

Studies on Effects of Androgen-injection on Day 1 or Day 25 of Age in Response to Superovulation 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/2297/8495

春機発動前におけるアンドロゲン投与雌ラットの 排卵機能に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

福岡 哲 二

雌ラット排卵機能に及ぼす春機発動以前のアンドロゲン投与の影響を明らかにする目的で、デヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone-acetate, DHA-Ac) あるいはテストステロン・プロピオネート (testosterone propionate, TP) を1日齢に投与した雌ラットおよび25日齢に投与した雌ラットについて過排卵処理時の卵巢の反応性を中心に検討した。なお、25日齢投与については、プロゲステロン (progesterone, P4) 投与の成績とも比較・検討した。過排卵処理は、20単位の牝馬血清ゴナドトロピンと10単位のヒト絨毛性ゴナドトロピンをそれぞれ24日齢と26日齢の9時に投与することにより行なった。1日齢に DHA-Ac 0.5mg, 1.0mg, 2.0mg, 2.5mg を投与したラットの排卵数 (排卵率) の平均±標準誤差 (排卵率) はそれぞれ 28.0±3.2 個 (100%), 24.9±3.2 個 (100%), 5.5±1.9 個 (67%), 5.3±1.2 個 (68%) であり、2.0mg 投与群および 2.5mg 投与群では対照群の 25.4±1.1 個 (100%) より低下していた。1日齢に 10 μ g, 40 μ g, 160 μ g, 640 μ g, 1250 μ g の TP を投与したラットの排卵数 (排卵率) は、それぞれ 13.0±2.6 個 (100%), 12.5±2.9 個 (73%), 7.7±1.1 個 (66%), 5.0±1.1 個 (57%), 3.4±1.5 個 (40%) であった。1日齢に 2.5mg の DHA-Ac を投与したラットまたは 1250 μ g の TP を投与したラットでは、過排卵処理後の卵巢・子宮頸部および陰の相対重量は対照群より有意に軽く、血中エストラジオール (estradiol, E2) 値は対照群より高い傾向がみられた。また1日齢に 2.5mg の DHA-Ac を投与したラットでは、5日齢において卵胞発育の亢進が認められ、ステージ I およびステージ II を合わせた卵胞数は 170±12 個で、対照群の 66±26 個より有意に増加していた。さらに、21日齢においては、ステージ I の卵胞数は 195±16 個で対照群の 133±17 個より多かったが、ステージ V 以上の卵胞は 3.9±0.8 個で対照群の 17.0±1.3 個より少なかった。25日齢に DHA-Ac (2.5mg), TP (0.5mg) または P4 (0.5mg) を投与したラットの排卵数は、それぞれ 19.9±3.7 個, 9.3±8.5 個, 21.6±2.6 個で、いずれも対照群の 33.5±3.4 個より有意に少なかった。また、これらのホルモン投与群では、いずれも排卵後の卵巢の相対重量は対照群より重く、血中 E2 値は対照群に比し高値であった。排卵後の卵巢内の I 型閉鎖卵胞数は、25日齢 DHA-Ac (2.5mg) 投与群, TP (0.5mg) 投与群, P4 (0.5mg) 投与群, 対照群の順に、3.0±0.3 個, 1.8±0.4 個, 2.4±0.4 個, 0.4±0.2 個であった。以上の結果から、1日齢に投与された DHA-Ac は発育途上の卵巢に作用して、卵胞プールや卵胞のゴナドトロピン感受性などに恒久的変化 (組織化効果) をもたらすものと結論された。また25日齢に投与された DHA-Ac は直接卵巢に作用して排卵抑制をもたらす可能性のあることが示された。

Key words dehydroepiandrosterone, testosterone, ovary, superovulation, follicles

多嚢胞性卵巢症候群 (polycystic ovary syndrome, PCOS) の患者では、血中のデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) やアンドロステンジオン (androstenedione) などのアンドロゲンが高値を示す症例が多くみられる¹⁾。また、ラット²⁾⁻⁷⁾やマウス⁸⁾に DHA やアンドロステンジオンを長期間投与することにより持続性無排卵・黄体の欠如・大型の嚢胞状卵胞の出現・莖膜細胞のルテイン化などのヒトの PCOS に類似した病態が惹起されることから、PCOS 患者に見られる高アンドロゲン血症がその病態形成にかかわっている症例すなわち高アンドロゲン血症性 PCOS (androgenic PCOS) があるものと考えられてきた⁹⁾。

われわれも、教室における副腎性アンドロゲンと性機能にお

ける一連の研究において、成熟ラットにデヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone-acetate, DHA-Ac) を長期間に渡り投与することによって排卵が抑制され性周期が消失すること¹⁰⁾、新生仔ラットに DHA-Ac を投与することによって成熟後に無排卵となること¹¹⁾¹²⁾などをこれまで報告してきた。

今回、DHA の春機発動前投与の性機能に及ぼす影響に関し排卵機能の面から明らかにすることを目的として、1日齢あるいは25日齢に DHA-Ac を投与したラットに過排卵処理を行ないその排卵反応に及ぼす影響を中心に検索し、テストステロン・プロピオネート (testosterone propionate, TP) およびプロゲステン (progesterone, P4) の投与時の影響と比較・検討した。

平成5年11月24日受付, 平成5年12月14日受理

Abbreviations: ADD, androstenedione; DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-Ac, dehydroepiandrosterone-acetate; E2, estradiol; FSH, follicle-stimulating hormone; hCG, human chorionic gonadotropin; LH, luteinizing hormone; LSD, least significant method; PCOS, polycystic ovary syndrome; PMSG, pregnant mare serum gonadotropin; P4, progesterone; T, testosterone; TP, testosterone propionate

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使用した。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)に下に飼育し、飼料CRF-1(日本チャールスリバー、厚木)および水(水道水)は自由摂取させた。

80日齢~100日齢の処女雌ラットを雄と交配させ(腔内に精子を確認した日を妊娠第1日とした)、妊娠第23日に出生した新生仔雌ラット(出生した日を1日齢とした)のうち、1腹の新生仔数が11~14匹の範囲内にあり、出生仔の雌雄比が0.71から1.33の間にあるものを実験に供した¹²⁾。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ケージ当たり2~4匹として飼育した。

II. 実験方法

1. DHA-Ac, TP および P4 製剤とその投与方法

DHA-Ac(和光純薬工業、大阪)、TP(Sigma, St. Louis, U.S.A.)およびP4(Sigma)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(50μl)に溶解し、新生仔雌ラットの項部皮下または幼児期雌ラットの背部皮下に27ゲージ注射針を用いて投与した¹²⁾。それぞれの投与日および投与量は、表1に示すとおりである。

なお、同腹ラットは、各実験群とごま油単独投与対照群がほぼ同数となるように無作為に割り当てた。

2. ゴナドトロピン製剤と排卵誘発法および卵子の観察法

妊馬血清ゴナドトロピン(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)としてはセトロピン(帝國臓器、東京)、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行なった。表1に示すごとく、24日齢の午前9時にラットあたり20単位のPMSGを皮下投与した後、26日齢の午前9時にラットあたり10単位のhCGを皮下投与した。hCG投与後29~30時間目に断頭屠殺し、右側卵管を摘出した後、卵管の子宮側の断端から先端鈍の27ゲージ針を卵管内に挿入し、生理的食塩水で還流して卵管内卵子を回収した¹²⁾。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)の存在下にビベッティング

を行なって顆粒膜細胞を除去し、卵子を位相差顕微鏡で観察した。一連の操作は出来るだけ速やかに行ない、卵子の変性による影響を最小限にするよう心掛けた。なお、幼若ラットに対する過排卵誘発法の諸条件の設定にあたっては、PMSG(20単位/ラット)とhCG(10単位/ラット)との組み合わせ投与によりこの日齢のラットの排卵数としては最大数となることを予備実験により確認した。

排卵数は、右側卵管あたりの排卵数(平均値±標準誤差)で表示した。排卵率は、被検ラットに占める右側卵管に1個以上の卵子が確認されたものの割合(百分率)で表示した。

3. 採血法と血中ホルモン測定

断頭屠殺後に臍幹血を採取した。血清を分離して-80℃で測定まで冷凍保存した。エストラジオール(estradiol, E2)は、“E2-kit 第一”(第一ラジオアイソトープ研究所、東京)を、テストステロン(testosterone, 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。

4. 臓器重量測定と組織学的観察

断頭屠殺後に子宮・卵巣・腔・副腎を摘出し、組織湿重量をメトラー直示分析天秤H-80型(Mettler 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表示した。

右側卵巣を、10%緩衝ホルマリンで固定後5~10μmのパラフィン連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin and eosin)染色を行なった。各卵巣について連続切片のすべてを観察し、以下の基準に従って卵胞を分類して卵巣内卵胞数を計数した。

21日齢の卵巣では、発育卵胞をKimら¹³⁾の基準に従って分類した。すなわち、卵胞径が最大となる断面で顆粒膜細胞の層数を無作為に4か所数えその平均が2~3層のものをステージI、4~5層のものをステージII、6~7層のものをステージIII、8層以上で卵胞腔の形成の全くみられないものをステージIV、8層以上で分離した卵胞腔の出現が認められるものをステージV、単一の卵胞腔が形成されたものをステージVIとした。

5日齢の卵巣では、発育卵胞を最大断面に含まれる顆粒膜細胞数により分類し、顆粒膜細胞数が10~14個のものをステージI、19個以下のものをステージIIa、20~24個のものをステー

Table 1. Schedule of experiments

Day of age	Experiment 1	Experiment 2
1	Subcutaneous injection of DHA-Ac (0.5, 1.0, 2.0, 2.5 mg/rat), TP (10, 40, 160, 640, 1250 μg/rat), or vehicle (50 μl/rat)	No
24	Subcutaneous injection of PMSG (20 IU/rat)	Subcutaneous injection of PMSG (20 IU/rat)
25	No	Subcutaneous injection of DHA-Ac (2.5 mg/rat), TP (0.5 mg/rat), P4 (0.5 mg/rat) or vehicle (50 μl/rat)
26	Subcutaneous injection of hCG (10 IU/rat)	Subcutaneous injection of hCG (10 IU/rat)
27	Decapitation	Decapitation

DHA-Ac, dehydroepiandrosterone-acetate; TP, testosterone propionate; PMSG, pregnant mare serum gonadotropin; hCG, human chorionic gonadotropin; P4, progesterone.

ジ II b, 25~29 個のものをステージ II c, 30~34 個のものをステージ II d, 35~39 個のものをステージ II e とした。また、顆粒膜細胞のうち核濃縮を示すものが 1% 以上を占めるものを閉鎖卵胞と判定した¹⁴⁾。

過排卵処理後の閉鎖卵胞は、顆粒膜細胞層および莢膜細胞層の所見から、最大径が 1000 μ m 以上のものを I 型と II 型に分類した。I 型閉鎖卵胞は、大型の胞状卵胞由来と考えられるもので、顆粒膜細胞が変性・消失して卵胞腔が大きく囊胞状に拡大を示すものである。部分的に顆粒膜細胞層の黄体化が見られ、ときに変性した卵細胞が卵胞腔内に観察される。II 型閉鎖卵胞は、小型のグラフ卵胞由来と考えられるもので、核濃縮を示す顆粒膜細胞層が厚く重層し卵胞腔は中等度の拡大と変形を示し、しばしば顆粒膜細胞層内に変性卵が認められるものである。

6. 推計学的処理

得られた成績は、すべて平均値±標準誤差で示した。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。相関の検定には、ケンダル (Kendall) の順位相関テストを用いた。独立 2 群の平均値の差の検定はマン・ホイットニイ (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・ウォリス (Kruskal-Wallis) の検定を用いて行ない、有意差 ($p < 0.05$) を認めたものについて一元配置分散分析後にフィッシャーの最少二乗法 (least significant difference, LSD) ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$) により多重比較を行なった。

成 績

1. 1 日齢 DHA-Ac 投与の幼若期排卵反応に及ぼす影響

1. 排卵率および排卵数

1 日齢 (生後 24 時間以内) に DHA-Ac (0.5~2.5mg) を投与

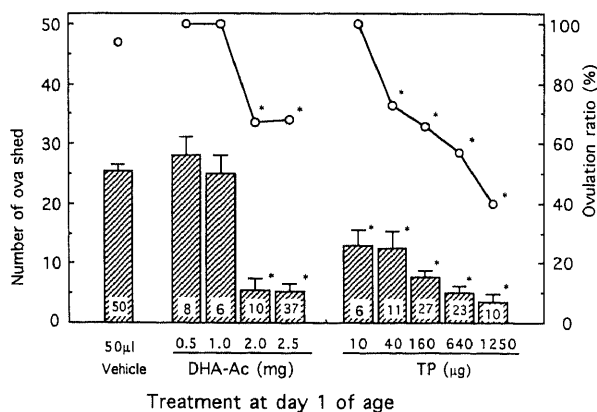


Fig. 1. Effects of a single injection of various doses of dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) or testosterone propionate (TP) at day 1 of age on the number of ova shed. Superovulation was induced by subcutaneous injection of 10 IU (/rat) of human chorionic gonadotropin (hCG) at day 26 of age after subcutaneous injection of 20 IU (/rat) of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) at day 24 of age. Each column and bar indicate the mean value and SEM of number of ova shed. Open circle indicates ovulation ratio. Figures inside the column are the number of rats examined. * $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated control.

し、24~27 日齢に過排卵処理を行なった幼若雌ラットの排卵数と排卵率を、T 投与 (10~1250 μ g) ラットのそれと比較して図 1 に示した。

1 日齢に DHA-Ac 0.5mg, 1.0mg, 2.0mg, 2.5mg を投与したラットの排卵数 (排卵率) の平均値±標準誤差 (排卵率) はそれぞれ 28.0±3.2 個 (100%), 24.9±3.2 個 (100%), 5.5±1.9 個 (67%), 5.3±1.2 個 (68%) であり、0.5mg 投与群および 1.0mg 投与群では対照群の 25.4±1.1 個 (100%) と差はなかったが、2.0mg 投与群および 2.5mg 投与群では対照群より低下していた ($p < 0.05$)。1 日齢に 10 μ g, 40 μ g, 160 μ g, 640 μ g, 1250 μ g の TP を投与したラットの排卵数 (排卵率) は、それぞれ 13.0±2.6 個 (100%), 12.5±2.9 個 (73%), 7.7±1.1 個 (66%), 5.0±1.1 個 (57%), 3.4±1.5 個 (40%) であり、TP 投与量の増加に伴う排卵数の減少が観察された ($p < 0.05$)。排卵率もおおむね TP 投与量に依存して低下したが、TP を 10 μ g を投与したラットでは排卵率の低下はみられなかった。

2. 排卵後の臓器重量と血中ホルモン値

排卵後の各臓器相対重量を表 2 に、血中 E2 値と T 値とを図 2 に示した。

対照群の卵巢重量は、過排卵処理を行なわなかった同日齢のラットに比し 3.5 倍となった。1 日齢に 2.0mg ないし 2.5mg の DHA-Ac を投与したラットおよび 1 日齢に 160 μ g 以上の TP を投与したラットでは、過排卵処理後の卵巢相対重量は対照群に比し有意に軽くなっていた ($p < 0.05$ または $p < 0.01$)。また、子宮角・子宮頸部・膣の相対重量も DHA-Ac 2.0mg および 2.5mg 投与群で低下 ($p < 0.05$ または $p < 0.01$) ないし低下傾向が認められた。過排卵処理後の副腎重量については、1 日齢 DHA-Ac 投与あるいは 1 日齢 TP 投与に伴う変化は認められ

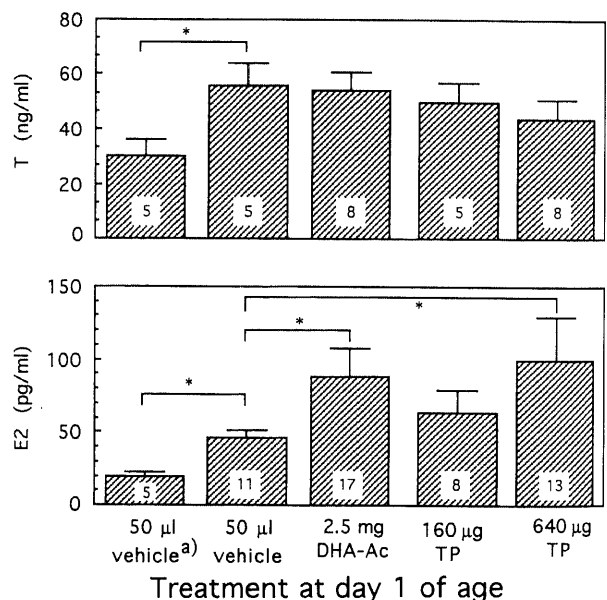


Fig. 2. Serum levels of estradiol and testosterone after superovulatory treatment in the rats injected with dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) (2.5 mg) or testosterone propionate (TP) (160 and 640 μ g) at day 1 of age. Superovulation was induced by PMSG-hCG treatment as in Fig. 1 except for one group indicated by a). Figures inside the column indicate the number of rats examined. Vertical bars indicate SEM above the mean value. * $p < 0.05$.

なかった。

過排卵処理後の血中 E2 濃度は、DHA-Ac 2.5mg 投与群および TP 160 μ g ないし 640 μ g 投与群では対照群より若干高値をとる傾向がみられたが、血中 T 値には対照群との間に差は認められなかった。

3. 1日齢 DHA-Ac 投与の発育期の卵胞数に及ぼす影響

1日齢にラットあたり 2.5mg の DHA-Ac を投与したラットについて、投与直後(5日齢)と排卵誘発前(21日齢)の卵巣内卵胞数を算定して対照群と比較した(図3および図4)。

5日齢における卵巣あたりの計数卵胞数は、対照群の 66 \pm 26 個に対し、DHA-Ac 2.5mg 投与群では 170 \pm 12 個と有意の増加がみられた ($p < 0.05$)。これらの卵胞数の増加は、図3に示すごとく各発育段階の卵胞で一様に観察された。21日齢においても、計数卵胞数の総数(卵巣あたり)は対照群の

295 \pm 27 個に対し、DHA-Ac 2.5mg 投与群では 368 \pm 19 個と有意の増加がみられた ($p < 0.05$)。しかしながら、ステージ V 以上に達する卵胞の数についてみると、図4に示すように対照群の 17.0 \pm 1.3 個に比し、1日齢 DHA-Ac 2.5mg 投与群では 3.9 \pm 0.8 個と逆に有意の減少が認められた ($p < 0.05$)。

II. 25日齢 DHA-Ac 投与の幼若期排卵反応に及ぼす影響

1. 排卵率および排卵数

PMSG 投与後24時間目に当たる25日齢の午前9時に、DHA-Ac 2.5mg を投与した際の排卵数を、TP 0.5mg あるいは P4 0.5mg 投与の場合と比較した成績を図5に示した。

過排卵処理を行なったすべてのラットで排卵が確認されたが、排卵数は DHA-Ac および P4 投与では対照群のおよそ 2/3 に、TP 投与では対照群のおよそ 1/3 にいずれも有意に減少していた ($p < 0.05$)。

Table 2. Effects of various doses of DHA-Ac or TP administration at day 1 of age on the relative weight of the ovary, the uterus, the vagina, and adrenal gland after PMSG-hCG treatment

Treatment at day 1 of age (dose)	PMSG-hCG treatment	Number of rats tested	Body weight (mean \pm SEM, g)	Relative weight of organs (mean \pm SEM, mg/100 g body weight)				
				Ovary	Uterine horn	Uterine cervix	Vagina	Adrenal gland
Vehicle	No	10	58.1 \pm 2.7	32 \pm 1**	67 \pm 2*	28 \pm 1*	77 \pm 5*	18 \pm 1
Vehicle	Yes	50	59.6 \pm 1.5	114 \pm 4	87 \pm 5	77 \pm 2	100 \pm 4	18 \pm 1
DHA-Ac (0.5 mg)	Yes	5	66.8 \pm 2.8*	99 \pm 8	73 \pm 2	74 \pm 5	98 \pm 8	17 \pm 1
DHA-Ac (1.0 mg)	Yes	5	57.2 \pm 3.5	105 \pm 3	78 \pm 3	64 \pm 4*	72 \pm 11	18 \pm 1
DHA-Ac (2.0 mg)	Yes	3	55.7 \pm 3.3	71 \pm 5**	78 \pm 3	62 \pm 0*	92 \pm 10	16 \pm 1
DHA-Ac (2.5 mg)	Yes	8	56.3 \pm 2.1	88 \pm 3**	61 \pm 2**	68 \pm 3*	74 \pm 5*	18 \pm 1
TP (10 μ g)	Yes	7	60.8 \pm 1.6	119 \pm 6				
TP (40 μ g)	Yes	11	62.4 \pm 1.4	112 \pm 5				
TP (160 μ g)	Yes	27	65.2 \pm 1.9*	91 \pm 4**				
TP (640 μ g)	Yes	23	63.5 \pm 1.0	95 \pm 4*				
TP (1250 μ g)	Yes	10	60.2 \pm 1.5	53 \pm 4**	71 \pm 6	32 \pm 1**	55 \pm 4**	18 \pm 0

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the PMSG-hCG treated control.

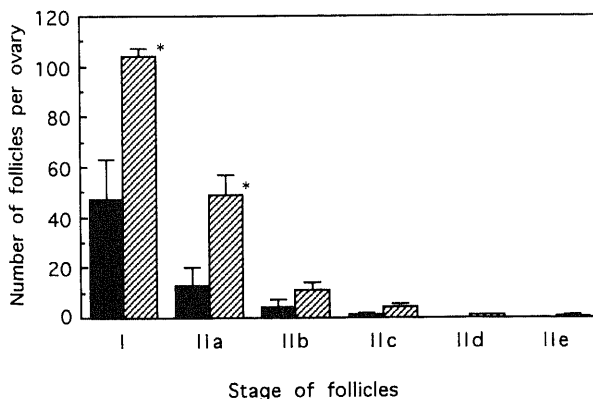


Fig. 3. Effects of a single injection of DHA-Ac on the number of follicles at day 5 of age. Hatched column, DHA-Ac treated; solid column, vehicle-treated. Vertical bar indicates SEM above the mean value. Follicles were classified after that of Kim, Shaha and Greenwald¹³⁾. Stage II follicles at day 5 of age were subclassified into 5 groups according to the number of granular cells appeared in the largest cross section. * $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated control.

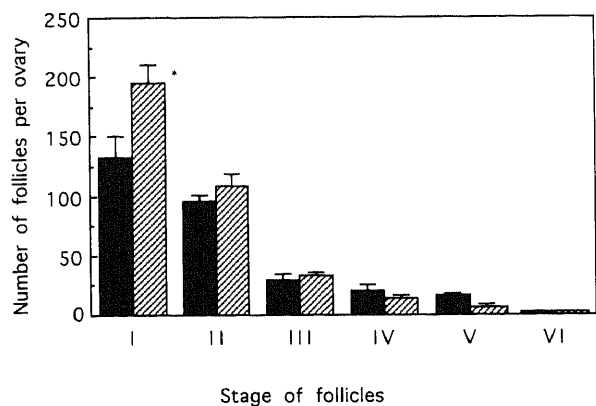


Fig. 4. Effects of a single injection of DHA-Ac on the number of follicles at day 21 of age. Hatched column, DHA-Ac treated; solid column, vehicle-treated. Vertical bar indicates SEM above the mean value. Follicles were classified after that of Kim, Shaha and Greenwald¹³⁾. * $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated control.

2. 排卵後の臓器重量と血中ホルモン値

過排卵後の卵巣, 子宮角, 子宮頸部, 副腎の各相対重量を表3に, 血中 E2 値を図6に示した.

DHA-Ac 投与群・TP 投与群・P4 投与群の卵巣重量は, いずれも対照群より有意に増加していた ($p < 0.05$). また DHA-Ac 投与群および TP 投与群では子宮角重量も, 対照群に比し有意に増加していた ($p < 0.05$).

屠殺時の血中 E2 値は, 対照群に比し DHA-Ac 投与群, TP 投与群, P4 投与群でいずれも有意に高値を示した ($p < 0.05$). また, 卵巣重量と血中 E2 値との関連について検討したところ, 対照群および各ホルモン投与群で卵巣重量と血中 E2 値の間には正の相関が認められた ($p < 0.05$).

3. 排卵誘発後の卵巣の組織学的所見および閉鎖卵胞数

対照群および各ホルモン投与群の過排卵後の卵巣には, 多数の黄体が観察された. 黄体は性成熟期の黄体よりやや小型で, 黄体化の程度も軽度で中央部に腔隙を残しているものが多くみられた. 各群の卵巣について卵胞の最大径が 100μ を越えた閉鎖卵胞数を集計した成績を図7に示した. 対照群では, I 型の閉鎖卵胞は殆ど観察されず, PMSG-hCG 投与により大型の発育卵胞はほとんどすべて排卵に至ったことが確認された. これに対し, DHA-Ac 投与群および TP 投与群では, I 型および II

型の閉鎖卵胞数が対照群に比し有意に多く ($p < 0.05$ または $p < 0.01$), P4 投与群では I 型閉鎖卵胞数が有意に増加していた ($p < 0.05$).

4. DHA-Ac 投与前後の卵巣重量の変化

DHA-Ac 投与および TP 投与前後の卵巣重量の変化を, 溶媒投与対照群の場合と比較した成績を図8に示した. DHA-Ac および TP 投与後の卵巣重量は, 投与後7時間では対照群と差は認められないが, 投与後31時間以降では対照群より重くなる傾向がみられた.

考 察

多嚢胞性卵巣と無排卵を示す患者のなかに DHA が高値を示すものがみられること, 副腎の酵素欠損症などで DHA や ADD の分泌が亢進した患者に多嚢胞性卵巣と無排卵を示す患者がみられることなどから, 血中 DHA 値の高値と排卵障害との関連が注目されてきた¹⁾⁹⁾¹⁵⁾.

実験的には, ラットまたはマウスに新生仔期²⁾¹⁶⁾¹⁷⁾または春機発動前期から性成熟期にかけての時期²⁵⁾¹⁰⁾¹⁸⁾に DHA を投与することにより, 無排卵状態が惹起できる. また, これらラットの卵巣には, 多数の胞状卵胞と閉鎖卵胞および大型の嚢胞が観察され, PCOS に類似した形態を示すことが知られている. な

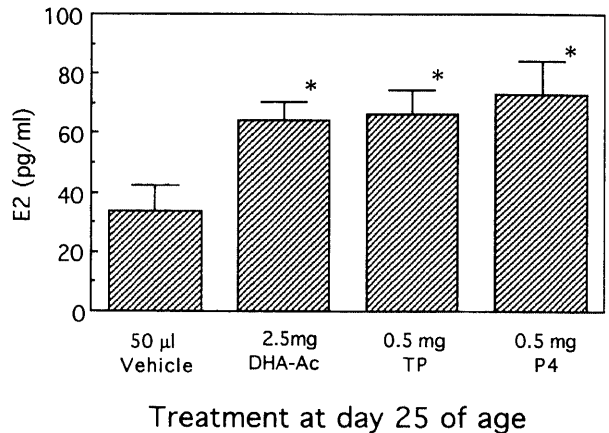
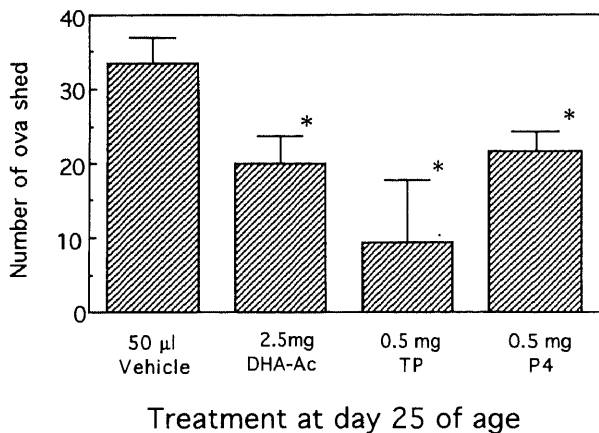


Fig. 5. Effects of a single injection of various doses of DHA-Ac, TP or progesterone (P4) at day 25 of age on the number of ova shed. Superovulation was induced by PMSG-hCG treatment as in Fig. 1. Each column and bar indicate the mean value and SEM of 7 animals. * $p < 0.05$ compared with the vehicle-treated control.

Fig. 6. Effects of a single injection of various doses of DHA-Ac, TP or P4 at day 25 of age on the serum levels of estradiol after superovulation. Each column and bar indicate the mean value and SEM of 7 animals. * $p < 0.05$ compared with the respective vehicle-treated control group.

Table 3. Effects of DHA-Ac, TP or P4 administration at day 25 of age on the relative weight of the ovary, the uterus, the vagina, and the adrenal gland after PMSG-hCG treatment

Treatment at day 25 of age (dose)	PMSG-hCG treatment	Number of rats tested	Body weight (mean±SEM, g)	Relative weight of organs (mean±SEM, mg/100 g body weight)				
				Ovary	Uterine horn	Uterine cervix	Vagina	Adrenal gland
Vehicle	No	5	56.8±2.6	32±1**	69±2*	30±4**	75±3**	15±1
Vehicle	Yes	8	60.1±1.9	109±4	83±3	79±3	104±12	14±1
DHA-Ac (2.5 mg)	Yes	7	57.0±2.0	134±6*	98±3*	86±16	110±13	13±2
TP (0.5 mg)	Yes	7	54.9±3.2	123±5*	107±2*	91±7	104±10	13±1
P4 (0.5 mg)	Yes	7	60.3±1.9	123±5*	84±2	75±13	95±20	15±2

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the PMSG-hCG treated control.

お、白膜肥厚や卵巣の腫大がみられないためヒトの PCOS 卵巣所見とは異なるとする指摘もあるが¹⁹⁾、これはラットやマウスの卵巣の表面は1層の表在上皮により覆われておりヒト卵巣の白膜に相当する構造をもたないこと、またラットやマウスでは排卵数が多く不完全黄体周期を有しているために卵胞期においても多数の退行過程の黄体が卵巣内にあってその重量を増加させているといった事由によるものと考えられる。

したがって、両者はともに齧歯類による PCOS の疾患モデルのひとつと考えられ、新生仔期 DHA 投与ラットは非可逆性排卵障害のモデルとして、春機発動前期から性成熟期にかけての時期の DHA 投与ラットは可逆性排卵障害のモデルとしてその排卵障害機序などについての検討が行われてきた²⁴⁾¹⁰⁾¹²⁾¹³⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。その結果、両者はともに中枢性機序による排卵障害を有しており、前者ではエストロゲンの黄体化ホルモン (luteinizing hormone, 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) の消失が^{12)17)20)~23)}、後者では DHA ないしその代謝産物によるゴナドトロピン分泌の変調⁹⁾がおもな機序と推定されている。

さらに、これまでのわれわれの教室の検討成績から、新生仔期 DHA-Ac 投与ラットにおける排卵障害には、中枢性の機序のほかにも卵巣性の機序も関与している可能性が示唆されている¹⁹⁾。性成熟期以降のラットを用いたこれまでの検討においては、中枢性機序と卵巣性機序を明確に区別することは困難であった。そこで、今回の研究では、刺激的フィードバック機構が生理的に作動するよりも前の時期に排卵誘発を行なうことにより、卵巣性排卵障害の有無について明らかにすることを試みた。

また、T などのアンドロゲンは発情周期における卵胞の発育過程に直接作用して排卵を抑制する可能性が報告されており²⁴⁾、春機発動前期から性成熟期にかけての時期の DHA 投与についても同様に卵胞発育に対する直接的抑制作用が作動している可能性が示唆されている。しかしながら、性成熟期のラットを用いた検討では DHA 投与前の内分環境が卵胞発育過程に影響を与えるため、DHA 単独の卵胞発育に及ぼす効果を検

討することはできなかった。一方、後述するように幼若ラット過排卵処理系においては性成熟ラットの場合と異なり、過排卵処理よりも前の発情周期の内分環境の影響を受けずに生理的排卵過程に近い卵胞発育を再現できる。そこで、今回の研究の後半では、春機発動前期から性成熟期にかけての時期の DHA 投与の卵胞発育に及ぼす影響を検討する目的で、過排卵処理幼若ラットに DHA-Ac を投与してその卵胞発育・排卵に及ぼす効果を検討した。

24~27 日齢のラットにおいては、エストロゲンや DHA-Ac などの性ステロイドの内因性ゴナドトロピンに対する抑制的フィードバック機構 (negative feedback mechanism) はすでに作動しているものの¹²⁾²⁵⁾²⁶⁾、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は未だ作動しておらず自然排卵はみられない^{29)~29)}。一方、卵巣においてはゴナドトロピンレセプターの発現が認められ、PMSG-hCG 投与により容易に過排卵を誘起することができる。この幼若ラットを用いた排卵誘発系は、成熟ラットと異なり内因性ゴナドトロピンの関与がほとんどなく、発情周期に伴う内分環境の変化の影響を受けないなどの利点があることから、卵胞発育や排卵過程などの研究に従来よりしばしば用いられてきた。この幼若ラット排卵誘発時に、あらかじめ脳下垂体を摘除して内因性ゴナドトロピンの関与を取り除く方法もあるが¹⁹⁾³⁰⁾、この系では下垂体摘除後に一定の回復期間において過排卵処理を行なうため、LH および卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) 以外の下垂体ホルモンの変化による間接的効果を受ける可能性があること、さらにこれらのゴナドトロピンの欠如した状態では発育卵胞や卵胞プールにも変化が生じるため正常発育過程にある幼若ラットの排卵反応とは異なってしまうことなどの問題点がある³¹⁾。そこで、本研究では下垂体摘除は行わず、生理的な発育過程の内分環境のもとで卵巣の排卵反応を検討する方法を採った¹⁴⁾。なお、種々の PMSG-hCG 投与量の組み合わせのうち予備実験により排卵数が最も多くなる組み合わせを決定し、この組み合

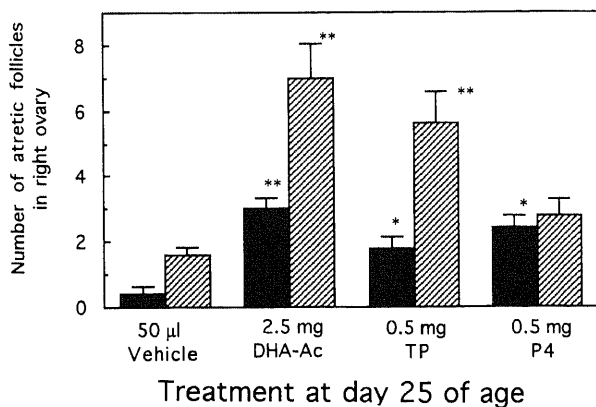


Fig. 7. Effects of a single injection of DHA-Ac, TP or P4 at day 25 of age on the number of atretic follicles after superovulation. Solid column, type I atretic follicles; hatched column, type II atretic follicles. Vertical bars indicate SEM above the mean value of 7 animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the vehicle-treated control.

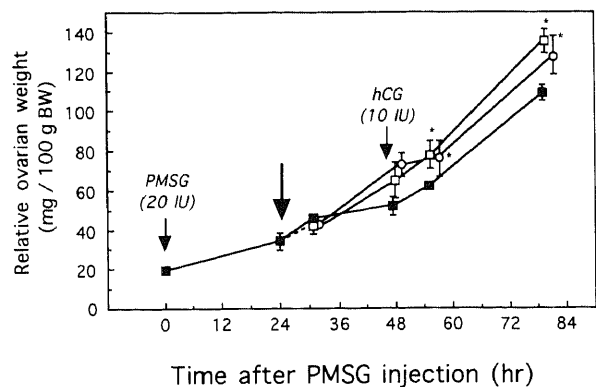


Fig. 8. Effects of a single injection of DHA-Ac or TP at day 25 of age on the relative weight of ovary. No treatment was done at neonatal period. All animals received subcutaneous injection of pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) between 9:00 and 9:30 of day 24 of age, and human chorionic gonadotrophin (hCG) 48 hours later. DHA-Ac, TP or physiological saline was injected 24 hours after PMSG injection. Each point and vertical bar indicate the mean value and SEM of 3-5 animals: ■, the physiological saline treated; □, DHA-Ac (2.5 mg) treated group; ○, TP (0.5 mg) treated, * $p < 0.05$ compared with the respective control.

わせにより今回の排卵誘発実験を行なった。これは同時期の幼若ラットに成熟期の生理的排卵数(およそ15個)に相当する排卵数を誘起するのに必要な投与量よりはるかに多く³⁰⁾³²⁾³³⁾、また本実験の後半の成績に示したように排卵のための臨界点を越えた卵胞で閉鎖過程に入ったと考えられる卵胞はほとんどなかったことから、今回採用した実験系では排卵過程と排卵数への内因性ゴナドトロピンの関与は小さいものと推測された。したがって、この実験系における排卵数も、下垂体摘除を施行した場合と同様に主として卵巣のゴナドトロピン感受性を反映しているものと考えられる。

前述のごとく1日齢にDHA-Ac(2.5mg)を投与されたラットでは、性成熟期以降のゴナドトロピン投与による排卵誘発実験などから、卵巣のゴナドトロピン感受性の低下がみられることが報告されている¹⁹⁾¹⁷⁾。1日齢にTP(0.5~1.25mg)の投与を受けたラットにおいても、同様に性成熟期以降に卵巣のゴナドトロピン感受性が低下していることがhCG単独投与・LH単独投与・PMSG-hCGまたはLH-FSHの併用投与、カテコールアミン⁴⁰⁾、内側視索前野や弓状核などの神経核の電気刺激による排卵誘発実験結果から明らかにされている^{20)27)34)~38)}。これらの報告では、性成熟後すなわち連続発情および無排卵状態成立後のラットにおける検討であり、卵巣のゴナドトロピン感受性低下が連続発情および無排卵に伴う内分泌環境の変化を反映したものである可能性がある。実際、Harlanら²⁷⁾は、5日齢にTP10mgを投与したラットについて遅発性連続発情成立前後の排卵数を比較検討し、卵巣のゴナドトロピン感受性の低下が遅発性連続発情成立後に比較的高濃度のエストロゲンに長期間曝露することなどによって生ずるものであろうと推定している。

本研究では、1日齢にTP(40~1000 μ g)またはDHA-Ac(2.0mgまたは2.5mg)を投与することにより、幼児期においてすでに卵巣のゴナドトロピン感受性の低下が生じていることをはじめて明らかにした。この卵巣のゴナドトロピン感受性の低下に関与する因子としては、卵巣自体の変化、排卵誘発時周期の内分泌環境、体重発育の遅延などが考えられる。しかし、教室の生水の報告によれば¹²⁾、1日齢DHA-Ac2.5mg投与ラットにおいて新生児期から幼児期にかけての血中ゴナドトロピン・E2・T値には、DHA-Ac投与直後を除き対照群との間に有意の差異がみられていないことから、少なくともDHA-Ac投与ラットについては排卵誘発時周期の内分泌環境の関与はないものと考えられる。また、排卵数減少の認められたDHA-Ac2.0mg投与ラットにおいても有意の体重減少が認められなかったこと、TP投与ラットにおいては体重は対照群よりむしろ増加の傾向を示したこと、身体発育の遅延が排卵数の低下に関与している可能性も否定できるものと思われる。

したがって、1日齢DHA-Ac投与ラットにおける排卵数の低下は、卵巣自体の変化によるゴナドトロピン感受性の低下により生じたものとみなされる。1日齢DHA-Ac2.5mg投与後の卵巣重量を経日的に検討した成績から、DHA投与により卵巣の発育過程に何らかの変化が生じていることが示唆されている¹²⁾。

そこで、今回の研究では、卵巣重量の増加のみみられる5日齢および卵巣重量の減少のみみられる21日齢を選び、卵巣の組織学的観察を行なった。その結果、1日齢DHA-Ac投与ラットでは、5日齢において原始卵胞および小型発育卵胞の形成促進がみられることが明らかにされた。このDHA-Ac投与ラットで

は2~5日齢に血中E2・Tの高値がみられることから¹²⁾、DHA-Acあるいはその代謝産物が小型発育卵胞の形成を促進したものと推察される¹⁴⁾³⁹⁾⁴¹⁾。一方、21日齢においては、ステージV以上の大型卵胞数の減少がみられることが明らかにされた。この大型卵胞は、PMSGの大量投与により閉鎖過程に入らず排卵に至ることができる卵胞すなわち臨界点を越えた卵胞であり¹⁴⁾⁴²⁾、この卵胞数の減少が排卵数の減少につながったものと考えられる。以上の成績から、1日齢に投与されたDHA-Acは発育途上の卵巣に作用して、卵胞プールや卵胞のゴナドトロピン感受性などに恒久的変化(組織化効果)をもたらし、その結果、幼若期過排卵処理時における排卵数の減少をもたらしたものと理解された¹²⁾。

新生仔期にTP投与したラットにおいても、卵胞の発育過程に変化が生じていることが報告されており⁴³⁾、DHA-Ac投与の場合と同様に卵胞プールの恒久的変化やゴナドトロピン感受性の恒久的変化すなわち組織化効果が生じ、これが排卵数の低下に関与している可能性があるものと理解される。周生期のエストロゲンやDHA-Acの投与は子宮に対し細胞種類ごとに異なる組織化効果をもたらすことが明らかにされており¹²⁾⁴⁴⁾⁴⁵⁾、卵胞についても顆粒膜細胞・莢膜細胞などの細胞成分に分けて検討を行なって、卵巣のゴナドトロピン感受性の低下がどの細胞で起こるのかについては今後検討する必要がある。

なお、1日齢DHA-Ac投与群およびTP投与群では、排卵後の血中E2・T値は対照群より高値をとる傾向がみられた。幼若ラットに排卵誘発を行なうと、血中E2・T値は排卵後24時間以内に排卵誘発前値に復するとされるが⁴⁶⁾、1日齢DHA-Ac投与群およびTP投与群では閉鎖卵胞が多数残存してエストロゲンおよびTの合成・分泌が続いていることが推定される。また、TP投与によるアンドロゲン不妊ラットでは、幼若期において卵巣5 α -還元酵素(5 α -reductase)の活性が低下していることが知られており⁴⁷⁾、排卵後のエストロゲン合成基質の減少が不完全となるため黄体でのエストロゲン合成が続くという機序も推定されている³⁷⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾。

春機発動前期から性成熟期にかけての時期におけるDHA投与によっても、多嚢胞性卵巣を伴う無排卵状態が惹起できることが知られており、これまでに春機発動前期の雌ラットに体重100gあたり6mgのDHAを20日間連続投与することにより早発腔開口後に多嚢胞性卵巣を伴う無排卵状態が生じること²⁾⁵⁾⁸⁾¹⁸⁾⁴⁹⁾、成熟雌ラットに体重100gあたり3ないし6mgのDHAを20日間連続投与することにより発情周期が消失して多嚢胞性卵巣を伴う無排卵状態が生じること⁷⁾などが報告されている。また、マウスでも春機発動前期(25~30日齢)の幼若マウスに体重100gあたり6ないし4.5mgのDHAを20日間投与すると、多嚢胞性卵巣を伴う無排卵状態が生じることが報告されている⁸⁾。これらのDHA投与中のラット卵巣には、嚢胞状拡張を示す大型閉鎖卵胞の他に、嚢胞状拡張を示さない閉鎖卵胞、莢膜細胞の部分的な黄体化を示す閉鎖卵胞などが多数観察され、ヒトの多嚢胞性卵巣の所見と類似している⁸⁾⁴⁹⁾。

この時期、すなわち春機発動前期から性成熟期にかけての時期のDHA投与によるPCOSモデルでは、DHAの代謝産物であるエストロゲンが中枢性にゴナドトロピンを抑制することにより可逆的な排卵抑制が生じるものと考えられてきた^{2)5)7)~9)50)}。しかしながら、幼若期過排卵モデルを用いた本研究の成績から、DHA-Acが卵巣レベルで作用することにより発育卵胞の閉

鎖過程を亢進させて排卵を抑制する機序の存在が明らかにされた。本研究成績からのみでは、DHA-Ac の卵巣での作用の詳細は不明であるが、これまでに DHA-Ac が卵細胞自体に作用して、卵細胞の変性をもたらす卵巣を閉鎖させる可能性があること^{51,52}、DHA が顆粒膜細胞種々のフィラメントの形成を抑制して顆粒膜細胞を変性させ卵巣を閉鎖させる可能性があること⁴⁹が報告されている。

一方、T についてはその排卵抑制作用が旧くより知られており、誘導体であるダナゾール (danazole) などが臨床に用いられている。T の排卵抑制機序についても、間脳・下垂体に作用してゴナドトロピン分泌を抑制しその比を変化させるとする中枢性の機序と⁹、卵巣への直接作用による末梢性の機序とが推定されているが、最近では末梢性機序がおもな機序であるとの報告が多い。この末梢性の機序については、これまでに直接卵巣の顆粒膜細胞のエストロゲン合成を抑制することにより卵巣を閉鎖させること^{31,53,54}、卵巣に作用してその微小ホルモン環境を変化させて卵巣閉鎖過程を亢進させること^{24,41,48}、卵細胞に作用してその還元分裂を遅延させて排卵を阻止すること⁵⁵などが報告されてきている。

以上の成績から、1日齢 DHA-Ac 投与による PCOS モデルの排卵障害には、中枢性の機序のほかに卵巣性の機序が関与している可能性が示唆された。この卵巣性排卵障害の成立には、投与した DHA-Ac の作用により発育過程の卵巣に形態学的・機能的な変化が生じたことが関連しているものとみなされた。一方、25日齢 DHA-Ac 投与による排卵誘発実験の成績から、DHA-Ac が卵巣レベルで作用して排卵を抑制することが明らかにされた。この排卵障害機序としては、DHA-Ac が発育卵巣に作用して発育卵巣の閉鎖を亢進させる機序が推定された。春機発動前期から性成熟期にかけての DHA-Ac 長期投与による PCOS モデルでは従来より中枢性排卵抑制機序が推定されてきたが、本実験成績から DHA-Ac が卵巣レベルで作用し排卵を抑制している可能性のあることが示唆された。

結 論

新生仔期 DHA-Ac 投与および春機発動前期から性成熟期にかけての時期における DHA-Ac 投与による PCOS モデルについて、幼若期過排卵モデルを用いることにより卵巣性の排卵障害機序の関与を明らかにし、さらにその機序の詳細を両モデルで比較検討した。

1. 1日齢に DHA-Ac (0.5mg, 1.0mg, 2.0mg, 2.5mg) を投与したところ、DHA-Ac 2.0mg 投与および DHA-Ac 2.5mg 投与で過排卵処理後の排卵率および排卵数の低下が認められた。1日齢に TP (10 μ g, 40 μ g, 160 μ g, 640 μ g, 1250 μ g) を投与したラットにおいても、10 μ g 投与群の排卵率を除き排卵率・排卵数の低下が認められた。

2. 1日齢に DHA-Ac (2.5mg) または TP (1250 μ g) を投与したラットにおいては、対照群に比し過排卵処理後の卵巣・子宮頸部および膣の相対重量の減少と血中 E2 値の高値傾向とが認められた。

3. 1日齢に 2.5mg の DHA-Ac を投与したラットでは、5日齢において対照群に比し小型発育卵巣 (ステージ I およびステージ II) 数の増加が認められた。21日齢においては、対照群に比し小型発育卵巣 (ステージ I) 数は増加していたが、大型卵巣 (ステージ V 以上) 数は逆に減少していた。

4. 25日齢に DHA-Ac (2.5mg), TP (0.5mg) または P4 (0.5mg) を投与したラットでは、対照群に比し過排卵処理後の排卵数の減少が認められた。

5. 25日齢 DHA-Ac (2.5mg) 投与群, TP (0.5mg) 投与群・P4 (0.5mg) 投与群では、対照群に比し過排卵処理後の卵巣の相対重量の増加と血中 E2 値の高値とが認められた。

6. 25日齢 DHA-Ac (2.5mg) 投与群, TP (0.5mg) 投与群・P4 (0.5mg) 投与群では、対照群に比し過排卵処理後の卵巣内に I 型閉鎖卵胞数の増加が認められた。

以上の結果から、1日齢 DHA-Ac 投与 PCOS モデルでは投与された DHA-Ac が発育途上の卵巣に対し組織化効果を及ぼすことにより卵巣のゴナドトロピン感受性を低下させて排卵数の減少をもたらすことが示された。また、25日齢投与の成績から、春機発動前期から性成熟期にかけての時期の DHA-Ac 投与 PCOS モデルでは、投与された DHA-Ac の中枢性排卵抑制機序の他に DHA-Ac が直接卵巣発育を抑制して排卵数の減少をもたらしている可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に慎んで謝意を表します。また、終始御指導と御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、大崎勝三元講師、細野泰元講師に深く感謝致します。研究の遂行に御協力くださいました教職員各位、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) および第59回日本内分泌学会総会 (松本, 1985) において発表された。

文 献

- 1) Turner, E. I., Watson, M. J., Perry, L. A. & White, M. C.: Investigation of adrenal function in women with oligomenorrhoea and hirsutism (clinical PCOS) from the north-east of England using an adrenal stimulation test. *Clin. Endocrinol.*, **36**, 389-397 (1992).
- 2) Roy, S., Mahesh, V. B. & Greenblatt, R. B.: Effect of dehydroepiandrosterone and Δ^4 -androstenedione on the reproductive organs of female rats: production of cystic changes in the ovary. *Nature*, **196**, 42-43 (1962).
- 3) Parker Jr, C. R., Bruneteau, D. W., Greenblatt, R. B. & Mahesh, V. B.: Peripheral, ovarian, and adrenal vein steroids in hirsute women: acute effects of human chorionic gonadotropin and adrenocorticotrophic hormone. *Fertil. Steril.*, **26**, 877-888 (1975).
- 4) Kundsén, J. F. & Mahesh, V. B.: Initiation of precocious sexual maturation in the immature rat treated with dehydroepiandrosterone. *Endocrinology*, **97**, 458-468 (1975).
- 5) Knudsen, J. F., Costoff, A. & Mahesh, V. B.: Dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat. *Fertil. Steril.*, **26**, 807-817 (1975).
- 6) Parker Jr, C. R. & Mahesh, V. B.: Interrelationship between excessive levels of circulating androgens in blood and ovulatory failure. *J. Reprod. Med.*, **17**, 75-90 (1976).
- 7) 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).
- 8) Familiari, G., Toscano, V. & Motta, P. M.: Morphological studies of polycystic mouse ovaries induced by dehydroepiandrosterone. *Cell Tissue Res.*, **240**, 519-528 (1985).
- 9) Greenblatt, R. B. & Mahesh, V. B.: The androgenic polycystic ovary. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **125**, 712-725 (1976).
- 10) 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 母体外陰研究班), p13-18, 1977.
- 11) 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 母体外陰研究班), p85-89, 1979.
- 12) 生水真紀夫: 新生仔期の dehydroepiandrosterone-acetate 投与の雌ラット生殖機能に及ぼす影響に関する研究. 十全医会誌, 1993. 印刷中
- 13) Kim, I., Shaha, C. & Greenwald, G. S.: A species difference between hamster and rat in the effect of oestrogens on growth of large preantral follicles. *J. Reprod. Fert.*, **72**, 179-185 (1984).
- 14) Braw, R. H. & Tsafiriri, A.: Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *J. Reprod. Fert.*, **59**, 267-272 (1980).
- 15) 辻 泰二, 西田正人, 岩崎寛和: 多嚢胞性卵巣症候群の治療法に関する考察: bromocriptine は多嚢胞性卵巣症候群に有効か. 日不妊誌, **36**, 578-587 (1991).
- 16) Gotz, F., Pfeiffer, U., Rohde, W. & Dorner, G.: Influence of neonatally administered dehydroepiandrosterone on reproduction of rats. *Endocrinol. Exp.*, **17**, 11-15 (1983).
- 17) 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 (ed.), *Neuropeptides, Neurotransmitters and Regulation of Endocrine Process*, 1st ed., p79-76, Akademiai Kiado, Budapest, 1986.
- 18) Black, J. B. & Mahesh, V. B.: Effect of dehydroepiandrosterone (DHA) on pituitary gonadotropins on ovulation in the rat. *Fed. Proc.*, **28**, 506 (1969).
- 19) 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).
- 20) Mennin, S. P. & Gorski, R. A.: Effects of ovarian steroids on plasma LH in normal and persistent estrous adult female rats. *Endocrinology*, **96**, 486-491 (1975).
- 21) Gorski, R. A.: Sexual differentiation of the brain. *In* D. T. Krieger & J. C. Hughes (eds.), *Neuroendocrinology*, 1st ed., p215-222, Sinatuer Associates, Sunderland, 1980.
- 22) Demarest, K. T., McKay, S. W., Riegler, G. D. & Moore, K. E.: Sexual differences in tuberoinfundibular dopamine nerve activity induced by neonatal androgen exposure. *Neuroendocrinology*, **32**, 108-113 (1981).
- 23) 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).
- 24) Bagnell, C. A., Mills, T. M., Costoff, A. & Mahesh, V. B.: A model for the study of androgen effects on follicular atresia and ovulation. *Biol. Reprod.*, **27**, 903-914 (1982).
- 25) Goldman, B. D. & Gorski, R. A.: Effects of gonadal steroids on the secretion of LH and FSH in neonatal rats. *Endocrinology*, **89**, 112-115 (1971).
- 26) Kawagoe, S. & Hiroi, M.: Maturation of negative and positive estrogen feedback in the prepubertal female rat. *Endocrinol. Jpn.*, **30**, 435-441 (1983).
- 27) Harlan, R. E. & Gorski, R. A.: Steroid regulation of luteinizing hormone secretion in normal and androgenized rats at different ages. *Endocrinology*, **101**, 741-749 (1977).
- 28) Andrews, W. W., Mizejewski, G. J. & Ojeda, A. R.: Development of estradiol-positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: A quantitative study. *Endocrinology*, **109**, 1404-1413 (1981).
- 29) Meijs-Roelofs, H. M. A., Kramer, P. & Sander, H. J.: Changes in serum concentration of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. *J. Endocrinol.*, **98**, 241-249 (1983).
- 30) Yun, Y. W., Yu, F. H., Yuen, B. H. & Moon, Y. S.: Effects of a superovulatory dose of pregnant mare serum gonadotropin on follicular steroid contents and oocyte maturation in rats. *Gamete Res.*, **23**, 289-298 (1989).
- 31) Hillier, S. G. & Ross, G. T.: Effects of exogenous testosterone on ovarian weight, follicular morphology and intraovarian progesterone concentration in estrogen-primed hypophysectomized immature female rats. *Biol. Reprod.*, **20**, 261-268 (1979).
- 32) Walton, E. A. & Armstrong, D. T.: Oocyte normality after superovulation in immature rats. *J. Reprod. Fert.*, **67**, 309-314 (1983).
- 33) Yun, Y. W., Yuen, B. & Moon, Y. S.: Effects of superovulatory doses of pregnant mare serum gonadotropin on oocyte quality and ovulatory and steroid hormone responses in rats. *Gamete Res.*, **16**, 109-120 (1987).
- 34) Tima, L. & Flerkő, B.: Ovulation induced by norepinephrine in rats made anovulatory by various experimental procedures. *Neuroendocrinology*, **15**, 346-354 (1974).
- 35) Everett, J. W., Holsinger, J. W., Zeilmaker, G. H., Redmond, W. C. & Quinn, D. L.: Strain differences for preoptic stimulation of ovulation in cyclic, spontaneously persistent-estrus, and androgen-sterilized rats. *Neuroendocrinology*, **6**, 98-108 (1970).
- 36) Kubo, K., Mennin, S. P. & Gorski, R. A.: Similarity

- of plasma LH release in androgenized and normal rats following electrochemical stimulation of the basal forebrain. *Endocrinology*, **96**, 492-500 (1975).
- 37) 沢田 勉: アンドロジェン性不妊ラットの多嚢胞性卵巣におけるステロイド代謝の研究. 阪府大紀要, **32**, 77-100 (1980).
- 38) Borvendeg, J., Hermann, H. & Bajusz, A.: Ovulation induced by synthetic luteinizing hormone releasing factor in androgen-sterilized female rats. *J. Endocrinol.*, **55**, 207-208 (1972).
- 39) 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).
- 40) Mori, T., Suzuki, A., Nishimura, T. & Kambegawa, A.: Evidence for androgen participation in induced ovulation in immature rat. *Endocrinology*, **101**, 623-626 (1977).
- 41) Ware, V. C.: The role of androgens in follicular development in the ovary. I. A quantitative analysis of oocyte ovulation. *J. Exp. Zool.*, **222**, 155-167 (1982).
- 42) Hirshfield, A. N. & Midgely Jr., A. R.: Morphometric analysis of follicular development. *Biol. Reprod.*, **19**, 597-605 (1978).
- 43) 林 要, 大沢悦二, 鷺尾元夫, 古結一郎: Androgen 不妊ラット卵巣の morphogenesis に関する研究. 日産婦誌, **25**, 1289-1295 (1973).
- 44) 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).
- 45) Mena, M. A., Arriaza, C. A. & Tchernichin, A. N.: Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens the rat uterus. *Biol. Reprod.*, **46**, 1080-1085 (1992).
- 46) Wilson, C. A., Horth, C. E., Endersby, C. A. & McDonald, P. G.: Changes in plasma levels of oestradiol, progesterone and luteinizing hormone in immature rats treated with pregnant mare serum gonadotrophin. *J. Endocrinol.*, **60**, 293-304 (1974).
- 47) Sawada, T. & Ichikawa, S.: Sites of production of sex steroids: secretion of steroids from X-irradiated and polycystic ovaries of rats. *Endocrinology*, **102**, 1436-1444 (1978).
- 48) Hillier, S. G., van den Boogaard, A. M. J., Reichert Jr, L. E. & van Hall, E. V.: Alterations in granulosa cell aromatase activity accompanying preovulatory follicular development in the rat ovary with evidence that 5α -reduced C19 steroids inhibit the aromatase reaction in vitro. *J. Endocrinol.*, **84**, 409-419 (1980).
- 49) Anderson, E.: In vivo and in vitro effects of androgens on rat ovarian granulosa cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **160**, 782-788 (1989).
- 50) Peillon, F. & Racadot, J.: Actions comparées de la testostérone, de la déhydroépiandrostérone (DHA) et du sulfate de déhydroépiandrostérone sur la fonction gonadotrope hypophysaire de la ratte prépuberé. *Ann Endocrinol. (Paris)*, **26**, 419-428 (1965).
- 51) Shinohara, H., Okoyama, S., Akasofu, K. & Nishida, E.: Influences of dehydroepiandrosterone acetate on ovarian oocytes in mature cycling rats. *Experientia*, **36**, 1329-1330 (1980).
- 52) Wassarman, P. M.: The mammalian ovum. *In* E. Knobil & J. Neill (eds.), *The Physiology of Reproduction*, 1st ed., p69-102, Raven Press., New York, 1988.
- 53) Payne, R. W., Hellbaum, A. A. & Owens, J. N.: The effect of androgens on the ovaries and uterus of the estrogen treated hypophysectomized immature rat. *Endocrinology*, **59**, 306-316 (1956).
- 54) Hillier, S. G.: A consideration of the roles of ovarian C19 steroid aromatase and 5α -reductase enzymic activities in the local control of follicular development in the human ovary. *In* R. T. Coutts (ed.), *Functional Morphology of the Human Ovary*, 1st ed., p94-101, MYP Press Limited, Lancaster, 1981.
- 55) Goh, H. H., Wong, P. C. & Ratnam, S.: Effects of sex steroids on the positive estrogen feedback mechanism in intact women and castrate men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **61**, 1158-1164 (1985).

Studies on Effects of Androgen-injection on Day 1 or Day 25 of Age in Response to Superovulation in Female Rats
Tetsuji Fukuoka, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J.
Juzen Med Soc., **102**, 896—906 (1993)

Key words dehydroepiandrosterone, testosterone, ovary, superovulation, follicles

Abstract

The present study was performed to examine the effects of dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) injection on day 1 or day 25 of age in response to superovulatory treatment in immature female rats compared with that of testosterone propionate (TP) injection. Superovulation was induced by subcutaneous injection of human chorionic gonadotropin (hCG) (10 IU per rat) at 9:00 of day 26 of age following injection of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) (20 IU per rat) 48 hr earlier. Injection of 2.0 mg per rat or more dose of DHA-Ac at day 1 of age reduced the number of ova shed: 5.5 ± 1.9 in 2.0 mg of DHA-Ac injected group and 5.3 ± 1.2 in 2.5 mg of DHA-Ac injected group vs 25.4 ± 1.1 in the control. Injection of $10 \mu\text{g}$ per rat or more dose of TP on day 1 of age also reduced the number of ova: 13.0 ± 2.6 in $10 \mu\text{g}$ of TP injected group; 12.5 ± 2.9 in $40 \mu\text{g}$ of TP injected group; 7.7 ± 1.1 in $160 \mu\text{g}$ of TP injected group; 5.0 ± 1.1 in $640 \mu\text{g}$ of TP injected group; 3.4 ± 1.5 in $1250 \mu\text{g}$ of TP injected group. Injection of DHA-Ac (2.5 mg/rat) or TP (1250 μg /rat) made the relative weight of the ovary, uterine cervix, and vagina heavier than those of the control after superovulation and made the serum level of estradiol higher than that in the control. DHA-Ac (2.5 mg/rat) injection on day 1 of age increased the total number of growing follicles on day 5 of age and the number of growing follicles of stage I on day 21 of age than that in the respective controls, whereas it reduced the number of growing follicles of stage V or more developed. The number of ova after the superovulatory treatment was reduced in rats which received DHA-Ac (2.5 mg/rat), TP (0.5 mg/rat) or progesterone (0.5 mg/rat) on day 25 of age compared with that of the control: 19.9 ± 3.7 , 9.3 ± 8.5 , 21.6 ± 2.6 and 33.5 ± 3.4 , respectively. Injection of DHA-Ac (2.5 mg/rat), TP (0.5 mg/rat) or progesterone (0.5 mg/rat) at day 25 of age resulted in 3.0 ± 0.3 , 1.8 ± 0.4 and 2.4 ± 0.4 type 1 atretic follicles, respectively; values significantly higher than the 0.4 ± 0.2 type 1 atretic follicles observed in the control. These results indicate that injection of DHA-Ac on day 1 of age induces a chronic effect on the follicular responsiveness and on the follicular pool. It is also suggested that injection of DHA-Ac on day 25 of age inhibits ovulation by stimulating follicular atresia.