

Human Menopausal GonadotropinおよびDehydroepiandrosterone併用 投与によるラットHyperprolactinemiaに関する研究

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/2297/8804

Human Menopausal Gonadotropin および Dehydroepiandrosterone 併用投与による ラット Hyperprolactinemia 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)

細 野 泰

(昭和54年11月20日受付)

女性および雌動物の種族保存面で prolactin は重要な位置を占めている。ヒトでは泌乳ホルモンとして作用しているが、ヒト以外の種々の動物にも prolactin は存在するとされ、マウス・ラットでは卵巣黄体に対して肥大的、すなわち luteotrophic な作用を示し、妊娠維持に重要な役割りを果している。また、他の動物では哺育、育児など、母性愛行動の behavior に prolactin が深く関与しているとされる。しかし、ヒトでは泌乳作用が主で卵巣に対する作用は認められない。このように prolactin は種族保存の comparative endocrinology の面で極めて興味深いホルモンである。

また、産科婦人科臨床面においても、Chiari - Frommel 症候群、Argonz-del Castillo 症候群、Forbes-Albright 症候群などのいわゆる galactorrhea-amenorrhea syndrome (乳汁漏出無月経症候群) として hyperprolactinemia は種々の病態を呈する。

一般的に、内分泌学的な実験的研究の方法としては、内因性ホルモン分泌を欠除せしめる方法、外因性にホルモンないしは臓器抽出物を投与してその変化を検索する方法などがあるが、prolactin に関しては現状では必ずしも容易に実施しうるわけではない。すなわち prolactin 分泌を抑制する薬剤としては、2-Bromo- α -ergokryptine (Bromocriptine; BrC) などがあるが、他の臓器への作用も皆無ではなく実験条件はやや複雑となる。また外因性に投与して種々生物学的効果の現れる程度の prolactin を入手使用することは現状ではかなり困難である。

このような観点から、prolactin に関する実験的研究の方法としては、実験的に内因性の

hyperprolactinemia を比較的容易に起こしうる方法があれば、基礎および臨床内分泌学の面でかなり有用な研究方法の一つとなるとみなされる。

1966年西田^{1,2)}は、幼若ラットに gonadotropin と副腎性 androgen を併用投与すると、卵巣は gonadotropin 単独投与よりも著しく肥大することを見出しており、1971年 Singer³⁾らは、その肥大は主に黄体の肥大によるものと報告している。

我々は、これらの研究を基礎として、幼若ラットに gonadotropin と副腎性 androgen を投与し、その場合の血中 prolactin 量の変化および卵巣黄体の体積の変化などについて詳細な検索を行ない、またその場合 BrC 投与、下垂体摘除の影響や、血中 follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), estradiol (E₂) などについて検討を加えたので報告する。

材料および方法

実験に供した雌ラットは、生後約 40 日目の体重 120g 前後の同腹 Wistar 系 (1 腹 5 ~ 6 匹) のものを約 150 匹用いた。これらのラットでは腔口は未だ開いていないものが大部分であった。飼育環境としては室温は 26 ± 1 °C に保ち、照明は人工照明とし、午前 5 時から午後 7 時までの 14 時間を、約 150 ~ 200 ルックスの明るさで照明した。飼料としては固型飼料 (オリエンタル NMF ラット繁殖用) を用い、水道水と共に自由に摂取せしめた。

各ラットの飼育状況の可否を推定する目的で、毎日、全ラットの体重測定、および腔開口後ラットの腔内容塗沫標本による性周期の判定を行なった。

投与ホルモンとしては次のものが用いられた。

Hyperprolactinemia in Female Rats by Combined Injection of Dehydroepiandrosterone and Human Menopausal Gonadotropin. **Yutaka Hosono**, Department of Obstetrics and Gynecology (Director: Prof. E. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

gonadotropin としては human menopausal gonadotropin ヒト閉経後性腺刺激ホルモン (以下 hMG) を用い、製剤として 1 vial 中 FSH 換算量 75 IU および微量の LH を含有するものを使用し、主に 1 回 7.5IU (生理的食塩水 0.1 ml に溶解) を注射した。溶解は注射直前に行なった。

副腎性 androgen としては、その主要成分である dehydroepiandrosterone (以下 DHA) をえらび、製剤としては DHA-acetate (DHA-Ac) 50 mg/ml の油溶液を用いた。投与量は実験により 1 回 2.5 mg ないし 10 mg を注射した。注射は背部皮下に注射した。

なお、本実験においては、hMG 単独投与群と、hMG + DHA-Ac 混合投与群の卵巢重量、黄体体積、血中 prolactin (PRL) 量などが比較されたが、その場合、hMG 投与量が過多でも過少でも両群間の差が著明とならない傾向があるので、各薬剤投与量の決定には予め、種々段階量における予備実験が行なわれ、それらの dose-response curve から上記の 1 回投与量が決定された。

実験としては次の 3 実験が行なわれた。

I. hMG + DHA-Ac 混合投与のラット卵巢重量に及ぼす影響。

本実験においては約 50 匹のラットを次の 5 群にわけ実験に供した (図 1)。

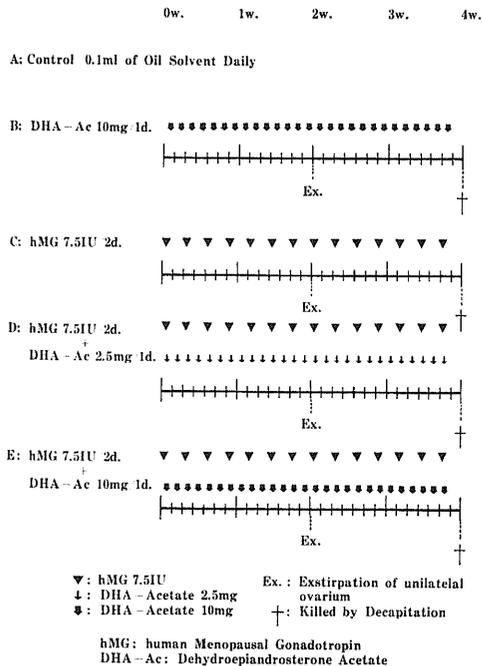


Fig. 1 Schedule of the experiment

A 群. 対照無処置群 (油溶媒 0.1 ml 毎日注射)

B 群. DHA-Ac 10 mg 単独投与群: DHA-Ac 毎日 10 mg 注射。

C 群. hMG 単独投与群: hMG 隔日 7.5IU 注射。

D 群. hMG + DHA-Ac 2.5 mg 投与群: hMG 隔日 7.5IU, DHA-Ac 毎日 2.5 mg 注射。

E 群. hMG + DHA-Ac 10 mg 投与群: hMG 隔日 7.5IU, DHA-Ac 毎日 10 mg 注射。

各群注射開始 14 日後に一側卵巢を摘除し、28 日後に屠殺し、他側卵巢を摘除し、それぞれの卵巢湿重量を測定し比較した。

この実験群では、DHA-Ac 投与による卵巢黄体機能の障害ないし変化の有無を検索する目的で卵巢内 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD と略) 活性を測定した。測定方法としては Wattenberg 法⁴⁾を改変した Levy ら⁵⁾の方法に従った。すなわち摘出した卵巢をなるべく速かに -20°C の cryostat 内で $6\sim 8\mu$ に薄切し、充分脱脂した載物ガラスにのせ、室温にて水解させ、約 2 時間静置した。

これを 0.1M 磷酸緩衝液に 5 分間、次で 4°C の修正 Krebs 液に 10 分間、さらに室温 (約 20°C) で修正 Krebs 液に 10 分間浸した。その後 DHA を基質として含んでいる基質液中に浸漬し、 37°C で 50 分間 incubate した。incubate 後エタノール、ホルマリン、水を 5:1:4 に混合した固定液中で 30 分間固定し、グリセリン・ゼラチン液で封入し、直ちに鏡検、写真撮影し比較検討した。

なお、Levy らの修正 Krebs 液は使用前 0.21M 磷酸緩衝液で 3 倍に希釈して用い、基質液中 DHA 濃度は 70 ml 中 2 mg とした⁵⁾。また、DHA を含まない基質液中で同様処理を行なったものについて検討し、 3β -HSD 以外の活性物質の有無を確認した。本実験では DHA を含まない基質液中で処理した場合は、反応はすべて陰性であった。

II. hMG + DHA-Ac 混合投与のラット卵巢および黄体の大きさ、ならびに血中 PRL, FSH, LH, E_2 値に及ぼす影響。

本実験では DHA-Ac 単独投与群、hMG 単独投与群、hMG + DHA-Ac 混合投与群の 3 群、各群 5 匹について卵巢および黄体の大きさ、ならびに血中各種ホルモンについて比較を行い、次いで hMG 単独投与群、hMG + DHA-Ac 混合投与群の 2 群 (各群 10 匹) について主に血中 PRL 値と、卵巢および黄体の大きさとの関連性について詳細な検討を加えた。ホルモン投与量は hMG は隔日 7.5IU, DHA-Ac は毎日 10 mg とし、投与期間は 14 日間とした。投与 14 日後の午前 8

時から8時30分にかけて断頭屠殺し、頸部より流出する血液を遠心管に採取し、室温に30分放置した後、血清を分離し、 -60°C に冷凍保存し、血中ホルモン測定に供した。

断頭屠殺に際しては無麻酔とし、また、断頭前に疼痛その他の stress が加わらないように留意した。

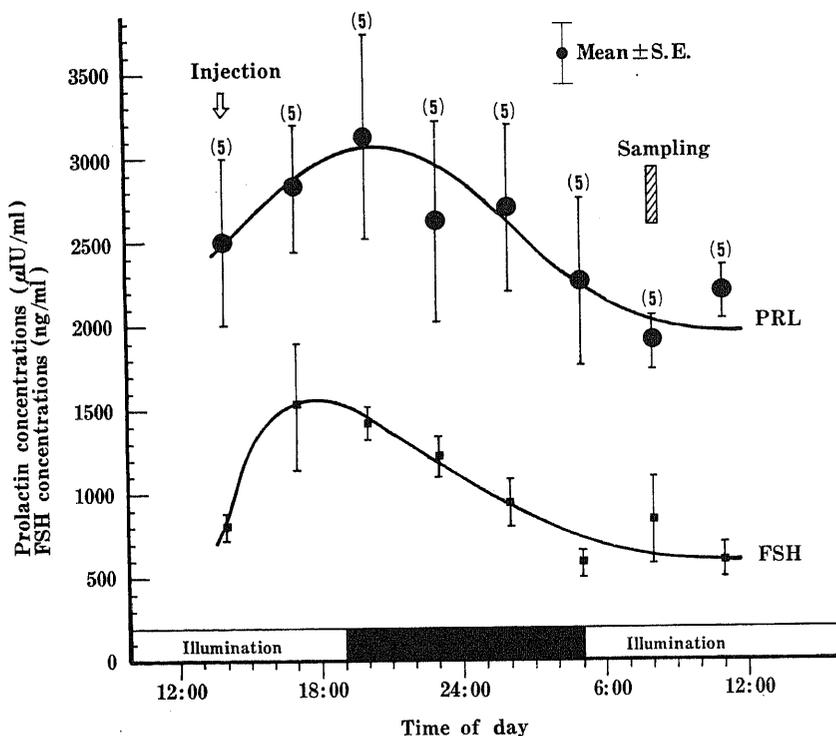
採血の時間は予め予備実験を行なって決定された。すなわち、本実験ではホルモン注射は午後2時より開始したが、その後の血中 PRL 値および FSH 値の変動を3時間毎に24時間にわたって測定し、その結果、注射後血中 PRL 値は6時間後に peak に達し、FSH 値は3時間後に peak となるが、共に午前8時頃には変化はゆるやかになり、curve はほぼ平坦となる結果が得られた(図2)。従って、午前8時を採血時間とすれば、血中濃度の時間的変動による誤差が比較的少なくなるものとみなされた。

PRL, FSH, LH, E_2 の測定には radioimmunoassay を用いた。とくに蛋白体ホルモン測定にはラット用 radioimmunoassay kit (NIAMDD, National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases) を用いて行なわれた。

本実験において、卵巣黄体の大きさを比較検討する目的で、次の如き方法が用いられた。卵巣を10%フォルマリン液で固定、水洗、脱水後、卵巣門が下になるようにしてパラフィン包埋し、卵巣遊離縁先端から卵巣門へのいわば縦軸に直角に薄切した。厚さは 12μ とし、卵巣全体にわたって連続切片とし、そのすべてについて卵巣断面の面積および黄体面積を計測し、それらを積分総和し、卵巣体積および黄体体積総和とした。

面積計測にはライツ A.S.M. 面積半自動解析装置 (Bildanalyse System, Leitz - A. S. M., Semi - Automatic Image Analysis System) を使用した。H-E 染色した標本を著者らが本研究のために特別に考案した投影装置に装着し、解析装置の描画板上に卵巣切片全体像を投影せしめ、附属の描画ペンにて卵巣および各黄体の投影像外縁をなぞることにより、内蔵電子計算器を介して自動的に面積を算出せしめた。本法により多数の卵巣および黄体断面面積を極めて容易に算出した。

Ⅲ. BrC 投与の hMG + DHA-Ac 混合投与ラットの血中 PRL, FSH, LH, E_2 値および黄体の大きさに及ぼす影響。



PRL : Prolactin, FSH : Follicle Stimulating Hormone

Fig. 2 Serum PRL and FSH in rats treated with hMG and DHA-Ac

本実験では、ラット 10 匹に hMG 隔日 7.5IU, DHA - Ac 毎日 10 mg ずつ注射を続け、その中 5 匹には 2 - Bromo- α -ergokryptine (BrC) 1 回 1 mg を実験開始後第 7 日目と第 10 日目の 2 回注射し、第 14 日目に断頭屠殺し、血中ホルモンを測定し、卵巣および黄体の大きさなどと共に、両群について比較検討を加えた。

成 績

I. hMG + DHA-Ac 混合投与のラット卵巣重量に及ぼす影響。

幼若ラットに DHA-Ac 毎日 10 mg 連続投与、hMG 隔日 7.5IU 連続投与、hMG 隔日 7.5IU + DHA-Ac 毎日 2.5 mg 混合投与、hMG + DHA-Ac 10 mg 混合投与を行った場合の卵巣実重量および体重 100g 当り比重量を測定した結果、図 3 の如き成績が得られた。

DHA-Ac 毎日 10 mg 単独投与群 (B 群) では 2 週間投与しても卵巣重量は平均 23.0 ± 3.1 mg (体重 100g 当り比重量: 平均 14.9 ± 1.8 mg) で、無処置対照群 (A 群) の平均 22.3 ± 3.8 mg (15.0 ± 2.6 mg) に比して著変は認められないが、DHA-Ac を 4 週間投与を続けると、平均 17.6 ± 1.3 mg (8.0 ± 0.8 mg) と減少し、無処置対照群の 65.0 ± 3.0 mg (30.1 ± 1.9

mg) に比し、約 1/4 に減少した。すなわち、DHA - Ac の単独投与を長期継続すると、卵巣の発育は障害され、その大きさおよび重量は減退する。

hMG を隔日 7.5IU 7 回 2 週間投与した場合の平均卵巣重量 (C 群) は、 49.2 ± 1.7 mg (25.8 ± 0.8 mg) となり、無処置対照群 (A 群) のその約 2 倍と増大した。一方、4 週間投与では平均 67.8 ± 3.3 mg (31.6 ± 1.3 mg) で、無処置対照群 4 週間目の値とほぼ同様であった。このことは hMG 単独投与による卵巣肥大にはこの程度に一つの限界があることを推測せしめた。

hMG と DHA-Ac 毎日 2.5 mg の混合投与を行なうと、2 週間後には平均卵巣重量 (D 群) は、 76.7 ± 9.0 mg (31.9 ± 4.5 mg) となり、hMG 単独投与群のそれに比し、約 1.5 倍の増大を示した。一方、4 週間投与では 72.2 ± 11.8 mg (32.5 ± 5.4 mg) であり、hMG 単独投与群 4 週間の値をやや超える程度であった。

hMG および DHA-Ac 10 mg 混合投与群 (E 群) では、2 週間投与すると平均卵巣重量は 106.0 ± 3.0 mg (52.9 ± 1.6 mg) となり、hMG 単独投与群の約 2 倍と著しい肥大を示した。4 週間投与では 138.0 ± 17.4 mg (61.0 ± 8.3 mg) と、やはり hMG 単独投与群の約 2 倍の著明な増大を示した。

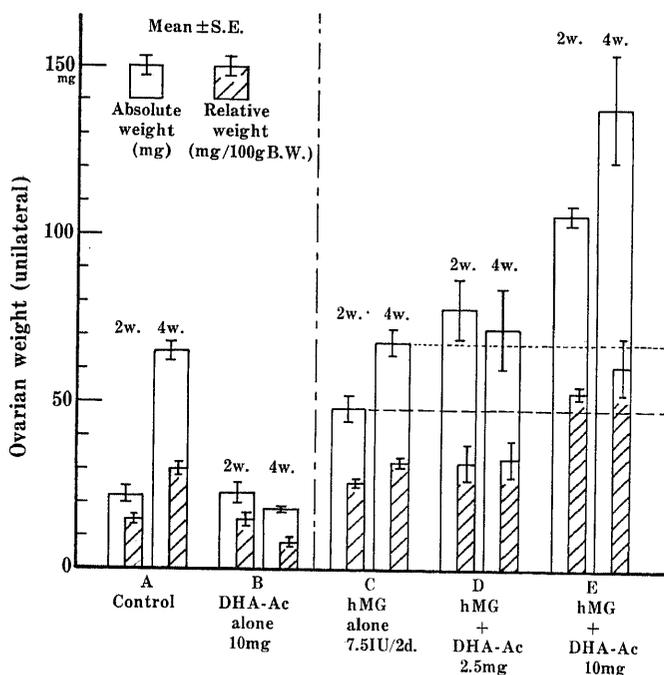
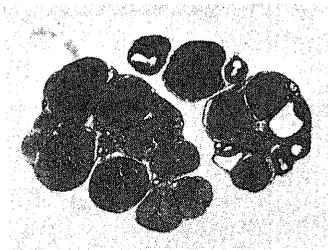


Fig. 3 Effects of combined administration of hMG with DHA-Ac on ovarian weight in rats

このように hMG と DHA-Ac を混合すると投与期間の長いほど、また、DHA-Ac 量が一定量以内であれば多ければ多いほど、卵巣の肥大度は増大する傾向が認められた。この傾向はわれわれの他の実験において DHA-Ac 量を 20 mg にした場合にも同様であった。

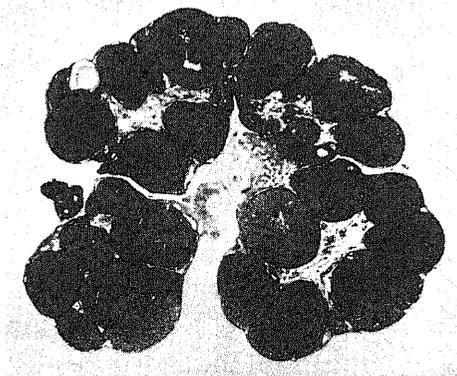
これら卵巣の組織像は写真 1-A, B に示す如くであった。A は hMG 単独投与 2 週間後のものであり、多数の黄体が認められるが、卵胞も処々にみられ、また他の切片ではかなり大きな卵胞が認められることも少なくなかった。B は hMG + DHA-Ac 10 mg 投与 2 週間後のものであり、卵巣は著しく増大し、その大部分は巨大な黄体で占められ、卵胞は存在はするがかなり少数であった。

写真 2 は hMG + DHA-Ac 10 mg を 2 週間投与した場合の卵巣内 3β -hydroxysteroid



Photog. 1-A × 10

A. Control (hMG alone)



Photog. 1-B × 10

B. hMG + DHA-Ac

Photog. 1. Effects of Combined Administration of hMG with DHA-Ac on Ovary in Rats

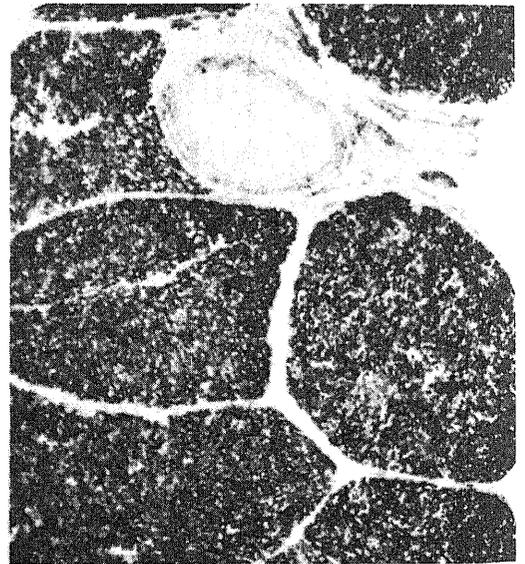
dehydrogenase (3β -HSD) 活性を示す写真であるが、黄体内に青紫色の物質すなわち formazan の沈着物が増加している。すなわち 3β -HSD 活性がかなり強いことを示している。このことから DHA-Ac をかなり長期間 hMG と共に連続投与しても卵巣の steroidogenesis に障害を及ぼさないものと推定された。

II. hMG + DHA-Ac 混合投与のラット卵巣および黄体の大きさ、ならびに血中 PRL, FSH, LH, E_2 値に及ぼす影響。

DHA-Ac 毎日 10 mg 14 日間連続投与、hMG 隔日 7.5 IU 7 回投与、hMG + DHA-Ac 混合投与群の 3 群について卵巣重量、血清中 PRL および E_2 値を測定した結果は図 4 に示す如くであった。

卵巣重量の平均値は DHA-Ac 単独投与群、hMG 単独投与群、hMG + DHA-Ac 混合投与群それぞれ 77.4 ± 8.2 mg, 102.2 ± 6.9 mg, 134.0 ± 17.9 mg であり、hMG + DHA-Ac 混合群が最大であった。

また、血清中 PRL 値は各群それぞれ $208.1 \pm 26.1 \mu\text{IU} / \text{ml}$, $181.5 \pm 44.0 \mu\text{IU} / \text{ml}$, $535.0 \pm 34.4 \mu\text{IU} / \text{ml}$ であり、DHA-Ac 単独投与群および hMG 単独投与群ではほぼ同値を示したが、hMG + DHA-Ac 混合投与群では 2~3 倍に著明に増加した。



× 40

Photog. 2. 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in ovary of rats treated with hMG and DHA-Ac.

血清 E₂ 値は hMG 単独投与群では、74.3 ± 6.2pg/mlであったが、DHA-Ac 単独投与群では 190.8 ± 8.3pg/mlと上昇し、hMG + DHA-Ac 混合投与群では 289.2 ± 43.0pg/mlとさらに上昇した。DHA-Ac 投与による E₂ 上昇は、卵巣および末梢における DHA から E₂ への convert の結果と推定された。

次いで、hMG 単独投与群と hMG + DHA-Ac 混合投与群の兩者について、主に血清中 PRL 値と卵巣重量との関連性、および卵巣体積と黄体体積との関連性などを中心として検討を加えた。PRL 値と卵巣重量との関連性は表 1 に示す如くで、PRL 値の平均値は hMG

+ DHA-Ac 混合投与群では 682.9 ± 56.6μIU/ml で hMG 単独投与群の 79.3 ± 13.5μIU/ml に比し、約 9 倍の著増を示した。また、卵巣重量は hMG + DHA-Ac 混合投与群では平均 286.6 ± 9.1 mg と hMG 単独投与群の平均 121.2 ± 5.2 mg に比し、約 2.3 倍の増加を示した。

FSH 値は全例において測定を行ないえなかったが、hMG + DHA-Ac 混合投与群では hMG 単独投与群より高値を示す傾向が認められた。LH 値は両群とも測定感度以下の低値であった。

個々のラットの血清中 PRL 値を横軸にとり卵巣重

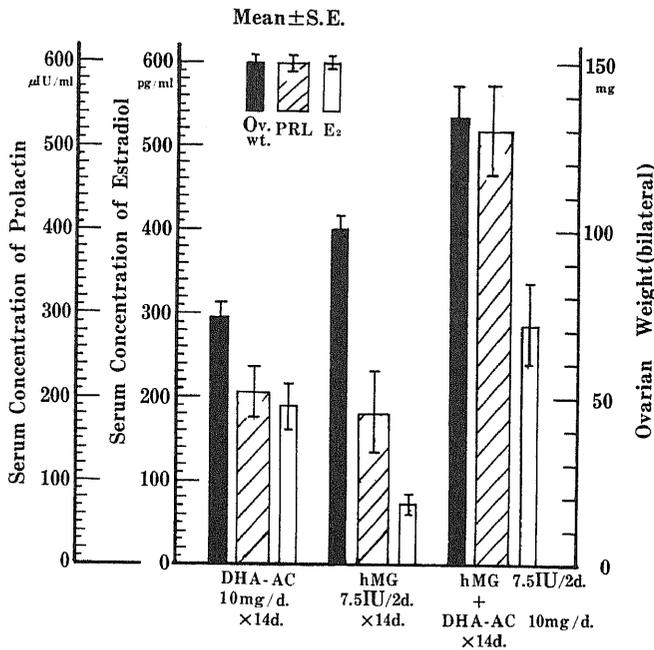


Fig. 4 Effects of Administration of hMG with DHA-Ac on ovarian weight, serum prolactin and estradiol concentrations

Table 1 Effects of Combined Administration of Human Menopausal Gonadotropin and Dehydroepiandrosterone on Serum Prolactin and Ovarian Weight in Rats.

Treatment (No.)	hMG alone (10)	hMG + DHA-Ac (8)
Prolactin (μIU/ml)	79.3 ± 13.5	682.9 ± 56.6
Ovarian weight (mg)*	121.2 ± 5.2	286.6 ± 9.1

hMG : 7.5IU/2d.

DHA-Ac : 10mg/1d.

Mean ± S.E.

*bilateral ovarian wet weight

量を縦軸にとると、図5に示す如くとなった。この両者はほぼ比例し、回帰直線 $Y = 0.25X + 106.9$ が得られ、相関係数は $r = 0.949$ ($p < 0.01$) であった。なお、後記の如くにして求められた卵巣および黄体の体積を縦軸にとると、血清中 PRL 値と卵巣体積との関係は $Y = 0.052X + 23.85$ ($r = 0.966$) ($p < 0.01$) となり、また、黄体体積との関係は $Y = 0.048X + 9.91$ ($r = 0.952$) ($p < 0.01$) となった。黄体の大きさと PRL 値とは極めて強い相関を示した。この両者の比例関係は、他の同様実験においても同様であったが、被験ラットの相違によりその直線の勾配は多少変化した。われわれは本実験にはすべて同腹ラットを用いたが、上記のことからも同腹ラットを用いることは、実験精度を高める上で重要なこととみなされた。

1 箇の卵巣の連続切片上の卵巣断面面積および黄体断面面積 (総和) を横軸にとり、縦軸には卵巣門より

その切片までの距離 (μ) をとると図6-Aに示す如くとなった。丸印はその高さにおける切片の卵巣断面面積であり、四角印は同様にその切片にみられた全黄体断面面積の総和である。

この図は、hMG 単独投与のものであるが、各断面における黄体の全卵巣に占める比率も示している。卵巣断面面積の最大に近い中央部の切片においては、黄体面積は卵巣断面面積の約 40~50% を占めていた。

本図の例においては卵巣門より卵巣遊離端までのいわば縦軸の長さは 2.2 mm あり、これを 12μ で薄切し、計 181 枚の切片を得た。この全切片について卵巣断面総面積を合計すると、 2202.0 mm^2 となり、また、黄体断面面積の全切片の総和は、 922.1 mm^2 となった。それぞれに切片の厚さ 12μ を乗ずると卵巣体積は 26.4 mm^3 となり、黄体総体積は 11.1 mm^3 となった。また、黄体の卵巣に占める比率は 42.0% であった。

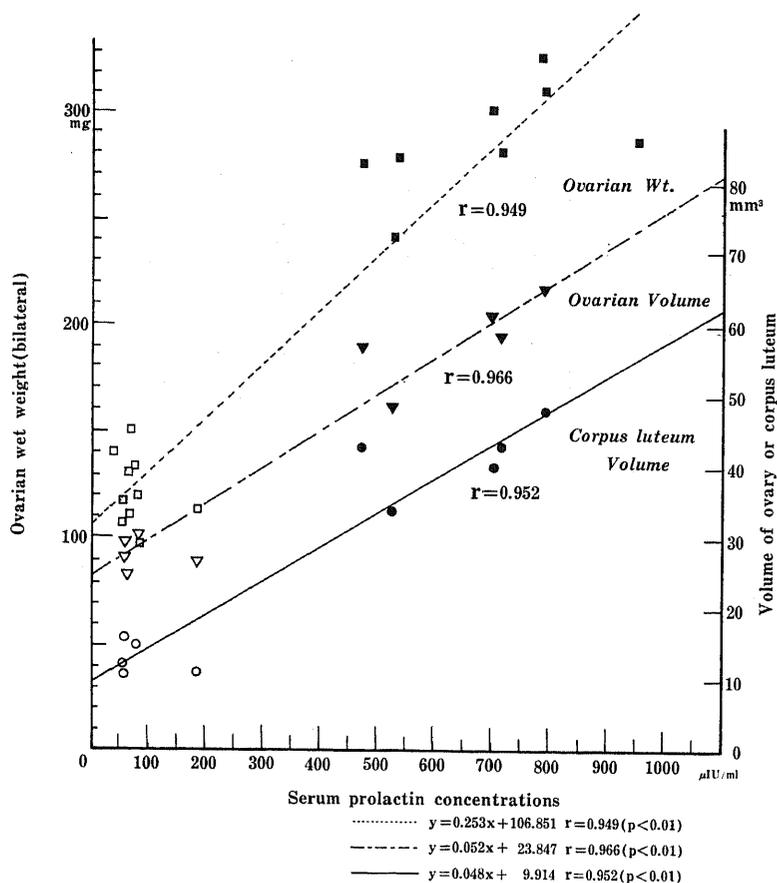


Fig. 5 Relationship between serum prolactin concentrations and ovarian weight, volume of ovary or corpus luteum in hMG+DHA-Ac treated rats (open mark: hMG alone, solid mark: hMG+DHA-Ac)

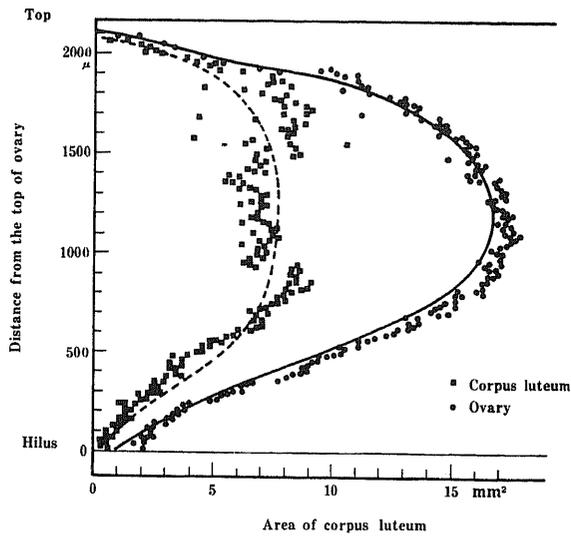


Fig. 6-A Size of corpus luteum in each serial section of an ovary in rat treated with hMG alone

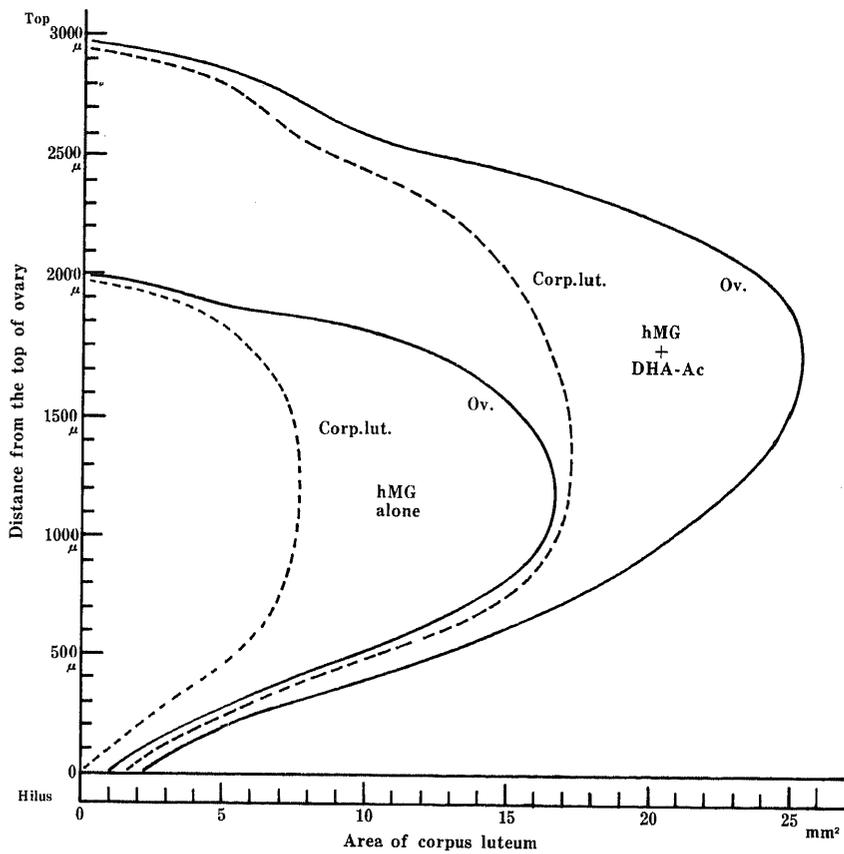


Fig. 6-B Size of corpus luteum in each serial section of an ovary in rat treated with hMG and DHA-Ac

同様に、hMG + DHA-Ac 混合投与した卵巣の1例を併せて図示すると、図6-Bの如くとなった。この図で明らかな如く、DHA-Acを添加混合投与した場合には黄体が巨大となるのみならず、黄体の占める比率が著しく増大した。すなわち、hMG + DHA-Ac 混合投与群では縦軸の長さ2.7mmで、12 μ の薄切切片228枚が得られ、卵巣断面総面積は合計4859.7mm²であり、黄体断面積総和は3583.4mm²であった。これに12 μ を乗じて体積を算出すると、卵巣では

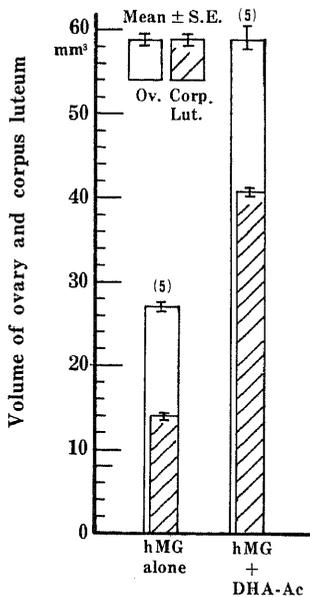


Fig. 7 Effects of combined administration of hMG with DHA-Ac on volume of ovary and corpus luteum

58.2mm³となり、黄体では43.0mm³であり、黄体の卵巣に占める比率は73.9%であった。

試みにこの1箇所ずつを比較すると、hMG + DHA-Ac 混合投与群では卵巣体積はhMG 単独投与群の2.2倍、黄体体積は3.9倍、黄体占有率は1.76倍であった。このことからDHA-Ac 添加混合投与による卵巣肥大はとくに黄体体積の増大によるものであることが実証された。

このような操作を各群5例について行ないそれらの平均値を図示すると図7の如くであった。hMG + DHA-Ac 混合投与群では卵巣体積は平均58.0 \pm 2.8mm³で、hMG 単独投与群の平均27.6 \pm 1.1mm³の2.1倍であった。黄体体積総和は平均41.6 \pm 2.3mm³でhMG 単独投与群の平均13.0 \pm 0.9mm³の3.2倍であり、DHA-Ac 添加投与により黄体体積が著明に増大することが明らかに示された。また、黄体の卵巣全体に占める比率は、hMG + DHA-Ac 混合投与群のそれは平均71.7%で、hMG 単独投与群の平均47.2%の1.5倍であった。すなわちhMGにDHA-Acを添加投与すると卵巣全体の2/3以上が黄体で占められた。

hMG 単独投与群とhMG + DHA-Ac 混合投与群とにおける個々の黄体の大きさと数を検討する目的で、両群の卵巣の最大切片における黄体の大きさと数とを図示すると、図8の如くであった。hMG 単独投与群では面積1mm²以上の黄体は稀であり、0.3mm²のものが最も多数を占めた。DHA-Acを添加混合投与すると、黄体は面積1.8~2mm²の巨大なものがみられるようになり、最も頻度の高いもの、すなわちmodeは0.7mm²となった。また、最大切片における黄体数は

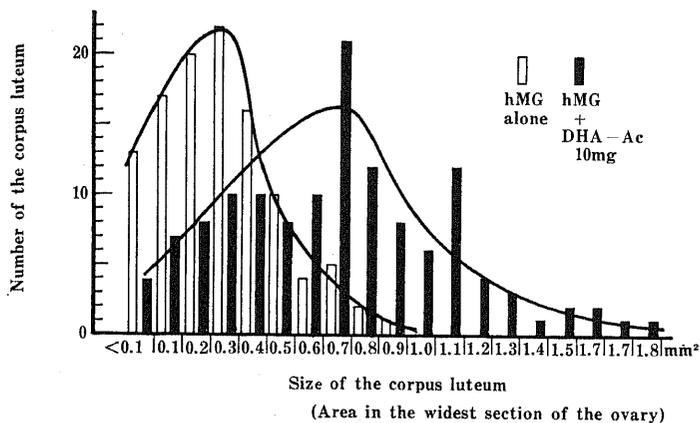


Fig. 8 Effects of combined administration of hMG with DHA-Ac on the size and number of the corpus luteum in the ovary

hMG + DHA-Ac 混合投与群では、129 箇であり、hMG 単独投与群の 110 箇に比し、軽度に増加した。

Ⅲ. BrC 投与の hMG + DHA-Ac 混合投与ラット血清中 PRL, FSH, LH, E₂ 値ならびに卵巣および黄体体積に及ぼす影響。

hMG + DHA-Ac を混合投与して上記のようないば実験的に hyperprolactinemia をおこしたラットに prolactin 分泌抑制剤である 2-Bromo- α -ergokryptine (BrC) を投与し、血中ホルモン、卵巣および黄体体積などを測定して表 2 の如き結果を得た。

hMG + DHA-Ac 混合投与群では血清中 PRL 値は平均 $2627 \pm 661 \mu\text{IU}/\text{ml}$ であったが、これに BrC 1mg を 2 回投与すると、PRL 値は激減し、平均 $653 \pm 225 \mu\text{IU}/\text{ml}$ と約 1/4 に減少した。FSH, E₂ 値には著変は認められなかった。LH 値は両群共に測定感度以下であった。

卵巣重量および体積は BrC 投与により平均 $187.8 \pm 14.9 \text{ mg}$ および $41.9 \pm 3.3 \text{ mm}^3$ から $150.8 \pm 9.3 \text{ mg}$ および $32.9 \pm 2.6 \text{ mm}^3$ とやや減少した。黄体体積は平均 $33.0 \pm 2.3 \text{ mm}^3$ から平均 $23.5 \pm 2.2 \text{ mm}^3$ と減少した。また黄体体積の卵巣全体に占める比率は平均 79% から 71% に減少した。

すなわち、血清中 PRL 値の減少により黄体体積が減少することが確認され、ラットにおいては血清中 PRL 値と黄体体積、ひいては黄体機能とが密接な関連性のあることが強く示唆された。

考 察

女性においては副腎皮質から多量のいわゆる副腎性 androgen が分泌され、age-dependent な特徴的な年令推移を示している。この副腎性 androgen の主要分画は dehydroepiandrosterone (DHA) とされているが、その生物学的作用および生理学的意義の詳細については、なお不明の点が多い。たとえば、女性の思春期 pubertas において、副腎性 androgen の分泌が急増するが、その意義および機序についてはほとんど全く不明といっても過言ではない。われわれの教室の成績でも⁶⁻⁸⁾、praepubertas (思春期前期) の 7~8 才頃より血中 DHA (遊離型)、DHA-sulfate、17-ketosteroid (17-KS) 値はいずれもかなり急激に上昇し始め、この上昇時期から時期的におくれて血中 estrogen 値が上昇を始め、月経が発来する。これら副腎性 androgen 分泌はいずれの分画も 20 才前後に peak に達する。

この初経開始前にみられる副腎性 androgen 分泌の急増は、直接的間接的に卵巣機能に影響を及ぼしており、また、間脳-下垂体-卵巣系の cyclicity の発現に何らかの形で密接に関与しているものと推測される。

一方、prolactin は、ヒトでは主に泌乳作用のみを有するとされるが、ラットでは卵巣黄体肥大作用を有し、いわゆる luteotrophic hormone (LTH) と同一のもの⁹⁾ とみなされ、卵巣機能や妊娠維持に重要な役割を

Table 2 Effects of Administration of Bromocriptine on Serum PRL, FSH, LH, E₂, Ovarian Volume and Weight in Experimental Hyperprolactinemia Rats

Treatment	hMG + DHA-Ac	hMG + DHA-Ac + Bromocriptine
Prolactin ($\mu\text{IU}/\text{ml}$)	2626.8 ± 661.4	652.8 ± 224.8
FSH (ng/ml)	2498.6 ± 629.7	2168.4 ± 649.0
LH (ng/ml)	N.D.	N.D.
E ₂ (pg/ml)	289.2 ± 43.0	273.0 ± 22.1
Ovarian volume (mm ³)	41.87 ± 3.25	32.94 ± 2.56
Luteal volume (mm ³)	33.0 ± 2.27	23.49 ± 2.19
Ovarian weight* (mg)	187.8 ± 14.9	150.8 ± 9.3

hMG : 7.5IU/2d.

DHA-Ac : 10mg/1d.

N.D. : Non-Detective

Mean \pm S.E.

*bilateral ovarian wet weight

果たしている。ヒトでもラットでも妊娠維持には大量の progesterone 分泌のあることが重要であり、ヒトでは妊娠初期の progesterone は卵巣のいわゆる妊娠黄体より分泌され、その妊娠黄体を肥大させる支配ホルモンは胎盤からの hCG であるが、ラットでは胎盤からそのようなホルモンは分泌されず、黄体を肥大維持するホルモンは下垂体からの prolactin である。このようにみると、ラットにおける prolactin はヒトにおける胎盤由来の hCG と機能的には一部 analogous なものといえることができる。

DHA も prolactin も種々の面で共に種族保存に關与しているが、近年、この両者が相互にその分泌状態に影響を与えていると示唆する報告がなされているが¹⁰⁻¹²⁾、なお、確定的ではない。

われわれは、前記の西田、Singer の報告に示唆されて、上記のような実験を企画実施し、幼若ラットに gonadotropin を投与しながら DHA を投与する場合のみ内因性 prolactin 量を著増せしめうることを実証した。

西田は gonadotropin として pregnant mare serum gonadotropin (PMSG、妊馬血清性腺刺激ホルモン) を用いているが、本実験では hMG を用いた。閉経後女性尿中より抽出精製したヒト下垂体性 gonadotropin が本実験でも証されたように異種ラット卵巣にも充分作用することは、蛋白体ホルモンの種特異性の観点からも興味深いことと考えられた。

血中ホルモン測定のため採血時間決定には、注射終了直後より継時的に 24 時間にわたり、prolactin 値と FSH 値を測定し、その成績に基いて行なったが、時間的変動いわば注射後の日内変動が共に 50% 程度のかかなり広い範囲で認められた。このことから、血中ホルモン測定には一般に、採血時間を一定にすること、予め予備実験にて実験条件下における血中ホルモン変動 pattern を検討することが大切であることが示唆された。

DHA ないし DHA-Ac を比較的少量、短期間ラットに投与しても卵巣重量には著しい変化は現われないが、たとえば 1 日 10 mg 4 週間連続投与などの大量長期投与を行なうと、卵巣は明らかに萎縮し、発育は阻害される¹³⁾。とくに幼若ラットではその傾向が強い。しかし、これに hMG などの gonadotropin を添加混合投与すると黄体は巨大化し卵巣重量は増大する。この機序の詳細は未解明であるが、DHA 単独投与による卵巣萎縮は、投与 DHA が estrogen ないしは testosterone に convert されて、それらが間脳、下垂体に negative feedback をかけ内因性 FSH 分泌を抑

制した結果、卵巣萎縮がおこったとすれば一応首肯されるが、testosterone の卵巣に対する直接的ないわば阻害作用も存在しうろと思われされる。

また、hMG 添加投与による巨大黄体の形成は、hMG その他の外因性 FSH の投与により、下垂体の内因性 FSH の分泌が抑制され、その影響で、下垂体内の cyclicity の上で cycle のいわば対側にあるホルモン、たとえば排卵後に作用する prolactin の分泌が亢進するとも考えられる。この場合、DHA から convert された estrogen による内因性 FSH 抑制も相加的に作用するものと思われる。このことは、われわれの他の実験において、下垂体摘除ラットでは、hMG と DHA-Ac 添加投与の卵巣に対する効果が現われないことから示唆される。

hMG 単独投与の場合、卵巣重量は投与 2 週間目では無処置対照群に比し約 2 倍に増大したが、4 週間投与では両群ほぼ同様の値であった。このことは、卵巣の増大は内因性 FSH と外因性 FSH との総和に比例すると仮定し、外因性 FSH 投与は内因性 FSH 分泌を抑制すると考えるとよく説明できるが、この現象は恐らくこのような機序によって現われたものと推定される。

β -HSD は性腺、副腎皮質、胎盤における steroid 代謝に必須の酵素であり、種々の研究が行なわれているが^{4,5)14,15)}、卵巣ではとくに黄体に多く証明される。本実験では hMG を DHA-Ac と共に投与した後もかなり強い活性を示したが、このことは、DHA-Ac 投与により、卵巣自体における steroidogenesis 能はほとんど障害を受けないことを示唆するものとみなされる。

血中各種ホルモン測定のための採血には、断頭屠殺を行ない、頸部血管より流出する血液を遠心管に採取して実験に供したが、この方法の方が、充分量の採血ができ、また、ラットに屠殺前の種々の stress を多く与えないので本実験においては好ましい方法とみなされた¹⁶⁾。採血時留意すれば、血液に他のものが混入することを容易に避けることができる。

血清中 prolactin 値と卵巣重量とはかなり良い相関を示したが、prolactin 値と黄体体積はさらに良い相関を示した。同様の実験は予備実験的にも何回か行なわれたが、購入時期の異なる動物集団間では相互に少しずつ勾配が移動した。このことから、われわれが本実験においてすべて同腹ラットを用いて群分けをしたことが、実験精度上有意であったことが確認された。

ライツ A.S.M. 面積半自動解析装置を応用して卵巣断面積や黄体断面積総和を算出する場合、下記条件を満足させさえすればその操作は比較的容易である¹⁷⁾。

すなわち、卵巢全面積が全体として一つにまとまって描画板上に投影されることが、操作を容易にするために大切な事柄である。その場合、附属の描画装置つき顕微鏡を用いると拡大が大きくなりすぎ、一つの全体像としてとらえ難くなり、面積測定が極めて困難となった。そこで実験ラット卵巢断面積に適合した投影装置を特に考案作製してそれを応用した。本装置により、全操作は極めて容易となった。

黄体体積ないしは重量を測定するには種々の方法が工夫されており、特殊固定液で固定後、実体顕微鏡で各黄体を摘出する方法、最大断面のみについて計測し、回転楕円体と仮定して算出する方法、その他があるが^{18,19)}、固定液による収縮、操作時の破壊、誤差の大きいことなど種々の問題があり、簡単で正確な方法はない。われわれが行なった方法は労作ははかなり多いが、高い精度を有している良い方法と考えられ、また労作も上記解折装置を応用すれば、相当軽減される。

卵巢の包埋薄切には、卵巢門を正しく底面となるよう細心に留意してパラフィン包埋し、薄切は卵巢遊離像の方から、遊離像卵巢門のいわば縦軸に直角に薄切したが、充分留意しても卵巢門を正しく底面となるように包埋することは時として必ずしも容易でないことも少なくなかった。より正確に縦軸に直角面で薄切する目的でパラフィン包埋後、超軟 X 線発生装置 (Softex EW 型) にて数方向から写真撮影を行ない、それに基づいて薄切方向に修正を加えた。

各切断面における面積を図 6-B の如くに図示すると、卵巢の形状や黄体の占有率が良く把握される。また、当然のことながら、曲線が囲まれた範囲の面積を算出することにより体積が算出される。すなわち、hMG + DHA-Ac 混合投与を行なうと、卵巢形状は hMG 単独投与群に比し、その縦軸方向にも横軸方向にもほぼ同比率で増大し、ほぼ相似形を成すことがうかがい知られる。一方、各断面における黄体面積総和および黄体体積が DHA-Ac 混合投与群では hMG 単独投与群に比し相当増大していることが、一見して理解される。

BrC は、麦角 alkaloid のうちで妊娠子宮筋や血管の収縮をおこす作用は小さくて、ラット子宮における受精卵着床、脱落膜形成を阻害するもののあることが見出されたことが切掛となり作られた薬剤であるが²⁰⁾、BrC は prolactin 分泌を抑制する作用を有するが、これは視床下部の dopamine receptor の刺激によるものとされている^{21,22)}。BrC は prolactin の分泌を抑制するが、gonadotropin 分泌に対する作用については、種々論議されている。hMG + DHA-Ac 混合投与によ

り血中 prolactin 値の著増したラット、いわば実験的 hyperprolactinemia ラットに BrC を投与すると、血中 prolactin 値は約 1/4 に激減したが、このことは、本実験によって起こされた hyperprolactinemia の性質と、ヒトにおける hyperprolactinemia がかなりよく似ていること、少なくとも BrC に対する態度においては同様であることを示唆している。卵巢重量、体積や黄体体積も BrC 投与により減少しているが、このように、hMG, DHA, BrC の 3 者を適当に使用することにより、ラット血中 prolactin 値、黄体の大きさなどがある程度任意な状態にある実験動物を作ることができることが示された。

本実験のように hMG と DHA-Ac との混合投与により、長期間巨大黄体を持続維持している状態は、黄体の状態からいえば偽妊娠状態といえることができる。正常周期を有するラットの発情前期に子宮頸部に一定の機械的刺激を加えると、黄体の life span が長くなり約 14 日間の偽妊娠状態に入るが、この場合の黄体の life span を決定する因子や機序については未解明である。本実験における巨大黄体の形成およびその維持と、血中 prolactin 濃度の関連性の検索、その他の検討が種々示唆を与える可能性が含まれている。

本実験によるいわば実験的 hyperprolactinemia ラットについて種々の面から研究を重ねることにより、乳房や乳汁分泌、動物の種の相違による prolactin の標的臓器の相違についての検索、prolactin 分泌機序や feedback 機構などの詳細の解明など、生殖内分泌学 reproductive endocrinology の面での新しい知見が多く得られる可能性があるものとみなされた。

結 論

幼若雌ラットに dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) および human menopausal gonadotropin (hMG) を混合投与し、血清中 prolactin (PRL) 量の変化および卵巢黄体の体積、その他について種々の面から検索を加え、また、PRL 分泌抑制剤である 2-Bromo- α -ergokryptine (BrC) を投与した場合の変化についても検討した。なお、これらの場合の血清中 FSH, LH, estradiol (E₂) についても測定を行なった。

DHA-Ac は 1 日 10 mg 毎日連続注射し、hMG は隔日 7.5IU を注射した。投与期間は 2 ~ 4 週間であった。血清中ホルモン測定には radioimmunoassay が用いられた。黄体や卵巢の体積測定には、卵巢の連続切片のすべてについてそれぞれの面積を計測し、それを全部積分総和した値を体積として比較検討した。

面積計測には、ライツ A.S.M. 面積半自動解析装置を利用した。

まず、hMG + DHA-Ac 混合投与の卵巣重量に及ぼす影響について、次の如き結果を得た。無処置対照群、DHA-Ac 単独投与群 (10 mg/日)、hMG 単独投与群 (7.5IU / 2日)、hMG + DHA-Ac 混合投与群の4群についての卵巣実重量 (および体重 100g 当り比重量) はそれぞれ2週間投与では、 22.3 ± 3.8 mg (15.0 ± 2.6 mg), 23.0 ± 3.1 mg (14.9 ± 1.8 mg), 49.2 ± 1.7 mg (25.8 ± 0.8 mg) および 106.0 ± 3.0 mg (52.9 ± 1.6 mg) であり、4週間投与では、 65.0 ± 3.0 mg (30.1 ± 1.9 mg), 17.6 ± 1.3 mg (8.0 ± 0.8 mg), 67.8 ± 3.3 mg (31.6 ± 1.3 mg) および 138.0 ± 17.4 mg (61.0 ± 8.3 mg) であった。すなわち、hMG + DHA-Ac 混合投与により卵巣重量は著しく増大した。また、この群の卵巣内 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性は強陽性であり、このことから、これらホルモン投与によって卵巣の steroidogenesis には障害が生じないものと推定された。

次で、同様条件下で2週間投与後の DHA-Ac 単独投与群、hMG 単独投与群、hMG + DHA-Ac 混合投与群の3群についての血清中 PRL 値は、それぞれ $208.1 \pm 26.1 \mu\text{IU}/\text{ml}$, $181.5 \pm 44.0 \mu\text{IU}/\text{ml}$ および $535.0 \pm 34.4 \mu\text{IU}/\text{ml}$ であり、hMG + DHA-Ac 混合投与群において著明な増加が認められた。血清 E_2 値は、それぞれ $190.8 \pm 8.3 \text{pg}/\text{ml}$, $74.3 \pm 6.2 \text{pg}/\text{ml}$, および $289.2 \pm 43.0 \text{pg}/\text{ml}$ であった。

さらに、hMG 単独投与群および hMG + DHA-Ac 混合投与群の両群について、血清中 PRL 値と卵巣重量ないし卵巣体積、黄体体積総和などとの関連性を比較した。この実験群では、PRL 値の平均値はそれぞれ $79.3 \pm 13.5 \mu\text{IU}/\text{ml}$, および $682.9 \pm 56.6 \mu\text{IU}/\text{ml}$ であり、卵巣重量は 121.2 ± 5.2 mg, および 286.6 ± 9.1 mg であった。また、卵巣体積はそれぞれ $27.6 \pm 1.1 \text{mm}^3$, および $58.0 \pm 2.8 \text{mm}^3$ であり、黄体体積総和は、 $13.0 \pm 0.9 \text{mm}^3$, および $41.6 \pm 2.3 \text{mm}^3$ であった。hMG 単独投与群では黄体の占める率は 47.2% であったが、hMG + DHA-Ac 混合投与群では 71.7% と約 1.5 倍に増大した。

hMG + DHA-Ac 投与中に BrC を投与すると、PRL 値は BrC 非投与群の 1/4 の値に著明に減少し、卵巣重量、体積、黄体体積総和の値は、20~30% 減少した。FSH、 E_2 値に著変は認められず、LH 値は共に測定感度以下であった。

hMG + DHA-Ac 混合投与によっておこるいわば

ラットの実験的 hyperprolactinemia の機序およびその応用の可能性などについて種々の面から検討が加えられた。

終りに指導と校閲をいただいた西田悦郎教授に感謝し、種々御協力いただいた赤祖父助教授、寺田、富田、大崎、石川、杉田、荒木各教官、穴田、相川、荒木、山崎各技術員に感謝致します。また、種々御教示いただいた横浜市立大学医学部第2生理学教室川上正澄教授、樋口隆教官、本学第1生理学教室永坂鉄夫教授、毛利元彦助教授、本学癌研究所高橋守信教授に感謝致します。

本論文の一部は第 50, 51, 52 回、日本内分泌学会総会において発表した。

文 献

- 1) 西田悦郎: Dehydroepiandrosterone および Cortisol 長期投与の幼若ラット卵巣に及ぼす影響。日産婦誌, 18, 285 - 290 (1966).
- 2) 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, 338 - 392 (1966).
- 3) Singer, E. L., Seelig, L. L. JR. & Rennels, E. G.: Effects of Dehydroepiandrosterone and Cyano-Ketone on ovarian weight, cholesterol content, and ultrastructure in PMS-HCG treated, immature rats. Endocrinology, 89, 1223 - 1235 (1971).
- 4) Wattenberg, L. W.: Microscopic histochemical demonstration of steroid- 3β -ol-dehydrogenase in tissue sections. J. Histochem. Cytochem., 6, 225 - 232 (1958).
- 5) Levy, H., Deane, H. W. & Rubin, B. L.: Visualization of steroid- 3β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology, 65, 932 - 943 (1959).
- 6) 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 Obst. Gynaec. Jpn., 31, 1871 - 1876 (1979).
- 7) Tomita, Y., Araki, K., Seki, K., Yamashiro, G., Akasofu, K. & Nishida, E.: Serum DHA, DHA-S, 11-Deoxy-17-KS, Estradiol, Prolactin, Co-

- rtisol, FSH, and LH in normal childhood and puberty. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, **31**, 2106 (1979).
- 8) Akasofu, K., Tomita, Y., Seki, K., Araki, K., Yamashiro, G., Shinohara, H. & Nishida, E. : Changes of serum dehydroepiandrosterone, its sulfate and 11-deoxy-17-ketosteroids in female life. Abstracts of IXth World Congress of Gynecology and Obstetrics, p109, 1979.
- 9) Flament - Durand, J. & Deselin, L. : Observations concerning the hypothalamic control of pituitary luteotrophin secretion in the rat. *Endocrinology*, **75**, 22-26 (1964).
- 10) Rennels, E. G. & Herbert, D. C. : Stimulation of prolactin secretion by estrogens and androgens in PMS-HCG treated immature rats. *Biol. Reprod.*, **17**, 484-488 (1977).
- 11) 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).
- 12) Knudsen, J. F., Costoff, A. & Mahesh, V. B. : Dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries and acyclicity in the rat. *Fertil. & Steril.*, **26**, 807-817 (1975).
- 13) Varon, H. H. & Christian, J. J. : Effects of adrenal androgens on immature female mice. *Endocrinology*, **72**, 210-222 (1963).
- 14) Baillie, A. H., Ferguson, M. M. & Mck Hart, D. : Development in Steroid Histochemistry, p103-107, Academic Press, London and New York, 1966.
- 15) Kent, J. & Ryle, M. : Histochemical studies on three gonadotropin-responsive enzymes in the infantile mouse ovary. *J. Reprod. & Fertil.*, **42**, 519-536 (1975).
- 16) Krulich, L., Hefco, E., Illner, P. & Read, C. B. : The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology*, **16**, 293-311 (1974).
- 17) Underwood, E. E. : Quantitative stereology, p23-30. Lockheed-Georgia Co., Marietta, Georgia, 1970.
- 18) 豊田裕: ラットの黄体の簡便な観察法について. *家畜繁殖誌*, **7**, 111-115 (1961).
- 19) Weichert, C. K. & Schurgast A. W. : Variations in size of corpora lutea in the albino rat under normal and experimental conditions. *Anat. Rec.*, **83**, 321-334 (1942).
- 20) Shelesnyak, M. C. : Ergotoxine inhibition of deciduoma formation and its reversal by progesterone. *Amer. J. Physiol.*, **179**, 301-304 (1954).
- 21) Flükiger, E., Marko, M., Doepfner, W. & Niederer, W.: Effects of ergot alkaloids on the hypothalamic-pituitary axis. *Postgr. Med. J.*, **52**, (Suppl. 1), 57-61 (1976).
- 22) Corrodi, H., Farnebo, L. O., Fuxe, K. & Hamberger, B. : Effects of ergot drugs on central 5-hydroxytryptamine neurons ; Evidence for 5-hydroxytryptamine release or 5-hydroxytryptamine receptor stimulation. *Europ. J. Pharmacol.*, **30**, 172-181 (1975).

Hyperprolactinemia in Female Rats by Combined Injection of Dehydroepiandrosterone and Human Menopausal Gonadotropin—Yutaka Hosono, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. *J. Juzen. Med. Soc.*, 88, 816–830 (1979).

Abstract Studies were made on the effects of combined administration of dehydroepiandrosterone acetate (DHA-Ac) and human menopausal gonadotropin (hMG) on rat serum prolactin (rPRL) concentrations and the size of the corpus luteum in immature female rats.

Rats were given combined injections of DHA-Ac (10mg/d.) and hMG (7.5IU/2d.) for 2 weeks.

Serum rPRL, LH and FSH were measured by radioimmunoassay using materials supplied by NIAMDD. The volume of ovaries and corpora lutea in the ovary was measured by Leitz A.S.M., the semi-automatic image analysis system.

Serum rPRL level of the treated animals was $682.9 \pm 56.6 \mu\text{IU/ml}$ as compared to $79.3 \pm 13.5 \mu\text{IU/ml}$ in the control animals treated with hMG alone.

The wet weight of bilateral ovaries was found on the average to be $286.6 \pm 9.1 \text{ mg}$, $121.2 \pm 5.2 \text{ mg}$ for the treated and the control group respectively.

Total volume of corpora lutea in the ovary was $41.6 \pm 2.3 \text{ mm}^3$, $13.0 \pm 0.9 \text{ mm}^3$ for the treated and the control group respectively.

Effects of treatment of 2-Bromo- α -ergokryptine (BrC) on hyperprolactinemia rats were observed. Twice during 2 weeks, 1 mg of BrC was injected to female rats treated with DHA-Ac and hMG.

Serum rPRL levels were decreased from $2626.8 \pm 661.4 \mu\text{IU/ml}$ to $652.8 \pm 224.8 \mu\text{IU/ml}$, bilateral ovarian weights were decreased from $187.8 \pm 14.9 \text{ mg}$ to $150.8 \pm 9.3 \text{ mg}$ and the total volume of corpora lutea in the ovary was decreased approximately by 24%.

In hypophysectomized female rats, no effect of combined DHA-Ac and hMG treatment on serum rPRL level was observed.

The role of DHA and gonadotropin in hyperprolactinemia and the relationship between the amount of administered DHA-Ac and serum rPRL concentrations were discussed.