

氏 名 (本籍)	こう さか てつ や 高 坂 哲 也
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 341 号
学位授与年月日	昭和 60 年 9 月 12 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	ラットにおけるリラキシンの分泌と 作用に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 正木 淳 二 教授 津 田 恒 之
教授 玉 手 英 夫

論文内容要旨

哺乳動物の妊娠は、受精、着床、胎子発育および分娩の過程を経過する。妊娠に伴う内分泌環境の変化については、性腺刺激ホルモンおよび性ステロイドホルモンを中心に論じられてきたが、このほかにまだ同定されない物質や、生理作用が明らかでないホルモンの関与も推察されている。リラキシンもその一つである。

本物質は、1926年に Hisaw によって発見された妊娠期に出現するペプチドホルモンである。発見当初は、妊娠モルモットの血清中に存在し、分娩に際して骨盤の恥骨じん帯を弛緩させ産道を広げる物質であると考えられていたが、その後の研究によって、ラットを始め恥骨じん帯を欠く多くの動物においても妊娠時の生殖器、主に卵巢で産生されることが示され、また、雌性生殖道に対して多彩な生物学的効果を発現する可能性が示唆されてきた。しかしながら、妊娠時における役割や分泌源については十分な検討がなされなかった。しかし、最近では、生理活性物質としてのリラキシンに注目する機運が芽生えており、特に生化学面からの研究が進展している。

本研究はラットを用い、まだ全ぼうが知られていないリラキシンの分泌および作用の解明を目的として着手した。

リラキシンの分泌源と動態

1) リラキシンの生物検定法（マウス恥骨じん帯計測法）を確立して、妊娠期の生殖器および胎子中におけるリラキシンの生物活性を調べた。その結果、本活性は卵巢で検出されたが、卵巢以外の生殖器系諸器官には認められなかった（Table 1）。

2) 卵巢内におけるリラキシンの分布を調べた結果、生物活性は黄体組織中で検出されたが、黄体以外の組織中には認められなかった。

3) 妊娠期を通じて黄体組織中のリラキシンの動態を調べた。その結果、リラキシン生物活性は、妊娠10日頃から検出され、妊娠15日以降急激に上昇し、妊娠20日にピークに達した。その後は急速に低下し、分娩後1日には低値に戻った（Fig. 1）。

4) 以上の結果から、リラキシンの分泌源は妊娠期卵巢の黄体組織で、産生組織中の含量は妊娠末期にピークとなることが示された。

黄体のリラキシン分泌

黄体は、受精卵の着床や妊娠の維持に必要な性ステロイドホルモン（特にプロジェステロン）の分泌器官として知られている。しかし、この組織はリラキシンの分泌源でもあることが明らかとなったので、黄体のリラキシン分泌様式について調べた。

1) 妊娠期における黄体細胞の超微形態を観察した。その結果、妊娠期を通して、黄体細胞には常に $4^5-3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase の活性がみられ、細胞質は管状クリステをもつミトコンドリア、よく発達した滑面小胞体など、ステロイド分泌細胞特有の小器官で占めら

れていることが観察された。しかし、リラキシン含量が最大となる妊娠末期の黄体では、暗調顆粒（一層の限界膜で囲まれた内腔に高電子密度の暗い物質を含む直径 200～300 nm の円形の顆粒）の著しい増加が認められた（Fig. 2）。

2）暗調顆粒について、Acid phosphatase（ACPase）の電顕細胞化学的検出を行った。その結果、ACPase 活性は少数の暗調顆粒で見いだされただけで、大多数の顆粒では検出されなかった（Fig. 3）。

3）暗調顆粒分画のリラキシン生物活性について調べた。その結果、暗調顆粒は 11,000 rpm の画分に集まり（Fig. 4）、この画分から強いリラキシン生物活性が検出された（Fig. 5）。

4）暗調顆粒について、リラキシンの免疫電顕的検出を行った。その結果、リラキシン免疫活性は大部分の暗調顆粒に認められ、暗調顆粒はリラキシン顆粒であると同定された（Fig. 6）。

5）リラキシン顆粒の形成と放出について免疫細胞化学的検索を行った。その結果、リラキシンは、初めに粗面小胞体で前駆体として合成され、次いでゴルジ装置に運ばれてプロセッシング（修飾）を受け、さらに暗調顆粒として成熟して貯留された後、開口分泌様式によって黄体細胞から放出されることが明示された（Table 2, Fig. 7）。

6）妊娠期における黄体細胞のリラキシン分泌活動について解析した。その結果、黄体細胞は妊娠中期から粗面小胞体、ゴルジ装置、分泌顆粒の形態を備え、リラキシンを分泌するタンパク分泌細胞としての機能を獲得することがわかった。また、妊娠20日に向けて、これらの小器官の体積比は増加し、リラキシンの合成活動は活発となった。しかし、妊娠20日から分娩に至るまでの短期間のうちに、顆粒の体積比は激減し、リラキシンの放出活動は亢進した（Table 3）。

7）以上の結果から、ステロイド分泌器官として定義されてきた黄体細胞において、リラキシンは一層の限界膜で囲まれた直径 200～300 nm の暗い顆粒として存在し、その合成・放出は Palade により提唱されている分泌タンパクの細胞内輸送系に基づくことが明らかとなった。さらに、分泌活動については、妊娠20日までは合成優位（合成型）を示すが、合成型分泌活動が頂点に達する妊娠20日において、放出優位に変わることがわかった。

分娩時を中心としたリラキシンの生理作用

産生細胞において、妊娠20日以降リラキシンの分泌活動が活発となることが明らかとなったので、分娩現象に焦点を当て、リラキシンの生理作用について解明を試みた。

1）妊娠期における血中リラキシンの消長について調べた。その結果、血中リラキシン濃度は妊娠20日から21日にかけて急激に上昇し、妊娠21日にピークに達したが、分娩後1日には検出できない値となった（Fig. 8）。

2）妊娠末期から分娩に至るまでの子宮頸管の性状変化について調べた。その結果、妊娠21日から22日にかけて、子宮頸管は物性面で伸展性（creep rate）が急激に高まり、著しく軟化した。この変化は分娩終了時に最大となった（Fig. 9）。重量についても同様の変化がみられた。その

時の子宮頸管の組織学的性状については、コラーゲン線維束の分枝化並びに切断が著しく亢進していた。コラーゲン type 別にみると、伸展性に乏しい type I コラーゲンが分解・減少し、逆に、伸展性に富む type III コラーゲンが網目状に発達していた。さらに、コラーゲン線維束の間げき（間質）は、拡大浮腫化し、ヒアルロン酸を中心としたプロテオグリカンが増量していた。

3) 血中リラキシン濃度の上昇を認める正常分娩例と、妊娠末期に卵巣除去を行い血中値の上昇を欠いた場合の分娩例について、胎子娩出に要する時間（分娩所要時間）を調べた。その結果、血中リラキシン濃度の上昇を欠く卵巣除去動物の分娩所要時間は、妊娠維持のために用いた性ステロイドホルモンの投与量と関係なく、平均5～6時間の範囲にあった。この値は、正常時のそれと比べて、著明に延長していた（Table 4）。

4) リラキシンの血中値に上昇がみられない妊娠末期卵巣除去ラットを用いて、リラキシン抽出液投与による影響を調べた。その結果、正常妊娠時に見られるような分娩前の血中リラキシン濃度の上昇が引き起こされた場合にのみ、正常時と同様に、子宮頸管は伸展性が著しく高まって十分に軟化し（Fig. 10）、組織構築面でも、コラーゲン線維束は大きく変ぼうをとげ、type I コラーゲンの分解と type III コラーゲンの網目状の発達、線維束の間隙を埋めるヒアルロン酸の増加が顕著であった。また、分娩所要時間についても、著しく短縮され、正常時と変わらなくなった（Fig. 10, Fig. 11）。

5) 妊娠末期から分娩に至るまでの血中リラキシンの経時的分泌動態について調べた。その結果、リラキシンの分泌パターンには個体差がみられたが、妊娠21日または22日にリラキシン濃度のピークが認められた。ピークが妊娠21日に出現した個体では、分娩は妊娠22日に、一方ピークが妊娠22日に出現したものでは、分娩は23日に起こった。さらに、ピークの出現から平均24時間後に、分娩が開始された（Fig. 12）。

6) 以上の結果から、妊娠20日以降認められる血中リラキシン濃度の上昇は、Fig. 13 に模式化したように、子宮頸管の結合組織の構築を変化させ、分娩にそなえて頸管を十分に軟化させることが明らかとなった。その結果、子宮頸管は、娩出器官としての機能を獲得し、胎子は頸管部を容易に、かつ速やかに通過できるために、分娩所要時間は短縮されるものと考えられた。さらに、血中値が上昇してピークに達すると、約24時間で分娩が始まることがわかった。

以上、本研究は、リラキシンがステロイドホルモン分泌組織として知られる黄体から分泌され、子宮頸管を軟化させることによって分娩現象、とくに胎子の娩出に必須の役割を果たしていることを明らかにした。本研究の成果は、分泌面では、黄体細胞の形態と機能に新たな概念をもたらしたと考える。また、作用面では、リラキシンによる分娩調整の可能性を示したものとする。

Table 1. Effect of the homogenates of reproductive organs and fetus in Day 20 pregnant rat on the length of interpubic ligament of the mouse.

Organs and fetus	Dose (mg of freeze-dried)	No. of mice	Interpubic ligament length (mm)
Ovary	0.5	13	2.07 ± 0.44
	1.0	9	2.84 ± 0.57
Uterus	0.5	7	1.13 ± 0.27
	1.0	6	1.11 ± 0.18
Placenta	0.5	6	1.03 ± 0.22
	1.0	6	1.08 ± 0.09
Fetus	0.5	6	1.16 ± 0.38
	1.0	7	1.13 ± 0.27
Benzopurprine 4B (Control)		12	0.92 ± 0.26

(M ± S.D.)

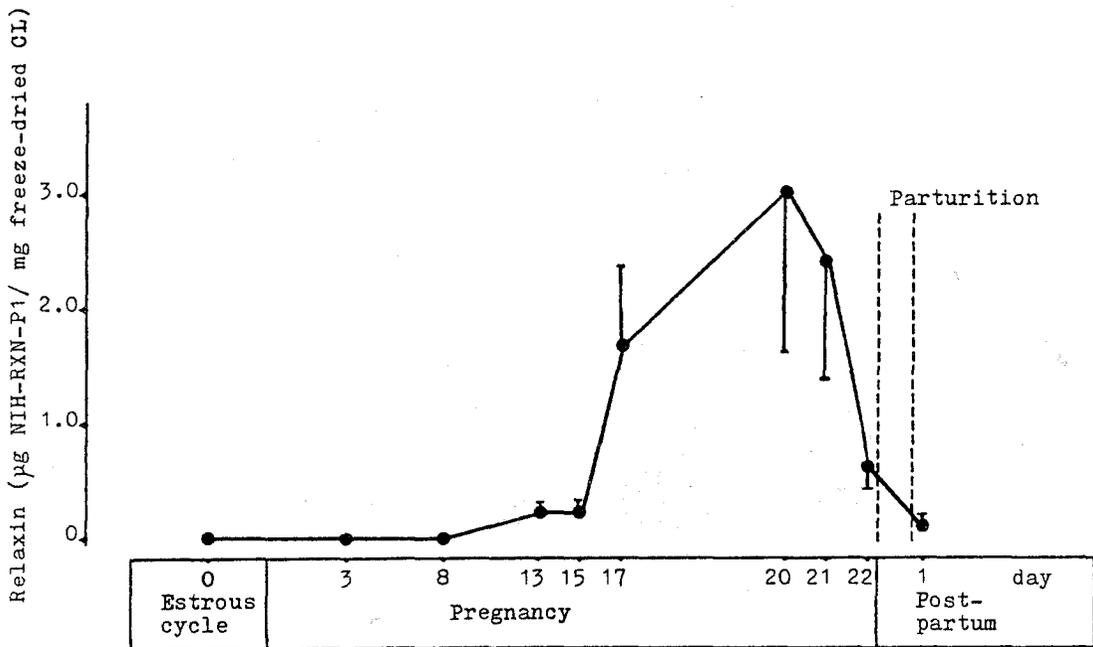


Fig. 1. Changes in biological activity of relaxin in corpora lutea (CL) during pregnancy in the rats. Each point represents mean ± S.D., expressed as µg NIH-RXN-P1/ mg freeze-dried CL.

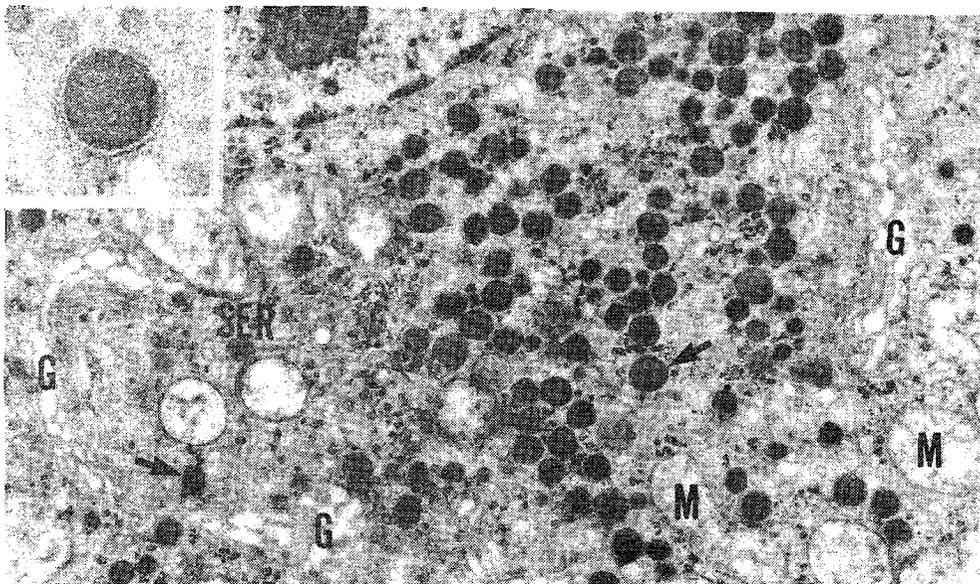


Fig.2. Electron micrograph of a luteal cell in Day 20 pregnant rat. The luteal cell has the ultrastructural features as steroid secreting cells; the cytoplasm is filled with smooth endoplasmic reticulum (SER), and contains mitochondria with tubular cristae (M). Note that membrane-limited dense granules (arrows), measuring about 200-300 nm in diameter, with matrix of homogeneous and electron-dense, are seen abundantly near Golgi apparatus (G). x 16,000 Inset, The dense granule.

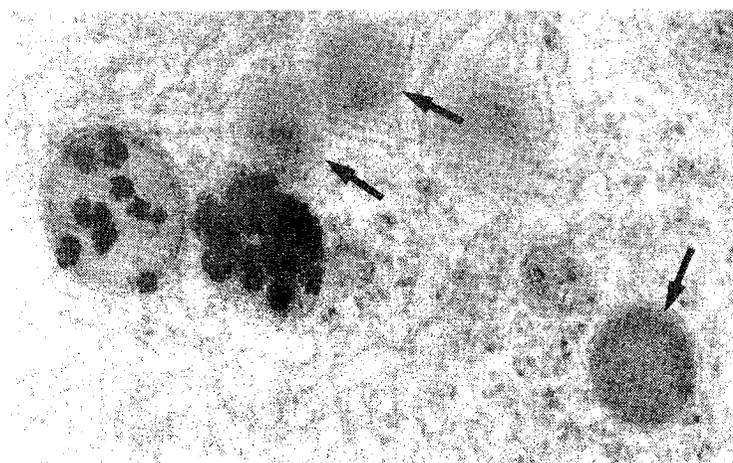


Fig.3. Acid phosphatase activity of a luteal cell in Day 20 pregnant rat. Two granules on the left-hand side contain reaction product showing the activity, while the others (arrows) have no such product. x 58,000

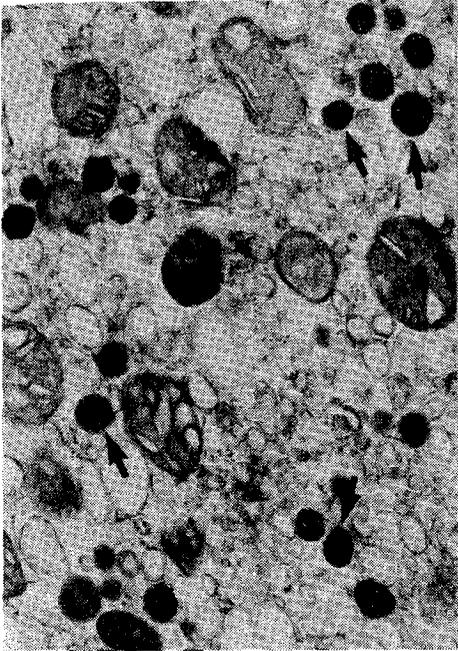


Fig.4. Electron micrograph of the cell fraction obtained after centrifugation at 11000 rpm. Dense granules (arrows) are abundant in this fraction. x 16,000

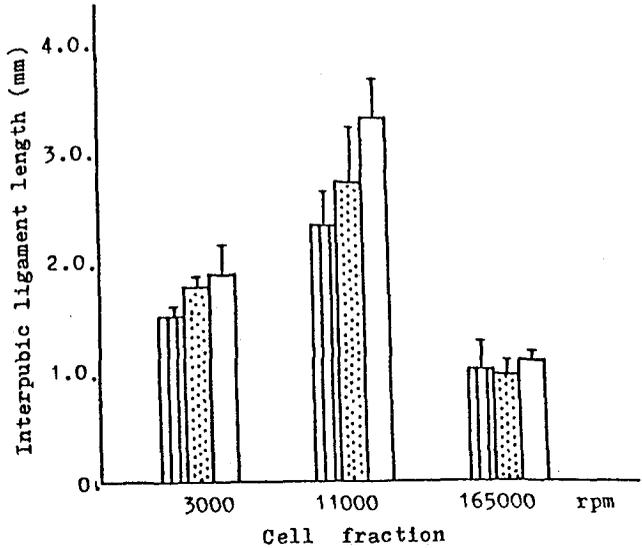


Fig.5. Biological activity of relaxin in luteal cell fractions of Day 20 pregnant rat.
 ▨ : 0.03125 mg of freeze-dried fraction
 ▩ : 0.0625 " "
 □ : 0.125 " "

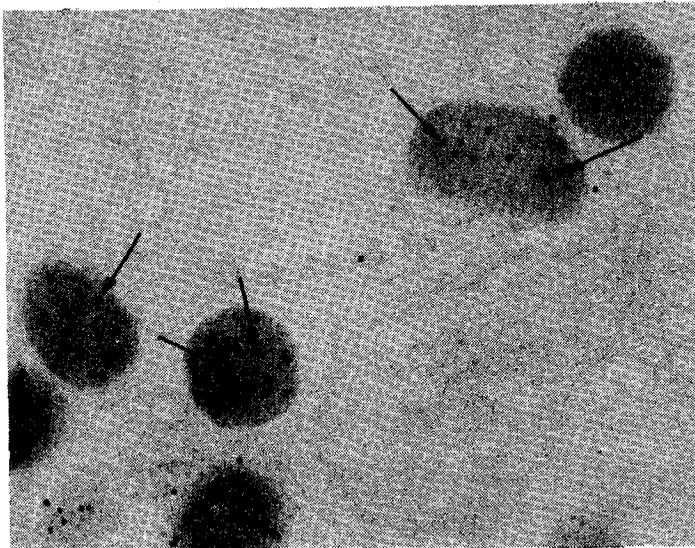


Fig.6. Ultrastructural localization of relaxin in a luteal cell of Day 20 pregnant rat. Protein A-gold immunocytochemical technique and anti-rat relaxin serum are used. The gold particles (arrows), indicative immunoactivity for relaxin, are labeled in the dense granules. x 59,000

Table 2. Density of gold particles showing immunoactivity for relaxin in various cellular organelles of luteal cells in Day 20 pregnant rat.

Organelle	No. of gold particles per organelle
Dense granules (Relaxin granules)	15.0 \pm 6.24
Immature granules	7.33 \pm 2.79
Golgi apparatus	2.96 \pm 2.24
Rough endoplasmic reticulum	-

(M \pm S.D.)

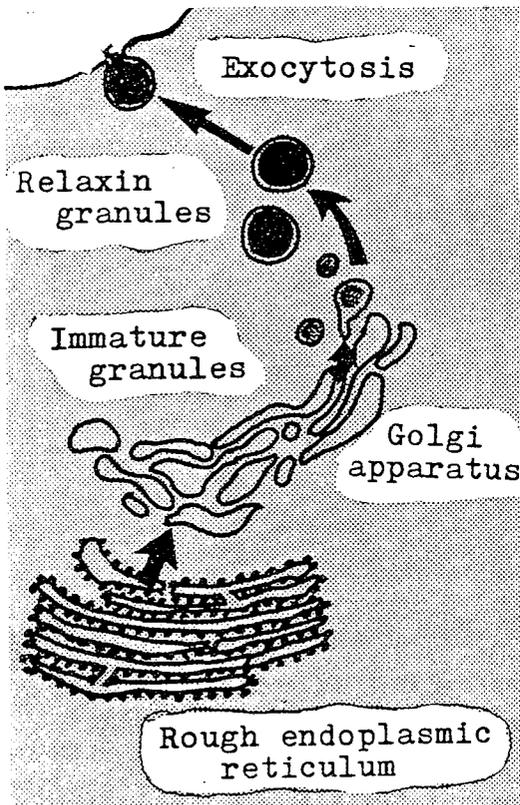


Fig.7. Diagram of luteal cells showing intracellular transport of relaxin granules.

Table 3. Morphometric changes of cell organelles in luteal cells of rats during pregnancy.

Organelles	Day of pregnancy					
	8	13	15	20	21	22
Relaxin granules	0*	0.24 ± 0.17	0.34 ± 0.22	4.85 ± 2.22	1.35 ± 0.84	0.74 ± 0.66
RER	0.68 ± 0.30	1.85 ± 1.49	1.90 ± 1.09	2.59 ± 1.40	1.33 ± 1.54	0.90 ± 0.68
Golgi apparatus	2.86 ± 0.97	2.96 ± 1.17	3.24 ± 0.99	5.23 ± 1.19	—	2.69 ± 2.12
Lysosomes	0.21 ± 0.17	0.34 ± 0.18	0.45 ± 0.17	1.19 ± 0.37	1.04 ± 0.44	1.09 ± 0.47
Lipid droplets	2.77 ± 1.85	2.14 ± 1.86	3.41 ± 3.03	2.83 ± 2.81	9.79 ± 5.30	17.2 ± 7.31

*Values are expressed as volume ratio of cytoplasmic percentage.

(M ± S.D.)

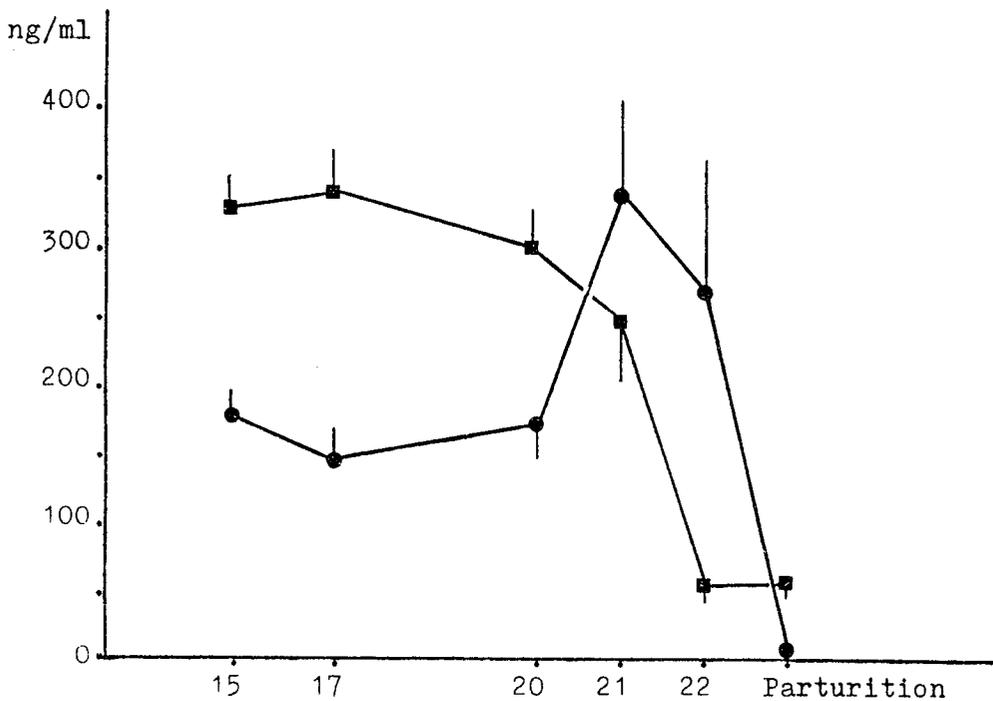


Fig.8. Changes in serum relaxin (●-●) and progesterone (■-■) levels during pregnancy in the rats.

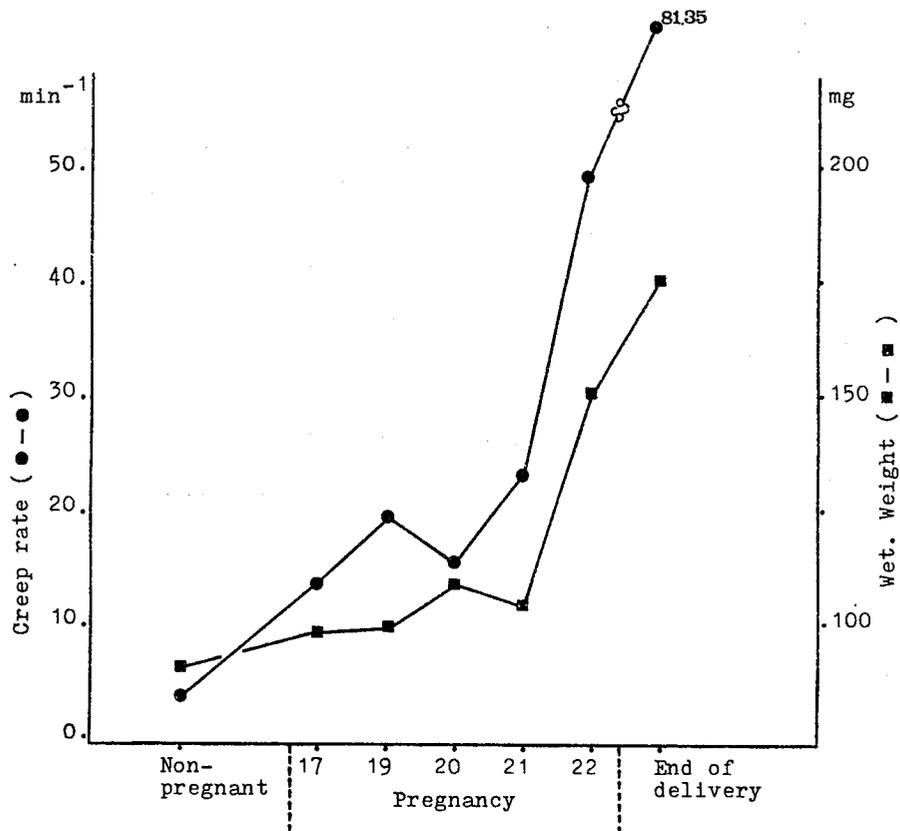


Fig.9. Physiological properties of cervix in the rats.

Table 4. Duration of delivery in ovariectomized rats treated with steroid hormone.

Treatments *	No.of rats	Duration of delivery (h)
P(4) + E(1)	20	5.0 ± 2.7
P(2) + E(0.5)	17	5.3 ± 2.8
P(2) + E(0.25)	9	6.1 ± 3.9
Normal	24	2.3 ± 0.7

*P; progesterone (mg), E; estradiol benzoate (µg) (M ± S.D.)

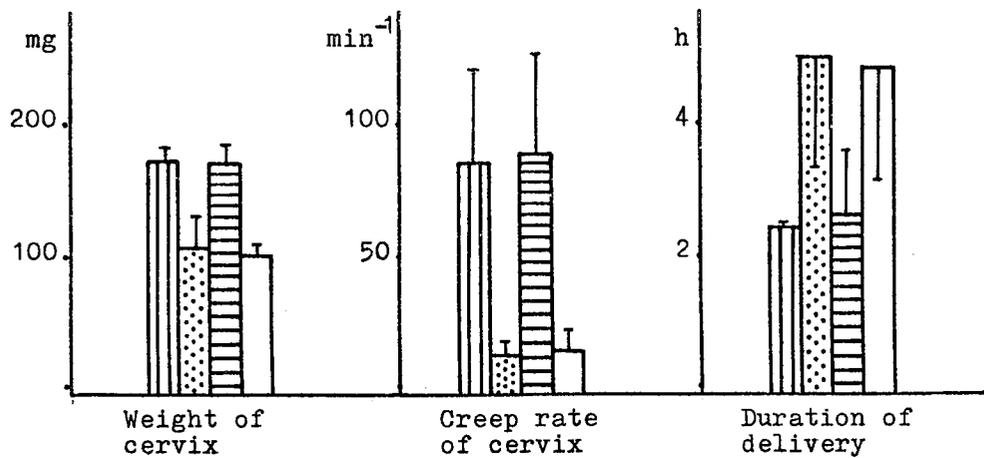


Fig.10. Effects of relaxin extracts on cervix and delivery.

- Group I (▨); intact
- Group II (▤); ovariectomy (OVE)
- Group III (▧); OVE + relaxin extracts
- Group IV (□); OVE + heated relaxin extracts

In Groups II,III and IV, all rats were ovariectomized at 09:00-13:00 h and injected s.c. with 4 mg progesterone plus 1 µg estradiol benzoate at 14:00 h on Day 19 of pregnancy. In Groups III and IV, 0.5 ml relaxin extracts, equivalent to 2.5 mg standard (rat relaxin) was injected s.c. at 8 h intervals from 18:00 h on Day 19 to 10:00 h on Day 21 of pregnancy.

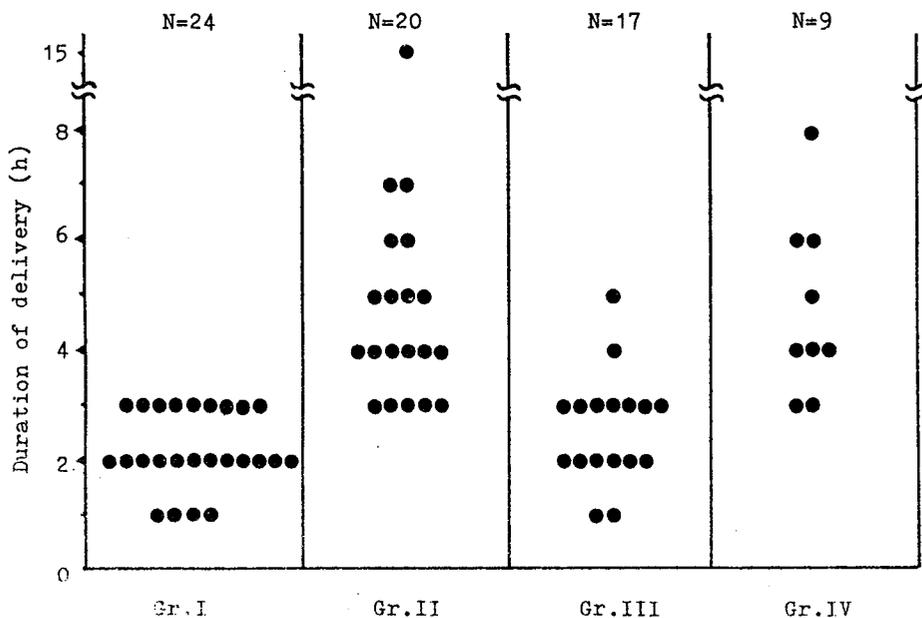


Fig.11. Distribution of duration of delivery.

- Group I ; Intact
- Group II ; Ovariectomy (Ove)
- Group III; Ove + relaxin extracts
- Group IV ; Ove + heat-treated relaxin extracts

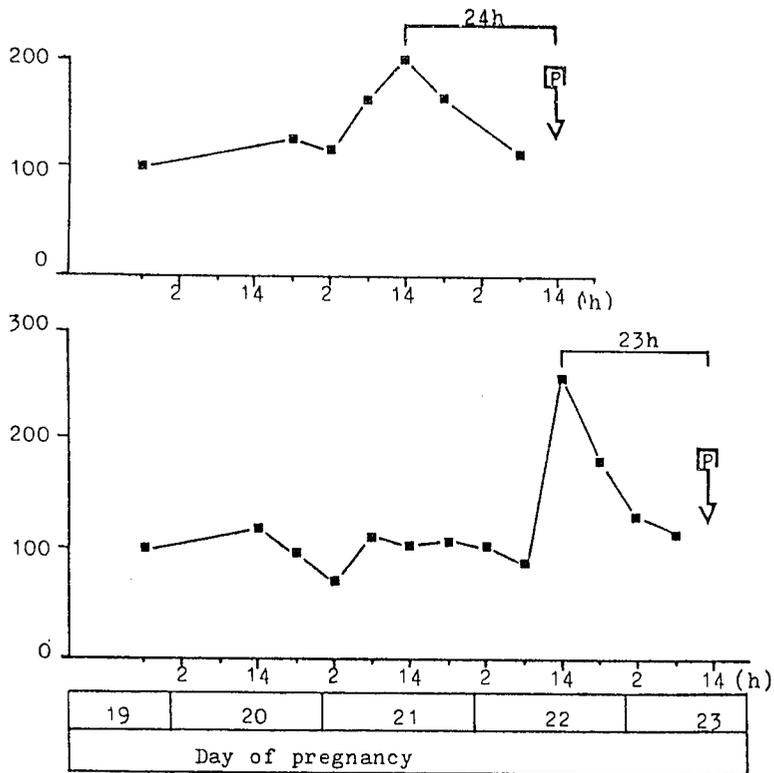


Fig.12. Successive changes in serum relaxin levels during late pregnancy in the rats. Sera were taken at 6 h intervals from 20:00 h on Day 19 of pregnancy to parturition via jugular vein. Serum relaxin levels at 20:00 h on Day 19 of pregnancy were expressed as 100%. P; parturition.

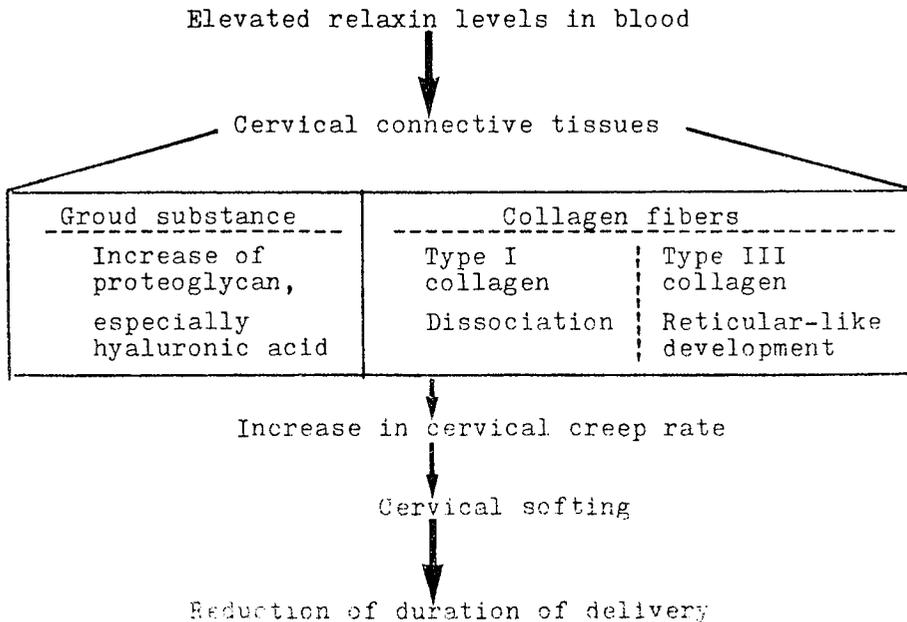


Fig.13. Diagram showing role of relaxin.

審 査 結 果 の 要 旨

リラキシンは哺乳動物の妊娠期に出現するペプチドホルモンで、モルモットなど恥骨じん帯を有する動物では分娩時にこれを弛緩させ、産道を広げる作用がある。一方、ラットなど恥骨じん帯を欠く動物でも、妊娠期の血清中に本物質の出現が認められているが、分泌部位や役割については、まだよく知られていない。

本研究はラットを用い、リラキシンの分泌源と動態および分娩時を中心としたリラキシンの生理作用について解明を試みた。

まず、マウス恥骨じん帯計測法により生物検定を行った結果、妊娠ラットでは卵巣以外の生殖器系諸器官には生物活性が見いだせなかった。また、卵巣内では黄体組織にのみ検出され、その活性は妊娠末期にピークに達することがわかった。性ステロイドの分泌細胞である黄体がリラキシンの分泌にも関与していることが明らかになったことから、黄体のリラキシン分泌様式についてしらべた。特に妊娠末期の黄体に増加する暗調顆粒についてリラキシンの免疫電顕的検出を行うとともに、リラキシンの形成と放出について免疫細胞化学的検索を行った。その結果、リラキシンは黄体細胞に出現する直径 200～300 nm の暗調顆粒に含まれること、およびその合成、放出は分泌蛋白の細胞内輸送系に基づくことが明らかになった。黄体細胞では妊娠20日以降、リラキシンの分泌活動が明らかになることがわかったので、分娩現象におけるリラキシンの関与をしらべた。その結果、妊娠末期における急激な血中リラキシン濃度の上昇に伴い、子宮頸管結合組織の構築が変化し、軟化が起こることが明らかになった。また、これにより胎児の娩出が容易になり、分娩所要時間が短縮され、さらに血中リラキシン値がピークに達したのち約24時間で分娩が開始されることがわかった。

以上、本研究はリラキシンがステロイドホルモン分泌組織として知られる黄体から分泌され、子宮頸管を軟化させることによって分娩現象、特に胎児の娩出に必須の役割を果たしていることを明らかにした。よって審査員一同、著者は農学博士の学位を授与するに値すると判定した。