

氏 名(本籍)	石 井 伸 一
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	農 博 第 4 1 9 号
学位授与年月日	平 成 3 年 3 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 畜産学専攻
学位論文題目	雌ラットの infantile 期における性腺刺激 ホルモン分泌に関する研究
論文審査委員(主査)	教 授 正 木 淳 二 教 授 佐々木 康 之 教 授 伊 藤 敏 敏

# 論文内容要旨

動物は生後一定の期間を経て性成熟に到達し、生殖活動を開始する。

雌ラットを用いた性成熟到来に関する研究は、1970年代にラジオイムノアッセイによって血中生殖ホルモン濃度が測定され始めてから急速に進展し、その結果、生後2~3週齢の時期に血中性腺刺激ホルモン(GTH)濃度に特徴ある変化が見られることが明らかになった。この時期はOjedaによって infantile期と定義されたが、infantile期に見られるGTH分泌の機構に関しては、今日までまだ十分に明らかにされていない。

本研究は、雌ラットの infantile期に見られる性腺刺激ホルモン分泌の特徴を視床下部一下垂体一卵巣系の中で考察し、性成熟到来との関連を明らかにすることを目的とした。

## I. infantile期の性腺刺激ホルモンの分泌調節について

視床下部および卵巣から分泌される各生殖ホルモンの動態について検索し、さらにこれらのホルモンに対する下垂体の反応性についても検討し、視床下部一下垂体一卵巣系機能の相互関係から、雌ラットの infantile期におけるGTHの分泌調節機構を明らかにしようとした。また、生殖機能に抑制的効果を示すと考えられている神経伝達物質のうち、opioid peptideを取り上げ、この物質の性成熟過程での関与について検討しGTH分泌との関連を調べた。

1) 雌ラットの性成熟に至るまでの性腺刺激ホルモン分泌の動態について調べたところ、infantile期には血中性腺刺激ホルモン濃度の上昇が確認され、特にLHよりもFSHの上昇が、明白であった(Fig. 1)。

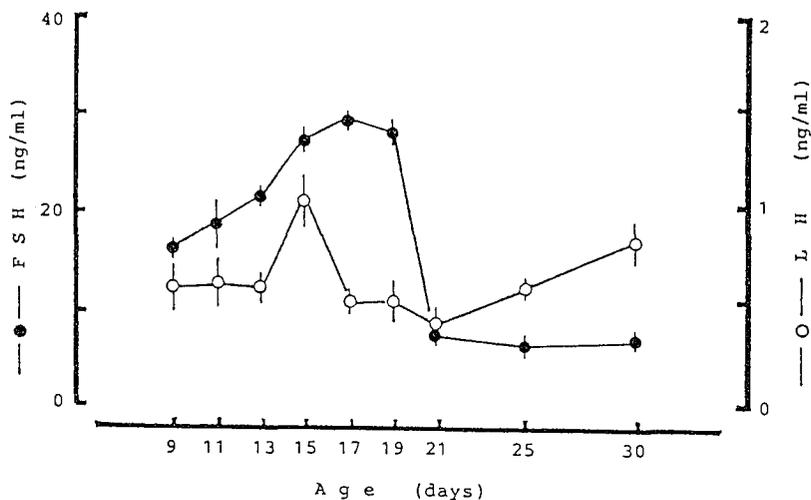


Fig.1 Changes in plasma FSH and LH concentration during sexual maturation in the female rats. Values are mean±SEM.

2) 性成熟過程の視床下部のLHRH含量および下垂体の性腺刺激ホルモン含量の消長を調べた。その結果、視床下部のLHRH含量は、5日齢の幼若時でも検出され、25日齢まで増加した。また、下垂体のFSH含量は、20日齢まで増加したのち25日齢にかけて減少した。下垂体中のLH含量は20日齢まで増加し、その後はプラトーとなった (Table 1)。

Table 1. Changes in the contents of LHRH hypothalamic LHRH and pituitary gonadotropins during sexual maturation in the female rats.

Age (day)	No. of rats	Hypothalamic LHRH (ng/hypothalamus)	Pituitary FSH ( $\mu$ g/Pituitary)	Pituitary LH ( $\mu$ g/Pituitary)
5	8	0.79 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	0.18 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.27 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>
10	11	1.08 $\pm$ 0.05 <sup>b</sup>	0.85 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup>	2.03 $\pm$ 0.25 <sup>b</sup>
15	10	1.25 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>	1.73 $\pm$ 0.12 <sup>c</sup>	4.31 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>
20	10	1.48 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	3.07 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	7.38 $\pm$ 1.16 <sup>d</sup>
25	9	1.85 $\pm$ 0.13 <sup>d</sup>	2.42 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	10.24 $\pm$ 0.76 <sup>d</sup>

Values are mean $\pm$ SEM.

a, b, c, d, e: Values in the same column with different superscripts differ significantly (P<0.01).

3) 性成熟過程の血中エストラジオール-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) およびエストロジェンと特異的に結合する $\alpha$ -フェトプロテイン ( $\alpha$ -FTP) の動態を調べた結果、血中E<sub>2</sub>は出生直後は高く、infantile期以降急激に減少すること、また、 $\alpha$ -FTPの結合能は9日齢で約80%を示し、その後15日齢までは変化が見られなかったが、17日齢からは緩やかに減少しはじめ、30日齢までに急激に減少した (Fig. 2)。

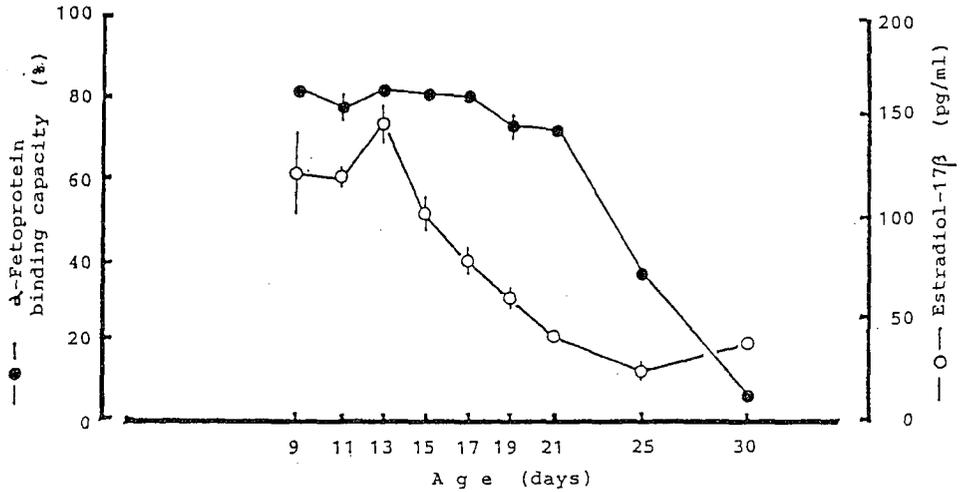


Fig.2 Relationship between plasma estradiol-17 $\beta$  level and  $\alpha$ -fetoprotein binding capacity.

4) 下垂体細胞培養法によるインヒビンのバイオアッセイを用いて性成熟過程での卵巣中インヒビン活性の変化を調べた結果、15日齢以降ではじめて検出され、卵巣重量の増加と一致して25日齢まで急激に増加した (Fig. 3)。また、インヒビンのRIA系を確立して血中インヒビン濃度を測定した結果、血中インヒビンは15日齢頃から急激に増加することが明らかになった (Fig. 4)。卵巣中インヒビンの生物活性と免疫活性を比較すると、20日齢以降インヒビンが増加したときにおいて相関が見られた (Table 2)。

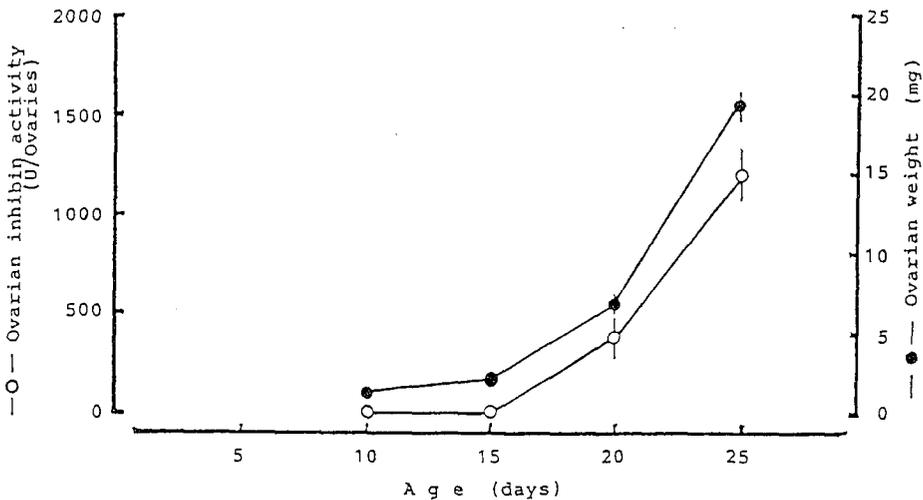


Fig.3 Changes in ovarian inhibin activity and ovarian weight during sexual maturation in the female rats. Values are mean $\pm$ SEM.

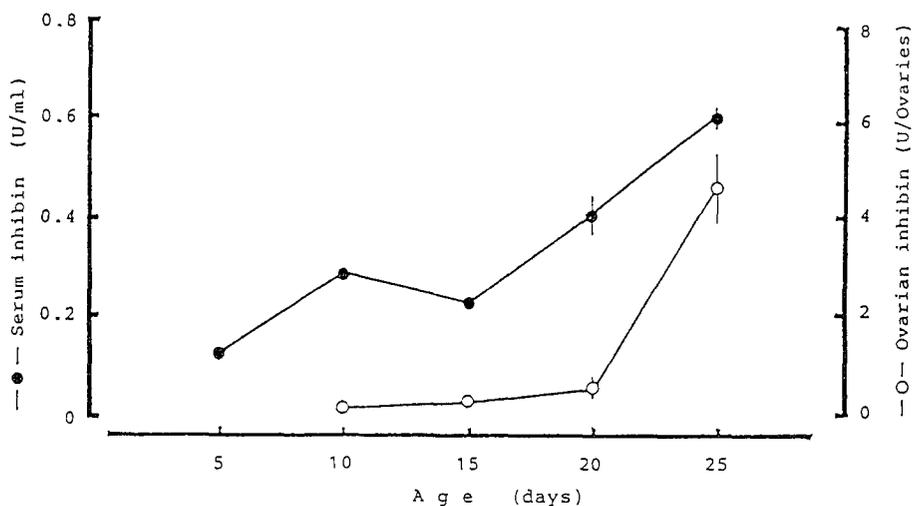


Fig.4 Changes in serum and ovarian inhibin content measured by RIA during sexual maturation in the female rats. Values are mean $\pm$ SEM.

Table 2. Comparison between bioactive and immunoactive inhibin in ovary during sexual maturation in female rat.

A G E	No. of Rat	Bioactive inhibin <sup>1)</sup> (U/Ovaries)	Immunoactive inhibin <sup>2)</sup> (U/Ovaries)
10 day	6	UD	0.19 $\pm$ 0.03
15 day	11	UD	0.34 $\pm$ 0.07
20 day	10	1.27 $\pm$ 0.39	0.60 $\pm$ 0.13
25 day	9	4.83 $\pm$ 0.58	4.76 $\pm$ 0.57

Values are mean $\pm$ SEM.

1) Bioactive inhibin levels were calculated using statistics for parallel-line assay in terms of PMSG-rOH.

2) Immunoactive inhibin levels were expressed as U PMSG-rOH.

5) 性成熟に至るまでのGnRHおよびインヒビンに対する下垂体の反応性の変化を調べた。GnRHに対する下垂体の反応性は性成熟過程で変化し、infantile期に増加することが明らかになった (Fig. 5)。チャコール処理した牛卵泡液 (b F F) をインヒビン源として腹腔内注射し、下垂体のインヒビンに対する反応性を調べた。その結果、全ての日齢でb F Fの投与量に依存したF S H分泌の抑制が観察されたが、体重当たり同量のb F F投与で比較すると、5、10日齢よりも、20、25日齢の方がより少ない量でF S H分泌が抑制された (Table 3)。種々の日齢の雌ラット下垂体を培養し、b F Fおよびインヒビンを添加してF S H放出の抑制率を比較した。その結果、10日齢よりも25日齢のほうが抑制の程度は大きかった (Fig. 6)。

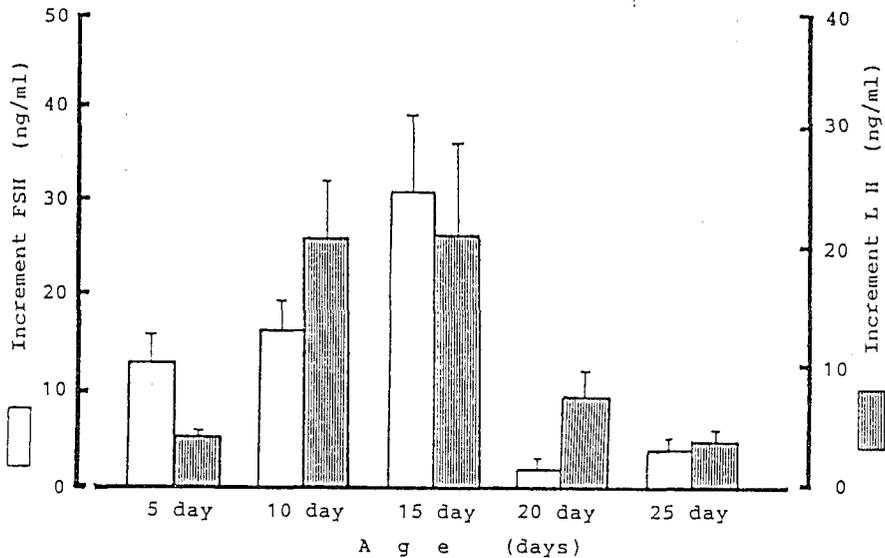


Fig.5 Changes in FSH and LH responsiveness to GnRH (100ng/100gBW) during sexual maturation in the female rats. All samples were collected 20 min after injection of GnRH. Values are mean±SEM.

Table 3. Effect of administration of bovine follicular fluid (bFF) on serum FSH concentration in female rats (mean±SEM)

b F F dose ( $\mu$ l/100gBW)	S e r u m F S H (ng/ml)			
	10 day	15 day	20 day	25 day
S a l i n e	18.62±2.52	42.31±2.80	31.93±3.39	6.40±0.56
1 0 0	14.23±0.67	34.01±1.05 *	15.07±0.53 *	2.92±0.25 **
2 0 0	13.26±1.30	24.86±2.76 **	12.27±0.36 *	2.56±0.06 **
5 0 0	10.36±1.28 *	21.48±2.60 **	10.80±1.08 **	1.97±0.11 **
1 0 0 0	8.76±0.51 *	19.27±1.71 ***	7.81±0.60 **	1.53±0.15 **

\* P<0.05, \*\* P<0.01 and \*\*\* P<0.001 compared with saline control.

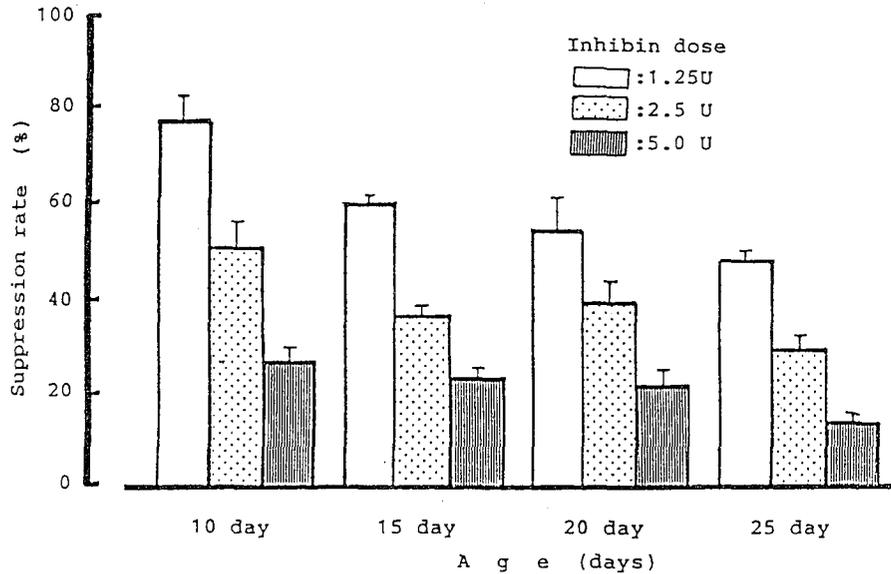


Fig.6 Changes in the FSH suppression rate following the administration of inhibin standard (WHO,86/690) to the cultured pituitary cells obtained at different post-natal ages. Values are mean±SEM expressed as percentage of control (without inhibin).

6) opioid receptor antagonistのナロキソンを用い、性成熟過程でのopioid peptideに対する反応性の変化を調べた。その結果、ナロキソン投与による血中GTH濃度は15日齢までは増加したが、20日齢以降では有意な増加は見られなかった (Fig. 7)。

7) 以上の結果から、infantile期のGTH分泌には、前半期の上昇は視床下部からのLHRHと下垂体の反応性に依存し、後半の急激な減少は、 $\alpha$ -FTPの減少に伴うエストロジェンのフィードバック機能の確立と、卵巣からのインヒビン分泌とインヒビンに対する下垂体の反応性の増加が関係していることが明らかになった。また、内因性opioid peptideも関係している可能性が示された。

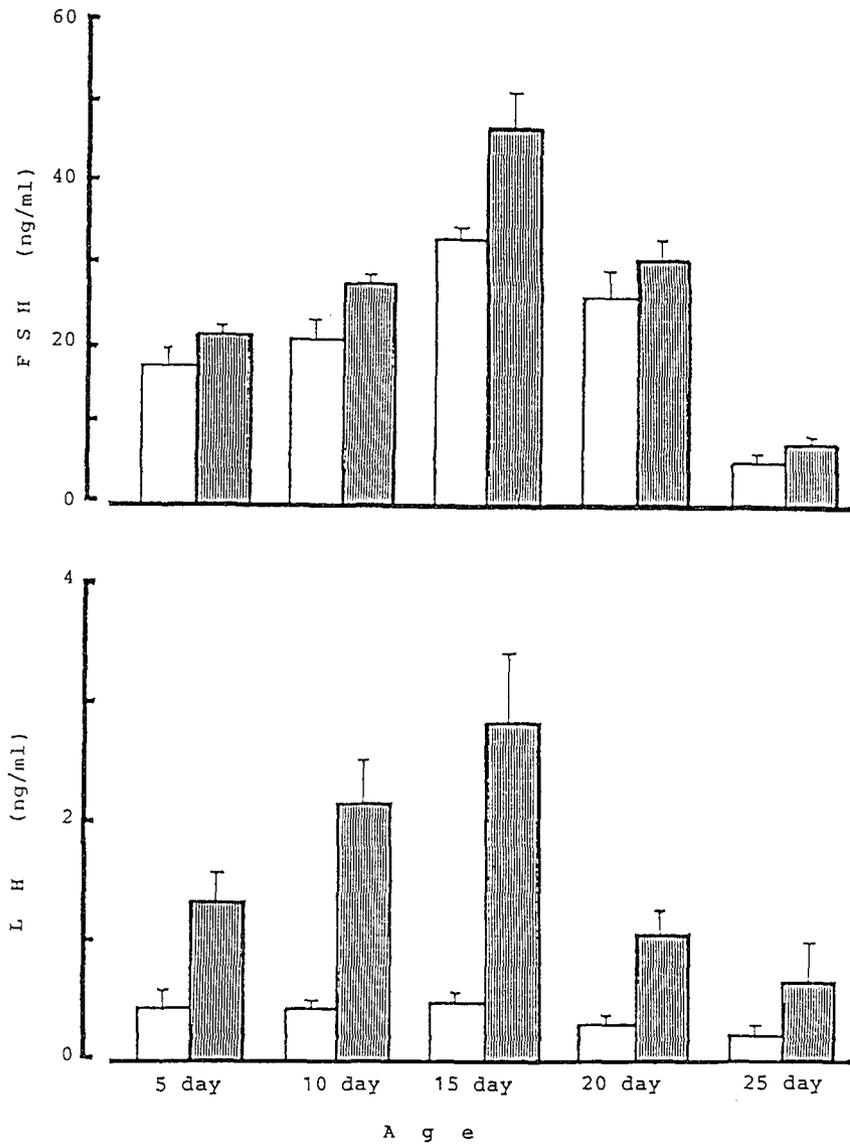


Fig.7 FSH and LH levels 30min after injection of naloxone during sexual maturation in the female rats. Values are mean $\pm$ SEM. Saline-injected controls are shown by the open bars and naloxone-treated animals by the hatched bars.

## II. infantile期の性腺刺激ホルモン分泌の性成熟到来への役割について

雄ラットの infantile期に特徴的に見られる血中GTH分泌の性成熟過程での役割と、その性成熟到来に対する生理的意義を検索した。

### 《照明条件を変えた場合の性成熟の到来と性腺刺激ホルモンの分泌》

1) 雌ラットの性成熟の到来は照明時間により影響を受け、連続照明(LL)条件下で飼育すると促進し、連続暗黒(DD)条件下で飼育すると遅れることが示された (Table 4)。また、初回発情あるいは初回排卵時の卵巢機能に関しては、正常照明(LD)条件下で飼育したものと同様に正常であることが明らかになった (Table 5)。

2) 性成熟到来まで照明条件を変えて飼育した場合のGTH分泌および卵巢の発達を観察した結果、卵巢重量の増加はLL区で早く、DD区では遅れることが明らかになった。また、infantile期に見られるFSHのピークは、LL区で早くDD区で遅れた。血中LH濃度は、個体による変動が

Table 4. Effect of continuous lighting and darkness on the age of vaginal opening (V.O.) and first estrus and body weight at V.O. (Mean±SEM).

Lighting condition	n	Age of vaginal opening	Age of first estrus	No. of estrus at V.O. (%)	Body weight at V.O. (g)
LD	44	34.0±0.3	34.1±0.3	40(90.9%)	101.2±2.6
LL	38	30.8±0.3***	30.9±0.3***	32(84.2%)	97.2±1.5
DD	37	40.3±0.5***	41.2±0.5***	32(86.5%)	111.0±3.4

\*\*\* P<0.001 as compared to control (LD).

Table 5. Effect of continuous lighting and darkness on first ovulation and the number of ova at first estrus.

Lighting condition	Presence of ova in ampulla (%)	No. of ova (Mean±SEM)	Ovarian weight (mg; Mean±SEM)
LD	9/11(81.8%)	8.8±0.6	32.3±1.4
LL	7/8 (87.5%)	8.6±0.2	31.1±3.1
DD	10/11(90.9%)	7.9±0.5	32.8±2.2

大きく、顕著な差は見られなかったが、LD区では15日齢でピークを示したのに対し、LL区では11日齢、DD区では21日齢でピークを示した (Fig. 8)。

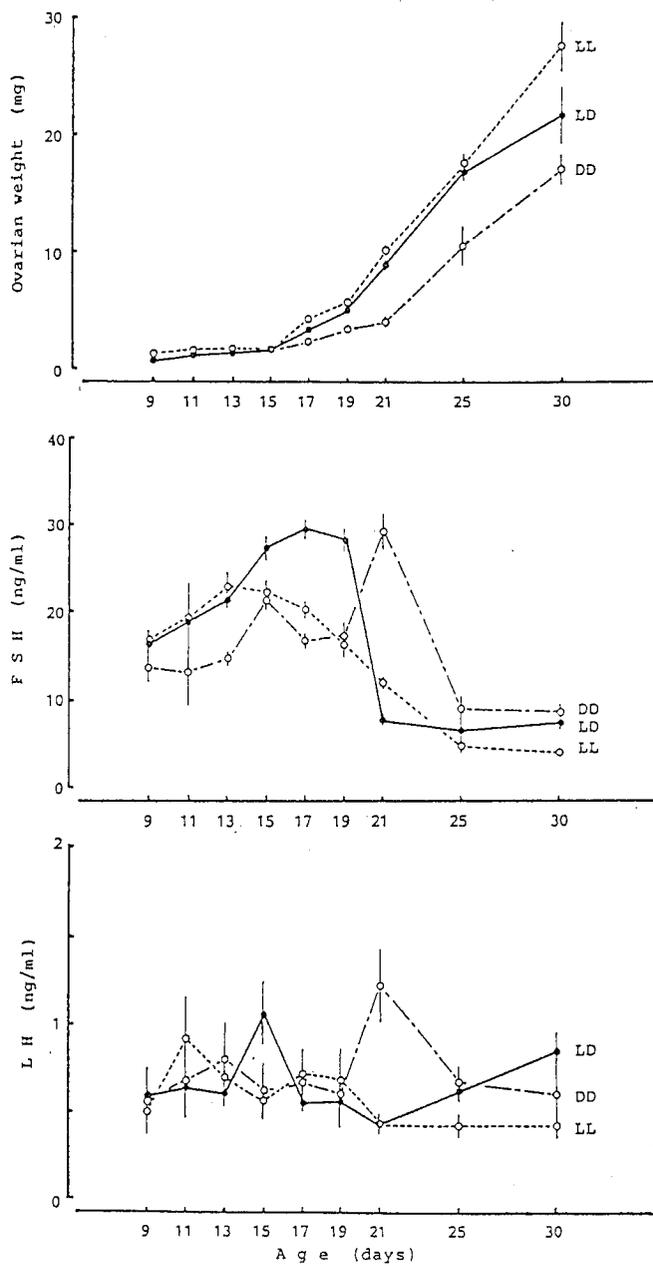


Fig.8 Effect of continuous lighting (LL) and darkness (DD) on ovarian weight and FSH and LH concentrations during post-natal growth in the female rats. Values are mean±SEM.

3) 性成熟到来までの血中インヒビンの動態について調べた結果、血中インヒビン濃度の増加は、LL区で早く、DD区では遅れることが明らかになった (Fig. 9)。

4) 以上の結果から、infantile期のGTH分泌の上昇が起こる時期は、その後の卵巣の発達開始時期に影響し、さらに性成熟到来の時期に関与していることが明らかになった。

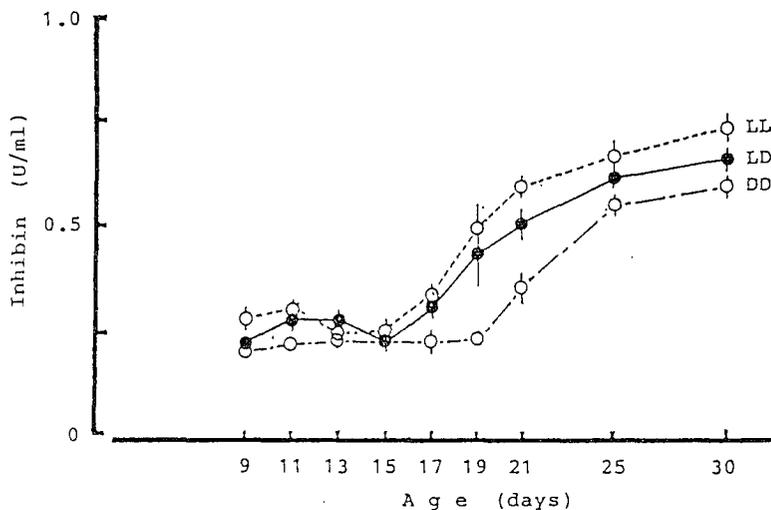


Fig.9 Effect of continuous lighting (LL) and darkness (DD) on inhibin concentration during post-natal growth in the female rats. Values are mean±SEM.

#### 《neonatal, infantile期におけるGnRH投与の性成熟到来に及ぼす効果》

1) neonatal期あるいは infantile期初期にGnRHを5日間投与し、その後の性成熟の到来を調べた。その結果、infantile期以前に外因性GnRHを投与することにより、性成熟の到来の促進が可能であることが示された (Fig.10)。

2) infantile期初期にGnRHを投与した個体で、血中GTH濃度の動態および卵巣重量の増加について調べた。その結果、処理個体の血中GTH濃度は無処置個体と比べて早い時期から高く、卵巣重量の増加も早かった (Fig.11)。

3) 以上の結果から、neonatal期あるいは infantile期の内分泌環境を調節することにより、性成熟到来の調節が可能なが示された。

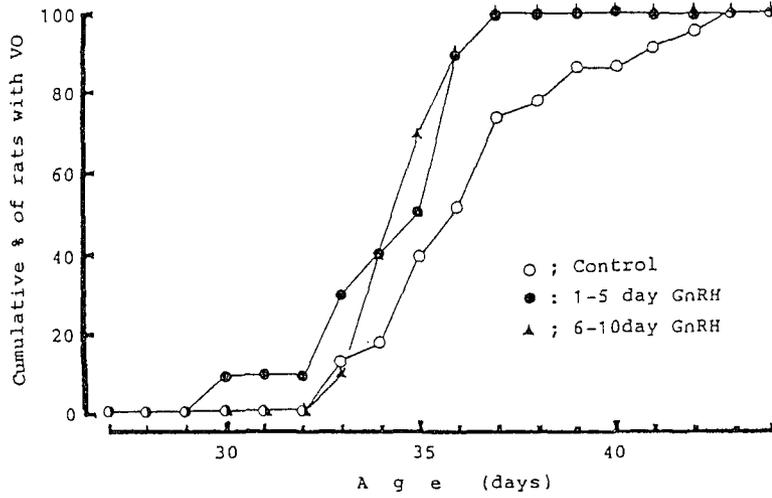


Fig.10 Percentage of rats with fully opened vaginas (VO) at a specified age (days). Rats were treated with GnRH (200ng/100gBW·day) at different intervals: ●, 1-5 days of age, and ▲, 6-10 days of age.

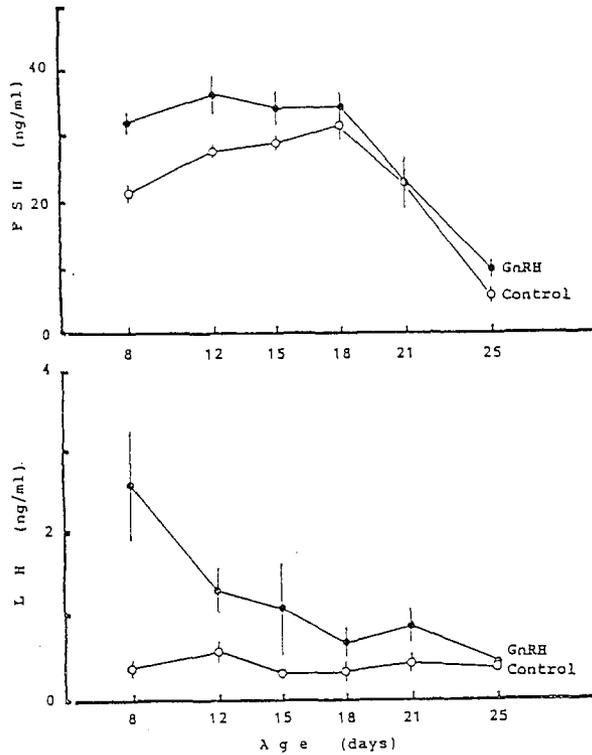


Fig.11 Serum FSH and LH levels in GnRH-injected (●) and control (○) rats during sexual maturation. Values are mean±SEM.

以上、本研究は、雌ラットの性成熟過程において infantile期前半は視床下部-下垂体系の機能でGTH分泌の上昇が起こり、 infantile期後半は、卵巣由来のホルモン（特にエストロジェンとインヒビン）のフィードバック機構も作動し、GTHが急激に減少することを明らかにした。また、 infantile期のGTH分泌に内因性opioid peptideが関与する可能性を提示した。さらに、 infantile期のGTH分泌の起きる時期が性成熟到来の時期に関連があることを明らかにした。これらの成果は、これまでの雌ラットの性成熟到来機構に新知見を加えたものとする。

## 審査結果の要旨

雌ラットは、生後2-3週齢でinfantile期といわれる時期に入り、血中性腺刺激ホルモン(GTH)濃度が一時的に増加する。本研究では、このようなホルモン分泌の特徴を視床下部-下垂体-卵巢系でとらえ、性成熟到来との関連を追求した。

まず、性成熟に至るまでの雌ラットのGTH分泌についてしらべ、infantile期における血中濃度の上昇は卵胞刺激ホルモン(FSH)で特に顕著なことを確認した。ついで、血中GTH濃度に関連のある視床下部の黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)および下垂体のGTH含量をしらべ、前者は測定終了時の25日齢まで増加を続け、後者はFSH含量が20日齢でピークを示すことを明らかにした。GTHの分泌には卵巢のエストラジオール- $17\beta$  ( $E_2$ ) およびインヒビンの関与も考えられるので、それぞれの動態を調べた。血中 $E_2$ は出生直後からinfantile期まで高値を続けるが、この間は $\alpha$ -フェトプロテインとの結合によって $E_2$ の作用が抑えられ、それ以降に $E_2$ 作用が発現される可能性を示した。また、インヒビンのRIA系を確立し、生物活性と免疫活性の両面から動態を調べ、20日齢ごろからインヒビン活性が急増することを示した。次いで、性成熟に至るまでのGnRHおよびインヒビンに対する下垂体の反応をしらべ、infantile期のGTH分泌のうち前半期の上昇は視床下部からのLHRH分泌と下垂体の反応性に依存し、後半の減少は $\alpha$ -フェトプロテインの減少に伴うエストロジェンのフィードバック機構の確立と、卵巢インヒビンに対する下垂体の反応性が関与していることを明らかにした。また、内因性オピオイドペプチド関与の可能性も示した。

infantile期のGTH分泌の生理的意義を明らかにするため、照明条件を変えた場合のinfantile期の変化と性成熟到来との関係をしらべた。その結果、処理区におけるinfantile期のFSHピークは対照区に比べて連続照明で早まり、連続暗黒で遅延したが、此の結果はその後の性成熟到来の順序とも一致した。また、neonatal期またはinfantile期にGnRHを投与した結果、処置個体の血中GTH濃度は対照に比べて早い時期から上昇し、卵巢重量の増加も促進されることがわかった。

以上、本研究は雌ラットの性成熟過程にみられるinfantile期のGTH分泌を中心にホルモンの相互関係を明らかにするとともに、infantile期のGTH分泌増加と性成熟到来との関係を実証した。これらの成果は、性成熟到来の機構に新知見を加えたものであり、著者は農学博士の学位を授与されるに値すると判定した。