雌ラットにおける血中dehydroepiandrosteroneの動態に関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 村上, 弘一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8289

雌ラットにおける血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座（主任：西田悦郎教授）
村　上　弘　一

（平成3年6月25日受付）

雌ラットにおける血中デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) の動態を明らかにするため，まず血中 DHA 測定法を改良し，その主要産生臓器，日齢的変動，性周期に伴う変動などについて検討した．60日齢発情間期9時における血中 DHA 濃度は 280.7±72.8pg/ml (平均±標準誤差) であり，20歳代ヒト女性の血中濃度の約1/15であった．両側卵巣摘除により血中 DHA のレベルは，著明に減少した．日齢的変動においては，50日齢まで 100～200pg/ml と低値であったが，60日齢以後では 300～400pg/ml のレベルに上昇した．この日齢的変動は，卵巣重量の日齢に伴う増加の推移とよく相関していた．性周期に伴う変動においては，発情間期における血中 DHA 濃度は 200～300pg/ml であったが，発情前期の午後には徐々に上昇して，17時では 498.5±26.9pg/ml (平均±標準誤差) と頂値を示した．これらのことから，ラットにおいては DHA の主要産生臓器は卵巣と考えられ，卵巣機能と DHA との密接な関係が示唆された．さらに雌ラットの卵巣機能に密接に関与しているプロラクチン (prolactin, PRL) と DHA の関連性を明らかにする目的で，ピモジド経口摂取による高 PRL 血症雌ラットを作成し，ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, HCG) 10IU，副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropin, ACTH) 1μg および 10μg をそれぞれ皮下注射し，主として血中アンドロゲン値の変動について比較検討した．高 PRL 血症雌ラットでは，対照群と比較して，卵巣重量は低値傾向を示したが，血中 DHA は有意の高値を示した ($p<0.05$)．HCG 投与の場合，卵巣重量の増加は有意に小さかった ($p<0.01$) が，血中 DHA，アンドロステンジオン，プロゲステロン，テストステロン値には有意の上昇が認められた ($p<0.01$)．また，ACTH 10μg 投与の場合，卵巣重量の増加は有意に小さく ($p<0.01$)，血中テストステロンおよびプロゲステロンも有意の低値を示した ($p<0.05$)．これらのことから，PRL は黄体化ホルモン (luteinizing hormone, LH) と協同的に卵巣 (特に黄体) に作用し，そのアンドロゲン産生を亢進させるものと考えられた．

Key words female rat, dehydroepiandrosterone, serum androgens, hyperprolactinemia

ヒトをはじめとするサル目 (以下，霊長類と記す) において，デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) とその硫酸抱合型であるデヒドロエピアンドロステロン・サルフェート (dehydroepiandrosterone sulfate, DHA-S) は，副腎に由来する副腎性アンドロゲン (adrenal androgens) としてよく知られている．その分泌動態の検索は，尿中・血中17－ケトステロイド (17-ketosteroids, 17-KS) や血中 DHA, DHA-S の測定によってなされており，ヒトでは加齢に伴う特徴的変化が認められている[1~5]

副腎性アンドロゲンは，ヒト女性では，エストロゲンやテストステロンの前駆ホルモンとして，あるいは

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotropin; AD, androstenedione; BSA, bovin serum albumin; DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-S, dehydroepiandrosterone sulfate; FSH, follicle-stimulating hormone; GH, growth hormone; HCG, human chorionic gonadotropin; 17-KS, 17-ketosteroids; LH, luteinizing hormone; PRL, prolactin; RIA, radioimmunoassay

糖質コルチコイドの拮抗ホルモンとして，種族保存(性・生殖機能)や個体保存に密接に関与しているものと考えられているが，その生理的役割については，なお不明な点が多い．また，副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotropin, ACTH)が副腎性アンドロゲンの主な分泌刺激物質とされているが，その分泌機序についても十分解明されておらず[6]，近年ACTH以外の分泌調節因子としてエストロゲン，プロラクチン(prolactin, PRL)，副腎性アンドロゲン分泌刺激因子(adrenal androgen stimulating factor, AASF)などが注目を浴びている[7]．しかし，これらの調節物質に関しても，現在なお一定の結論は得られていない[8)~10)]．

一方，哺乳動物における DHA や DHA-S の血中濃度は種によって異なる．ラット，マウスなどのネズミ目(以下，げっ歯類と記す)では，極めて低値で，生理的・病理的状態下における変動も軽微である．また，ウサギやイヌにおいては，性成熟に伴う DHA の分泌亢進は認められるが，霊長類にみられるような年齢的推移は示さないとされている[11)]．このような差異はステロイド代謝酵素活性の差に起因するものとされているが[12)13)]，その詳細は明らかではない．したがって，動物実験を行う場合には，用いる動物の DHA の分泌動態についてよく把握しておく必要がある．ラットに関しては，血中 DHA は低値であると報告されているが，研究者の用いた測定方法によってかなりの差があり[14)~17)]，また，その産生臓器や分泌制御機構についても明らかにされていない．

本研究では，ヒト副腎性アンドロゲンである DHA に関し，ラットにおける分泌動態の一端を明らかにするため，まず，雌ラットにおける血中 DHA とアンドロステンジオン(androstenedione, AD)の測定方法について検討を加え，生理的状態下における血中レベルの変動とその主要産生臓器について検討した．次いで，高 PRL 血症雌ラットを作成し，卵巣・副腎刺激による血中ホルモンの変動から，DHA と PRL との関連性について考究した．

材料および方法

I．実験動物

実験には，ウイスター(Wistar)系ラット(日本チャールズ・リバー，厚木)を親として施設内で交配させて生まれた二世代目の雌ラットを使用した．飼育条件は，明時間11.5時間(9時～20時30分)，暗時間12.5時間，温度23± 2 ℃とし，飼料 CRF-1 (日本チャールズ・リバー)および飲料水は自由摂取とした．

II．試　薬

実験に使用した放射性ステロイドおよび試薬は，以下の通りである．

[1, 2-^{3}H] DHA (55.0Ci/mmol)，[1β, 2β-^{3}H] AD (48.5Ci/mmol)，[4-^{14}C] プロゲステロン (57.2 mCi/mmol)，[9, 11-^{3}H] アンドロステロン (53.3Ci/mmol)，[4-^{14}C] テストステロン (52.0mCi/mmol)，[4-^{14}C] プレグネノロン (57.2mCi/mmol) および [1, 2-^{3}H] コルチコステロン (46.5 Ci/ mmol) (NEN Research Products, Boston, U.S.A.) は，セファデックス LH-20 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) カラムにより精製したのち使用した．DHA および AD (Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.) は，含水アセトンによる再結晶法で純化したのち使用した．ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA; Armour Pharmaceutial Co., Kankakee, U.S.A.); ペプシン処理ヒト免疫グロブリン (pepsin-treated human immune globulin, γ-Venin; Hoechst Japan, 東京); チャコール (charchol)，アジ化ナトリウム (sodium azide, NaN_3)，ブドウ糖，0.1M 酒石酸，2，5－ジフェニルオキサゾール (Dotite DPO) および1，4－ビス[2－(5－フェニルオキサゾイル)]ベンゼン (Dotite POPOP) (和光純薬工業，大阪) をそれぞれ購入して使用した．0.2Mホウ酸緩衝液 (pH＝7.4，和光純薬工業) は蒸留水で希釈し，0.05M として使用した．

エチルエーテル，メタノール，ヘキサン，ベンゼン，クロロホルム，アセトン，トルエン，(和光純薬工業) は特級試薬を使用した．

ピモジド (pimozide) は藤沢薬品工業 (大阪) より提供されたものを使用した．ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, HCG) は，注射用 HCG モチダ (持田製薬，東京) を0.9%日局生理食塩液 (扶桑薬品工業，大阪) にて希釈し，10IU/0.2ml の溶液として使用した．ACTH (コートロシン注；第一製薬，東京) は，生理食塩液にて希釈し，1μg/0.2ml または10μg/0.2ml の溶液として使用した．

抗 AD 抗血清は，AD-3-CMO-BSA で免疫した家兎血清より得られた抗体で，帝国臓器製薬 (東京) より購入したものを使用した．抗 DHA 抗血清は，DHA-17 oxime-BSA および DHA-3-O•CO-BSA でそれぞれ免疫した家兎血清より得られた抗体であり，東京大学医学部第3内科学講座の大沢・関原両博士より提供されたものを使用した．

III．検体採取時期と方法

採血は，下記実験群1，2および3のそれぞれの目的に合った日時に断頭法により行った．検体は，採血

後4℃，2時間静置，その後4℃，3,000rpm で30分間遠心分離を行い血清として，ホルモン測定まで−80℃で保存した．

なお，各実験群の検体採取時期は次の通りである．

1．対照群

正常（対照）群（各群 n＝5〜7）の DHA 測定用血液は，60日齢雌ラットの発情間期9時に採取した．

血中 DHA 濃度の日齢的変動については，10日齢より10日齢間隔で100日齢までの10群（各群 n＝4〜7）の雌ラットを各該当日齢の9時に採血した．なお，日齢は新生子を確認した日を1日齢とした．また，性周期を認めるものにおいては発情間期の9時に採血を行った．各日齢群において，血中 DHA の測定と同時に卵巣および副腎の湿重量を計測した．

性周期に伴う血中ホルモン濃度の変動については，性周期が規則的であることを確認した60日齢前後の雌ラットにおいて，発情間期第1，2日，発情期の9時および21時，発情前期の6，9，11，12，13，15，17，19，21，23時の計16群（各群 n＝5〜7）について，それぞれ採血を行い，血中ホルモンの測定に供した．また，採血時の卵巣および副腎の湿重量も計測した．

2．卵巣・副腎摘除群

両側卵巣摘除群，両側副腎摘除群および両側卵巣・副腎摘除群では，それぞれの摘除術を50日齢に施行し，術後10日目（60日齢）に採血した．

3．高 PRL 血症雌ラット群

腟スメアにて2周期以上の正常性周期を確認した60日齢前後の雌ラットに，発情間期第1日の朝よりピモジド溶液（ピモジド 10mg，0.1M 酒石酸 50ml，ブドウ糖 10g，水道水 950ml）を連日自由摂取させた（P群）．一方，対照群にはコントロール溶液（ピモジドを除いた溶液）を自由摂取させた（C 群）．さらに，P および C 群を，それぞれ4つの実験群（各群 n＝5〜7）に分けた．溶液摂取開始後第13日目の19時に，卵巣刺激のために HCG 10IU，副腎刺激のために ACTH 1 μg および 10μg，対照として生理食塩液 0.2ml をそれぞれに皮下注射した．第14日目の9時に採血し，血中ホルモンの測定に供した．同時に卵巣，副腎，子宮角，子宮頸，腟の湿重量を計測した．なお，実験期間中は，毎日腟スメアの観察と体重測定を行った．

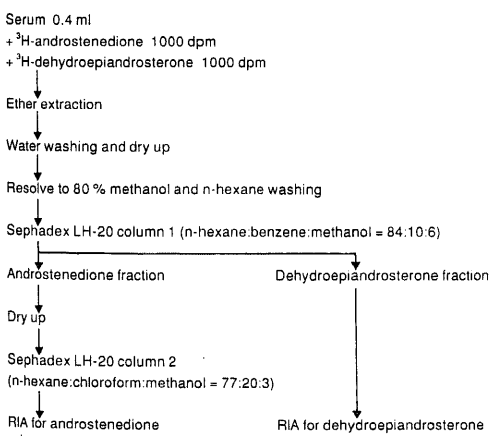

Fig. 1. Extraction and determination of dehydroepiandrosterone and androstenedione from rat serum.

Ⅳ．血中 DHA および AD 測定法

1．血清からの DHA および AD の抽出，分離

測定方法の概要は，図1に示した通りである．まず，血清 0.4ml に，^{3}H-DHA と ^{3}H-AD をそれぞれ 1,000dpm ずつ回収率補正用に加えたのち，エチルエーテル 4ml で抽出した．エーテル相を水洗し，窒素ガス下で乾固したのち，80%メタノール 1ml とヘキサン 1ml を加え十分に攪拌して，ヘキサン相を除去した．この操作を2回繰り返したのち，窒素ガス下で乾固した．乾固した検体をヘキサン：ベンゼン：メタノール＝84：10：6の混合溶媒0.1ml で溶解し，同じ溶媒で膨潤，脱気したセファデックス LH-20 カラム（直径4.8mm，長さ 100mm のカラムに 2ml 充塡）で溶出分離した．AD および DHA 分画をそれぞれ回収したのち，AD 分画は，さらにヘキサン：クロロホルム：メタノール＝77：20：3の溶媒で膨潤，脱気した同様のセファデックス LH-20 カラムを用いて再度の分離・回収を施行した．

セファデックス LH-20 カラムにおいては，DHA，AD，プレグネノロン，アンドロステロン，テストステロンなどの至適な分離状態を検討するため種々の混合溶媒を作成し，各ステロイドの溶出パターンを比較した．また，本実験の AD 分画および DHA 分画における種々のステロイドの回収率や混入率についても検討した．

2．DHA および AD のラジオイムノアッセイ（radioimmunoassay，RIA）

DHA の RIA は，以下の方法により行った．回収した DHA 分画を乾固したのち，メタノール0.6ml を加え，これを3等分し，1つは回収率補正用として放射能を測定し，残りの2つを測定用検体とした．検体に ^{3}H-DHA 10,000dpm を加え乾固したのち，抗血清溶液（0.05M ホウ酸緩衝液に BSA を0.06%，ペプシン処理ヒト免疫グロブリンを0.05%，アジ化ナトリウムを0.01%の濃度で加えた溶液に，抗 DHA 抗血清を1：

80,000～1：90,000で希釈) 0.5ml を加えて十分に混和し，4℃で一夜静置した．インキュベーション終了後，飽和硫安溶液0.5ml を加え混和し，10分間静置したのち，4℃，3,000rpm で10分間遠心分離を行った．上清0.5ml をカウントバイアルに入れ，トルエンシンチレーター (Dotite DPO 4g, Dotite POPOP 100mg をトルエン 1l に溶解) 5ml を加えて放射能を液体シンチレーションカウンター (Aloka-LSC-700；アロカ，三鷹) で測定した．

AD の RIA は，吉田ら[18]の方法により行った．回収した AD 分画を乾固したのち，メタノール0.6ml を加え，これを3等分して，1つは回収率補正用として放射能を測定し，残りの2つを測定用検体とした．検体に^{3}H-AD 10,000dpm を加え乾固したのち，抗血清溶液 (0.05M ホウ酸緩衝液に BSA を0.06%，ウシ血清γ-グロブリンを0.05%，アジ化ナトリウムを0.01%の濃度で加えた溶液に，抗 AD 抗血清を1：5,000で希釈) 0.25ml を加えて十分に混和し，室温で30分間静置した．インキュベーション終了後，飽和硫安溶液0.25ml を加え混和し，10分間静置したのち，室温，3,000rpm で10分間遠心分離を行った．上清0.25ml をカウントバイアルに入れ，トルエンシンチレーター5ml を加えて放射能を測定した．

V．その他の血中ホルモンの測定法

黄体化ホルモン (luteinizing hormone, LH)，卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) および PRL 濃度は，NIAMDD-RIA-Kit (National Pituitary Agency, Baltimore, U.S.A.)，すなわち，LH はＮＩＡＭＤＤ－γLH RP-2, FSH はＮＩＡＭＤＤ－γFSH RP-2, PRL は NIAMDD-γPRL RP-2 の各キットを用いて測定した．

プロゲステロンおよびテストステロンは第一ラジオアイソトープキット (第一ラジオアイソトープ研究所,東京) で測定した．

VI．組織学的検索

高 PRL 血症雌ラットにおける実験で得られた卵巣，副腎，子宮角，子宮頸および膣は，ホルマリン固定を行い，ヘマトオキシンーエオジン染色にて組織学的検討を行った．

VII．統計学的検討

実験結果の統計学的処理は，等分散分析のあと Student t－検定または Aspin-Welch 検定により行った．

成　　績

Ⅰ．雌ラットにおける血中 DHA および AD の測定法

今回の研究に用いた測定方法におけるセファデック

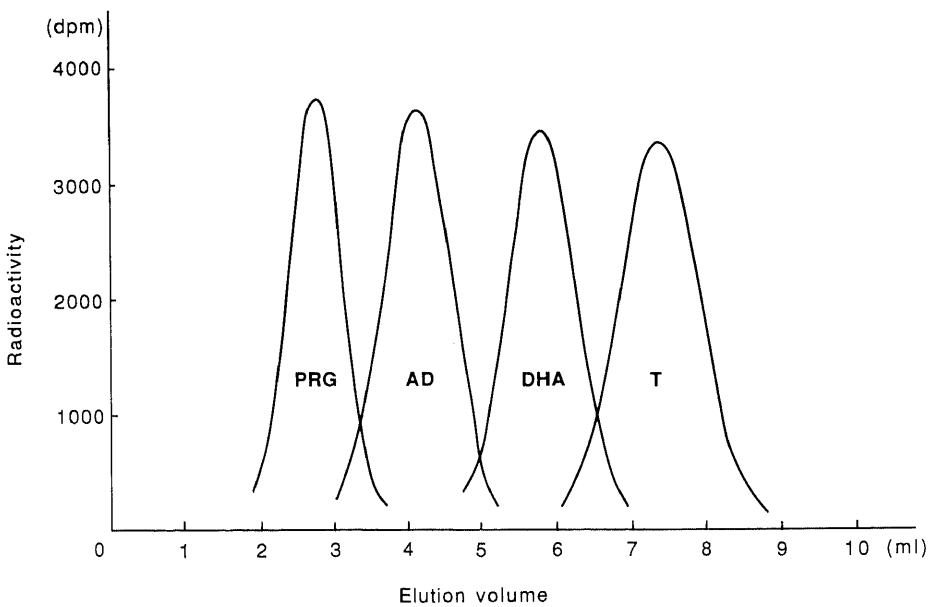

Fig. 2. Elution pattern of dehydroepiandrosterone and other steroids by Sephadex LH-20 column chromatography. The solvent system was hexane : benzene : methanol = 84 : 10 : 6. PRG, progesterone; AD, androstenedione; DHA, dehydroepiandrosterone; T, testosterone.

ス LH-20 カラムのヘキサン：ベンゼン：メタノール=84：10：6による各ステロイドの溶出条件（カラム1）は，図2に示す通りであった．この分離において，AD 分画は3.2～5.0ml, DHA 分画は5.2～6.7ml の溶出部分を回収した．なお，図には示さなかったが，AD 分画再分離のために用いたヘキサン：クロロホルム：メタノール=77：20：3による分離（カラム2）では，測定用の AD 分画として1.2～2.4ml の溶出部分を回収した．AD 分画および DHA 分画における各ステロイドの回収率および混入率は，表1に示す通りであった．カラム1とカラム2により得られた AD 分画では，AD は平均76.6%回収され，他のステロイドとほぼ分離可能であった．カラム1により得られた DHA 分画では，DHA は平均75.9%回収されたが，アンドロステロン平均11.1%，テストステロン平均16.0%の混入が認められた．

蒸留水を用いて全測定操作を行って求めた水におけるブランク値（pg/tube，平均±標準誤差）は，DHA では7.5±1.2 (n=9), AD では3.2±0.7 (n=9) であった．また，60日齢にて両側卵巣および副腎摘除後7日目に採血した検体にチャコール処理を加えた血清のブランク値（pg/tube，平均±標準誤差）は，DHA で10.5±1.2 (n=6), AD で3.5±0.7 (n=5) であり，ほぼ水におけるブランク値と同じであった．

標準曲線の読み取りから求められた最少感度は，DHA で 4pg, AD で 5pg であった．したがって，血中濃度の測定に際しては，標準曲線からの読み取り値は，DHA, AD ともに 20pg/tube を測定限界とした．測定全体での回収率は，DHA で69.4±1.3%（平均±標準誤差，n=75), AD で63.0±1.0% (n=49) であった．測定法の再現性を示す測定内変動 (intra-assay variance) は，DHA で10.4% (n=10), AD で8.4% (n=9) であり，測定間変動 (inter-assay variance) は DHA で15.4% (n=7), AD で15.0% (n=7) であった．

これらの結果より，本研究において用いた血中 DHA および AD の測定法は，感度，回収率，精度，再現性は，ともに良好であり，雌ラットにおける血中濃度の測定に十分使用できるものと考えられた．

II．雌ラットの生理的状態下における血中アンドロゲン動態

1．成熟期正常雌ラットにおける血中 DHA 濃度と両側卵巣および副腎摘除の及ぼす影響

上記の血中 DHA 測定法を用いて測定した成熟期雌ラットの血中 DHA 濃度は，図3に示す通りであった．すなわち，正常群である60日齢雌ラットの発情間期第1日9時の血中 DHA 濃度（pg/ml，平均±標準誤差）は，280.7±72.8 (n=7) であった．これに対し，両側副腎摘除後10日目の雌ラットでは，108.0±28.0 (n=5) と有意の低値を示した ($p<0.05$)．両側卵巣摘除および両側卵巣・副腎摘除後10日目の雌ラットでは，それぞれ血中 DHA 濃度は測定感度以下であった．

2．血中 DHA 濃度の日齢的変動

雌ラットの10日齢より100日齢まで，10日間隔で採血し測定した血中 DHA 濃度（pg/ml，平均±標準誤差）の日齢変動は，表2および図4に示す通りであった．すなわち，10日齢では130.5±30.8 (n=5) であり，20日齢から30日齢にかけてやや上昇するものの，50日齢までは 100～200pg/ml と比較的低値であった．60日齢では320.2±50.7 (n=7) と50日齢に比べて有意に上昇し ($p<0.01$)，その後は 300～400pg/ml の範囲でほぼ一定に推移した．

なお，卵巣重量（mg/100g 体重，平均±標準誤差）

Table 1. The recovery and contaminaton of steroids by Sephadex LH-20 column

Steroids	AD fraction	DHA fraction
Progesterone	0.6%	0.4%
Pregnenolone	4.6%	6.3%
Androsterone	3.2%	11.1%
Androstenedione	76.6%	3.4%
Dehydroepiandrosterone	0.5%	75.9%
Testosterone	0.5%	16.0%

Androstenedione (AD) fraction was columned with column 1(hexane : benzene : methanol=84 : 10 : 6) and subsequently by column 2 (hexane : chloroform : methanol=77 : 20 : 3).
Dehydroepiandrosterone (DHA) fraction was separated by column 1. Results represent the mean rate of the added steroid amounts.

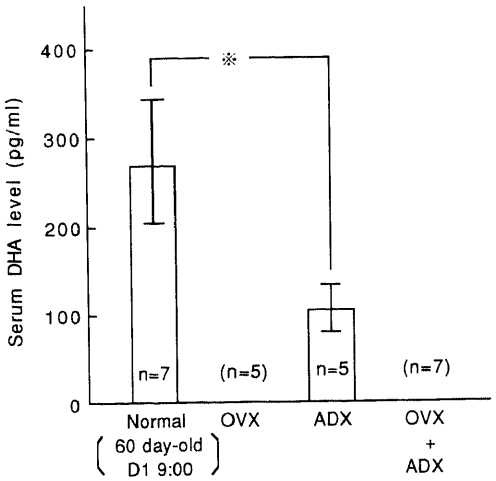

Fig. 3. Serum dehydroepiandrosterone (DHA) levels of 60 day-old normal, ovariectomized and/or adrenalectomized female rats.
Each column represents the mean±SEM. Numbers in column and parenthesis indicate the number of serum samples examined. Normal, normal control female rats; OVX, ovariectomized rats; ADX, adrenalectomized; D1, diestrus first day. ※ $p<0.05$.

は，10日齢では9.0±6.8 (n=5) であったが，20日齢には35.7±2.4 (n=4) と有意に増加した ($p<0.01$)．30日齢では22.4±0.9 (n=5) と減少したが，以後は日齢の進行とともに次第に増加して，60日齢で37.0±1.2 (n=7) となり，その後はほぼ一定であった．副腎重量においても，卵巣重量の変化と同様に，20日齢で一時的に増加し，30日齢で減少するものの以後は日齢の進行とともに増加して60日齢で最大値となる推移を認めた．しかし，その変化の程度は卵巣重量の変化と比べて軽度であった．なお，実験対象雌ラットの膣開口日齢は36.1±0.8日齢 (平均±標準誤差，n=8) であり，膣スメアによる性周期の規則性が認められたのは52～55日齢以降であった．

3．性周期に伴う血中ホルモン濃度の変動

血中 DHA および AD の性周期に伴う変動について，FSH, LH, PRL などの変化と比較検討した成績は，図5に示す通りであった．FSH と LH は，発情前期の17時以後に上昇し，23時に頂値を有する変動を示した．PRL は，発情前期の15時以後に上昇し，23時に頂値を示した．AD (pg/ml，平均±標準誤差) は，発情間期第1日における血中濃度はきわめて低値であった

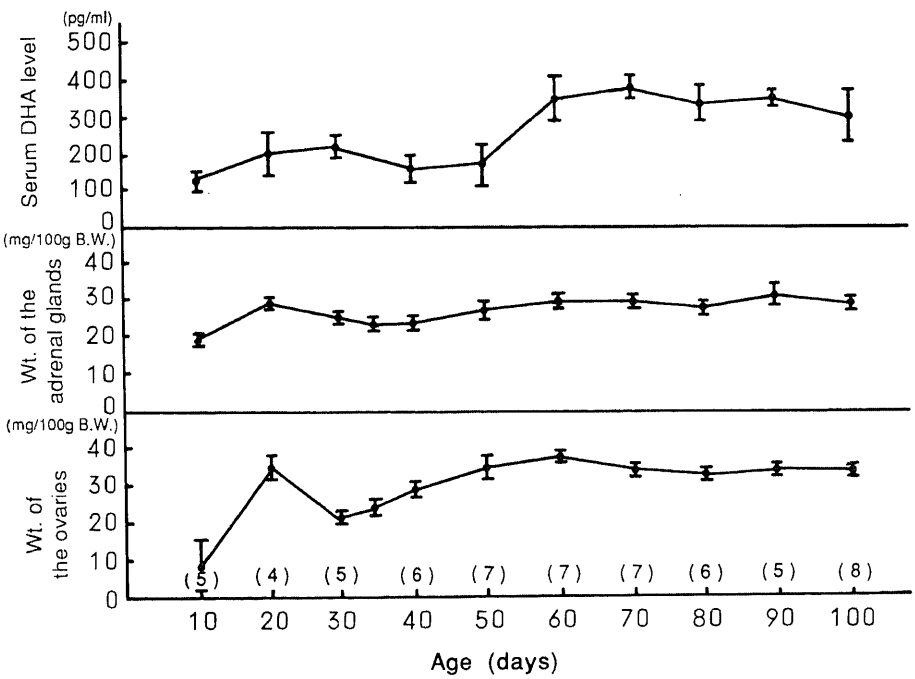

Fig. 4. Changes of serum dehydroepiandrosterone (DHA) levels, adrenal and ovarian weights through age in female rats.
Each point represents the mean±SEM. Bloods and organs were taken at 9: 00 of each days before 50 day-old, and taken at 9: 00 of the first day of diestrus after 60 day-old. Numbers in parenthesis indicate the number of female rats examined. B. W., body weight; Wt, weight.

Table 2. Changes of serum DHA levels and adrenal and ovarian weights with age

Age (day)	Serum DHA levels (pg/ml)	Adrenal gland (mg/100g B.W.)	Ovarian weight (mg/100g B.W.)	Number of rats
10	130.5±30.8	19.7±0.8	9.0±6.8	5
20	211.7±61.3	29.5±0.8	35.7±2.4	4
30	230.8±31.4	25.9±0.8	22.4±0.9	5
40	174.5±42.7	24.3±1.1	29.7±0.1	6
50	173.8±59.6	27.5±2.2	35.0±2.6	7
60	320.2±50.7	29.1±0.5	37.0±1.2	7
70	378.7±28.5	29.2±1.8	34.0±1.4	7
80	343.6±41.2	27.6±0.4	32.9±1.5	6
90	349.7±21.1	31.8±3.0	33.8±1.4	5
100	303.4±68.7	27.8±1.3	33.5±1.5	8

Each result represents the mean ± SEM.

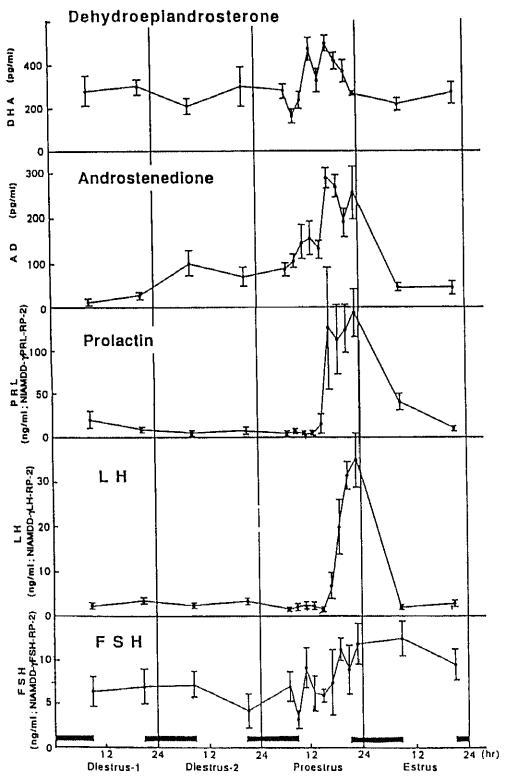

Fig. 5. Changes of serum hormone concentrations during the estrus cycle in female rats. The rats were housed under controlled light (11.5 hr of light 9 : 00～20 : 30, 12.5 hr of dark).
Each mean is calculated from the values of 5 to 7 serum samples examined. DHA, dehydroepiandrosterone; AD, androstenedione; PRL, prolactin; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone.

が，発情前期に向けて次第に上昇し，発情前期9時では104.6±12.8 (n=5) となり，17時には290.2±20.8 (n=5) と頂値を示した．その後，次第に低下し，発情期の9時にはほぼ発情間期第1日の血中濃度にまで低下した．DHA (pg/ml, 平均±標準誤差) は，発情間期第1，2日を通じて 300pg/ml 前後の血中濃度を示したが，発情前期の13時には471.5±53.9 (n=5) と発情前期の11時に比べて有意に上昇し ($p<0.01$)，17時には498.5±26.9 (n=5) と頂値を示した．その後は，次第に低下し，発情前期の23時にはほぼ発情間期の血中濃度にまで低下した．なお，同時に検索した卵巣重量 (mg/100g 体重，平均±標準誤差) は，発情間期第1日の9時では32.0±1.3 (n=5) であったが，発情前期になると漸増し，23時に43.7±1.8 (n=5) と最大値を示した．発情期の9時には35.3±1.7 (n=5) と低下した．副腎重量においては，性周期に伴う有意の変化は認められなかった．

Ⅲ．高 PRL 血症雌ラットにおける血中アンドロゲン動態

ピモジドの経口摂取開始後の血中 PRL 値は，速やかに上昇，投与開始第5日目には 400～500ng/ml と著増し，それ以降では 200～300ng/ml のレベルで推移した．なお，投与第14日目の検索では，その日内変動は認められなかった．

腟スメアは，ピモジド溶液摂取の P 群では，摂取開始後持続的に非発情期像を示した．一方，ピモジドを含まないコントロール溶液摂取の C 群では，正常性周期像を示した．体重においては，両群の間に有意差を認めなかった．

このようなピモジド経口摂取によって持続的高

PRL 血症を誘発した雌ラットに対して，HCG および ACTH を負荷したときの卵巣，性器および副腎重量の変化と血中ホルモンの変化について検討した成績は，以下の通りであった．

HCG および ACTH 投与による卵巣および副腎重量の変化は，図 6 に示す通りであった．すなわち，卵巣重量 (mg/100g 体重，平均±標準誤差) は，生理食塩液注射投与の P 群では33.6±1.0と，C 群の37.6±1.7に比べやや低値を示したが，有意差は認められなかった．HCG 注射投与によって，P 群では39.4±0.8，C 群では45.3±1.5と共に増加したが，P 群では C 群に比べて有意に低値であった ($p<0.01$)．ACTH の 1 μg 注射投与によって，P 群では32.4±0.6で，C 群の32.5±1.6との間に有意の差を認めなかった．しかし，ACTH の 10μg 注射投与では，P 群では 3 5 . 2 ± 0.8で，C 群の42.1±0.9に比べ有意に低値であった ($p<0.01$)．副腎重量 (mg/100g 体重) には，各実験群の間で有意の差は認められなかった．

子宮角 (mg/100g 体重)，子宮頸 (mg/100g 体重) および膣 (mg/100g 体重) の重量には，各実験群の間で有意の差は認められなかった．

血中 PRL, LH および FSH 値の変化は，表 3 に示す通りであった．血中 PRL は，P 群では，HCG, ACTH および生理食塩液注射投与のいずれの群においても 200～300ng/ml の高値を示し，各実験群間で有意の差は認められなかった．C 群では，いずれも 4～6ng/ml と低値であり，HCG, ACTH および生理食塩液注射投与による変化は認められなかった．血中 LH および FSH 値は，P, C 両群において低値であり，両群の各実験群間において有意の差は認められなかった．

血中 DHA と AD の濃度の変化は，図 7 に示す通り

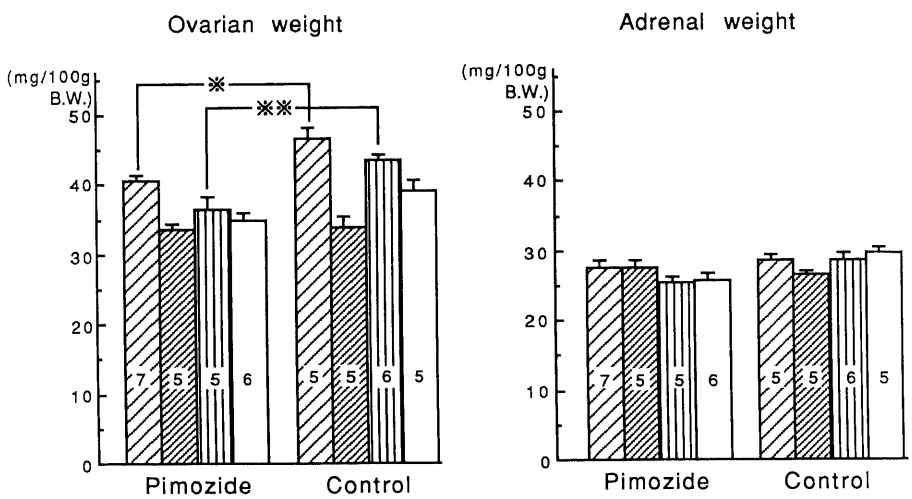

Fig. 6. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and adrenocorticotropin (ACTH) administrations on ovarian and adrenal weights in pimozide-induced hyperprolactinemic rats and control rats. HCG 10IU (▨), ACTH 1μg (▩), ACTH 10μg (■) and saline 0.2ml (□) were injected subcutaneously at 19 : 00 on 13th day of hyperprolactinemic state, and organs were taken at 9 : 00 on 14th day. Each column represents the mean±SEM. Numbers in column indicate the number of female rats examined. ※※ $p<0.01$, ※ $p<0.05$, B. W., body weight.

Table 3. Effects of HCG and ACTH administrations on serum PRL, LH and FSH concentrations in Pimozide-treated and control rats

	Pimozide-treated rats				Control rats			
	HCG 10 IU	ACTH 1μg	ACTH 10μg	Saline	HCG 10 IU	ACTH 1μg	ACTH 10μg	Saline
PRL (ng/ml)	254.5±30.2	204.5±38.7	209.9±30.1	291.9±51.8	6.2±1.7	6.0±0.6	6.3±0.6	4.7±0.3
LH (ng/ml)	1.6± 0.3	2.9± 0.6	1.8± 0.2	1.7± 0.3	1.9±0.4	2.1±0.7	1.9±1.0	1.8±0.2
FSH (ng/ml)	3.1± 1.0	3.7± 0.7	3.6± 4.1	9.0± 1.7	8.8±2.8	8.4±3.8	2.9±0.7	3.8±1.0
Number of rats	7	5	5	6	5	5	6	5

Results represent the mean±SEM. PRL, prolactin; LH, luteinizing hormone; FSH, follicle stimulating hormone; HCG, human chorionic gonadotropin; ACTH, adrenocorticotropin.

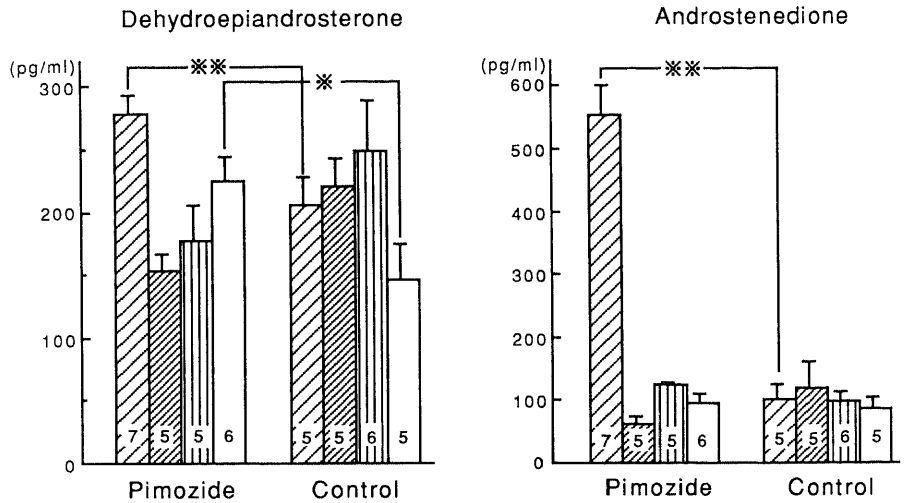

Fig. 7. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and adrenocorticotropin (ACTH) administrations on serum dehydroepiandrosterone and androstenedione concentrations in pimozide-induced hyperprolactinemic rats and control rats. HCG 10IU (▨), ACTH 1μg (▩), ACTH 10μg (▥) and saline 0.2ml (□) were injected subcutaneously at 19 : 00 on 13th day of hyperprolactinemic state, and each rats were decapitated and taken blood at 9 : 00 on 14th day.
Each column represents the mean±SEM. Numbers in column indicate the number of serum samples examined. ※※ $p<0.01$, ※ $p<0.05$.

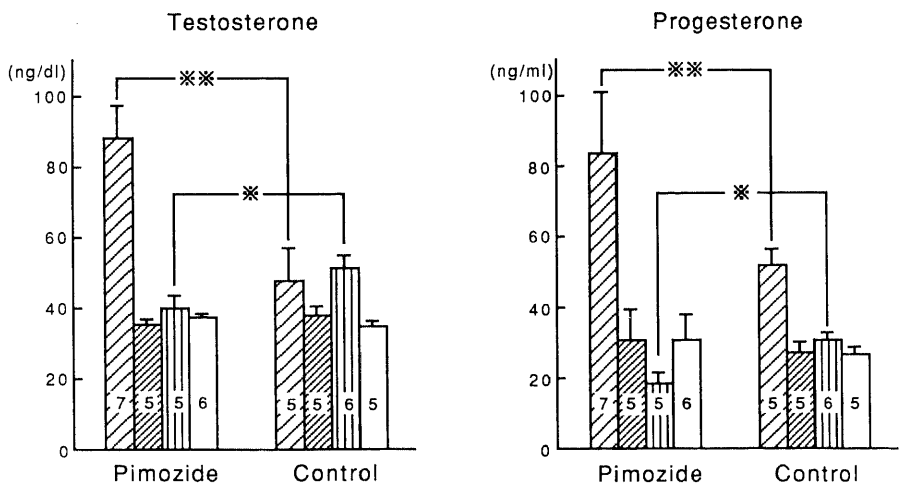

Fig. 8. Effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and adrenocorticotropin (ACTH) administrations on serum testosterone and progesterone concentrations in pimozide-induced hyperprolactinemic rats and control rats. HCG 10IU (▨), ACTH 1μg (▩), ACTH 10μg (▥) and saline 0.2ml (□) were injected subcutaneously at 19 : 00 on 13th day of hyperprolactinemic state, and each rats were decapitated and taken blood at 9 : 00 on 14th day.
Each column represents the mean±SEM. Numbers in column indicate the number of serum samples examined. ※※ $p<0.01$, ※ $p<0.05$.

であった．血中 DHA (pg/ml，平均±標準誤差) は，生理食塩液注射投与の P 群では220.1±19.3と，C 群の142.2±28.0に比べて有意に高値であった ($p<0.05$)．HCG 注射投与により，P, C 両群において上昇をみたが，P 群では273.6±14.6と C 群の201.4±22.5に比べて有意に高値であった ($p<0.01$)．ACTH 1μg 注射投与によって，P 群では148.3±13.3，C 群では215.2±23.5となり，ACTH 10μg 注射投与によって，P 群では173.3±27.1，C 群では244.8±39.3となった．いずれも，P 群では C 群より低値傾向を示したが，P, C 両群の間で有意の差は認められなかった．血中 AD (pg/ml，平均±標準誤差) は，HCG 注射投与によって，P, C 両群において上昇したが，P 群では545.0±47.9と C 群の92.2±23.5に比べて有意に高値を示した ($p<0.01$)．生理食塩液および ACTH 注射投与では，P 群と C 群各実験群の間には有意の差は認められなかった．

血中テストステロンおよびプロゲステロン濃度の変化は，図8に示す通りであった．血中テストステロン (ng/dl，平均±標準誤差) は，生理食塩液注射投与の P 群では36.6±1.3と，C 群の34.2±1.4との間に有意の差は認められなかったが，HCG 注射投与によって，P 群では87.4±9.5，C 群では47.3±9.2と共に上昇し，前者が後者に比し有意の高値を示した ($p<0.01$)．ACTH 1μg 注射投与では，P 群は34.6±1.9，C 群は37.4±2.4であり，共に有意の変化は認めなかった．しかし，ACTH 10μg 注射投与では，P 群では39.4±3.7，C 群では50.4±3.6と後者の方が有意の高値を示した ($p<0.05$)．

血中プロゲステロン (ng/ml，平均±標準誤差) でも同様に，生理食塩液注射投与では，P 群の30.3±6.8と C 群の26.0±2.2との間には，有意の差は認められなかったが，HCG 注射投与により両群共に上昇し，P 群では82.8±17.6と C 群の51.2±4.5に比べて有意の高値を示した ($p<0.01$)．ACTH 1μg 注射投与では，P 群は30.0±9.1，C 群は26.7±3.1と変化なく，両群の間にも有意の差は認められなかった．しかし，ACTH 10μg 注射投与では，P 群は17.9±2.9，C 群は30.1±2.2と前者が後者に比べて有意に低値を示した ($p<0.05$)．

考　　察

ヒト副腎性アンドロゲンの主体を占める DHA とその硫酸抱合型である DHA-S の血中濃度は，RIA 法の開発とその測定操作の改良・進歩によって微量の検体で容易に測定されるようになり，それらの生理的・病理的状態下における分泌動態が次第に明らかにされてきている．我々の教室でも，これまでに富田[2][19]，荒木[3]，Akasofu ら[20] がヒト女性における血中 DHA, DHA-S, 11－デオキシ－17－KS などを RIA 法[21]で測定し，各種状態下における副腎性アンドロゲンの動態について詳細に検討してきた．それらのうち，血中 DHA の動態に限定して教室の成績を略述すると，「血中 DHA には早朝に高値を示す日内変動が認められる．性周期に伴う変動では，一定のパターンは認められないが，排卵前の LH サージと一致して血中レベルの上昇する症例がみられる．年齢的推移では，幼児期は 0.1μg/dl 以下と低値であるが，思春期前半の初め8～9歳より急速に上昇し，初経後も更に上昇して，20歳周辺期において平均 0.65μg/dl とピークを示す．20歳代後半には平均0.31μg/dl に低下し，以後50歳代まではほぼ一定の傾向を示す．その後さらに低下して60歳代以降では平均 0.21μg/dl となる年齢依存的な変動が認められる．また，手術をはじめとするストレスや ACTH の負荷により，血中 DHA 値が急上昇する．しかし，その場合においてコルチゾール分泌との解離現象がみられる．」などである．その他，肥満[22][23]，神経性食思不振症[24]，高 PRL 血症[9]，多嚢胞性卵巣症候群[25]，多毛症[26]において，副腎性アンドロゲンの分泌異常が認められており，性機能との密接な関連性が示唆されている．

ヒトにおける DHA や DHA-S の分泌を調節する機構については，ACTH を介する下垂体－副腎系が最も重要な役割を果たしていることが明らかである[6]．しかし，血中副腎性アンドロゲンとコルチゾールには，ACTH やデキサメサゾン負荷時にその変動パターンに解離が認められることや，年齢的推移のパターンに差異のあることから，副腎性アンドロゲン分泌に対する ACTH 以外の調節因子の存在が示唆されている．現在までに調節因子として考えられているものには，エストロゲンやプロラクチンがある．また，近年では副腎性アンドロゲン刺激因子としてヒト下垂体より抽出された分子量60,000の糖タンパク物質が注目されている[7]．

一方，ラットやマウスなどのげっ歯類では，霊長類に比べ血中 DHA は極めて低値であり，上述のようなヒトにおいて認められる加齢に伴う特徴的な変化はみられず，また，思春期発来に関連してみられる副腎性アンドロゲンの分泌亢進，すなわち思春期副腎皮質機能亢進微候発現 (adrenarche) や性成熟に伴う変化も乏しいとされている．このことは逆に，ヒト副腎性アンドロゲンの生物学的作用を研究するためにラットを

用いることが，投与 DHA の体内における代謝の問題はあるものの，その固有の作用を知るうえではかえって有利であるといえる．西田ら教室一連の基礎的研究から，DHA の生物学的作用としては，膣上皮の肥厚，膣上皮細胞の粘液化，子宮重量の増加，包皮腺重量の増加，代謝面における蛋白同化作用などが確認されている[1)27)28)]．また，一方では，幼若期の雌ラットに DHA 投与した場合，早発排卵 (precocious ovulation) が生じ膣開口日も早くなるが[14)29)]，その後の性周期は不規則となり，卵巣における卵胞数の減少，排卵数の減少，妊孕能の低下などの生ずることが明らかにされている．また，幼若期雌ラットへのエストロゲンやアンドロゲンの大量投与は，卵巣の多嚢胞性変化と性周期の異常，無排卵を引き起こすが[30)31)]，DHA の投与でも同様の変化が生ずるとされている．この変化は，ヒト女性における多嚢胞性卵巣症候群の実験モデルとして注目されている．その他に，DHA の作用として，抗肥満作用[32)33)]や乳癌における抗癌作用[34)35)]なども報告されている．

ラットに対する DHA の投与実験から，上記のような種々の生物学的作用が明らかにされてきているが，ラット自体における血中濃度とその動態，産生臓器などについては十分に解明されていなかった．近年，ラットにおける DHA について再検討されるようになってきているが，報告されている血中濃度は測定方法によってかなり異なっている．Ducharme ら[36)]は雌ラットの血中濃度が0.05ng/ml 以下であること，石井ら[37)]は 4～5ng/ml と比較的高値であることを報告しているが，一般にその基礎値は0.1～0.5ng/ml の範囲にあるとされている[14)~17)38)]．しかし，その主要産生臓器や制御機構については，あまり検討されていない．

本研究では，ラットの血中 DHA を測定するため，まずヒトにおける血中 DHA 測定方法[21)]の改良を行った．測定法の検討に際しては，検体量，抽出方法，他のステロイドの交叉反応をできる限り少なくするための DHA 分画の分取方法などが重要なポイントであった．まず，検体量については，ヒト女性の DHA 測定では従来0.02～0.1ml が用いられてきたが，文献によるラットの血中濃度，測定法における標準曲線上の感度，回収率，血清ブランク値などを考慮して血清量 0.4～0.5ml を用いた．抽出方法に関しては，従来のヘキサンによる抽出は検体量の増加により抽出率が50～60%に低下するため，エチルエーテルを使用した．また，エチルエーテル抽出に伴う水溶性物質や抗原－抗体反応を阻害する脂質の混入を防ぐために水洗とヘキサンによる洗浄を加え，それらによってステロイド以外の夾雑物の除去を図った．DHA の分離には，測定する検体数や RIA 法による精度および効率を考慮して，セファデックス LH-20 によるカラムクロマトグラフィーを用いた．国分ら[39)]は，セファデックス LH-20 による AD や DHA の分離に 2ml ツベリクリン注射器を使用したマイクロカラムに，ヘキサン：ベンゼン：メタノール＝8：1：1の混合溶媒を用いているが，この方法では AD と DHA の分離が不十分であったので，径4.8mm，長さ 100mm の細長いカラムに変更して，種々の比率の混合溶媒による溶出条件を検討した．このカラムを用い，ヘキサン：ベンゼン：メタノール＝84：10：6の混合溶媒により分離した場合，ほぼ AD と DHA の分離が可能となり，血中 DHA の測定と同時に AD の測定も可能となった．なお，この方法による溶出条件には，同一の溶媒を使用しても温度，湿度などの環境条件によって僅かながら変化が認められたので，測定の際にはその都度溶出条件を確認し分離を行った．種々の条件下における AD と DHA の分離度 (separation, Rs) はほぼ1.0であり，相互の混入率はそれぞれの分画で約３％程度であった．なお，ヘキサン：ベンゼン：メタノール＝84：10：6の混合溶媒により分離された AD 分画にはプロゲステロン，アンドロステロン，プレグネノロンなどがかなり含まれており，また，AD 測定のために使用した抗 AD 抗体のプロゲステロン，アンドロステロンに対する交叉反応がそれぞれ1.4%，4.8%[18)]認められるため，ヘキサン：クロロホルム：メタノール＝77：20：3の混合溶媒を用いたセファデックス LH-20 カラムクロマトグラフィーを再度行った．この方法により，AD 分画においては，AD 以外の主要ステロイドをほぼ除去することが可能となった．また，今回 DHA 測定のために使用した抗 DHA 抗体は，DHA-3-O-CO-BSA と DHA-17 oxime-BSA より作成した抗体を１：１に混合したものであり，ヒト血清の測定に用いた場合，そのアンドロステロンに対する交叉反応は2.5%，テストステロンに対する交叉反応は１～２％ときわめて低値であった[3)21)]．DHA 分画には，表１に示す通りアンドロステロン11.1%，テストステロンが16%混入していたが，抗 DHA 抗体の特異性と雌ラットにおける血中アンドロステロンやテストステロンの濃度がそれぞれ 0.1～0.2ng/ml，0.3～0.5ng/ml と低値であることを考慮すれば，実際の測定値にはほとんど影響しないものと考えられた．なお，本測定法における回収率，感度，精度はともに良好であり，ラットにおける血中 DHA および AD の動態を検討するために十分使用できるものと判断された．

この測定法で雌ラットの血中 DHA を測定したところ，60日齢の発情間期9時の検体における血中 DHA 濃度は，280.7±72.8pg/ml であった (図3)．また，両側副腎・卵巣摘除ラットの血清における血清ブランク値は水ブランク値とほぼ同じであったことから，血清中の夾雑物の影響はうけないものと考えられた．

日齢的変動においては，50日齢までの血中 DHA 濃度は 100～200pg/ml と低値であり，60日齢以後には300～400/ml の範囲に上昇した (図4)．また，卵巣および副腎重量は，20日齢前後の幼若期に有意に増加するが，この時期に DHA の血中濃度もやや上昇する傾向が認められた．Döhler ら[40]によれば，この時期には血中のエストロゲン，ゴナドトロピンが上昇するとされており，また，後述のごとく副腎の関与の少ないことから，この時期の血中 DHA の上昇は卵巣におけるエストロゲン分泌の亢進に付随した変化と考えられた．なお，実験対象雌ラットにおける性周期の確立は52～55日齢以降であり，また，卵巣重量は30日齢以後に日齢の進行とともに漸増し，最大値となるのが60日齢であり，このような性成熟確立の時期と血中 DHA 濃度が急増する時期が一致していた．これらのことから，雌ラット性成熟過程における卵巣 DHA の分泌亢進が生殖現象の発現に関連している可能性が示唆された．

さらに性周期に伴う血中 DHA 濃度の変化は，発情間期，発情期ではあまり変化がみられなかったが (図5)，発情前期の午後に基礎値の約2倍程度に上昇することが今回の研究で明らかにされた．同時に測定した AD においては，基礎値は DHA に比べてかなり低値であったが，頂値の血中濃度は DHA とほぼ同程度にまで上昇し，増加の比率も5～10倍に達していた．これらの変化は，卵巣における卵胞発育に伴うステロイド産生の亢進によるものと考えられた．ラット卵巣におけるステロイド産生は，LH の刺激をうけた莢膜細胞において主に Δ^5 経路を経て AD やテストステロンが合成され，FSH の刺激をうけた顆粒膜細胞で芳香化酵素が作用してエストロゲンが産生されるとされている[41]．同様の代謝経路はヒト卵巣でも明らかにされており[42]．一般的には卵巣における莢膜・顆粒膜2種細胞協調ステロイド産生理論 (two cells theory or two compartments theory) として知られている．このようなラット血中 DHA の性周期における変化や性成熟に伴う変動などからみて，DHA が排卵現象，性機能の発現などに密接に関与しており，また，単にエストロゲンの前駆物質としての役割のみならず交尾行動の誘発作用を有する可能性も示唆された．また，雌ラットにおける血中 DHA 濃度の卵巣および副腎摘除による影響 (図3)，日齢的変動 (図4)，性周期に伴う変動 (図5) などより，DHA は主として卵巣より生成分泌され，副腎からの分泌はほとんどないものと考えられた．なお，血中 DHA 濃度は副腎摘除のみでも低下するが (図3)，その程度は卵巣摘除に比べて小さく，この低下は副腎性ステロイド消失による卵巣機能の低下やゴナドトロピン分泌の変化に起因するものと考えられた．

これらの結果から雌ラットにおける血中 DHA は，20歳代ヒト女性の約1/15～1/20程度の低い血中濃度であるが，DHA は卵巣から生成分泌されており，性成熟，性周期の成立など性・生殖機能面で重要な役割を果たしているものと推考された．

さて，近年ヒトにおける PRL の生殖生理における役割が注目されており[43][44]，月経異常・排卵障害患者に PRL とアンドロゲンの分泌異常を認めることが多いと報告されている[9][10]．しかし，PRL の卵巣や副腎におけるアンドロゲン産生に対する作用については，未だ明確な結論が得られていない現状にある[45]．一方，成熟雄ラットにおける研究では，下垂体の腎被膜下移植やエストロゲン投与による高 PRL 血症状態で，血中ゴナドトロピンの低下と，血中プロゲステロンの上昇，テストステロンの低下がみられるとされているが[46]～[49]，成熟雌ラットの高 PRL 血症状態における血中各種アンドロゲンの動態については，あまり検討されていない．

本研究では，DHA と PRL との関連性を考究するため，高 PRL 血症雌ラットのアンドロゲンを中心とするホルモン動態について検索した．高 PRL 血症誘発方法としては，子宮頸管刺激，エストロゲンの投与，下垂体の腎被膜下移植，中枢性ドーパミン拮抗剤の投与などが知られているが，今回は，中枢性ドーパミン拮抗剤であるピモジドを使用した．Advis ら[50]の方法を改変したピモジド溶液を作成しこれを自由摂取させることによって，血中 PRL は 200～300ng/ml となったが，この血中濃度は正常性周期における PRL サージの頂値よりもやや高値であった．同じドーパミン拮抗剤であるスルピリドやドンペリドンにも血中 PRL 上昇作用が認められているが，飲水としての投与法に問題があり，また血中 PRL 上昇の持続時間が短いことから，高 PRL 血症状態を持続的に維持することには適さないと考えられた．

さて，ピモジドはカルモジュリン阻害剤として Ca^{2+} チャンネルブロック作用を有し，試験管内実験では，0.1μM 以上の投与で下垂体前葉からの GH と

LH 分泌を抑制し，また，副腎細胞におけるステロイド産生を抑制することが知られている[51)~54)]．しかし，今回使用したピモジド溶液は 10mg/l の濃度であり，ラット一匹あたりの飲水量が 20～30ml/日であることから，ピモジド摂取量は 0.5～0.7μM/日と考えられた．今回の実験では，ラットの血中ピモジド濃度を測定しなかったが，ヒトに 6mg/日 (12μM/日) 投与した際の血中ピモジド濃度の頂値は約 0.02nM/ml にとどまることから[55)]，本研究に用いた高 PRL 血症雌ラットの血中ピモジド濃度は Ca^{2+} 拮抗作用を示す濃度よりはかなり低いものと考えられた．

雌ラットにおいては，発情間期第1日に PRL を投与すると黄体が肥大化し，偽妊娠状態になるとされている[56)]．成熟雌ラットにおける高 PRL 血症状態は偽妊娠状態に近似しているが，今回の実験で生じた高 PRL 血症状態では，偽妊娠においてみられる血中 PRL の日周リズム (circadian rhythm) としての日中と夜半の上昇 (diurnal surge, nocturnal surge) が認められず，実験期間を通じての持続的な血中 PRL 濃度の上昇が認められた．このような高 PRL 血症が14日間持続することにより，卵巣重量は対照群に比べてやや減少し (図6)，血中 DHA 濃度の上昇することが認められたが (図7)，副腎重量や他の血中ホルモンには有意の差はみられなかった．

さらに，高 PRL 血症状態における内分泌動態を検索するため，HCG および ACTH を投与し，その影響について検討した．高 PRL 血症雌ラットでは，HCG 注射投与の場合，卵巣重量の増加は，対照群に比し小さいが (図6)，血中 DHA, AD, テストステロンなどのアンドロゲンやプロゲステロンが著明に上昇することが認められた (図7，8)．これは PRL と LH の協同作用による卵巣におけるアンドロゲン産生亢進に起因するものと考えられた．なお，HCG 注射投与において，高 PRL 血症雌ラットの卵巣重量が対照群のそれに比し小さいのは (図6)，高 PRL 血症のために黄体が肥大するものの，ゴナドトロピンの分泌が抑制され，発育卵胞が減少した結果によるものと考えられた．

高 PRL 血症ラットにおけるゴナドトロピンとアンドロゲンの動態については，主として雄ラットで検討されているが，それによると血中 LH, FSH, テストステロン値はともに低下するとされている[47)~49)]．しかし，LH の低下は認めるもののテストステロンは逆に上昇するという報告もある[57)]．また，高 PRL 血症雄ラット[58)]や偽妊娠ラット[59)]に HCG を投与したとき，あるいは下垂体摘除雄ラット[60)]，偽妊娠黄体細胞[61)]，ライデッヒ細胞[62)]などに PRL と LH を同時に投与したときに，テストステロンとプロゲステロンの著明な産生亢進がみられるとされている．しかしこれを否定する報告もある[49)63)]．このようにアンドロゲンの動態に関する見解は一致していないけれども，一般には PRL と LH がラット睾丸や卵巣 (特に黄体) に協同的に作用して，テストステロンやプロゲステロンの産生を亢進させるものと考えられている．それには，黄体細胞における $C_{17\text{-}20}$ リアーゼ，17α－ヒドロキシラーゼ活性の亢進[64)]，また，雄ラットでは睾丸におけるコレステロールエステルリガーゼ，3β－ヒドロキシステロイド脱水酵素および17β－ヒドロキシステロイド脱水酵素活性の亢進[58)]が関与しているとされている．

また，性腺のみならず，副腎が，高 PRL 血症雌ラットにおける PRL と LH の作用発現に関与していることが示唆されている[65)]．しかし，本研究の予備実験において，副腎摘除高 PRL 血症雌ラットに HCG を注射投与したところ血中アンドロゲンやプロゲステロンの上昇を認めており，また，本研究の卵巣重量などに及ぼす影響からみて，副腎の関与は極めて少ないものと考えられた．

なお，偽妊娠ラットの黄体においては，偽妊娠発症10日目頃よりプロゲステロンの産生が低下するとされている[66)]．しかし，本研究の高 PRL 血症雌ラットにおいては，HCG 注射投与によるアンドロゲンやプロゲステロンの産生能の最大値が10日目から15日目にかけてみられることを予備実験で確認している．また，卵巣の組織学的検索で，高 PRL 血症雌ラットにおいては，発育卵胞の減少傾向と黄体の肥大が認められ，HCG 注射投与によりさらに黄体が肥大する所見が得られた．このことから，持続的高 PRL 血症の状態においては，PRL と LH (HCG) が協同的に黄体に作用し，アンドロゲンとプロゲステロンの産生を亢進するものと考えられた．

一方，ACTH 注射投与の場合，1μg 投与では，高 PRL 血症群と対照群の間に卵巣重量や血中ホルモン値の差は見られなかったが，10μg 投与では，高 PRL 血症群よりも対照群において卵巣重量が大であり，血中プロゲステロンおよびテストステロンが高値を示した (表3，図6～8)．対照群における ACTH 10μg 注射投与時の血中アンドロゲンとプロゲステロンの上昇と卵巣重量増加の理由としては，ACTH 大量投与により副腎性ステロイドの分泌が亢進し，これが卵巣で代謝されたためと考えられる．この ACTH 投与による血中アンドロゲンの上昇は性腺摘除によって認められなくなるが，今回の研究で高 PRL 血症雌

ラットにおいて ACTH 投与による血中アンドロゲンの上昇が認められなかったことから，PRL が卵巣機能 (特に卵胞) を抑制している可能性が示唆された．しかし，今回の実験からのみではその詳細な機序を明らかにすることはできなかった．

以上，高 PRL 血症雌ラットを対象とした今回の実験から，PRL と LH (HCG) の協同作用によって卵巣におけるアンドロゲンとプロゲステロンの産生の亢進することが明らかにされた．しかし，一部にアンドロゲンの産生が抑制されるとの報告[65)67)]もあるので，PRL, LH, アンドロゲンの相互関係については，今後さらに検討すべきものと考えられる．

結　　論

雌ラットにおける DHA の血中動態を明らかにするために，まず血中 DHA 測定法を改良し，その主要産生臓器，日齢変動，性周期に伴う変動などについて検索した．ついで高 PRL 血症雌ラットにおいて PRL と DHA との関連性について検討し，以下の結論を得た．

1）測定法に関しては，血清量，抽出方法，分離方法の改良によって，ラット血中 DHA と AD の同時測定が可能となった．また，本研究に用いた血中 DHA 測定法における回収率，感度，精度，再現性はともに良好であり，雌ラットの血中 DHA 動態を検討するために十分使用可能なものと考えられた．

2）雌ラット60日齢発情間期9時の血中 DHA 濃度は 280.7±72.8pg/ml (平均±標準誤差，n=7) であり，これは20歳代ヒト女性の血中 DHA 濃度の約1/15であった．両側副腎摘除により血中 DHA 濃度は 108.0±28.0pg/ml (平均±標準誤差，n=5) と有意に低下し ($p<0.05$)，両側卵巣摘除および両側卵巣・副腎摘除により測定感度以下に著減した．

3）血中 DHA の日齢的変動では，20日齢でやや上昇するものの，50日齢までは 100～200pg/ml と低値であった．60日齢以後に 300～400pg/ml と上昇し，100日齢まではほぼ同じレベルを維持していた．また，この血中 DHA の変化は，卵巣重量の日齢に伴う増加の推移とよく相関していた．

4）血中 DHA の性周期変動においては，発情間期では 200～300pg/ml であったが，発情前期の17時には498.5±26.9pg/ml (平均±標準誤差，n=5) と頂値を示し，同時に測定した AD においても，発情前期の17時に頂値をもつ変動が認められた．

5）DHA と PRL との関連性について考究するため，ピモジド経口摂取による高 PRL 血症雌ラットを作成し，HCG による卵巣刺激，ACTH による副腎刺激を行い，血中アンドロゲンの動態について検討した．高 PRL 血症雌ラットでは，対照群雌ラットと比較して，生理食塩液投与時において，卵巣重量は低値傾向を示したが，血中DHA は有意の高値を示した ($p<0.05$). HCG 10IU の投与時においては，卵巣重量の増加は有意に小さかった ($p<0.01$) が，血中DHA, AD, テストステロンおよびプロゲステロン値には有意の上昇が認められた ($p<0.01$)．また，ACTH 10 μg 投与において卵巣重量の増加は有意に小さく，($p<0.01$)，血中テストステロンとプロゲステロンも有意の低値を示した ($p<0.05$).

以上の結果から，雌ラットにおけるDHA の主要産生臓器は卵巣であると考えられ，また，PRL は LH (HCG) と協同して卵巣 (主に黄体) に作用し，アンドロゲン及びプロゲステロンの産生を亢進させるものと考えられた

謝　　辞

稿を終えるに当たり，御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します．また，終始直接御指導下さいました赤祖父一知助教授に深謝致します．なお，本研究の測定法に関し，貴重な御助言を賜りました生化学第二講座山本博教授に感謝いたします．また，研究の遂行にご協力頂きました寺田督講師はじめ教室員各位，並びに穴田幸子，相川みち代事務官に深く感謝致します．

なお，本論文の要旨は，第32回日本不妊学会学術講演会 (仙台，1986)，第14回卵巣談話会 (札幌，1987) および第60回日本内分泌学会学術総会 (京都，1987) において発表した．

文　　献

1） **西田悦郎：** 産科婦人科学領域における老年医学的研究とくに閉経後婦人における副腎性 androgen の意義と応用．日産婦誌，**21,** 887-894 (1969).

2） **富田嘉昌：** 女性における血中 11-deoxy-17 ketosteroid の動態に関する研究．十全医会誌，**88,** 210-232 (1979).

3） **荒木克己：** 女性における血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究．十全医会誌，**89,** 852-876 (1980).

4） **Cutler, G. B. Jr. & Loriaux, D. L.:** Adrenarche and it's relationship to the onset of puberty. Fed. Proc., **9,** 2384-2390 (1980).

5） **Orentreich, N., Brind, J. L., Rizer, R. L. & Vogelman, J. H.:** Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. J. Clin. Endocrinol. Metab., **59,** 551-555 (1984).

6) **Parker, L. N. & Odell, W. D.:** Control of adrenal androgen secretion. Endocr. Rev., **1,** 392-410 (1980).

7) **Parker, L. N., Lifrak, E. T. & Odell, W. D.:** A 60,000 molecular weight human pituitary glycopeptide stimulates adrenal androgen secretion. Endocrinology, **113,** 2092-2096 (1983).

8) **O'Hare, M. J., Nice, E. C. & Neville, A. M.:** Regulation of androgen secretion and sulfoconjugation in the adult human adrenal cortex: studies with primary monolayer cell cultures. *In* A. R. Genazzani, J. H. H. Thizssen & P. K. Siiteri (eds.), Adrenal Androgens, 1st ed. p7-25, Raven Press, New York, 1980.

9) **富田嘉昌, 関久美子, 山城 玄, 荒木克己, 赤祖父一知:** 高 prolactin 血症不妊患者の bromocriptine 療法時における血中 prolactin および副腎性 androgen の変動について. 日不妊会誌, **27,** 199-209 (1982).

10) **Higuchi, K., Nawata, H., Maki, T., Higashizima, M., Kato, K. & Ibayashi, H.:** Prolactin has a direct effect on adrenal androgen secretion. J. Clin. Endocrinol. Metab., **59,** 714-718 (1984).

11) **Cutler, G. B. Jr., Glen, M., Bush, M., Hodgen, G. D., Graham, C. E. & Loriaux, D. L.:** Adrenarche: a survey of rodents, domestic animals, and primates. Endocrinology, **103,** 2112-2118 (1978).

12) **梅原千治, 佐藤武雄:** ステロイドホルモンVI, 第1版, 1485-1522頁, 南江堂, 東京, 1968.

13) **Hornsby, P. J. & Alden, K. A.:** Steroidogenic enzyme activities in cultured human definitive zone adrenocortical cells: comparison with bovine adrenocortical cells and resultant differences in adrenal androgen synthesis. J. Clin. Endocrinol. Metab., **58,** 121-127 (1984).

14) **Parker, C. R. Jr. & Mahesh, V. B.:** Interrelationship between excessive levels of circulating androgens in blood and ovulatory failure. J. Reprod. Med., **17,** 75-90 (1976).

15) **Legrand, C., Marie, J. & Maltier, J. P.:** Testosterone, dihydrotestosterone, androstenedione and dehydroepiandrosterone concentrations in placentae, ovaries and plasma of the rat in late pregnancy. Acta Endocrinol., **105,** 119-125 (1984).

16) **Hemmings, R., Farookhi, R. & Brawer, J. R.:** Pituitary and ovarian responses to luteinizing hormone releasing hormone in a rat with polycystic ovaries. Biol. Reprod., **29,** 239-248 (1983).

17) **Punjabi, V., Deslypere, J. P., Verdonck, L. & Vermeulen, A.:** Androgen and precursor levels in serum and testes of adult rats under basal conditions and after hCG stimulations. J. Steroid Biochem., **19,** 1481-1490 (1983).

18) **吉田孝雄, 胤森和幸, 稲富顕二, 尾崎晴彦, 高木繁夫, 牧野拓雄, 神戸川明:** 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay (その6)-Δ^4-androstenedione の radioimmunoassay. ホと臨床, **22,** 109-114 (1974).

19) **Tomita, Y., Akasofu, 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 prepubertal and pubertal females. Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., **33,** 1780-1788 (1981).

20) **Akasofu, K., Tomita, Y., Araki, K., Shinohara, H., Seki, K., Yamashiro, G. & Nishida, E.:** Effects of surgical stress on concentrations of serum androgens in women. Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., **31,** 737-746 (1979).

21) **Sekihara, H. & Ohsawa, N.:** A non-chromatographic radioimmunoassay for serum dehydroepiandrosterone using a mixture of antisera. Steroids, **24,** 317-326 (1974).

22) **赤祖父一知, 原田丈典:** 女性の肥満と内分泌. 日医新報, **3312,** 25-30 (1986).

23) **荒木克己, 富田嘉昌, 関久美子, 山城 玄, 赤祖父一知:** 思春期女性肥満症における内分泌学的検索－とくに低熱量食療法の血中ホルモン値に及ぼす影響について. 産と婦, **48,** 107-117 (1981).

24) **Zumoff, B., Walsh, B. T., Katz, J. L., Levin, J., Rosenfeld, R. S., Kream, J. & Weiner, H.:** Subnormal plasma dehydroepiandrosterone to cortisol ratio in anorexia nervosa: a second hormonal parameter of ontogenic regression. J. Clin. Endocrinol. Metab., **56,** 668-672 (1983).

25) **春日義生, 中村幸雄, 吉尾敬徳, 簡 邦彦, 片山恵利子, 飯塚理八:** 多嚢胞性卵巣における steroidgenesis－特に副腎皮質関与の有無についての検討－. 日不妊会誌, **29,** 22-29 (1984).

26) **岩崎寛和, 臼杵 悊:** 多毛症とその治療. 産と婦, **48,** 1871-1879 (1981).

27) **西田悦郎:** 産科婦人科領域における副腎性

androgen に関する研究 I. dehydroepiandrosterone および glucocorticoids 投与の正常成熟および両側副腎剔除去勢雌ラット性器に及ぼす影響. 日産婦誌, **15**, 1151-1158 (1963).

28) **西田悦郎**: Dehydroepiandrosterone および gonadotropin 混合投与の両側副腎摘除ラット卵巣に及ぼす影響. 日産婦誌, **18**, 383-392 (1966).

29) **Parker, 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).

30) **Barraclough, C. A. & Gorski, R. A.**: Evidence that the hypothalamus is responsible for androgen-induced sterility in the female rat. Endocrinology, **68**, 68-79 (1961).

31) **Brawer, J. R., Naftolin, F., Martin, J. & Sonnensheim, C.**: Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat. Endocrinology, **103**, 501-512 (1978).

32) **Cleary, M. P., Shepherd, A., Zick, J. & Schwartz, A.**: Effect of dehydroepiandrosterone on body weight and food intake in rats. Nutr. Behav., **1**, 127-136 (1983).

33) **Schwartz, A. G., Pashko, L. L., Henderson, E. E., Tannen, R. H., Cleary, M. P., AbouGharbia, M. & Swern, D.**: Dehydroepiandrosterone: an anti-obesty and anticartinogenic agent. Comment. Res. Breast Dis., **3**, 113-130 (1983).

34) **Bulbrook, R. D., Hayward, J. L. & Spicer, C. C.**: Relation between urinary androgen and corticoid excretion and subsequent breast cancer. Lancet, **2**, 395-398 (1971).

35) **Schwartz, A. G.**: Inhibition of spontaneous breast cancer formation in female C3H (A^{vy}/a) mice by long-term treatment with dehydroepiandrosterone. Cancer Res., **37**, 1129-1132 (1979).

36) **Ducharme, J. R., Morera, A. M., Laurin, P., Collu, R., Audi, L., Jequier, 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).

37) **石井久一, 山下 明, 平川公昭, 浜田陽一郎, 能勢尚志**: Dehydroepiandrosterone sulfate の副腎摘出雌性ラット内分泌系におよぼす影響. 日薬理誌, **76**, 201-212 (1980).

38) **Corpéchot, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J. & Baulieu, E. E.**: Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulfate in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **78**, 4704-4707 (1981).

39) **国分知子, 久富優子, 大内力男, 森 弘, 神戸川明, 古屋清英, 田 根培, 吉田孝雄, 高木繁夫**: Dehydroepiandrosterone および dehydroepiandrosterone sulfate の radioimmunoassay による簡易測定法の開発. 日内分泌誌, **54**, 117-130 (1978).

40) **Dohler, K. D. & Wuttke, W.**: Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. Endocrinology, **97**, 898-907 (1975).

41) **Fortune, J. E. & Armstrong, D. T.**: Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrus rat follicles. Endocrinology, **100**, 1341-1347 (1977).

42) **Tsang, B. K., Armstrong, D. T. & Whitfield, J. F.**: Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicler cells in vitro. J. Clin. Endocrinol. Metab., **51**, 1407-1411 (1980).

43) **太田博孝, 福島峰子**: 性線系におけるプロラクチンの作用機序, とくに卵巣直接作用. 産と婦, **54**, 1477-1482 (1987).

44) **武谷雄二, 水野正彦**: プロラクチンと性機能. 産と婦, **53**, 1203-1207 (1986).

45) **Serio, M., Forti, G., Giusti, G., Bassi, F., Giannotti, P., Calabresi, E., Mantero, F., Armato, U., Fiorelli, G. & Pinchera, A.**: In vivo and in vitro effects of prolactin on adrenal androgen secretion. *In* A. R. Genazzani, J. H. H. Thizssen & P. K. Siiteri (eds.), Adrenal Androgens, 1st ed. p71-108, Raven Press, New York, 1980.

46) **Weber, R. F. A., Ooms, M. P. & Vreeburg, J. T. M.**: The contribution of corticosterone and testosterone to the suppression of serum LH in hyperprolactinemic adult male rats with pituitary transplants. J. Endocrinol., **113**, 111-116 (1987).

47) **Katovich, M. J., Cameron, D. F., Murray, F. T. & Gunsalus, G. L.**: Alternations of testicular function induced by hyperprolactinemia in the rat. J. Androl., **6**, 179-189 (1985).

48) **Bartke, A., Doherty, P. C., Steger, R. W.,**

Morgan, W. W., Amador, A. G., Herbert, D. C., SilerKhodr, T. M., Smith, M. S., Klemcke, M. G. & Hymer, W. C.: Effects of estrogen induced hyperprolactinemia on endocrine and sexual function in adult male rats. Neuroendocrinology, **39,** 126-135 (1984).

49) Tresquerres, J. A., Esquifino, A. I., Perez Mendez, I. L. & Lopez Calderon, A.: Possible role of prolactin in the inhibitory effect of estradiol on the hypothalamic-pituitary -testicular axis in the rat. Endocrinology, **108,** 83-87 (1981).

50) Advis, J. P., Richards, J. S. & Ojeda, S. R.: Hyperprolactinemia induced precoious puberty: studies on the mechanism by which prolactin enhances ovarian progesterone responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats. Endocrinology, **108,** 1333-1342 (1981).

51) Bilezikjian, L. M. & Vale, W. W.: Stimulation of adenosine 3', 5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro. Endocrinology, **113,** 1726-1731 (1983).

52) Liu, T. C. & Jackson, G. L.: Synthesis and release of luteinizing hormone in vitro by rat anterior pituitary cells: effects of gallopamil hydrochloride (D 600) and pimozide. Endocrinology, **117,** 1608-1614 (1985).

53) Flain, S. F., Brannan, M. D., Swigart, S. C., Gleason, M. M. & muschek, L. D.: Neuroleptic drugs attenuate calcium influx and tension development in rabbit thoracic aorta: effects of pimozide penfluridol, chlorpromazine, and haloperidol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **82,** 1237-1241 (1985).

54) Carr, B. R., Rainey, W. E. & Mason, J. I.: The role of calmodulin antagonists on steroidogenesis by fetal zone cells of the human fetal adrenal gland. Endrocrinology, **120,** 995-999 (1987).

55) McCreadie, R. G., Heykants, J. J. P., Chralmers, A. & Anderson, A. M.: Plasma pimozide profiles in chronic schizophrenics. Br. J. Clin. Pharmacol., **7,** 533-534 (1979).

56) 川上正澄, 貴邑冨久子: 偽妊娠, 妊娠中のプロラクチン分泌と調節. 内分泌生理学, 第1版, 188-202頁, 南山堂, 東京, 1978.

57) Waeber, C., Reymond, O., Reymond, M. & Lemarchand-Beraud, T.: Effect of hyper-and hypoprolactinemia on gonadotropin secretion, rat testicular luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors and testosterone production by isolated Leydig cells. Biol. Reprod., **28,** 167-177 (1983).

58) Bartke, A.: Pituitary-testis relationships: role of prolactin in the regulation of testicular function. Sperm Action. Prog. Reprod. Biol., **1,** 136-152 (1976).

59) Sridaran, R., Basuray, R. & Gibori, G.: Sourse and regulation of testosterone secretion in pregnant and pseudopregnant rats. Endocrinology, **108,** 855-861 (1981).

60) Hafiez, A. A., Lloy, C. W. & Bartke, A.: The role of prolactin in the regulation of testis function: the effects of prolactin and luteinizing hormone on the plasma levels of testosterone and androstenedione in hypophysectomized rats. J. Endocrinol., **52,** 327-332 (1972).

61) Murakami, N., Takahashi, M., Suzuki, Y. & Homma, K.: Responsiveness of dispersed rat luteal cells to luteinizing hormone and prolactin during the estrus cycle and early pseudopregnancy. Endocrinology, **111,** 500-508 (1982).

62) Welsh, J. T. H., Kasson, B. G. & Hsueh, A. J. W.: Direct biphasic modulation of gonadotropin-stimulated testicular androgen biosynthesis by prolactin. Biol. Reprod., **34,** 796-804 (1986).

63) Magoffin, D. A. & Erickson, G. F;.: Prolactin inhibition of luteinizing hormone-stimulated androgen synthesis in ovarian interstitial cells cultured in defined medium: mechanism of action. Endocrinology, **111,** 2001-2007 (1982).

64) Khan, I., Sridaran, R., Johnson, D. C. & Gibori, G.: Selective stimulation of luteal androgen biosynthesis by luteinizing hormone: comparison of hormonal regulation of $P450_{17\alpha}$ activity in corpora lutea and follicles. Endocrinology, **121,** 1312-1319 (1987).

65) Advis, J. P., Aguado, L. I. & Ojeda, S. R.: Hyperprolactinenia enhances ovarian estrogen responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats: antagonistic effect of adrenalectomy. Biol. Reprod., **29,** 181-194 (1983).

66) Yoshinaga, K.: Gonadotrophin-induced hormone secretion and structural changes in the

ovary during the nonpregnant reproductive cycle. *In* R. O. Greep, E. B. Astwood & S. R. Geiger (eds.), Handbook of Physiology Section 7: Endocrinology Volume II. Part 1. 1st ed. p363-388, American Phsiological Society, Washington, D. C., 1973.

67) Bartke, A., Hafiez, A. A., Bex, F. J. & Dalterio, S.: Hormonal interactions in regulation of androgen secretion. Biol. Reprod., **18,** 44-54 (1978).

Studies on Dynamics of Serum Dehydroepiandrosterone in Female Rats

Kouichi Murakami, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J. Juzen Med Soc., **100,** 693－710 (1991)

Key words female rat, dehydroepiandrosterone, serum androgens, hyperprolactinemia

Abstract

The present study was performed to elucidate the major productive organ of serum dehydroepiandrosterone (DHA) and how serum DHA concentration changes with age, the estrus cycle and hyperprolactinemia in female rats. To determine the exact amount of serum DHA in the female rat, the DHA assay methods which are used for human serum were improved. The serum DHA level of the 60 days-old rats was 280.7±72.8 pg/ml (M±SEM) at 9: 00 of diestrus, and it was about 1/15 of that of 20 year-old women. The serum DHA levels of ovariectomized (OVX) rats were markedly decreased. The serum DHA of normal female rats were 100～200 pg/ml until 50 days-old, and became elevated to 300～400 pg/ml after 60 days-old. This elevation with age was well correlated to the increases of ovarian weights. During the estrus cycle, serum DHA levels were 200～300 pg/ml on the day of diestrus and increased gradually in the afternoon of proestrus, then reached to the maximum concentration of 498.5±26.9 pg/ml at 17: 00 of proestrus. These results indicate that the major productive organ of serum DHA in female rats was the ovarium. The effects of human chorionic gonadotropin (HCG) and adrenocorticotropin (ACTH) on the androgen level of pimozide-induced hyperprolactinemic rats were investigated. HCG (10 IU), ACTH (1, 10 μ g) and saline (control, 0.2 ml) was injected at 19: 00 on the 13th day of hyperprolactinemia and blood was taken at 9: 00 on the 14the day. In hyperprolactinemic rats with HCG, the ovarian weight did not change ($p<0.01$), but the serum levels of DHA, androstenedione, testosterone (T) and progesterone (P) increased significantly ($p<0.01$). In the control rats, the ovarian weight and serum levels of T and P were increased by ACTH (10 μ g), but these did not change in the hyperprolactinemic rats. These results suggest that prolactin cooperates with luteinizing hormone to stimulate ovarian androgen synthesis.