血清ゴナドトロピン・ヒト絨毛性ゴナドトロピン投与後の排卵率および排卵数は，TP 0.5mg 投与ラットに比し DHA-Ac 2.5mg 投与ラットで有意に低下していた．また，卵巣摘出後に体重 100g あたり 0.5μg のエストラジオールを投与し，6時間後の子宮の反応性を1日齢油溶媒投与対照群と比較したところ，DHA-Ac 2.5mg 投与ラットでは子宮湿重量増加率の低下および子宮内膜間質浅層の細胞密度の逆指数 (reciprocal values of cell density, RVCD) の増加率に低下がみられたのに対し，TP 0.5mg 投与ラットでは子宮輪状筋層の RVCD 増加率に低下が認められた．また，発育過程における性器重量と血中ホルモン値の経日齢的変化について検討したところ，DHA-Ac 2.5mg 投与ラットでは，8日齢まで卵巣・子宮の相対重量が油溶媒投与対照群より重かったが，10日齢以降では逆に油溶媒投与対照群より軽量であった．卵巣と子宮の相対重量の相対的増加時期には血中エストラジオール・テストステロン値の上昇と LH・卵胞刺激ホルモン値の低下がみられ，相対的減少時期には PRL 値の上昇を除いて血中性ホルモン値に明瞭な変化はみられなかった．以上の結果から，1日齢 DHA-Ac 投与雌ラットにみられる生殖機能の変化は TP 投与にみられるアンドロゲン不妊ラットの病態と類似しているものの，膣閉鎖膜のホルモン感受性・卵巣のゴナドトロピン感受性・子宮のエストロゲン反応性などの点で若干異なるものと考えられた．

Key words dehydroepiandrosterone, precocious vaginal opening, persistent estrus, gonadotropins, estrogens

ヒトでは，デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の血中濃度が明瞭な経年的変化を示すことが知られている[1]．とりわけ，胎児期から新生児期にかけての期間と前思春期から30歳代前半にかけての期間には大量の DHA およびデヒドロエピアンドロステロン・サルフェート (dehydroepiandrosterone-sulfate, DHA-S) が合成・分泌されているが，その生理学的意義は必ずしも明らかではない[1][2]．

胎児副腎から大量に分泌される DHA-S は，胎盤でエストロゲンに転換されて母体乳腺の発育・子宮の肥大・子宮頸部の熟化などに重要な役割を果たしているものと推定されている．最近では，DHA-S 値の低下が陣痛発来機序に関与している可能性も示唆されている．一方，前思春期から思春期における DHA および DHA-S の急増は，乳腺の発育・恥毛や髭・身長発育の加速などにも密接に関与しているものと考えられている[3]．

われわれの教室では DHA の作用について雌ラットを用いて種々検討してきているが，これまでに前思春期におけるデヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone-acetate, DHA-Ac) 投与によって，発情周期の周期性が低下すること，膣開口日日齢が早まること，発育卵胞数および排卵数が減少することを報告した[4][5]．DHA-Ac 投与雌ラットにみられるこれらの生殖機能の変化は，新生児期にテストステロン (testosterone, T) ないしテストステロン・プロピオネート (testosterone propionate, TP) を投与したラットすなわちアンドロゲン不妊ラット (androgen sterilized rat) にみられる無排卵状態と類似しており，その異同が問題となる．

平成5年10月5日受付，平成5年10月22日受理

Abbreviations: DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-Ac, dehydroepiandrosterone-acetate; DHA-S, dehydroepiandrosterone-sulfate; E2, 17β-estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; hCG, human chorionic gonadotropin; LH, luteinizing hormone; PCOS, polycystic ovary syndrome; PMSG, pregnant mare serum

そこで，今回の研究ではまず1日齢に各用量の DHA-Ac を投与したラットにおける生殖機能の変化を検討し，主として DHA-Ac 投与ラットの生殖機能と TP 投与ラットの生殖機能の異同について比較検討した．さらに，DHA-Ac 投与後の性器重量と内分泌環境の経日齢的変化を観察することにより，生殖機能の変化の発生機序について考究した．

材料および方法

I．実験動物

北陸動物実験施設(富山)より購入したウィスター(Wistar)近交系ラットを継代繁殖させて実験に用いた．ラットは常温(23±2℃)・常湿(55±15%)・人工照明(明時間9時〜20時30分)下に飼育し，飼料 CRF-1(日本チャールズ・リバー，厚木)および水(水道水)は自由摂取させた．

90日齢前後の処女雌ラットを雄と交配させ(腟内に精子を確認した日を妊娠第1日とした)，得られた新生仔雌ラット(出生した日を1日齢とした)を実験に用いた．この際，出生時体重や脳重量などのばらつきを少なくするため，妊娠第23日に出生したもののうち，1腹の新生仔数が11〜14匹の範囲内にあったものを実験に用いた[6]．また，同腹雄ラット胎仔からのアンドロゲンの拡散によるクレメンス(Clemens)効果を考慮して，出生仔の雌雄比が0.71以下または1.33以上ものは除外した[7〜9]．5日齢に1腹あたりの新生仔数を8匹に調整し，21日齢で離乳させた．以後，1ケージ当り2〜4匹として飼育した．

II．実験方法

1．DHA-Ac および TP 製剤とその投与方法

DHA-Ac(和光，大阪)および TP(Sigma, St. Louis, U.S.A.)は，17%の安息香酸ベンジル(和光)および1%のベンジルアルコール(和光)を添加したごま油(保栄薬工，大阪)の溶媒(50μl)に溶解して実験に供した．

DHA-Ac(1匹あたり 1.0mg, 2.0mg, 2.5mg)・TP(1匹あたり 0.5mg)を実験群に，油溶媒(50μl)または生理的食塩水(0.9%塩化ナトリウム注射液，大塚製薬，東京)(50μl)を対照群に，それぞれ出生後24時間以内に雌ラット項部に皮下投与した．この際，注射針(27ゲージ)は尾側より頭方に向けて刺入し，項部皮下に丘疹を作るようにして注射溶液を注入した．注射針を抜去後，皮膚を揉むようにして刺入孔をずらし，注射液の漏出が起こらぬよう注意した．また，同腹ラットは，実験群と対照群がなるべく同数になるよう無作為に割り当てた．

2．体重測定および腟開口の有無・腟スメア像の観察

体重の測定は，原則として14時から15時に行なった．20日齢以降，毎日14時から15時の間に，腟開口の有無を視診により判定した．発情周期については，腟開口後にスポイドを用いて腟内を蒸留水で2ないし3回洗浄し，得られた剝離細胞像から発情間期I，発情間期II，発情前期，発情期に分けた[10]．腟開口後200日齢頃までの発情周期について検討したが，60日齢から200日齢にかけて2日間の発情間期の後に発情前期と発情期とが各1日出現するパターンが連続して観察できたものを周期4日の規則周期(regular cycle)，同様に3日間の発情間期の後に発情前期と発情期とが各1日出現するパターンが連続して観察できたものを周期5日の規則周期とした．なお，規則周期の判定に60日齢以後の性周期を用いたのは，規則的な発情周期の確立までに腟開口後10日程度を要するためである．また，DHA-Ac および TP 投与群にみられた異常周期については，1ないし8日間の不規則な長さの発情間期と1ないし10日間持続する発情期とを交互に繰り返すものを不規則周期(irregular cycle)，初回発情後1ないし6周期の不規則な発情周期を経たのち約60日齢以降持続的に発情期を示すものを遅発性連続発情(delayed anovulatory syndrome)，初回発情後より持続的に発情期を示すものを連続発情(constant estrus)とした．なお，50日齢までに自然に腟開口がみられなかったラットについては，50日齢にメスにより腟閉鎖膜を切開してスメア像の観察を行なった．

3．臓器重量測定と組織学的観察

1〜109日齢に断頭屠殺後すみやかに各臓器を摘出し，付着した結合組織と脂肪組織を実体顕微鏡下に丁寧に除去したのち，組織湿重量をメトラー直示分析天秤 H-80 型(Mettle Instrumente, AG, Greifensee, Switzerland)で測定した．各臓器の重量は，屠殺時の体重 100g あたりの相対重量で比較した．組織標本は，10%緩衝ホルマリン(武藤化学薬品，東京)またはブアンの固定液で24時間固定した後，5〜7μ の厚さのパラフィン切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin)により染色した．なお，ブアンの固定液は 2,4,6-トリニトロフェノール(和光)を蒸留水に溶解して作成した飽和ピクリン酸，ホルマリン液，酢酸をそれぞれ20：5：1の用量比で混合したもので，使用時に調製した．

4．排卵誘発法と排卵の確認

妊馬血清ゴナドトロピン(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)としてはセロトロピン(帝国臓器，東京)を，ヒト絨毛性ゴナドトロピン(human chorionic gonadotropin, hCG)としては HCG(注射用)(持田製薬，東京)を用いて排卵誘発を施行した．90日齢前後に PMSG 30 単位を皮下投与し，48時間後に hCG 10 単位を皮下投与した．hCG 投与後20時間目に屠殺し，黄体形成の有無を実体顕微鏡下に観察した．また，分離した卵管の子宮側の断端から先端を鈍にした27ゲージ針を挿入し，生理的食塩水で卵管内を還流して卵管内卵子を回収した．0.01%トリプシン(和光)および0.03%のヒアルロニダーゼ(和光)の存在下にピペッティングを行なって顆粒膜細胞を除去し，卵細胞を位相差顕微鏡で観察した．卵巣に黄体が認められず，かつ卵管内卵子がみられなかったものを排卵なしと判定した．

5．子宮のエストロゲン反応性の検討

子宮のエストロゲン反応性は，Astwood の6時間法(six-hour test)[11]に成熟ラット用の変更を加えた方法により検討した．すなわち，80日齢で両側卵巣を摘除し，2週間後に10%の安息香酸ベンジルを添加したごま油に溶解したエストラジオール(17β-estradiol, E2)(Sigma)を体重 100g あたり 0.5μg ずつ皮下投与した．投与6時間後に子宮角を摘出し，湿重量を測定した．さらに，一側子宮角を+110℃で24時間乾燥した後，重量を測定してその差から水分含有量を求めた，他側子宮角の中央部をブアンの固定液で24時間固定した後，子宮内腔に直角な断面で 7μ の厚さの組織標本を作成した．この標本について，Grunert ら[12]の方法にしたがって，内膜間質の浅層

gonadotropin; PRL, prolactin; RVCD, reciprocal values of cell density; T, testosterone; TP, testosterone propionate

部分および輪状筋層部分の細胞密度の逆指数 (reciprocal values of cell density, RVCD) を求めた．すなわち，標本ごとに無作為に5箇所を選び，400倍の倍率で観察して 1963mm² 中に含まれる細胞核数を数え，計数面積を細胞核数で割って RVCD を算出した．なお，卵巣摘除後約7日で子宮重量の減少が止り，組織学的にも子宮内膜間質および子宮輪状筋層内に好酸球の浸潤が全く観察されなくなることを予備実験により確認した．

6．膣のエストロゲン反応性の検討

80日齢前後の14時に，エーテル麻酔下に両側卵巣切除術を施行した．その7日後より体重 100g あたり 0.5μg の E2 (前出) を24時間の間隔で2回皮下投与した．この間，連日14時に膣スメア像の観察を行なった．

7．採血法と血中ホルモン測定

採血は1日齢から30日齢にかけての時期と，120日齢から140日齢にかけての時期に断頭屠殺により行なった．新生仔期から春機発動前のラットでは，原則として14時から15時の間に採血した．分離した血清は−80℃にて測定まで冷凍保存した．1〜5日齢のラットでは，軀幹血を2〜5匹ずつプールして各測定に供した．離乳後のラットでは，採血の前に予めハンドリングを行なって順化させるよう配慮し，採血当日はケージより取り出したのち別室で可及的速やかに断頭屠殺した．

血中黄体化ホルモン (luteinizing hormone, LH)・卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH)・プロラクチン (prolactin, PRL) は NIAMDD-RIA-Kit (National Pituitary Agency, Baltimore, U.S.A.) を用いて測定し，それぞれ NIAMDD のラット・スタンダード (rat standard) γLH-RP1, γFSH-RP2, γPRL-RP3 で表示した．E2 は，"E2-kit 第一" (第一ラジオアイソトープ研究所，東京) を，T は "テストステロン栄研" (栄研化学，東京) を使用して測定した．

8．推計学的処理

得られた成績は，すべて平均値±標準偏差で示した．計数値データの独立性はフィッシャー(Fisher) の直接確率計算法を用いて検定した．独立2群の平均値の差の検定はマン・ホィットニイ (Mann-Whitney) の検定を用いて行なった．独立多群の平均値の差の検定はクラスカル・ワーリス (Kruskal-Wallis) の検定を用いて行ない，有意差 (危険率 5%) を認めたものについては一元配置分散分析後にフィッシャーの LSD 法 (least significant difference) (危険率 5%) により多重比較を行なった．関連多群の平均値の差の検定は，二元配置分散分析を用い，フィッシャーの LSD 法 (危険率 5%) により多重比較を行なった．

成 績

Ⅰ．体重増加に及ぼす影響

DHA-Ac 1.0, 2.0, 2.5mg の各用量投与群のうち DHA-Ac 2.5mg 投与群の体重は，15〜60日齢で油溶媒投与対照群 (対照群) および生食投与対照群の体重より軽い傾向にあり，80日齢および110日齢では有意に軽かった ($p<0.05$) (図1)．これに対し，TP 0.5mg 投与群では60日齢以降対照群および DHA-Ac 各用量投与群より有意に重くなっていた ($p<0.05$)．

Ⅱ．膣開口・初回発情および発情周期に及ぼす影響

膣開口日日齢・初回発情日日齢・初回発情日体重・発情周期の変化を表1に示した．

対照群および DHA-Ac 各用量投与群のすべてにおいて膣開口が観察された．対照群には膣口狭窄を示したものはなかったが，DHA-Ac 投与群では軽度の膣口狭窄を示すものがみられ，その出現頻度 (DHA-Ac 1.0mg 投与群，3/11匹；DHA-Ac 2.0mg 投与群，5/8匹；DHA-Ac 2.5mg 投与群，21/29匹) を比較したところ，DHA-Ac 1.0mg 投与群と DHA-Ac 2.5mg 投与群との間に有意差が認められた ($p<0.05$)．TP 投与群では，12匹中7匹に高度の膣口狭窄をともなう膣開口が観察されたが，残り5匹には自然の膣開口は認められなかった．

膣開口日日齢および初回発情日日齢は，DHA-Ac 投与量の増加に応じて有意に早期化した ($p<0.01$)．初回発情日体重は DHA-Ac 投与量に応じて有意に軽くなった ($p<0.01$)．

対照群のラットでは，初回発情後に2ないし3周期の不規則な発情周期を経て，50日齢頃より周期4日ないし5日の規則的な発情周期に移行し，すべてが規則周期と判定された．これに対し，DHA-Ac 投与群では DHA-Ac 投与量に依存して周期性の低下することが認められた．すなわち，DHA-Ac 投与群の発情周期を，不規則周期，遅発性連続発情，連続発情に分けて比較すると，表1に示すごとく DHA-Ac 投与群ではその投与量が多いほど連続発情を示すものの頻度が増加した．これに対して，TP 0.5mg 投与群では，すべて連続発情と判定された．

Ⅲ．卵巣の重量・組織学的所見・排卵能に及ぼす影響

対照群では，成熟後の卵巣に多数の黄体が観察された．これに対し，DHA-Ac 2.5mg 投与または TP 0.5mg 投与により連続発情となったラットでは，図2に示すごとく黄体は欠如しており，組織学的観察では多数の胞状卵胞と閉鎖卵胞および数個の大型の嚢胞が観察された．58〜60日齢・80〜82日齢・103〜109日齢のいずれの時期においても，DHA-Ac 2.5mg 投与群および

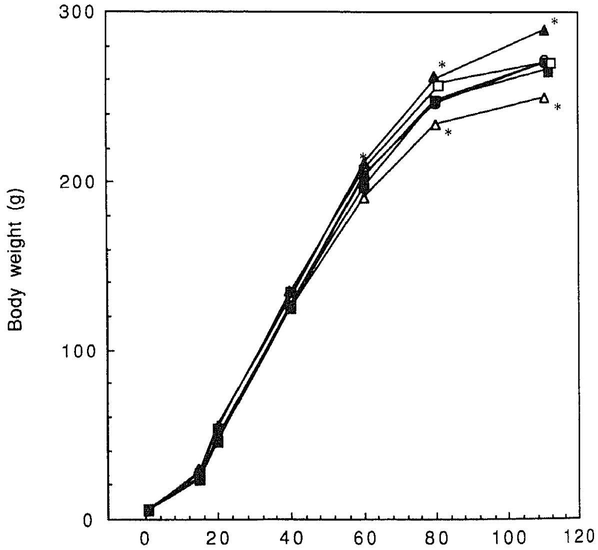

Fig. 1. Effects of a single injection of dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) or testosterone propionate (TP) at day 1 of age on the body weight. Each point indicates the mean value of 5−12 animals: open circle, the physiological-saline (50 μl/rat) treated group; closed circle, vehicle (50 μl/rat)-treated group; open square, DHA-Ac (1.0 mg/rat)-treated group; closed square, DHA-Ac (2.0 mg/rat)-treated group; open triangle, DHA-Ac (2.5 mg/rat)-treated group; closed triangle, TP, (0.5 mg/rat)-treated group. *$p<0.05$ compared with the respective control by Mann-Whitney method.

TP 0.5mg 投与群の卵巣の相対重量は対照群より有意に軽量であった（$p<0.05$ または $p<0.01$）（表2）．DHA-Ac 2.5mg 投与群と TP 0.5mg 投与群とで比較すると，58～60日齢では DHA-Ac 2.5mg 投与群の卵巣の相対重量が TP 0.5mg 投与群のそれより有意に軽かったが（$p<0.05$），80～82日齢および103～109日齢においては両群の相対重量に差はみられなかった．

対照群の5匹では全例において自然排卵が認められ，発情期午後に卵管内に観察された卵子数は14.8±2.9個であった．発情周期に同期させて行なった PMSG-hCG 投与でも全例（5匹）に排卵がみられ，排卵数は32.2±10.2個であった．これに対し，DHA-Ac 2.5mg 投与群および TP 0.5mg 投与群では，自然排卵は全くみられなかった．そこで，PMSG-hCG による排卵誘発を行なったところ，排卵はそれぞれ6匹中1匹，5匹中3匹に認められ，排卵数はそれぞれ0.3±0.3個，2.6±1.5個であった．両群の排卵率および排卵数には有意差が認められた（いずれも $p<0.05$）．

Ⅳ．子宮の E2 に対する反応性に及ぼす影響

卵巣切除後に体重 100g あたり 0.5μg の E2 を投与して，子宮角重量・水分量・子宮内膜間質浅層部 RVCD・子宮輪状筋層部 RVCD の変化について検討した成績を図3に示した．なお，E2 を含まない油溶媒のみを投与した場合の各群の子宮角の相対重量・水分含有量・RVCD をおのおのの前値として取り扱った．

1．子宮角相対重量と水分含有量

Table 1. Changes of cyclicity in female rats injected with various dose of dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac), testosterone-propionate (TP), vehicle or physiological saline at day 1 of age

Treatment (dose/rat)	Over all	Cyclicity			
		Regular cycle	Irregular cycle	Delayed anovulatory syndrome	Constant estrus
	No. of rats (a, b, c)	No. of rats (g) (d, e)	No. of rats (b)	No. of rats (b, d, f)	No. of rats (b, f)
Physiological saline (50μl)	12 (35.3±0.6, 36.0±0.6, 99±5)	12 (12, 0) (2.8±0.6, 50.1±0.9)	0	0	0
Vehicle (50μl)	19 (34.5±1.0, 36.8±1.1, 104±6)	19 (17, 2) (2.4±0.3, 49.7±1.7)	0	0	0
DHA-Ac (1.0mg)	9 (32.6±0.9*, 32.9±0.8*, 91±3*)	0	2 (34.0±2.0)	4 (33.0±0.4, 4.3±1.1, 58.8±8.1)	3 (30.7±1.5, 30.9±1.6)
DHA-Ac (2.0mg)	8 (30.8±1.1*, 32.2±0.2*, 83±3*)	0	0	1 (32, 2, 48)	7 (32.3±0.3, 32.3±0.3)
DHA-Ac (2.5mg)	29 (29.7±0.2*, 31.1±0.3*, 75±2**)	0	0	2 (32.1±0.4, 1.5±0.7, 43.5±0.5)	27 (31.1±0.2, 31.2±0.2)
TP (0.5mg)	7 (33.9±0.8*, 36.8±0.8, 97±8)	0	0	0	7 (36.8±0.8, 36.8±0.8)

Number of each case is represented: a, day of vaginal opening (mean±SEM); b, day of the first estrus (mean±SEM); c, body weight at the first estrus (mean±SEM); d, cycles before onset of regular cycles (mean±SEM); e, onset of regular cycles (mean±SEM); f, onset of persistent estrus (mean±SEM); g, number of rats showing 4-day-cycle and 5-day-cycle. *$p<0.05$ and **$p<0.01$ compared with the vehicle-injected controls by 1 way ANOVA followed by LSD method.

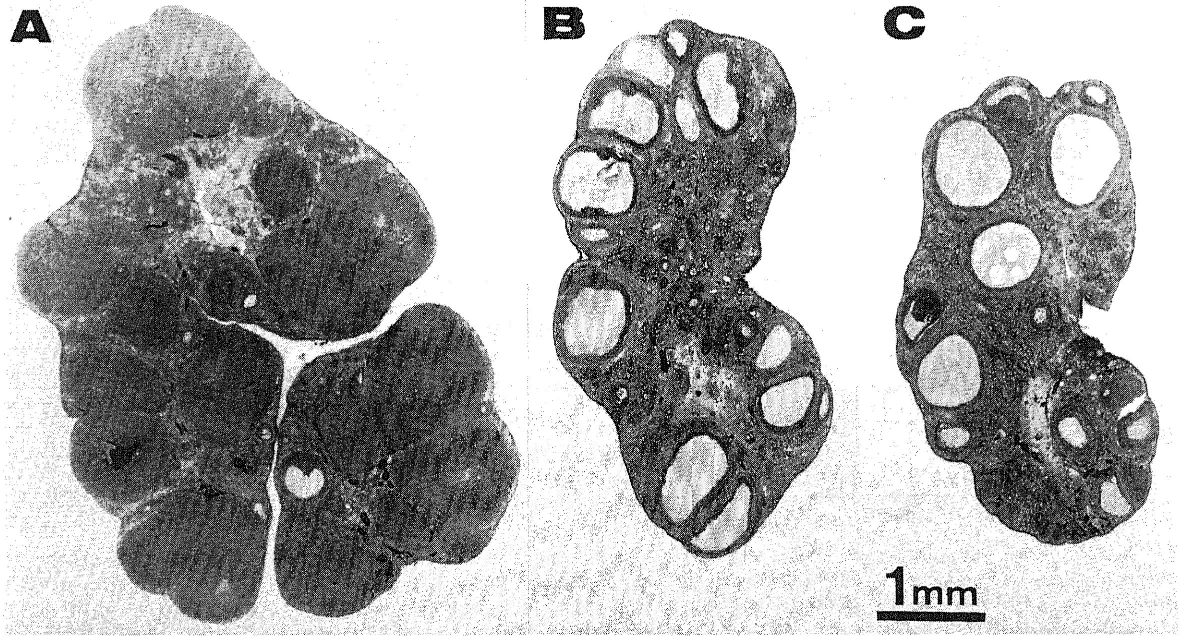

Fig. 2. Comparative observation of ovarian histology at day 80 to day 82 of age (hematoxyline-eosin stain). Rats were injected with a single dose of DHA-Ac, TP or vehicle at day 1 of age. A: a vehicle (50 μl/rat)-treated rat at estrus. B: a DHA-Ac (2.5 mg/rat)-treated rat. C: a TP (0.5mg/rat)-treated rat.

E2 を含まない油溶媒を投与した場合の子宮角の相対重量すなわち子宮角の相対重量の前値は，1日齢油溶媒投与対照群に比し DHA-Ac 2.5mg 投与群で有意に重かったが (p<0.001), TP 0.5mg 投与群では有意の変化はみられなかった．子宮角の水分含有量の前値も，DHA-Ac 2.5mg 投与群で1日齢油溶媒投与対照群の前値より高値を示した (p<0.05).

E2 投与後の子宮角の相対重量は，1日齢油溶媒投与対照群・DHA-Ac 2.5mg 投与群・TP 0.5mg 投与群ともそれぞれの前値に比し有意の増加を示した (いずれも p<0.001)．子宮角重量の増分を増加率 (前値の平均値に対する比) で比較すると，対照群 (50±10%) と TP 0.5mg 投与群 (65±11%) に比し，DHA-Ac 2.5mg 投与群 (28±7%) で低い傾向がみられた．E2 投与後の水分量は，油溶媒投与対照群および DHA-Ac 2.5mg 投与群において前値に比し有意の増加 (p<0.05), TP 0.5mg 投与群において増加傾向を示した．

2．子宮内膜間質浅層 RVCD および子宮輪状筋層 RVCD

E2 を含まない油溶媒を投与した場合の子宮内膜間質浅層 RVCD すなわち子宮内膜間質浅層 RVCD の前値は，1日齢油溶媒投与対照群に比し DHA-Ac 2.5mg 投与群で有意に重かったが (p<0.05), TP 0.5mg 投与群では有意の変化はみられな

Table 2. Changes of the relative weight of female sex organs (mg/100 g body weight) in female rats injected with 2.5 mg of dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) or 0.5mg of testosterone propionate (TP) at day 1 of age

Treatment (dose/rat)	Day of autopsy (range)	Number of rats tested	Relative weight (mg/100 g body weight) of			
			Ovary	Uterine horn	Uterine cervix	Vagina
Vehicle (50μl)	58−60	6	48.7±3.3	162±13.2	69.8±4.3	91.4±10.0
DHA-Ac (2.5mg)	58−60	18	22.3±2.1**	123±10.5*	61.5±6.6	57.5±3.0**
TP (0.5mg)	58−60	5	32.7±2.2*	141±18.0	32.9±6.2*	32.9±3.0**
Vehicle (50μl)	80−82	4	30.1±2.6			
DHA-Ac (2.5mg)	80−82	7	8.3±0.7**			
TP (0.5mg)	80−82	5	6.8±1.0**			
Vehicle (50μl)	101−109	13	20.5±1.7	113±12.9	70.4±5.9	
DHA-Ac (2.5mg)	101−109	4	7.9±1.0**	68.8±8.8**	59.2±2.8*	
TP (0.5mg)	101−109	10	5.4±0.5**	74.7±4.3**	61.1±4.2	

* p<0.05 and ** p<0.01 compared with the vehicle-treated control by Mann-Whitney method.

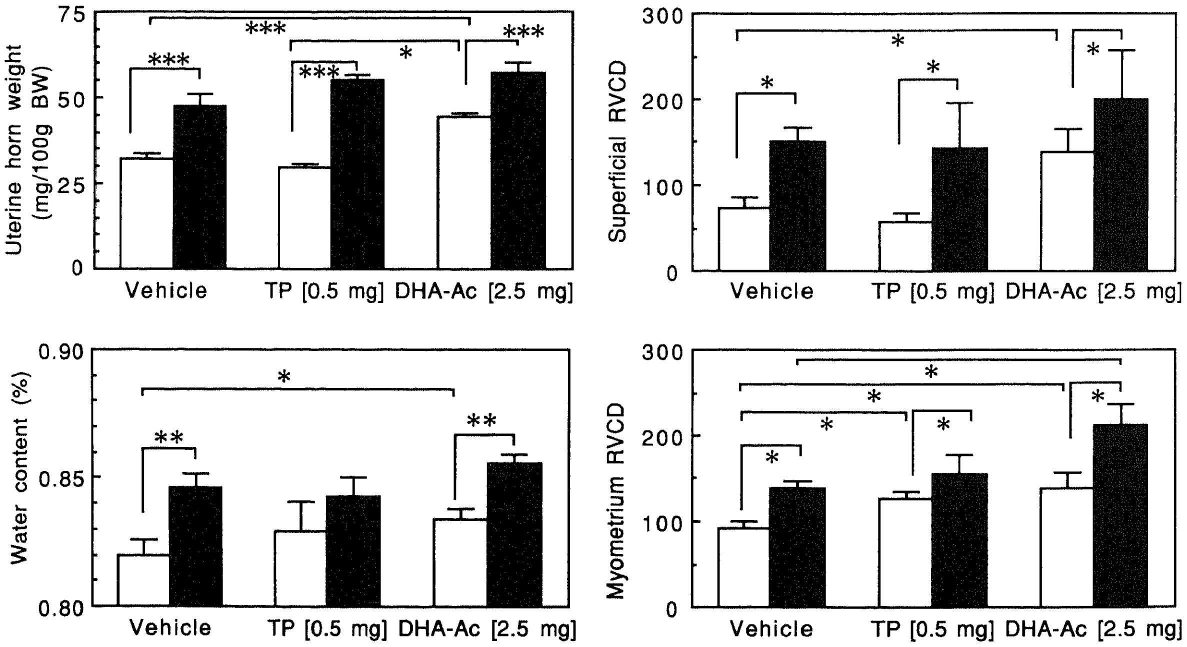

Fig. 3. Effects of a single injection of DHA-Ac or TP on estradiol induced increase in the uterine wet weight, in uterine water contents, in reciprocal values of cell density (RVCD) of superficial endometrium and in RVCD of circular myometrium. Experimental rats were injected at day 1 of age, with a single dose of vehicle (50 μl/rat), DHA-Ac (2.5 mg/rat) or TP (0.5 mg/rat). Rats were castrated at day 80 of age and were injected with a single dose of 17β-estradiol (E2) (5 μg/kg body weight) or vehicle (1.0 ml/kg body weight) 2 weeks later. Values were obtained 6 hours after the injection from E2-injected rats (closed column) or vehicle-injected rats (open column). Each bar indicates 1 SEM above the mean value of 4−6 animals. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared by Mann-Whitney method.

かった．また，子宮輪状筋層 RVCD の前値は，DHA-Ac 2.5mg 投与群および TP 0.5mg 投与群はともに対照群より高値であった ($p<0.05$).

E2 投与後の子宮内膜間質浅層 RVCD および子宮輪状筋層 RVCD は，対照群・DHA-Ac 2.5mg 投与群・TP 0.5mg 投与群ともそれぞれの前値に比較して有意の増加を示した ($p<0.05$). RVCD の増加率 (RVCD の前値の平均値に対する比) で比較すると，DHA-Ac 2.5mg 投与群では子宮内膜間質浅層 RVCD の増加率に低下がみられたのに対し ($p<0.05$), TP 0.5mg 投与群では子宮輪状筋層 RVCD の増加率に低下がみられた ($p<0.05$).

V．腟の E2 に対する反応性に及ぼす影響

DHA-Ac 2.5mg 投与あるいは TP 0.5mg 投与により連続発情となったラットおのおの5匹について，80日齢前後に両側卵巣摘除を行なったところ2日後より発情間期の腟スメア像に移行した．さらに，1週間後に体重 100g あたり 0.5μg の E2 を皮下投与したところ，2日後よりすべて発情期の像に移行した．この卵巣摘除および E2 投与に伴う腟スメア像の経日的変化は，対照群（5匹）の経日変化と同じであった．

VI．臓器重量の経日齢的推移に及ぼす影響

DHA-Ac 2.5mg 投与群の各臓器重量の1日齢から30日齢までの経日齢的推移を対照群と比較して，図4に示した．対照群の

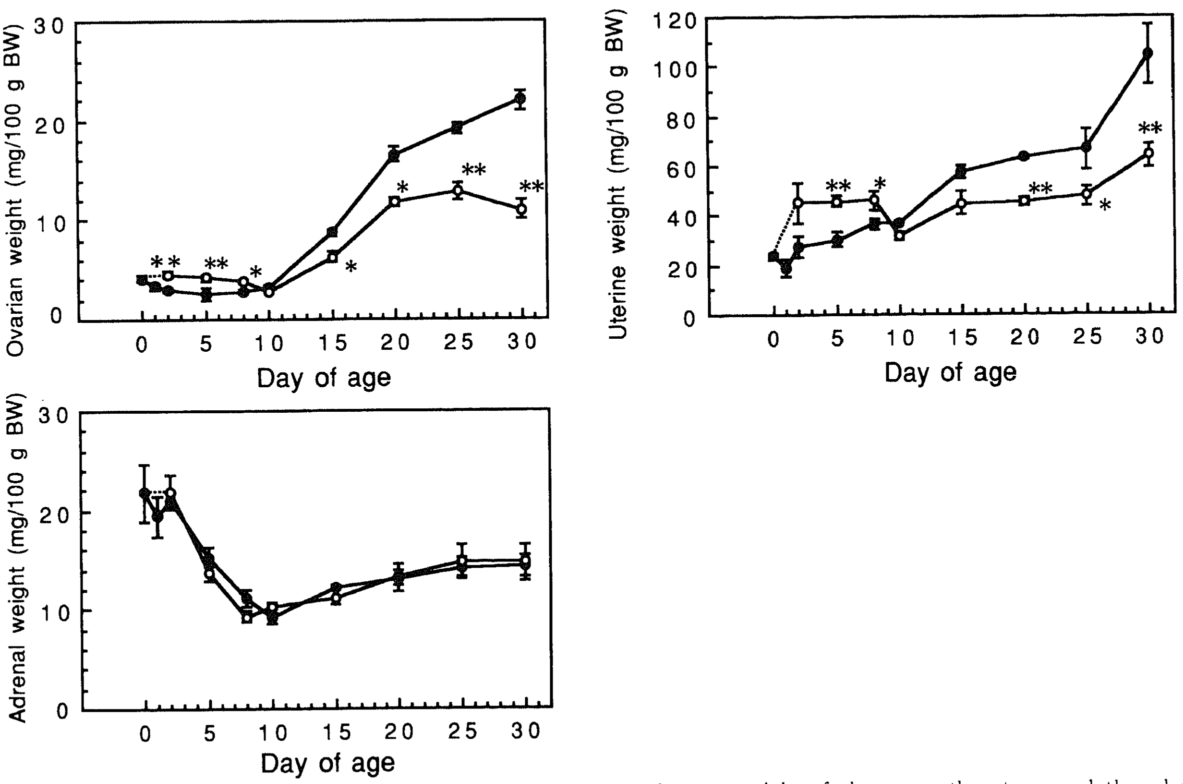

Fig. 4. Effects of a single injection of DHA-Ac at day 1 of age on the wet weight of the ovary, the uterus and the adrenal between day 1 and day 30 of age. The organ weights are expressed as the relative weight (mg/100 g body weight). Each bar indicates 1 SEM above and/or below the mean value of 4−7 animals. Closed circle, the vehicle (50 μl/rat)-treated group; open circle, the DHA-Ac (2.5 mg/rat)-treated group. *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with the vehicle-treated group by Mann-Whitney method.

Table 3. Changes of serum luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin (PRL), 17β-estradiol (E2), and testosterone (T) in vehicle-treated 4-day cyclic rats and dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) treated rats

Treatment (dose/rat)	Cycles (sampling time)	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	PRL (ng/ml)	E2 (pg/ml)	T (ng/ml)
Vehicle (50 μl)	Diestrus I (14:00)	1.23±0.08 (10)[a]	4.63±0.14 (9)	6.08±1.21 (7)	21.9±3.8 (4)	37.0±4.5 (5)
Vehicle (50 μl)	Diestrus II (14:00)	1.31±0.08 (12)	2.41±0.45 (5)	5.74±0.86 (6)	35.0±2.3 (4)	29.1±3.0 (6)
Vehicle (50 μl)	Proestrus (14:00)	1.50±0.23 (7)	4.20±0.22 (10)			
Vehicle (50 μl)	Proestrus (20:30)	51.1±21.1 (5)	8.29±1.22 (6)	211±44.8 (8)	52.0±4.3 (5)	65.9±9.0 (6)
Vehicle (50 μl)	Estrus (14:00)	1.05±0.21 (9)	7.10±0.33 (10)	4.78±1.01 (7)	16.4±2.8 (4)	20.7±1.8 (6)
DHA-Ac (2.5 mg)	CE (14:00)	1.43±0.18 (11)	5.85±0.16 (11)	54.3±17.51 (8)	31.5±2.9 (6)	38.2±4.1 (6)
DHA-Ac (2.5 mg)	CE (20:00)	1.50±0.30 (5)	5.84±0.20 (15)	58.0±17.51 (5)	33.2±3.8 (5)	37.3±5.1 (5)
DHA-Ac (2.5 mg)	DAS (14:00)	1.56±0.18 (10)	5.77±0.19 (10)	35.9±17.33 (3)	30.2±2.4 (6)	36.4±9.9 (5)
DHA-Ac (2.5 mg)	DAS (20:00)	1.54±0.26 (10)	5.70±0.11 (8)	39.7±22.05 (3)	38.1±5.0 (3)	40.9±8.3 (2)

Blood was collected by the decapitation at around 130 day of age. Rats were treated with DHA-Ac or vehicle at day 1 of age. Animals injected with DHA-Ac are divided into two groups according to its cyclicity: constant estrus rats (CE) and delayed anovulatrory syndrome rats (DAS). Each value represents the mean±SEM. a), number of rats tested.

卵巣重量および子宮角と子宮頸を合わせた子宮重量は，5日齢まではほぼ不変，8日齢と10日齢で微増，15日齢以降は急増を示した．これに対し，DHA-Ac 2.5mg 投与群では卵巣重量と子宮重量は，2～8日齢で対照群に比し有意に重くなったが（$p<0.05$ または $p<0.01$），15日齢以降は逆に対照群より有意に軽くなった（$p<0.05$ または $p<0.01$）．DHA-Ac2.5mg投与群の副腎重量は，いずれの日齢においても対照群の値と一致していた．

性成熟後（58～60日齢）の子宮角の相対重量は，表2に示すごとく，対照群に比し DHA-Ac 2.5mg 投与群で有意の減少（$p<0.05$），TP 0.5mg 投与群で減少傾向がみられた．性成熟後（58～60日齢）の膣の相対重量は，対照群に比し DHA-Ac2.5mg 投与群および TP 0.5mg 投与群で有意の減少がみられた（$p<0.01$）．

VII．血中ホルモン値の経日齢的推移および日内変動に及ぼす影響

DHA-Ac 2.5mg 投与群における血中ホルモン値について，1日齢から30日齢までの日齢的推移を図5に，成熟後（120～140日齢）の日内変動を表3に示した．なお，DHA-Ac 投与ラットの値については，遅発性連続発情を示したものと連続発情を示したものとに分けて呈示し，対照群の発情周期の値と比較した（表3）．

1．血中 LH 値

対照群の血中 LH 値は，1日齢で雄の約3倍の高値を示したが，2日齢以降低下した．15日齢で一過性の増加を示した後，25日齢で成熟期（発情期の14時）に相当する値となった．

DHA-Ac 2.5mg 投与群では，2日齢から10日齢にかけて対照群より低値を示した（$p<0.05$）．2日齢と5日齢の LH 値は，1日齢の雄の LH 値に相当する値であった．15日齢では，対照群と同様に一過性に増加を示した．25日齢および30日齢では，標準誤差が対照群より小さい傾向がみられた．性成熟期では，連続発情・遅発性連続発情にかかわらず，対照群の発情前期

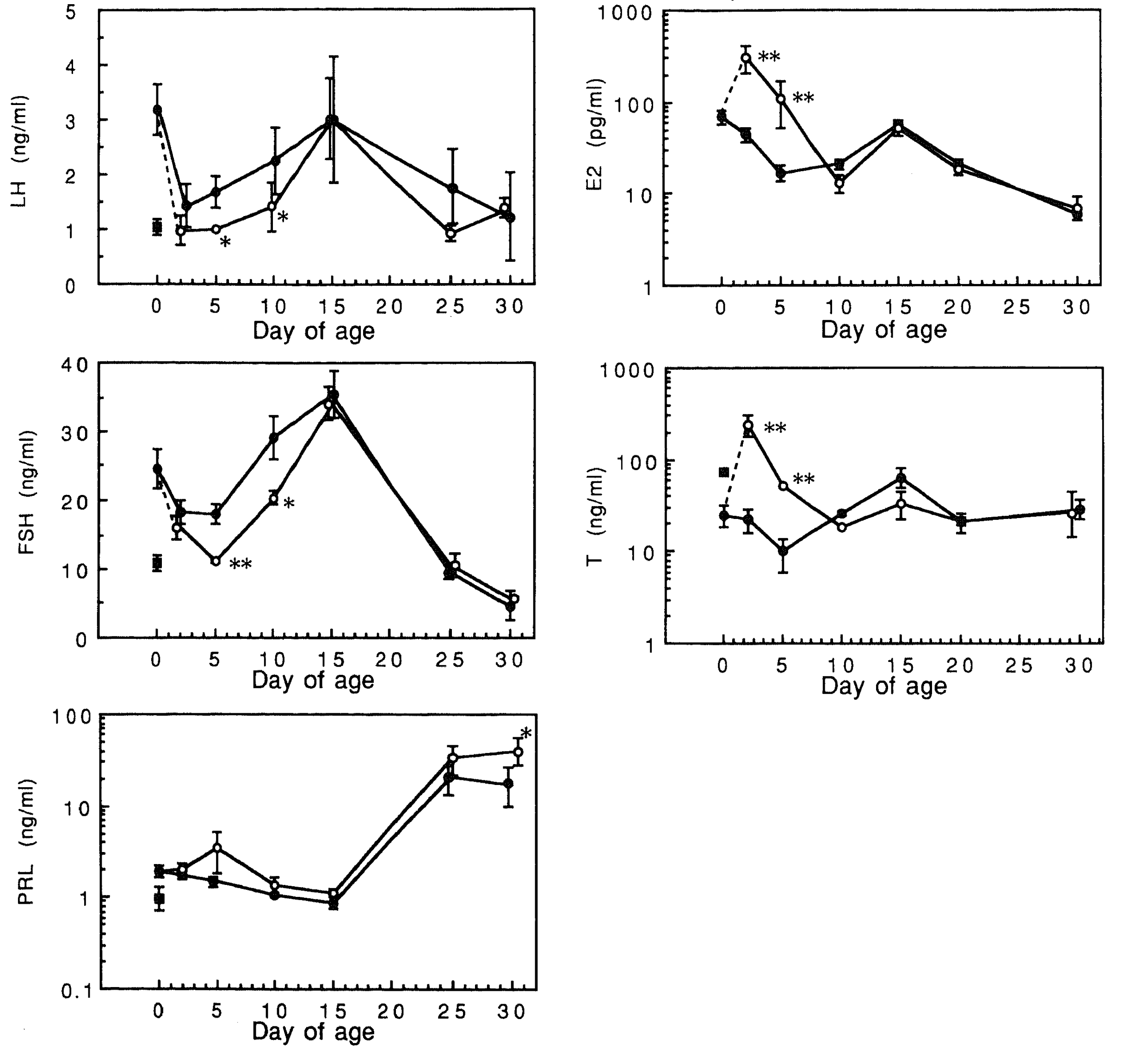

Fig. 5. Effects of a single injection of DHA-Ac at day 1 of age on serum levels of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin (PRL), E2 and testosterone (T) between day 1 and day 30 of age. Pooled sera from 5—12 animals were used for assay between day 1 and day 5 of age. Each bar indicates 1 SEM above and/or below the mean value of 4—7 animals, or 5—7 pooled sera. Closed circle, the vehicle (50 μl/rat)-treated group; open circle, the DHA-Ac (2.5 mg/rat)-treated group; closed square, non-treated male. *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with the control group by Mann-Whitney method.

(14時) に相当する値を示した．

2．血中 FSH 値

対照群の血中 FSH 値は，1日齢で雄の約2.5倍の高値を示した後，2日齢と5日齢に低下を示した．その後，15日齢で一過性に増加した後，25日齢以降性成熟期の発情前期に相当する値となった．

DHA-Ac 2.5mg 投与群では，5日齢と10日齢で対照群より有意に低値となった (それぞれ $p<0.01$, $p<0.05$)．その後は，対照群と同様の経日齢的推移を示した．性成熟期では，連続発情・遅発性連続発情にかかわらず発情前期 (14時) に相当する高値を示した．

3．血中 PRL 値

対照群の血中 PRL 値は，1日齢で雄の約2倍の高値を示したが，その後15日齢まで漸減し，25日齢では再び急増した．

DHA-Ac 2.5mg 投与群では2日齢から25日齢にかけて対照群より若干高めに推移し，30日齢では有意に対照群より高値となった ($p<0.05$)．性成熟期では，対照群の発情間期の値の約10倍に増加していた ($p<0.001$)．

4．血中 E2 値

対照群の血中 E2 値は，1日齢から5日齢にかけて漸減した．15日齢で一過性の上昇を示した後，30日齢でほぼ成熟期の発情間期に相当する値となった．

DHA-Ac 2.5mg 投与群では，2日齢と5日齢において対照群より高値を示した (いずれも $p<0.01$)．15日齢以降は，対照群と同様の推移を示した．性成熟期では，発情間期に相当する値を示した．

5．血中T値

対照群の血中T値は血中 E2 値の同様の経日齢的推移を示し，1日齢から5日齢にかけて低下し，15日齢で一過性の上昇を示した．その後，30日齢でほぼ成熟期の発情間期に相当する値となった．

DHA-Ac 2.5mg 投与群では，2日齢と5日齢で対照群より有意に高い値を示した (いずれも $p<0.01$)．その後，対照群とほぼ同様の推移を示した．性成熟期には，発情間期に相当する値となった．

考　　察

ラットでは，副腎の17α-ステロイド水酸化酵素の活性が低いため血中の DHA 濃度はヒトのおよそ1/15と低い[13]．この DHA を春機発動前の雌ラットに投与すると，卵巣に多数の嚢胞状卵胞が出現して無排卵状態となることが報告され[14)~17]，ヒトの多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome, PCOS) の疾患モデルのひとつとして検討が行なわれてきた[18)19]．われわれの教室でも，5～35日齢の雌ラットに DHA-Ac を投与して，腟開口日日齢の早発化や発情周期の規則性に低下がみられることなどを報告してきた[4)5)20]．今回の研究では，まず各用量の DHA-Ac を1日齢の雌ラットに投与し体重・生殖機能に及ぼす影響を TP 投与の場合と比較し，血中性ホルモン値や臓器重量の面から DHA-Ac 1日齢投与がラットの発育過程に及ぼす影響について検討を行なった．その結果，各用量の DHA-Ac 1日齢投与により腟開口日日齢の早発化・初回発情日日齢の早発化・連続発情を示す持続的無排卵の出現・卵巣のゴナドトロピン感受性の低下・E2 に対する子宮の反応性の低下などがみられることが明らかとなった．

新生仔期の雌ラットに TP を投与すると，腟開口日日齢の早発化と連続発情を伴う無排卵状態が惹起されることが知られており，アンドロゲン不妊ラットと呼ばれている．種々の検索から，投与された TP は主として脳内でエストロゲンに転換されて[21] 視床下部や大脳辺縁系[22)23] などのエストロゲンレセプターあるいはTやジヒドロテストステロンの形でアンドロゲンレセプターに結合することにより，神経核の神経細胞数・シナプス数・シナプス結合パターンを雄性化させて形態学的雌雄差 (性的二型核，sexually dimorphic nucleus) をもたらすよう作用することが明らかにされている[24)25]．また，TP 投与により視床下部や大脳辺縁系以外の部位においても，セロトニン[26] やカテコラミン[27)28] 代謝に恒久的変化の生ずることが明らかにされ，機能的な性分化は脳の広い範囲に起こっているものと考えられている．最近の研究によれば，周生期の性ステロイドはエストロゲンやカテコールエストロゲンなどの形でカテコラミンなどの脳内伝達物質の代謝を変化させることにより，神経核の形成に影響を与えている可能性がある[25)29)~31]．雄ラットでは，胎生期後半から新生仔期にかけて睾丸よりTが多量に分泌されており，このTが雄の脳の生理的な雄性化をもたらすものと考えられている[32]．

上述のごとく新生仔期の雌ラットに TP を投与すると種々の神経核に変化が生じ，このうち内側視索前野・弓状核・扁桃体内側核などの雄性化によって，エストロゲンの LH 分泌に対する刺激的フィードバック機構 (stimulating feedback mechanism，ポジティブ・フィードバック機構 positive feedback mechanism) が作動しなくなることが明らかにされている．この刺激的フィードバック機構の欠如により，持続性無排卵となったものがアンドロゲン不妊ラットである．

齧歯類においては，性腺からの性ホルモン分泌は周生期と性成熟期とに亢進する．この2つの時期における性ホルモンの効果には明瞭な差異があり，それぞれ組織化効果 (organizing effects) と活性化効果 (activation effects) と称されている．組織化効果とは，周生期の性ホルモンが発育途上にある種々の臓器・細胞に作用した結果生じる恒久的な形態学的・機能的性差を指す．このうち，アンドロゲンによる乳頭の退縮[33]，前立腺の誘導[34]，骨盤の雄性化，外性器の雄性化[35]，顎下腺顆粒導管部の雄性化，会陰皮膚メラノサイトの誘導[36]，性的二型性を示す神経核[24)37)~39] などの形態学的性差は，周生期のアンドロゲン作用直後より確認することが可能であり，性成熟後もこの性差が維持される．これに対し，機能的性差は，性的非活動期である新生仔期・乳児期・幼児期には多くが不顕性である．春機発動前期以降に性腺からの性ホルモン供給が開始されると，性ホルモンの活性化効果 (activation effects) として間脳－下垂体－性腺系などの性的活動が開始される．その結果，組織化効果によって生じた機能的性差が顕性となる．このような機能的性差の例としては，体重増加におよぼすアンドロゲンの効果[40]，アンドロゲン負荷による雄型性行動パターンの出現[41)~43]，アンドロゲンまたはエストロゲンの負荷時の肝臓における 7α-ステロイド水酸化酵素や 16α-ステロイド水酸化酵素あるいはその他の P_{450} の酵素活性[44]・アンドロゲンによる腎臓の β-グルクロニダーゼ活性・アンドロゲンおよびエストロゲンによる骨細胞活性の調節[45] などの性差が知られている．雄型の性行動の性分化についてみると，雄では周生期のTが視床下部腹内側核背外側部を含むいくつかの神経核を肥大させ，幹シナプスと棘シナプ

スとを増加させて雄型に分化させ，成熟後には睾丸からのTが作用し，その活性化効果として雄型の性行動であるマウンティング (mounting) を示すようになる．この雄では，エストロゲンを投与しても雌型の性行動であるロルドーシス (lordosis) を示さない．一方，雌ではアンドロゲンの関与なしに性行動の中枢は発育し，成熟後は卵巣からのエストロゲンに反応してロルドーシスを示す．この雌に，アンドロゲンを投与してもマウンティングはほとんどみられない．また，排卵能についてみると，雌の脳では成熟後に卵巣からのエストロゲンに反応してLH を大量に放出して排卵を惹起することができるのに対し，雄の脳では周生期のTによりこの LH 放出能を喪失する．この排卵能の喪失も周生期のアンドロゲンによる組織化効果とみなされる．

このように，雄型の機能的特徴は，周生期と成熟後の両時期におけるアンドロゲンの作用，すなわちその組織化効果と活性化効果とによって顕性化される．これに対し，雌型の機能的特徴は，周生期にアンドロゲンの作用が欠如するか，あるいはエストロゲンの作用を受けて雌型の形態・機能を獲得したのちに，成熟後に至り雌性ホルモンであるエストロゲンが作用することにより顕性化される．したがって，活性化による生理的な性差の発現は組織化に関与した性ホルモンと同じホルモンによって行なわれるのが一般的と考えられ，この性ホルモンは個体の性腺に固有の性ホルモンである．これに対し，アンドロゲン不妊ラットでは，周生期に外因性のアンドロゲンが作用し雄型の組織化が行なわれた後，成熟後に卵巣固有の雌型のホルモンによって生殖機能の活性化が行なわれるものであり，特異な病態といえる．

DHA を新生仔期のラットに投与し，生殖機能に及ぼす影響を検索した報告は少ない．今回まず，各用量の DHA-Ac を1日齢に投与し腟開口および発情周期におよぼす影響について検討したが，これまでに Mallampati ら[46]は，0.25mg の DHA を5日齢のホルツマン (Holtzmann) 系ラットに投与し，腟開口日や発情周期に影響はみられなかったと報告している．近ら[47]は，4日齢のスプラーグ・ドーレイ (Sprague-Dawley) 系雌ラットに 1.0mg の DHA または DHA-S を投与しても発情周期に変化が認められなかったが，1.15mg 以上の DHA を投与するとほぼ全例が100日齢までに連続発情を示すようになったと報告し，われわれの教室の寺田ら[48]は，生後18時間以内のウィスター系雌ラットに 0.5mg～5.0mg の DHA-Ac を投与し，投与量依存性に腟開口日日齢の早発化が起こったこと，0.5mg ないし 1.0mg の DHA-Ac の投与で各々 33%, 93% に散発排卵がみられたこと，5.0mg の DHA-Ac 投与では腟開口後全例が連続発情を示したことを報告している．さらに，Mohri ら[49]も寺田らと同様の条件でウィスター系雌ラットに DHA-Ac を投与して100日齢まで腟スメア像の観察を行ない，0.1mg 以下の投与量では発情周期に変化が認められなかったが， 0.2mg, 0.5mg, 1.0mg, 2.5mg 投与によりそれぞれ4/31，11/28，13/18，21/21匹に連続発情がみられたと報告している．Götz ら[50]は，ウィスター系雌ラットに1ないし 5mg の DHA を2日齢より隔日5回投与すると，投与量に応じて発情周期の周期性が低下することを報告している．さらに，当教室の打出[5]が5日齢ウィスター系雌ラットに体重 100g 当り 1mg, 2mg, 10mg の DHA-Ac を投与した成績では，10mg 投与ラットにのみ不整周期を示すものの割合が増加したとしている．これらの成績を総括すると，新生仔雌ラットに 0.2mg 以上の DHA-Ac あるいは1.15mg 以上の DHA を投与することにより，投与量に依存して腟開口の早発化がみられ持続発情の出現頻度が高くなるが，これ以下の投与量では発情周期に変化は生じないものと考えられる．今回の実験成績もこれらの成績と一致するものであったが，発情周期の変化についての詳細な検討から DHA-Ac 投与量の増加に伴って不規則周期から遅発性連続発情を経て連続発情へと発情周期が変化していく過程が明らかにされ，またDHA-Ac 投与量の増加に伴い遅発性連続発情ラットでの持続発情の初発日が早くなることが示された．

今回の DHA-Ac 投与ラットに認められた一連の発情周期の周期性の変化については，TP 投与によるアンドロゲン不妊ラットでも観察されることが報告されている[51)~53)]．この TP 投与によるアンドロゲン不妊ラットでは，性成熟後に刺激的フィーバック機構が低下ないし消失していること，この刺激的フィーバック機構の消失は TP 投与量が多いほどより早い時期から認められるようになること[54)~56)]，TP 投与量に応じて PRL 値が上昇すること[46)54)57)~61)]，黄体維持機能が低下していること[61)62)]などが報告されている．DHA-Ac 投与ラットで刺激的フィーバック機構の有無については今回直接検討しなかったが，25日齢以降の血中 LH の変動が対照群より小さくなっていたこと，さらに性成熟後の血中 LH 値が14時と20時とで有意差を示さなかったことなどから，DHA-Ac 投与ラットにおいてもLH の日内変動の欠如と LH 放出反応の低下があるものとみなされた．Mohri ら[49]も，DHA-Ac 投与ラットにおいては，内側視索前野および弓状核の電気化学刺激に対する LH 放出反応がTP 投与ラットの放出反応に比較して低下していると報告している．また，今回の検討で1日齢 DHA-Ac 投与ラットに高PRL 血症がみられることも確認された．これらの点を考慮して，1日齢 DHA-Ac 各用量の投与ラットにみられた一連の発情周期の変化については次のように考えられる．すなわち，1.0mg の DHA-Ac 投与を受けたラットでは刺激的フィードバック機構が軽度に障害されているものと考えられ，血中エストロゲンが閾値を越えて上昇しても必ずしも LH 放出が起こらず発情期が延長する．また，合併する高 PRL 血症のため時々偽妊娠に入るものと考えられるが，その黄体維持機構は不十分で比較的早期に偽妊娠が終了する．この結果，種々の長さの発情期と発情間期とが不規則に反復されたものが不規則周期と理解される．これに対し，2.0mg の DHA-Ac が投与された場合には，腟開口後しばらくの間刺激的フィードバッグ機構が存在して周期性が発現されるものの，やがて刺激的フィードバック機構は低下・消失して周期性のない持続発情状態に移行していく．これが遅発性連続発情と考えられる．また，2.5mg のDHA-Ac 投与では刺激的フィードバック機構が完全に欠如するため，腟スメア像は腟開口直後より持続的に発情期像を示して連続発情となるものとみなされる．

新生仔雌ラットへの 0.5～1.0mg の TP 投与は，肛門生殖結節間距離の延長と腟口狭窄ないし閉鎖をもたらすことが知られている[28)58)59)62)~64)]．これに対し，1日齢 DHA-Ac 投与ラットに観察された腟口狭窄は軽度であったこと，また1日齢の DHA-Ac 投与による肛門生殖結節間距離の延長は軽度であるとの報告[48)]がみられることから DHA-Ac の外性器に対する作用は TP よりも弱いものと考えられた．外性器の皮膚は 5α-ステロイド還元酵素を有しており，睾丸由来のTが 5α-ジヒドロ

テストステロンに転換されて細胞内のアンドロゲン受容体に結合しすることにより外性器の雄性化作用を示すことが明らかにされている．DHA-Acの外陰皮膚に対する作用もDHA-Acから転換されたTまたはアンドロステンジオン (androstenedione) などを介するものと考えられ，DHA-Ac の腟口狭窄や生殖結節間距離の延長に及ぼす作用はTよりはるかに弱いものと推察された．

腟開口日日齢は，各用量の DHA-Ac 1日齢投与のすべての群においてその早発化が認められた．春機発動前のさまざまな日齢のラットに DHA または DHA-Ac を投与すると種々の程度に腟開口日日齢が早発化することについては，これまでにも多くの報告がある[5,48,49,65~67]．今回の1日齢 DHA-Ac 1.0mg 投与の成績を，投与日齢は異なるが体重当りの投与量がほぼ等しい当教室の打出[5]の成績と併せて図6に模式的に示し，その投与時期による早発化の機序の違いについて考察した．図6にみられるように，DHA-Ac 投与は1日齢から生理的な腟開口日日齢 (図には36日齢として示した) までのいずれの日齢での投与でも腟開口日日齢の早発化をもたらし，その効果は10・15日齢の投与で最大となる． 1～20日齢での投与では初回排卵の早発化を伴わないのに対し，25～30日齢以降の投与では腟開口・初回発情に引き続き排卵が招来される[66,68]．最近の研究によれば，ラットにおいては初回発情日の約2日前にあたる早期発情前期 (early proestrus) に卵巣から分泌される芳香化可能なアンドロゲン (T とアンドロステンジオン，主に T) が，直接あるいは局所で芳香化されて腟閉鎖膜に作用することにより生理的腟開口が起こることが明らかにされている[69,70]．そこで，今回検索した血中ホルモン値の日齢的変動に関する成績を中心に考慮すると，各投与時期における DHA-Ac の腟開口促進効果については次のごとく理解できる．

すなわち，DHA-Ac の新生仔期の投与では，今回の1日齢 DHA-Ac 2.5mg 投与群の腟開口周辺期の血中 T, E2 値に対照群との間に有意差が認められなかった成績などから，投与された

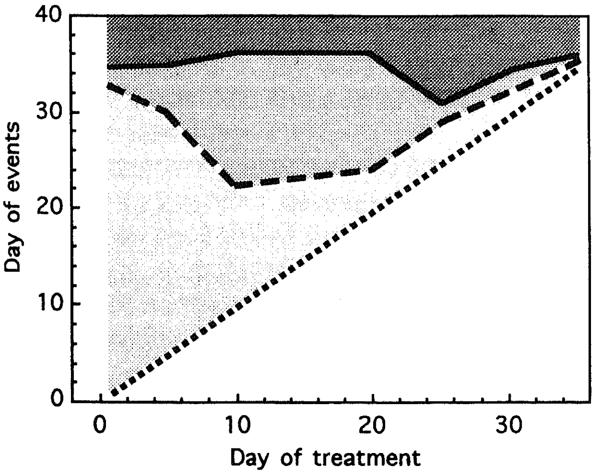

Fig. 6. Relationship between the day of a single injection of DHA-Ac and the advancement of vaginal opening and the first estrus. Data between day 5 and 30 of age were cited from literatures[5,16,17,48]. Ideal vaginal opening in accordance with the first estrus is adjusted to day 36 of age. Dotted line, treatment with DHA-Ac (20 to 45 mg/kg body weight); dashed line, vaginal opening; solid line, the first estrus.

DHA-Ac が新生仔期に腟閉鎖膜と腟壁の細胞とに直接作用しそのホルモン感受性を変化させて，腟開口日日齢の早発化と初回発情日齢の早発化をもたらしたものと考えられる．この場合の腟開口には，生理的腟開口時にみられるような LH のサージはみられず，排卵も起こらない．腟閉鎖膜の細胞のホルモン感受性が亢進しているために，30日齢前後の卵巣から分泌される比較的少量のアンドロゲンに反応して腟閉鎖膜の融解が開始されるものと理解される．また，連続発情を示すラットの血中 E2 値は，対照群の発情間期Ⅱや発情前期の値よりも低値であった今回の成績から，早期の角化像の出現についても腟壁細胞自体のエストロゲン感受性の変化によるものと推察できる．すなわち，腟開口日日齢および初回発情日日齢の早発化は，性中枢に対する組織化効果ではなく，腟閉鎖膜および腟壁細胞に対する組織化効果とみなすことができる．Mallampati らも，TP 投与ラットで腟開口周辺期の内分泌環境に変化がみられなかったことから，TP が直接腟壁細胞に作用して腟開口を促進させるものと推定している[46]．さらに，Jacobson ら[71]は，TP 1.5mg 投与した雌ラットと対照群ラットとの間で卵巣の交換移植を行ない，TP の腟開口早発効果は腟閉鎖膜に対する直接作用と推論している．なお，マウスでは新生仔期に芳香化可能なアンドロゲンを大量に投与すると腟壁細胞が恒久的に変化して，エストロゲン非依存性に持続的な角化を示すようになることが知られている[72~74]。

10～20日齢 DHA-Ac 投与では，図6に示すごとく腟開口日日齢が著しく早くなるが，初回発情日日齢の早発化はみられない[5]．10日齢 DHA-Ac 投与の成績では[4]，腟開口周辺期の内分泌環境に対照群との間に違いがみられなかったことから，この時期の DHA-Ac 投与は腟閉鎖膜の細胞のホルモン感受性を著しく亢進させるために，20日齢前後のホルモン環境に反応して腟閉鎖膜の融解が進行するものと考えられる．一方，この時期の DHA-Ac 投与では初回発情日日齢の早発化は認められなかったことから[5]，腟壁細胞のエストロゲン感受性には変化が起こらなかったものと考えられる．すなわち，10～20日齢には腟閉鎖膜の組織化効果に対する感受性が最も高くなっているが，すでに腟壁細胞に組織化効果を生じる時期，すなわち腟壁細胞の臨界期が過ぎているものとみなされる．

DHA-Ac 30日齢投与では，投与1～2日後に腟開口が起こる[5,17]．この時期における投与では，投与された DHA-Ac が直接あるいはTに転換されて腟閉鎖膜に直接作用し腟閉鎖膜の融解をもたらすものと推定される[17]．また，この時期には不十分ながら刺激的フィードバック機構がすでに作動し得る状態となっているので，DHA-Ac はエストロゲンに転換された後に中枢に作用して LH サージを招来し，初回発情と初回排卵を惹起することになる[70]．この場合，大量の DHA-Ac が腟閉鎖膜の直接作用するため腟壁の角化が起こるよりも前に腟開口が起こるものと考えられ，腟開口と初回発情とがほぼ同時に起こる生理的腟開口とは異なり，腟開口が1ないし2日初回発情に先行する．さらにこの時期における DHA-Ac 投与では，2回目以降の排卵は通常の春機発動まで起こらない．すなわち，30日齢頃には腟壁細胞および腟閉鎖膜細胞はいずれも組織化効果の臨界期を過ぎており，投与された DHA-Ac は一時的に視床下部－下垂体－卵巣軸の活性化をもたらすものと解される．

成熟期の卵巣重量に及ぼす DHA-Ac 投与の影響については，これまでに1～4日齢に DHA または DHA-Ac を投与した

ラットでは対照群より軽くなることが報告されている[47)~50)]．この卵巣には，大型の嚢腫状卵胞と成熟卵胞および閉鎖卵胞とが混在しており，黄体は観察されない．これらの組織学的特徴は，TP 投与によるアンドロゲン不妊ラットの特徴と一致している[59)63)75)~78)]．今回，DHA-Ac 投与後の卵巣重量の変化を経日齢的に観察したところ，その投与直後より7日間に渡り卵巣の相対重量は対照群より増加を示す相対的増加期を経て，15日齢以降には逆に対照群より減少を示す相対的減少期となることが明らかになった．なお，今回の実験成績には記さなかったが，同時に施行した卵巣の組織学的観察によれば，この相対的増加期には1次および2次卵胞の形成が亢進がみられること，相対的減少期には一次および二次間質腺の発達が不良となることが認められた．また，卵巣重量の相対的増加期には，E2とTは増加しLHとFSHは低下していたことから，この時期の卵胞形成の亢進はDHAあるいはその代謝産物であるE2ないしTの卵胞に対する直接作用によるものと推定される．実際，性成熟期以降の卵巣では小卵胞はゴナドトロピンに依存せずにTやE2に依存した発育を示すことが知られている[79)]．TP 投与によるアンドロゲン不妊ラットでも，20日齢以降に間質腺の発育が不良となり[78)]，卵巣相対重量の減少がみられることが報告されているが[60)80)]，ホルモン投与直後の卵胞形成の亢進は認められていない[78)]．1日齢に TP 1.25mg を投与したラットでも，投与後数日間エストロン・E2・Tが上昇することが報告されており[81)]，TP 投与後に卵胞形成の亢進が認められない理由は不明である．

子宮重量についても，DHA-Ac 2.5mg 投与群では10日齢を境にして相対的増加期から相対的減少期への移行が認められた．2～5日齢にみられた子宮重量の相対的増加は，卵巣の場合と同様に，DHA-Ac ないしその代謝産物であるエストロゲンによる直接作用によるものと考えられ，相対的減少期における子宮重量の減少にはエストロゲンに対する反応性の変化が関与している可能性が示唆された．子宮重量の相対的減少は，成熟後の DHA-Ac 2.5mg 投与群および成熟後の TP 0.5mg 投与群でも観察された．TP 0.5mg 投与群のホルモン環境については直接検索しなかったが，DHA-Ac 2.5mg 投与群では血中 E2 が対照群の発情間期と同等かあるいはそれ以上の値に維持されていたことから，成熟後の子宮重量の減少にも組織化効果によるホルモン感受性の変化が関わっているものと推定された．

そこで，成熟後の子宮のエストロゲンに対する反応性を検討した．子宮のエストロゲンに対する反応は，その発現時期と機構とにより早期反応 (early responses) と後期反応 (late responses) の2相に分けられている．早期反応は，エストロゲン投与後数時間以内にみられる反応であり，細胞内外の水分貯留・充血・カルシウムイオンの細胞内流入・ヒスタミンの遊離・好酸球浸潤・RNA や DNA および蛋白合成基質の細胞内取り込みの増加・ぶどう糖酸化の亢進などが含まれる．後期反応は，早期反応にみられる反応とほぼ同じ反応がさらに亢進して1ないし3日以上に渡って持続するもので，早期反応とは別の機構により発現されるものと考えられている．今回の検討では早期反応については子宮内膜間質の水分貯留などの非遺伝子反応 (non-genomic response) を示す指標とされている子宮内膜間質表層 RVCD と細胞肥大などの遺伝子反応 (genomic response)の指標と考えられている子宮輪状筋層 RVCD をパラメーターとして，子宮構成細胞別に検討を行なった[82)]．その結果，DHA-Ac 2.5mg 投与群では，エストロゲンの欠如した状態でも子宮内膜間質の水分含有量が多くなっていること，E2 投与に対する反応性は内膜間質で低下しているものの子宮輪状筋層では低下がみられないことが示された．これに対し，TP 0.5mg 投与群では，子宮輪状筋層の E2 に対する反応性に低下が認められた．これらの結果から，TP 0.5mg 投与群・DHA-Ac 2.5mg 投与群はともに E2 に対する反応性の低下を示すが，細胞成分ごとにみると両者の E2 反応性低下には違いがあると考えられた．Arriaza ら[83)] および Mena ら[48)] は TP 投与によるアンドロゲン不妊ラットについて子宮のエストロゲン反応性を検討しており，Tについても組織化効果の臨界期が子宮の細胞成分ごとに異なることを報告している．なお，ジエチルスチルベステロール (diethylstibesterol) 投与を受けた妊婦から生まれた児では，子宮の発育異常・傍卵巣嚢腫・不妊・腟癌などの発生率が高いことが知られており[85)]，ヒトにおいては周生期の外因性の性ステロイドがミューラー管などの臓器に組織化効果を惹起させて疾病の原因となる可能性があるものと考えられる．

成熟後の体重増加に及ぼす影響については，TP 0.5mg 投与群では対照群より有意の増加がみられたのに対し，DHA-Ac 投与群ではその 2.5mg 投与群において対照群より若干軽くなる傾向がみられた．新生児期の TP 投与により，体重増加量が増加することはこれまでにも多く報告されている[40)46)63)86)]．また，DHA およびその代謝産物であるエチオコラノロンなどについては，ラット[63)87)88)] およびマウス[89)90)] において成熟後の長期経口投与によって体重増加の抑制されることが報告されているが，新生児期の投与による効果に関する検討は Mohri らの報告[49)] と今回の報告のみと思われる．新生児期にアンドロゲンが存在すると，成長ホルモンの分泌パターンが雄性化すること，成熟後成長ホルモンの体重増加作用に対するテストステロンの協調作用がみられるようになることなどが報告[40)] されているものの，新生仔期のアンドロゲンが体重増加促進効果を示す機序については十分明らかになっていない．今回の実験で DHA-Ac 投与ラットで体重増加促進効果がみられなかった理由も含め今後の検討が必要と考えられる．

以上の検討により，1日齢 DHA-Ac 2.5mg 投与によりもたらされる発情周期の変化や卵巣の組織学的所見は，TP 0.5mg 投与によるアンドロゲン不妊ラットの所見と類似しているものとみなされた．しかし，卵巣のゴナドトロピン反応性・子宮壁のエストロゲン反応性・腟閉鎖膜への作用および体重増加におよぼす影響については TP によるアンドロゲン不妊ラットとは異なっているものと考えられた．また従来より，TP によるアンドロゲン不妊ラットは PCOS の疾患モデルのひとつと考えられてきた．これまでに齧歯類で PCOS モデルとして検討されてきたのは，hCG を長期投与した甲状腺機能低下ラット[91)]，連続照明下で飼育したラット[54)55)92)]，TP または安息香酸エストラジオール投与によるアンドロゲン不妊ラットもしくはエストロゲン不妊ラット (estrogen sterilized rat)，春機発動前期より DHA はまたは DHA-Ac を投与したラット[16)] またはマウス[93)]，成熟後 2μg の吉草酸エストラジオールを1回投与したラット[94)95)]，発情期の16時に100単位の PMSG を1回投与したラット[96)] などである．これらの PCOS モデルが満たすべき条件としては，多嚢胞性卵巣，発情周期の規則性の低下，LH および LH/FSH の比の高値，卵巣におけるアンドロゲン合成の亢進

と相対的なエストロゲン合成の低下などが挙げられているが[18]，すべての条件を同時に満たす齧歯類の PCOS モデルはこれまでのところ得られていない．今回の検討では，1日齢 DHA-Ac 2.5mg 投与ラットは，上述の前2項の条件を満たすものの後2項の条件は満たさず，T あるいは TP 投与によるアンドロゲン不妊ラットに最も近いと考えられた．

結 論

DHA-Ac を1日齢の雌ラットに投与してその生殖機能に及ぼす影響を TP 投与ラットと比較検討した．

1．TP（1匹あたり 0.5mg）投与群では対照群に比し有意の体重増加が認められたのに対し，DHA-Ac（1匹あたり 1.0mg, 2.0mg, 2.5mg）投与群のうち 2.5mg 投与群では対照群より若干体重が少なかった．

2．DHA-Ac（1.0mg, 2.0mg, 2.5mg）投与群では，膣開口日日齢の早発化・初回発情日日齢の早発化・膣口の軽度狭窄・発情周期の周期性の低下がみられた．なお，TP 0.5mg 投与群では高度の膣口狭窄ないし自然膣開口の欠如がみられ，膣スメアは連続角化像を示した．

3．DHA-Ac 2.5mg 投与群および TP 0.5mg 投与群の成熟後の卵巣には，多数の胞状卵胞と閉鎖卵胞および数個の大型の嚢胞が観察された．いずれも黄体が欠如しており，卵巣重量は対照群の約1/2〜1/3であった．

4．成熟後の PMSG-hCG による排卵誘発では，DHA-Ac 2.5mg 投与群の排卵率および排卵数は TP 0.5mg 投与群より低下していた．

5．E2 に対する子宮の反応性を検討したところ，DHA-Ac 2.5mg 投与群では子宮内膜間質浅層 RVCD の低下がみられたのに対し，TP 0.5mg 投与群では子宮筋層 RVCD の低下がみられた．

6．DHA-Ac 2.5mg 投与群の卵巣相対重量および子宮相対重量は，8日齢までは対照群に比し増加を示したのに対し，15日齢以降30日齢までは対照群に比し減少を示した．この卵巣および子宮重量の相対的増加期には血中 E2・T の高値および血中 LH・FSH の低値がみられ，相対的減少期には血中 PRL の高値がみられた．

7．DHA-Ac 2.5mg 投与群では，成熟後の血中 PRL 値の上昇と LH の周期性分泌の欠如が認められた．血中 LH・FSH・E2・T 値は発情間期から発情前期に相当する値であった．

謝 辞

稿を終えるに臨み，ご指導とご校閲を賜わりました西田悦郎教授に慎んで謝意を表します．また，終始ご指導とご教示をいただきました赤祖父一知助教授ならびに寺田督講師に深謝致します．研究の遂行に御協力くださいました教室員各位，穴田幸子，相川みち代，棚田留美子の各事務官に厚く御礼申し上げます．

なお，本論文の要旨の一部は第58回日本内分泌学会総会（名古屋，1985），第59回日本内分泌学会総会（松本，1985）および第32回日本不妊学会総会（金沢，1987）において発表した．

文 献

1）**Akasofu, K., Tomita, Y., Araki, K., Shinohara, H., Seki, K., Yamashiro, G. & Nishida, E.**: Influence of aging on serum dehydroepiandrosterone, DHA sulfate and 11-deoxy-17-ketosteroids in women. Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., **31**, 1871-1876 (1979).

2）**Tomita, Y., Akasofu, K., Araki, K., Seki, K., Yamashiro, G., Aratani, J. & Nishida, E.**: Changes of serum concentrations of dehydroepiandrosterone, its sulfate, 11-deoxy-17-ketosteroids, cortisol, estradiol, testosterone, prolactin and gonadotropins in normal pre-pubertal and pubertal females. Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., **33**, 1780-1788 (1981).

3）**Parker, L. N.**: Adrenal Androgens in Clinical Medicine, 1st ed., p98-117, Academic Press, San Diego, 1989.

4）**Uchide, K., Shozu, M., Tomimatsu, N., Terada, S., Akasofu, K. & Nishida, E.**: Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian function in rats. *In* K. Ichinoe, S. J. Segal & L. Mastoroianni (eds.), Presentation on Tuboovarian Function in Gynecologic Benign and Malignant Disease, 1st ed., p316-325, Raven Press, New York, 1988.

5）**打出喜義**：雌ラットの性機能に及ぼす dehydroepiandrosterone 投与の影響に関する研究．十全医会誌，**102**, 349-357 (1993).

6）**Zamenhof, S. & van Marthens, E.**: Litter size, maternal parameters, and brain and body parameters of neonatal rats. Biol. Neonate, Foetal Neonatal Res., **45**, 296-298 (1984).

7）**Tobet, S. A., Dumlap, J. L. & Gerall, A. A.**: Influence of fetal position on neonatal androgen-induced sterility and sexual behavior in female rats. Horm. Behav., **16**, 251-258 (1982).

8）**Slob, A. K., Ooms, M. P. & Vreeburg, J. T. M.**: Sex ratio in utero and the plasma concentration of testosterone in male and female rat foetuses. J. Endocrinol., **79**, 395-396 (1978).

9）**Richmond, G.**: Further evidence for masculinization of female rats by males located caudally in utero. Horm. Behav., **18**, 484-490 (1984).

10）**杉田直道，窪田与志，生水真紀夫，三輪正彦，寺田 督，西田悦郎**：膣上皮細胞についての組織細胞学的研究．第1報．妊娠ラット膣上皮細胞の経時的変化－正常性周期細胞との比較を中心として．日臨細胞会誌，**23**, 33-39 (1984).

11）**Astwood, E. B.**: A Six-hour assay for the quantitative determination of estrogen. Endocrinology, **23**, 25-31 (1938).

12）**Grunert, G., Porcia, M. & Tchernitchin, A. N.**: Differential potency of oestradiol-17β and diethylstilboestrol on separate groups of responses in the rat uterus. J. Endocrinol., **110**, 103-114 (1986).

13）**村上弘一**：雌ラットにおける血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究．十全医会誌，**100**, 693-710 (1991).

14）**Roy, S., Mahesh, V. B. & Greenblatt, R. B.**: Effect of dehydroepiandrosterone and Δ4-androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. Nature, **196**, 42-43 (1962).

15）**Black, J. B. & Mahesh, V. B.**: Effect of dehydroepiandrosterone (DHA) on pituitary gonadotropins on ovulation in the rat. Fed. Proc., **28**, 506 (1969).

16）**Knudsen, J. F., Costoff, A. & Mahesh, V. B.**:

Dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat. Fertil. Steril., **26**, 807-817 (1975).

17) **Ward, R. C., Costoff, A. & Mahesh, V. B.**: The induction of polycystic ovaries in mature cycling rats by the administration of dehydroepiandrosterone (DHA). Biol Reprod., **18**, 614-623 (1978).

18) **Goldzieher, J. W.**: Polycystic ovarian disease. Fertil. Steril., **35**, 371-394 (1981).

19) **Mahajan, D. K.**: Polycystic ovarian disease: animal models. Endocrinol. Metab. Clin. North Am., **17**, 705-732 (1988).

20) **西田悦郎，寺田　督，木原順子，富田哲夫，大崎勝三**：Androgen 投与による性周期異常ラットの妊孕率および胎仔発育に関する研究．厚生省心身障害研，年度研報，母体および胎児に対する外的因子に関する研究（厚生省心身障害研究，母体外因研究班），p13-18, 1977.

21) **Takasugi, N.**: Vaginal cornification in persistent-estrus mice. Endocrinology, **72**, 607-619 (1972).

22) **Kawakami, M. & Terasawa, E.**: A possible role of the hippocampus and the amygdala in the androgenized rat: effect of electrical or electrochemical stimulation of the brain on gonadotropin secretion. Endocrinol. Jpn., **19**, 349-358 (1972).

23) **Arai, Y.**: Effect of electrochemical stimulation of the amygdala on induction of ovulation in different types of persistent estrous rats and castrated male rats with an ovarian trasplant. Endocrinol. Jpn., **18**, 211-214 (1971).

24) **Arai, Y. & Matsumoto, A.**: Synapse formation of the hypothalamic arcuate nucleus during post-natal development in the female rat and its modification by neonatal estrogen treatment. Psychoneuroendocrinology, **3**, 31-45 (1978).

25) **Naftolin, F., Keefe, D., Apa, R., Palumbo, A. & Garcia, S. L.**: The apparent paradox of sexual differentiation of the brain. Contrib. Gynecol. Obstet., **18**, 24-32 (1991).

26) **Walker, R. F. & Timiras, P. S.**: Loss of serotonin circadian rhythms in the pineal gland of androgenized female rats. Neuroendocrinology, **31**, 265-269 (1980).

27) **Demarest, K. T., McKay, S. W., Riegle, G. D. & Moore, K. E.**: Sexual difference in tuberoinfundibular dopamine nerve activity induced by neonatal androgen exposure. Neuroendocrinology, **32**, 108-113 (1981).

28) **Lookingland, K. J., Wise, P. M. & Barraclough, C. A.**: Failure of the hypothalamic noradrenergic system to function in adult androgen-sterilized rats. Biol. Reprod., **27**, 268-281 (1982).

29) **Raum, W. J., Marcano, M. & Swerdloff, R. S.**: Nuclear accumulation of estradiol derived from the aromatization of testosterone is inhibited by hypothalamic beta-receptor stimulation in the neonatal female rat. Biol. Reprod., **30**, 388-386 (1984).

30) **Reznikov, A. G., Nosenko, N. D. & Tarasenko, L. V.**: Augmentation of the sterilizing effect of neonatal androgenization with tropolone, a catechol-O-methyltransferase inhibitor, in female rats. Neuroendocrinology, **52**, 455-459 (1990).

31) **Dörner, G.**: Hormone-dependent brain development and neuroendocrine prophylaxis. Acta Anat., **94**, 4-22 (1989).

32) **Perakis A. & Stylianopoulou, F.**: Effects of a prenatal androgen peak on rat brain sexual differentiation. J. Endocrinol., **108**, 281-285 (1986).

33) **Imperato-McGinley, J., Binienda, Z., Gedney, J. & Vaughan, E. D. J.**: Nipple differentiation in fetal male rats treated with an inhibitor of the enzyme 5α-reductase: definition of a selective role for dihydrotestosterone. Endocrinology, 118, 132-137 (1986).

34) **George, F. W. & Peterson, K. G.**: 5α-DHT formation is necessary for embryogenesis of the rat prostate. Endocrinology. 122, 1159-1164 (1988).

35) **Imperato-McGinley, J., Binienda, Z., Arthur, A., Mininberg, D. T., Vaughan, E. D. J. & Quimby, F. W.**: The development of a male pseudohermaphroditic rat using an inhibitor of the enzyme 5α-reductase. Endocrinology, **166**, 807-812 (1985).

36) **Wilson, M. J.**: Inhibition of development of both androgen-dependent and androgen-independent pigment cells in scrotal skin dermis of the rat by anti-androgen treatment during fetal growth. Endocrinology, **221**, 321-325 (1983).

37) **Raisman, G. & Field, P. M.**: Sexual dimorphism in the neurophil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. Brain Res., **54**, 1-29 (1973).

38) **Gorski, R. A., Gordon, J. H., Shryne, J. E. & Southam, A. M.**: Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain Brain Res., **148**, 333-346 (1978).

39) **Mizukami, S., Nishizuka, M. & Arai, Y.**: Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. Exp. Clin. Endocrinol., **79**, 569-575 (1983).

40) **Klindt, J., Ford, J. J. & Macdonald, G. J.**: Synergism of testosterone propionate with growth hormone in promoting growth of hypophysectomized rats: effect of sexual differentiation. J Endocrinol., **127**, 249-256 (1990).

41) **Thomas, D. A., Howard, S. B. & Barfied, R. J.**: Influence of androgen on the development of sexual behavior in the rat. Ⅱ. Time and dosage of androgen administration during the neonatal period and masculine and feminine copulatory behavior in females. Horm. Behav., **17**, 308-315 (1983).

42) **Parsons, B., Rainbow, T. C. & McEwen, B. S.**: Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progestin receptors in rat brain. Endocrinology, **115**, 1412-1417 (1984).

43) **McEwen, B. S.**: Steroid hormones: effect on brain development and function. Horm. Res., **37** (suppl. 3), 1-10 (1992).

44) **Lucier, G. W., Rumbaugh, R. C., Sloop, T. C. & Thompson, C. L.**: Sex differentiation of liver protein synthesis. *In* M. Marois & H. S. Bennett (eds.), Basic and

Medical Science, Education and Future Strategies, 1st ed., p381-387, Alan R. Liss, New York, 1985. (Progress in clinical and biological research, 163c).
45) **Weisman, W., Cassorla, F., Malozowski, S., Krief Jr., R. J., Goldray, D., Kye, A. M, & Sömjen, S.:** Sex-specific response of bone cells to gonadal steroids: modulation in perinatally androgenized females and in testicular feminized male rats. Steroids, **58**, 126-133 (1993).
46) **Mallampati, R. S. & Johson, D. C.:** Gonadotropins in female rats androgenized by various treatment: prolactin as an index to hypothalamic damage. Neuroendocrinology, **15**, 225-266 (1974).
47) **近鶴次郎，小川誠一，唐沢陽介:** Hormonal steroid とその ester の雌ラット新生仔の性分化に及ぼす作用. Proceeding of 3rd Symposium on Drug Metabolism and Action, p98-110, 福岡, 1971.
48) **寺田　督，木原順子，大崎勝三，杉田直道，細野　泰，西田悦郎:** 月経周期異常婦人の妊娠による心身障害発生の防止対策に関する研究. 厚生省心身障害研究，年度研報，母体および胎児に対する外的因子に関する研究 (厚生省心身障害研究，母体外因研究班), p85-89, 1979.
49) **Mohri, M., Nagatsuka, Y., Tadokoro, Y. & Kawakami, M.:** Changes of the limbic-hypothalamic system in sterilized rat by the neonatal administration of dehydroepiandrosterone. *In* E. Erdözi (eds.), Neuropeptides, Neurotransmitters and Regulation of Ecdocrine Process, 1st ed., p79-86, Akadémiai Kiadó, Budapest, 1986.
50) **Götz, F., Pfeiffer, U., Rohde, W. & Dörner, G.:** Influence of neonatally administered dehydroepiandrosterone on reproduction of rats. Endocrinol. Exp., **17**, 11-15 (1983).
51) **Swanson, H. E. & van der Werff ten Bosch, J. J.:** The early-androgen syndrome; its development and the response to hemi-spaying. Acta. Endocrinol., **45**, 1-12 (1964).
52) **Sheridan, P. J., Zarrow, M. X. & Denenberg, V. H.:** Androgenization of the neonatal female rat with very low doses of androgen. J. Endocrinol., **57**, 33-45 (1973).
53) **Gorski, R. A.:** Sexual differentiation of the brain. *In* D. T. Krieger & J. C. Hughes (eds.), Neuroendocrinology, 1st ed., p215-222, Sinauer Associates, Sunderland, 1980.
54) **Harlan, R. E. & Gorski, R. A.:** Correlations between ovarian sensitivity, vaginal cyclicity and luteinizing hormone and prolactin secretion in lightly androgenized rats. Endocrinology, **101**, 750-759 (1977).
55) **Mennin, S. P. & Gorski, R. A.:** Effects of ovarian steroids on plasma LH in normal and persistent estrous adults rats. Endocrinology, **96**, 486-491 (1975).
56) **Mass, T. E., Matt, D. W., Judd, H. L. & Lu, J. K. H.:** Prepubertal treatment with estrogen or testosterone precipitates the loss of regular estrous cyclicity and normal gonadotropin secretion in adult female rats. Biol. Reprod., 31, 723-731 (1984).
57) **Ratner, A. & Peake, G. T.:** Maintenance of hyperprolactinemia by gonadal steroids in androgen-sterilized and spontaneously constant-estrus rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **146**, 680-683 (1974).
58) **Yogev, L. & Terkel, J.:** Daily rhythm in secretion of prolactin in androgenized female rats. J. Endocrinol., **87**, 327-332 (1980).
59) **Peters, J. A. & Gala. R. R.:** Reduction of elelvated prolactin levels in neonatally androgenized female rats by corticomedial amygdaloid lesions. Endocrinology, **106**, 1740-1746 (1980).
60) **Fujii, T. & Ohtaki, Y.:** Role of ovarian follicles in the regulation of gonadotropin secretion in androgenized rats. *In* T. Fujii & C. P. Channing (eds.), Non-steroidal Regulations in Reproductive Biology and Medicine, 1st ed., p97-106, Pregamon Press., London, 1982.
61) **van der Schoot, P. & de Greef, W.:** Regulation of luteal activity in adult female rats treated neonatally with testosterone propionate. J. Endocrinol., **96**, 417-425 (1983).
62) **Gala, R. R.:** The influence of estrogen administration on plasma prolactin levels in the neonatally androgenized (NA) female rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **166**, 216-220 (1981).
63) **Harris, G. W. & Levine, S.:** Sexual differentiation of the brain and its experimental control. J. Physiol., **181**, 379-400 (1965).
64) **Stylianopoulou, F., Fameli, M., Brountzos, E. & Contopoulos, A. N.:** Neonatal neural organizing effects of exogenous corticosteroids on sexual differentiation of the brain in the female rat. Horm. Behav., 17, 332-341 (1983).
65) **小川誠一，唐沢陽介:** Dehydroepiandrosterone sulfate ならびに enanthate の雌ラット性腺に及ぼす特異な効果. 日不妊会誌, **19**, 145-153 (1974).
66) **Parker Jr, C. R. & Mahesh, V. B.:** Dehydroepiandrosterone(DHA)-induced precocious ovulation: correlative changes in blood steroids, gonadotropins and cytosol estradiol receptors of anterior pituitary gland and hypothalamus. J. Steroid Biochem., 8, 173-177 (1977).
67) **Ducharme, J. R., Morera, A. M., Laurin, P., Collu, R., Audi, L., Jéquier, J. C. & Saez, J.:** Further studies on the relationship of adrenal and gonadal steroids in pubertal development in female rats. Horm. Res., **10**, 130-142 (1979).
68) **Knudsen, J. F. & Mahesh, V. B.:** Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. Endocrinology, **97**, 458-468 (1975).
69) **Mathews, D., Andrews, W. W., Parker Jr, R. & Ojeda, S. R.:** A role for aromatizable androgens female rat puberty. Biol. Reprod., **36**, 836-843 (1987).
70) **Ojeda, S. R. & Urbanski, H. F.:** Puberty in the rat. *In* E. Knobil & J. Neill (eds.), The Physiology of Reproduction, 1st ed., p1677-1737, Raven Press, New York, 1988.
71) **Jacobson, D. & Norgren, A.:** Early effects of testosterone propionate injected into 5 day old rats. Acta Endocrinol., **49**, 453-465 (1965).
72) **Iguchi, T. & Takasugi, N.:** Occurrence of permanent changes in vaginal and uterine epithelia in mice treated

neonatally with progestin, estrogen and aromatizable or non-aromatizable androgens. Endocrinol. Jpn., **23**, 327-332 (1976).

73) **Ohta, Y. & Iguchi, T.**: Development of the vaginal epithelium showing estrogen-independent proliferation and cornification in neonatally androgenized mice. Endocrinol. Jpn., **23**, 333-340 (1976).

74) **Iguchi, T. & Ohta, Y.**: Electron-microscopic study on the development of permanently proliferated and conified vaginal epithelium in mice treated neonatally with androgen. Acta Anat., **108**, 469-480 (1980).

75) **Barraclough, C. A.**: Production of anovulatory, sterile rats by single injection of testosterone propionate. Endocrinology, **68**, 62-67 (1961).

76) **Gorski, R. S. & Wagner, J. W.**: Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. Endocrinology, **76**, 226-239 (1965).

77) **Swanson, H. E. & van der Werff ten Bosch, J. J.**: Sex differences in growth of rats, and their modification by a single injection of testosterone propionate shortly after birth. J, Endocrinol., **26**, 197-207 (1963).

78) **林　要, 大沢悦二, 鷲尾元夫, 古結一郎**: Androgen 不妊ラット卵巣の morphogenesis に関する研究. 日産婦会誌, 25, 1289-1295 (1973).

79) **Kumari, G. L., Datta, J. K., Das, R. P. & Roy, S.**: Evidence for a role of androgens in the growth and maturation of ovarian follicles in rats. Horm. Res., **9**, 112-120 (1978).

80) **Johnson, D. C.**: Sexual differentiation of gonadotropin patterns. Am. Zoologist, 12, 193-205 (1972).

81) **Cheng, H. D. & Johnson, D. C.**: Serum estrogens and gonadotropins in developing androgenized and normal female rats. Neuroendocrinology, **13**, 357-365 (1973/74).

82) **Grunert, G., Fernàndez, S. & Tchernitchin, A. N.**: Methods for the evaluation of responses to estrogen in individual cell types or regions of the uterus. Horm. Res., 19, 253-262 (1984).

83) **Arriaza, C. A., Mena, M. A. & Tchernitchin, A. N.**: Prenatal androgenization selectively modifies some responses to oestrogen in the prepubertal rat uterus. J. Endocrinol., **120**, 379-384 (1989).

84) **Mena, M. A., Arriaza, C. A. & Tchernitchin, A. N.**: Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. Biol. Reprod., **46**, 1080-1085 (1992).

85) **Ennis, B. W. & Davies, J.**: Reproductive tract abnormalities in rats treated neonatally with DES. Am. J. Anat., **164**, 145-154 (1982).

86) **Tartelin, M. F., Shryne, J. E. & Gorski, R. A.**: Patterns of body weight change in rats following neonatal hormone manipulation: A "critical period" for androgen-induced growth increases. Acta Endocrinol., **79**, 177-191 (1975).

87) **Perry, B. N., McCracken, A., Furr, B. J. A. & MacFie, H. J. H.**: Separate roles of androgen and oestrogen in the manipulation of growth and efficiency of food utilization in female rats. J. Endocrinol., 81, 35-48 (1979).

88) **Shepherd, A. & Cleary, M. P.**: Metabolic alterations after dehydroepiandrosterone treatment in Zucker rats. Am. J. Physiol., **246**, 123-128 (1984).

89) **Cleary, M. P., Hood, S. S., Chando, C., Hansen, C. T. & Billheimer, J. T.**: Response of sucrose-fed BHE rats to dehydroepiandrosterone. Nutr. Res., **4**, 485-495 (1984).

90) **Coleman, D. L., Schiwizer, R. W. & Leiter, E. H.**: Effect of genetic backgrounds on the therapeutic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) in diabetes-obesity mutants and in aged normal mice. Diabetes, **33**, 26-32 (1984).

91) **Jones, H. M., Vernon, M. W. & Ruch, M. E.**: Systematic studies invalidate the neonatally androgenized rat as a model for polycystic ovary disease. Biol. Reprod., **36**, 1253-1265 (1987).

92) **Fuxe, K., Höffelt, T. & Nilsson, O.**: Effect of constant light and androgen-sterilization on the amine turnover of the tuberoinfundibular dopamine neurons: blockade of cyclic activity and induction of a persistent high dopamine turnover in the median eminence. Acta Endocrinol., **69**, 625-639 (1972).

93) **Familiari, G., Toscano, V. & Motta, P. M.**: Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. Cell Tissue Res., **240**, 519-528 (1985).

94) **Farookhi, R., Hemmings, R. & Brawer, J. R.**: Unilateral ovariectomy restores ovulatory cyclicity in rats with a polycystic ovarian condition. Biol. Reprod., **32**, 530-540 (1985).

95) **Olmos, G., Naftolin. F., Tranque, P. & Garcia-Segura, L. M.**: Synaptic remodelling in the rat arcuate nucleus during the estrus cycle. Neuroscience, **32**, 663-667 (1989).

96) **Furudate, S. & Nakano, T.**: PMSG-induced persistent estrus in rats as a model for polycystic ovary disease: characteristics and restoration of the normal cycle. Exp. Anim., **38**, 121-126 (1989).

Studies on Effects of Dehydroepiandrosterone-injection at Day 1 of age on Sexual Function in Female Rats
Makio Shozu, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **102,** 698－713 (1993)

Key words dehydroepiandrosterone, precocious vaginal opening, persistent estrus, gonadotropins, estrogens

Abstract

The present study was performed to examine the effects of neonatal dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) injection on the sexual function of female rats compared with that of testosterone propionate (TP) injection. Increasing doses of DHA-Ac (1.0 mg, 2.0 mg, 2.5 mg/rat) at day 1 of age induced progressively precocious vaginal opening, precocious first estrus, stenosis of the vaginal introitus and abolishment of regular estrus cycles. Most adult rats which received 2.5 mg of DHA-Ac at day 1 of age showed constant estrus and had small uterus and small multifollicular ovaries without corpus luteum. These changes caused by neonatal DHA-Ac (2.5 mg/rat) injection were the same as those caused by TP (0.5 mg/rat) injection except for body weight changes and severity of the stenosis of the vaginal introitus. Serum hormone patterns of adult rats which received DHA-Ac (2.5 mg/rat) at day 1 of age revealed acyclicity of luteinizing hormone (LH) and an elevated prolactin (PRL) level. The ovulatory response after pregnant mare serum gonadotropin and human chorionic gonadotrophin treatment was less in DHA-Ac (2.5 mg/rat)-injected rats than in TP (0.5 mg/rat)-injected rats. Early responses of the uterus to 17β-estradiol (E2) (5 mg/kg body weight) treatment were compared 2 weeks after castration: percent increases in uterine wet weight and the reciprocal value of cell density (RVCD) of superficial endometrium were lower in DHA-Ac (2.5 mg/rat)-injected rats than in the controls, whereas percent increases in RCVD of circular myometrium were lower in TP (0.5 mg/rat)-injected rats. Injection of DHA-Ac (2.5 mg/rat) at day 1 of age made the relative weight of the ovary and the uterus heavier than that of controls between 2 and 8 day of age and made them lighter thereafter. Serum levels of E2 and testosterone increased and serum levels of LH and follicle-stimulating hormone decreased compared with that in controls between 2 and 8 days of age, whereas no significant change except an elevated serum PRL level was found after day 10 of age. It is concluded that similar changes occur in the sexual function of adult female rats exposed to DHA-Ac (2.5 mg/rat) and TP (0.5 mg/rat) at day 1 of age, whereas the imprinting effects of DHA-Ac on the vaginal membrane, the ovary and the uterus are somewhat different from those of TP.