Histological responses of the alternative or combined administrations of ACTH and GH to adrenal cortex

By

Tetsuo ITO

Dept. of Hist. and Embry. Tokyo Jikei-kai School of Med., Minato-ku, Tokyo

(Director : Prof. Fujio Yoshimura)

The hypophysectomized rats of Wistar strain receiving an operation in 60-90th postnatal day respectively were injected with ACTH and GH alternatively or in combination. The adrenal cortex of these animals was histologically examined in comparing it to that in control hypophysectomized rats and the results were as follows:

A decided conclusion was not obtained as to the changes in weight of adrenal cortex, since the number of experimental animals was small, and the value presented was complicated with the animal difference. But the organ body weight ratio shows that the adrenal gland surely decreases in weight by the hypophysectomy, but cannot be recovered from the reduction by means of the maintenance test of ACTH (2.5 mg/day for 7, 10 days) or GH (2 mg/day for 7 days), and of the repair test of ACTH (the same dose for 5 days) or ACTH and GH in combination (the same dose for 5 days), begun from the 6th day after the removal. Therefore ACTH and GH would be ineffective to allow the animals to recover the loss of organ weight, so far as this administration method is concerned.

However, it was informed in present research that the hormones are able to modify the histological changes induced by the hypophysectomy. The control hypophysectomized rats (7th day) provided the partially broadened zona glomerulosa in which the cells containing a lot of fat granules arrange fascicularly without a formation of glomerulum. The transitional zone became thicker, representing a layer of the package of nuclei. The cell-strands in zona fasciculata were irregular in general, slender, anastomosed one another and atrophic in some degree. Their cell-bodies were submitted to be rich in fat granules instead of proteinic stainable granules. The cortex cells at the vicinity of medulla surrounded by the multiplied connective tissue were usually flat in shape. The finding in the 10th day after the removal resembled in many respects that of the 7th day, but tended to be shown as the more pronounced changes. When the hypophysectomized rats were administered for 7-10 days with ACTH, the zonation of adrenal cortex was precisely altered, although the whole thickness of it was not recovered. The elongation of cell fascicules in zona fasciculata presses the zona glomerulosa on the capsule. The disappearance of the transitional zone resulted in the mutual transformation between atrophic zona glomerulosa and broad zona fasciculata, where the former no longer consisted of independent glomeruli. The superficial area of adrenal cortex was scanty of fat granules, whereas full of stainable granules (stained with iron-hematoxylin). Despite the atrophic pattern and irregularity of fasciculata cell-strands was not restituted by the administration of ACTH, it was fairly demonstrated that the gross fused fat droplets decreased in number within the cell-bodies, in addition the stainable granules increased. This fact may show that the improvement in the internal cell structure fellow the replacement therapy. Also the connective tissue near the medulla became thoroughly indistinct. As above mentioned, ACTH is expected to have the sweeping

ability of some obstacles in intracellular hormone synthesis by the hypophysectomy, and at least the changes by ACTH was akin, beyond the recovery, to the pattern of elevation in function of cortical cells, as is seen in intact rats exposed by the stressful stimuli.

The repair test by ACTH showed the same improvement as by its maintenance test. Of course, the betterment may be restricted to zonation and cell internal structures in connection with the metabolic amelioration, but was not involved in the hyperplasia of cortical cells.

In the event of repeated injections of GH for 7 days (maintenance test) to the hypophysectomized rats, the symptom of the ablation is almost irrecoverable. The changes is not utterly reconcile with the findings of hypophysectomized untreated group, but usually provides the fascicular arrangement of zona glomerulosa whose superficial cells underlying the capsule are packed with the stainable granules, and whose profound areas contain numerous fat granules. Also GH administration alone could deprive of the connective tissue layer surrounding the medulla. Therefore it is enough to allow for us to make an assumption in the present cytological observation that the administration of GH alone is not always ineffective to the adrenal cortex, but engage in a certain stimulative actions.

The repeated injections of ACTH and GH in combination for 5 days (repair test) to the hypophysectomized rats made the remarkable improvement in the ablation symptom in the following respects: The hypertrophic action of zona glomerulosa was strongly inhibited; the cell-strands of zona fasciculata extend themselves to the capsule, beneath which is sometimes seen the immature glomerulum, where the constituent cells were full of stainable granules instead of fat droplets; the deprivation of transitional zone resulted in the natural transformation of zona glomerulosa downwards up to zona fasciculata with the subsequent formation of the continuous elongated cell-strands. Despite the arrangement of fasciculata cell and the atrophic patterns were not sufficiently recovered so much as by ACTH administration, it was a commonly characteristic to this event that the abundant stainable granules was associated with a lot of fat granules of the corresponding size within fasciculata cells, showing the excitable but stabilized pattern regarding the cellular metabolism. The combined administration may have an important links with the co-operated action to the adrenal cortex on reasons that the cell degeneration or disintegration near the medulla is most effectively sustained.

In summarized, we can furnish an information that, although the combined administration of ACTH and GH is unable to inhibit the reduction in cell number and volume, it may conduct to improve harmoniously the disfunction reflected to the cell distribution and internal structure, and rather put the cortex cells into a hyperfunctional state.

Experimental Studies on the Influence of Endocrine Functions upon the Erythrocyte Respiration

By

Toshio MIGHASHI

Department of Medicine, Kyoto Pref. Univ. of Med. (Director: Prof. S. Tateishi, M.D.)

The author investigated the erythrocyte respiration in left ventricle blood of endocrine eviscerated rabbit and the effect of different hormone upon it. Oxygen consumption was measured by means of the direct Warburg's method, and coefficient of respiration was calculated.

ACTH, GH 単独及び同時投与による副腎 皮質の組織学的反応態度

東京慈恵会医科大学組織学教室 (主任: 吉村不二夫教授)

伊 東 鐵 男

緒 言

ACTH の検定には下垂体摘出動物を用いて副腎アスコルビン酸の回復度を指標として行う方法がある。この検定法は Sayers, Sayers and Woodbury (1948) によつて行われて以来最も信頼すべき敏感な反応として一般に広く採用されている。既に充分明かな如く, ACTH は下垂体摘出動物のアスコルビン酸値を十分に回復させるに足りる力価をもっているのであるが, 副腎の大きさや構造上の変化を回復させる力価は顕著ではない。形態像を中心に判定する場合には, 下垂体摘出後一定の期間を経て ACTH を投与するいわゆる repair test でも, 又術後ただちに ACTH を連続的に反復投与するいわゆる maintenance test でも何れも反応度を数的に適確につかみ得ない点が欠点とされている。我々の教室でも ACTH の副腎皮質細胞に対する作用方式が細胞学的に検討されたが, 横須賀 (1959) は前掲の論文に於いて, ACTH は下垂体摘出ラットの副腎重量を回復させないにも拘らず, 細胞の内部構造及び細胞配列に於いては強く摘出症状を回復させるどころか, 反つて細胞が積極的に活動する事実を指摘した。

さて, Selye (1951, 1950) は副腎皮質が ACTH 以外の trophic hormone によつても同時に支配されていると考え, mineralocorticotrophin の存在を推定した。それは GH 投与による諸臓器の組織学的所見が, DCA 大量投与による所見と類似している事, 及び GH は副腎皮質を肥大させ, 且つ DCA 投与によつて起る副腎皮質球状層の萎縮を防止する事から, GH が球状層を刺激し mineralocorticoid を分泌させると共に, 組織の電解質代謝感受性を亢めると見做したことに基づいている。然し後に至つて (1950), 彼自身下垂体摘出所見が GH 投与によつて回復しないことから自説を訂正したことは周知の通りである。Stein 等 (1952) は副腎摘出ラットに GH を投与したが, 副腎の在, 不在が GH の生長促進作用の発現に対しては無関係であることを明かにし, 球状層が GH の target organ であるとは見做さんとせる説には反対した。Simpson 等 (1949) は下垂体摘出ラットに長期 GH を投与した場合, ほんの僅かな肥大を示すに過ぎないことから, GH の副腎皮質に対する直接作用は殆ど取るに足らないことを主張した。

さて, 最近 Deane 等 (1948) の副腎皮質 2 元論に対する反論が多数現われ (吉村の総説, 1959 参照), 球状層が下垂体の支配を離れた独立の層ではなく, やはり ACTH によつて調節されている層であることが明かにされた。Wexler と Rinfret 等 (1955) は 1 v.s.p. 以下又は以上の ACTH を下垂体摘出ラットにゲラチン溶液として投与して反応態度をしらべたところ, 以下の量では球状層の脂肪顆粒が消失するが, 以上の量では殆ど消失しないことを認め, Venning 等 (1956) はヒトで ACTH が aldosterone 分泌を少し亢めることを報告し, Lever (1956) は Na/K ratio を低下させる外的要因が加わつたり ACTH が投与されたラットの副腎球状層の変化を電子顕微鏡によつて検討し, mitochondria の osmiophilia, 脂肪顆粒, Golgi 装置の状態が両者の条件で極めてよく似ていることから, ACTH が電解質代謝ホルモン形成に対する刺激効果があることを推定したのである。その後, ACTH が示す球状層又は aldosterone 分泌に対する調節作用は Muller 等 (1956), Kovacs 等 (1957), Nagy 等 (1957), Maclean 等 (1957) によつても盛んに主張され, 今日では 2 元論に対しても尚多くの支持者があるに拘らず, aldosterone 分泌に関しては球状層細胞の主要な役割を重視しながらも, ACTH は皮質全層の glucocorticoid 及び mineralocorticoid の双方を同時に調節しているとの考えが抬頭するに至つた。然るに, ACTH と GH との副腎皮質に対する協同的效果につ

いては文献の上では当然予測できたにも拘らず、この課題が実際に確められたのは極く最近になつてからであり、漸く Rosenfeld 等 (1956) が分離した牛の副腎皮質を用い、その medium の中に GH, ACTH を混入させ、perfusion technique で aldosterone 分泌に検討を加えた。その結果 GH 単独では Na retaining activity には何等著明な影響がなかつたが、ACTH を加えると明かな影響がみられた。Giroud 等 (1956) もラットの副腎を in vitro で incubate し、GH 単独では Na retaining activity には全く変化が起らないが、ACTH はそれ自身でも軽度ではあるが確実な aldosterone 分泌を増加せしめる作用のあることを指摘した。一方 Bois と Selye (1957) は GH と thyroxine, ACTH と thyroxine との同時注射がラット副腎を非常に肥大させることに注意し、Lostroh と Woodward (1958), Lostroh (1958) は下垂体摘出ラットに α -corticotrophin と GH とを単独及び同時注射 (術後20日) したところ、同時注射が最も著明に回復したと述べた。又摘出後5日のラットを用いて、4日間の注射実験を行い、その回復過程を検討し、同じ結論に達している。

私の今回行つた実験は上の Lostroh の研究に刺激されて行われたものであるが、教室の横須賀 (1959) が報告した ACTH の副腎皮質細胞に対する作用方式に関する知見と比較しながら、GH と ACTH との協調的作用を細胞学的に検討し、ACTH 単独投与との間に質的差異を求めようとしたのである。

実験方法

当教室で行つている一定の飼育環境で自家繁殖せしめた Wistar 系雄性成熟ラット (生後60~90日) を使用した。第1群は下垂体摘出群で、摘出後7日目 (4例)、10日目 (3例) のものである。第2群は下垂体摘出後 ACTH 2.5mg/日単独投与群で、下垂体摘出後の翌日より7日間投与 (2例)、10日間投与 (2例) したものと (maintenance test)、下垂体摘出後6日目より5日間投与 (3例) したものである (repair test)。第3群は下垂体摘出後 GH 1mg/日単独投与群で、下垂体摘出の翌日より7日間投与 (6例) した。第4群は下垂体摘出後6日目より ACTH 2.5mg/日 と GH 2mg/日 とを5日間同時投与 (4例) したものである (repair test)。

動物は何れも18~22°Cの恒温室内に飼育し、出来得る限り外部的ストレスが加わらぬ様に注意した。食餌は教室所定の混合食 (ふすま6、こめか6、細麦2、魚粉1) である。用いたホルモンは Armour の ACTHAR (Lot No. R. 68305, P. 46203), Armour の SOMAR-A (Lot No. R. 285128, R. 50109) である。ACTH, GH は水溶液で1日1回背部皮下注射を行つたのであるが、その持続効果は充分とは云えない。理想的には perfusion 又は suspension の形で行うべきでその点今後の研究でやり直したいと思つている。又今回用いたホルモンの1回投与量も少々多すぎたきらいがある。Lostroh (1958) は ACTH も GH も suspension の形で 0.050~0.250 mg/rat 与えている。1単位以上と以下では或る程度反応態度が異なると云う意見 (Wexler, Rinfret 等 (1955)) もある。又2単位/日4日、1単位/日11日間では corticosteroid 生産は正常ラットに於いて促進されないが、16~54単位では36時間以内に急激に増加することも知られているが (Holzbauer と Vogt (1957)), 私は今回は 2.5mg/日 で注射を施行した。

所見

重量変化:

使用した動物の体重及び副腎重量の変化は表1に示す通りであるが、例数の僅少或は動物の個体差がからみ合つて実験値と予想される理論値と大分異なつている。

第1群の下垂体摘出群では諸家の述べる如く副腎重量は下垂体欠落により減少している。第2群の下垂体摘出 ACTH 投与群では7日間投与と10日間投与とでは後者の方が副腎重量は大で、ACTH の効果とも考えられるが、その真偽のほどは明瞭でない。又下垂体摘出後6日目より ACTH を5日間投与したものであるが、実験値から見れば、副腎重量の増加は殆んどなく第1群の下垂体摘出7及び10日目のものと変りない。第3

Table 1. Effect of ACTH and GH on the adrenal organ weight of hypophysectomized rats.

Groups	No. of rat	Days after hypophysectomy	Administration	Daily dose (mg)	Injection periods (days)	Body weight (gm)	Adrenal weight (mg)	Organ B.W. ratio	Average
I	4	7	none			a. 127	24	0.018	0.0145
						b. 108	17	0.015	
						c. 127	17	0.013	
						d. 120	15	0.012	
	3	10	none			a. 120	17	0.014	0.0143
						b. 123	18	0.014	
						c. 118	18	0.015	
II	2	7	ACTH	2.5	7	a. 140	24	0.017	0.0165
						b. 85	14	0.016	
	2	10	ACTH	2.5	10	a. 110	24	0.021	0.0200
						b. 118	23	0.019	
	3	10	ACTH	2.5	5	a. 115	18	0.015	0.0140
						b. 115	14	0.011	
III	6	7	GH	1	7	c. 95	16	0.016	0.0136
						a. 120	20	0.016	
						b. 130	17	0.013	
						c. 130	18	0.013	
						d. 115	15	0.013	
						e. 118	24	0.011	
IV	4	10	ACTH GH	2.5 2	5	f. 108	18	0.016	0.0125
						a. 150	27	0.018	
						b. 128	15	0.011	
						c. 135	14	0.010	
						d. 135	16	0.011	

群の GH 投与群でも副腎重量の増加はなく、第 4 群の ACTH と GH との同時投与群でも副腎重量の増加は全くないのである。即ち重量的關係から總体的に眺めれば、ACTH を下垂体摘出後翌日より長期にわたり持続的に投与したならば或は重量の回復が或る程度起つて来ことも可能の様に思われる。然るに一定期間を置いた後に投与した場合では、GH は勿論、ACTH でも副腎重量の回復は殆ど認められなかつた。

組織学的所見：

1) 下垂体摘出群：

下垂体摘出ラットの副腎皮質の組織像については既に横須賀 (1958) が発表した。今回の観察も大体に於いてそれと一致した。術後 7 日群では球状層は幅をましている (図 1)。しかし 10 日以後のものと比較すれば未だそんなに厚くはなく、正常ラットのそれに近い場所に残っている。球状層には豊富な脂肪顆粒が充満し、Zona spongiosa の觀を呈している (図 2)。下垂体摘出後 10 日以上経過の如く、球状層はまだ典型的な束状配列を示すことはないが、その傾向が多少とも現われて来る。可溶性顆粒は少いので、この点で球状層とそれ以下の層とが明瞭に区別される。被膜下には幼若な皮質細胞は見られず一様に成熟度の進んだ細

胞ばかりである。移行層は幅を増し、核の密集帯となり、配列は全く不規則で、細胞の境界は不明瞭であつて(図1, 2), もはや正常雄対照ラットに見られるが如き扁平な細胞ではないようである。胞体には常に脂肪顆粒を有しないか、或はあつても少く、その代り多くの可染性顆粒を含んでおり、著しく暗調である。束状層では細胞の配列は乱れて、その細胞索は細く、束状配列は不完全となり互に吻合している。細胞は多少とも萎縮性となり、境界は明瞭を欠いている(図3)。胞体内には脂肪顆粒が豊富に存在するが、一方可染性顆粒は少ない。脂肪顆粒の大きさは球状層におけるそれより小さく、又大小不均等である。核には染色性顆粒が多く、又濃縮に陥ることもある。取り立てて網状層と云える場所はなく、束状層全体がある意味では網状配列をしていると云えないことはない。髄質近くでは細胞は扁平となり、周辺に結合組織の増生が見られる。

下垂体摘出10日後の副腎皮質は7日後の所見と略々等しく、唯上記摘出症状が除々に増強されて行く、即ち7日例では球状層の肥大も部分的で全面的ではなかつたが、10日群では確実に全体が厚くなり、而も糸球形成と云うよりは寧ろ細胞は柱状配列を呈する場合が多い(図4)。然し細胞の境界は正常ラットと同様に不鮮明であつて胞体は粗大な脂肪顆粒で充満される。7日例ではまだ浅層に比較的小さい脂肪顆粒が出現している部分があつたが、10日目では凡て粗大な脂肪顆粒ばかりになつている。10日後では束状層全体の厚さは未だ7日後に比してそんなに薄くなつていゝとは思われない(図1と4とを比較せよ)。しかし束状層を強拡大でよく見ると細胞索は大いに乱れ、束状配列は極めて不確かで網状を呈している。細胞間に結合組織が増生して来ることも、細胞の萎縮と平行する退縮現象を意味するものであり、又個々の細胞の形は極めて不規則であり、その内に豊富な脂肪顆粒のほか可染性顆粒も現われて来る。束状層深部では細胞の配列は更に乱れ、萎縮の程度も強くなり(図6)、胞体内の脂肪顆粒も癒合して巨大脂肪小滴となり、同時に可染性顆粒も又粗大化している。髄質との境界では細胞質が崩壊し、或は縮小して原形質は崩壊し殆んど核だけになつてゐる細胞がある(図1)。結合組織の増生は著じるしいが、これは萎縮或は崩壊によつて生じた空間を補充するための反応であらうと思われる。

2) 下垂体摘出 ACTH 単独投与群:

下垂体摘出後翌日より ACTH 2.5mg/日を7日間連続投与した場合 (maintenance test) には、図1, 図7とを比較するとわかる様に、皮質そのものの厚さはそれ程回復していない。しかし球状層はこんどは薄くなつており、被膜の方に圧迫されて僅かに存在するに過ぎないことが理解される。この状態は正常ラットの球状層の厚さ以下である。而も図1では粗大な脂肪顆粒が充満し明調であるが、図7では暗調を呈している。ここを強拡大にて見ると(図8)、球状層はもはや言葉の示す如き糸球の形成はなく、束状を示す細胞索が上方に登つている。中には被膜直下で反転して dome を形成していることもある。細胞には豊富な可染性顆粒と mitochondria が充満するが、脂肪顆粒は極めて乏しく、深層に僅かにみとめられるに過ぎない。移行層はもはや殆ど存在しない。束状層と球状層とが一続きに連なっているからである(図8)。束状層では細胞の束状配列はみられず、やはり下垂体摘出群と同様不規則な配列を示し、又個々の細胞も萎縮性であり、細胞の境界がわかりにくい。しかし反面胞体内には可染性顆粒が多数出現しており、脂肪顆粒は少ない。下垂体摘出によつて細胞が萎縮性変化に陥るが、これは ACTH の投与によつて防止することは出来ないけれども、細胞の内部構造は或る程度積極化することは明かである。例えば可染性顆粒が増加することは動物がストレスに曝された場合に常に起り得る所見であり、又移行層の消失、球状層の縮小並びに束状配列の出現等は何れも副腎皮質に於ける機能亢進像を示すものである(Yoshimura 1954 参照)。髄質の近くに現われた結合組織の増生も ACTH の投与によつて消失することもその理由の一つである。

ACTH 2.5mg/日を10日間投与した場合では球状層の圧迫縮小は7日群より更に大となる(図9)。しかし束状層の幅は前と同様にせまく、殆ど回復していない。又移行層は全く消失し、束状層の細胞索はそのまま上方に向ひ被膜まで達し皮質表面は束状に配列する傾向が強く、時にいわゆる Zona arcuata の形態を呈することもある。従つてもはや何処が球状層になつてゐるかが不明であつて、このことはストレスに曝露された時に現われる副腎皮質の機能亢進像と似てゐるのである。束状層の萎縮、短縮は10日間の注射によつて

尚改善されはしていないけれども、束状層細胞には可染性顆粒が前と同様に多く、やはりこれも代謝面では副腎皮質の積極性を物語る。10日間投与群では束状層の深層或は髓質の近くでも、細胞内に殆ど粗大な脂肪顆粒が現われないで、小さい弱染性顆粒で満されている。又束状層及び網状層では類洞腔は拡張し充血している。又髓質近くの結合組織の増生も非常に少くなっている(図11)。以上の所見は何れも、ACTHが萎縮に陥った細胞をfullに回転して幾分なりとも分泌機能を履行させていることを意味する像ではないかと考えられる。

次に下垂体摘出後6日を経たからACTHを5日間投与した場合(repair test)では、術後長い間隔をおいたにも拘わらず下垂体摘出の症状は大いに軽減され、やはり球状層は下垂体摘出群の様に厚くはなく、若干とも回復の徴候を示し、幅を狭めていた(図12)。移行層は一度肥大したものが再び消失している。そして前と同様束状層と球状層とは一続きになつている。図12と図9とを比較しても、束状層が暗調を呈している程度が強い以外は殆ど同じ所見であつて、ACTHの完全な欠落状態が6日間を経過して出てもこの量のACTHによつて充分によく回復させ得ることがわかる。球状層を強拡大でみると、maintenance testの場合の様に細長い束状を呈することはなく、かなり太い細胞索を形成する。又repair testでは細胞に強染性顆粒を極めて豊富に充満させることが特徴で(図13)、やはりそこには脂肪顆粒が少いのである。次に束状層細胞の配列の乱れはよく修復され maintenance test よりも寧ろ repair testの方がやや美しい配列を示している。個々の細胞はそれにも拘らずやはり萎縮しており、依然として正常群の如き飽満な原形質を持たない。それ等の胞体内には可染顆粒が密に存在する。束状層の表層では脂肪顆粒が豊富であるが、深層では次第に減少して可染性顆粒に取つて代る。しかし完全に消失することはないかなり残つている。このことが maintenance test と異なる点である。束状層深層ではやはり充血像があり、髓質の近くに出現していた結合組織の増生が起らない。これらの事柄はやはり外因的に与えられたACTHによつて副腎皮質は自己の細胞を積極的に働かせホルモンの合成を行つているかの如き像であり、maintenance test ほどではないにしても、ACTHが代謝面において極めて有効に作用したことを物語つていようである。

3) 下垂体摘出、GH単独投与群:

下垂体摘出後翌日よりGH1mg/日7日間連続投与したものでは図15に示す如くやはり下垂体摘出の症状はよく回復しない。皮質全層の厚さは依然として薄いことはACTH投与と同じである。ACTHとGHとの単独投与を比較すると、その副腎に対する作用は大いに異なっている。先づ第1に球状層の厚さは下垂体摘出のレベルと殆ど同じであることである。下垂体摘出時にそうであつた如く球状層の細胞は束状に配列し、被膜に直接達し或はここで反転していわゆるZona arcuataを形成することがある。唯下垂体摘出時と異なる点は、被膜に近い球状層細胞では可染性顆粒が密集する傾向が強く、球状層の深層では脂肪顆粒が豊富である(図16)。しかし場所的に脂肪顆粒が球状層の表層から深層に至るまで充満することもあり、更に脂肪顆粒と可染性顆粒との分布の比率には個体差があるので、GH注射による固有の変化だとは云い切れない。第2に移行層が消失しないことである(図15, 16)。下垂体摘出時と同じ様に核が密集して横に連なっている帯として認められる。この細胞の境界は不明瞭であるが核の割に細胞の胞体は小さく一定の区劃内に互にひしめき合つていような感じをうけ、胞体は何れも強染性の微細な顆粒と、mitochondriaを入れるが、脂肪顆粒も時折含んでいることが明かである(図16)。第3は束状層細胞に脂肪顆粒がやはり大分残つているが、そのほかに可染性顆粒が現われていることである(図16)。束状層は下垂体摘出時にみられた配列の乱れ萎縮等は完全に残つており、ACTHと同様GHも萎縮性変化を回復することはできない。又個々の細胞の内部構造ではACTHの様に可染性顆粒を増加させることは不能で、とくに束状層の表層ではZona spongiosaの如く粗大な脂肪顆粒が胞体を満しているのである。第4に髓質の近くではACTH投与時とは異なり細胞の崩壊、退縮がみられるが、反面結合組織の増生はACTHと同じく消失している(図17)。又充血像も殆どない。以上の所見からも、GH単独投与はACTHの如く皮質細胞に、或る程度積極的に作用し、やはり代謝面で恐らくごく軽度の改善をもたらすものであるが、その程度は問題にならぬ程後者に劣り、とくに球状層、移行層を狭ばめ又消失させる力はない。さりとて、下垂体摘出症状と全然同じであるかと云う

とそうではなく、或る程度改善させることは確かである。これは GH が多少の ACTH を contaminate しているか、或いは GH 自身に多少は向副腎皮質作用があるか何れかである。

4) 下垂体摘出、ACTH と GH の同時投与群：

下垂体摘出後 6 日目より ACTH 2.5mg/日 及び GH2mg/日 とを 5 日間にわたり連続的に同時に投与した群では図18に示す如く摘出症状の著しい改善がある。図12に示す如く ACTH 2.5mg/日 の repair test に於ける所見と比較すれば次の点に於いて異なる。第1は球状層の肥大を阻止する力はずっと強く、被膜に近く圧迫されている球状層は細い而も短い束状配列を示すことが特徴であり、胞体内には可染性顆粒が充満し、球状層の深層にも全く脂肪顆粒はみとめられない(図19, 20)。然し標本の様々の場所を捜すと、正常ラットにみられる様な糸球形成が多少見られ、共通の被膜でつまれた境界不明の細胞集団が見えて来る。尚又被膜直下には幼若な孤立性皮質細胞が出現し、これが2〜3個の小集団をなしていることがある。その様な幼若細胞には可染性顆粒が充満するが、脂肪の合成は殆ど行われていない。可染性顆粒は浅層に至るほど増加する傾向が明らかである。第2に束状層と球状層との続き具合であるが、勿論移行層は ACTH 単独投与時の如く完全に消失しており、両層はじかに相接している。図19に見られる如く両層の細胞索は非断続的で両者の自然的移行がある。そして何処から何処までが球状層かわからない。第3に束状層細胞の配列であるが、ACTH と GH との投与によつてずっと美しい束状配列を示す様になる(図19と図13とを比較せよ)。配列の乱れは束状層の深層は勿論のこと表層部に於いても殆んどなく、よく回復している。然し正常ラットのそれと比較すればやはり完全には元に戻ることは出来ない。束状層の幅もやはり正常レベルには戻らないのである。第4に束状層細胞の内部構造であるが、ACTH 投与と同じように脂肪顆粒は減つており、可染顆粒が多数存在するために暗く見える。然し GH と ACTH との同時注射は ACTH 単独投与よりも小さい脂肪顆粒を増加させていることは明かである。下垂体摘出時に於ける粗大脂肪顆粒や癒合した不正形の大きな脂肪顆粒はなく、何れも均等に小さい脂肪顆粒である。このことはやはり活発なる活動を物語るものではあるが、ストレス曝露時に見られた如き急激なホルモン合成と放出とを必要とするわけではなく、合成されたホルモン物質を脂肪顆粒として胞体内に貯蔵する比較的安定せる合成能として回復している如く思われる。類洞腔が拡張していたり、髓質近くの細胞の崩壊、萎縮等も軽度であることも(図21)たしかに GH と ACTH の協調的作用が存在することを示す。髓質近くに現われる結合組織の増生も殆んどない。斯くの如く阻止の程度は GH, ACTH の同時投与が最も強いのである。

考 察

生長ホルモン(GH)は現在の段階では純粋な結晶型で単離することが出来ず、ACTH, TSH 等を少量ながら含有していると云われている。事実今回、私が用いた GH は 1mg 中に 0.01 i.u. の ACTH を含むのである。従つて純粋な GH の副腎に対する作用をたしかめることには尚幾多の困難が残されている。GH は幼若動物の生長促進作用のあることは勿論であるが、成熟動物と雖も、生理的條件の範囲で各細胞の増殖と大いに関係がある。特に内分泌腺に於いては絶えず細胞の新生と退化とが繰返えされるわけであるから(吉村 1955 参照)、GH が此の現象に直接間接関係していることは想像出来ることである。まして副腎皮質では被膜で新生された細胞が徐々に深層に移動し、網状層で細胞が死滅する一定の生活史を営むことを推定する細胞移動学説(エスカレーター説)もある位であるから、GH が何等かの関係を有することが相当に強く考えられるのである。今回の観察によれば GH は下垂体摘出による副腎重量の減少を回復させることが出来ず、組織学的にも球状層と移行層との増大を回復させることは出来ず、又 ACTH の如く束状層細胞に可染性顆粒を増加させて、恰もストレスに曝された動物のそれに近づかせることもない。摘出時と同様細胞内には脂肪顆粒が多いのであり、放出は促進されない。

次に ACTH には下垂体摘出ラットの副腎重量を回復させる力とアスコルビン酸の低下を回復させる力とが区別され、両者は完全に異質的であることが報告された(Stack-Dunne 1953, Stack-Dunne と Young 1951)。Dixon 等(1951)も ACTH に ascorbic acid depleting factor と weight factor との2つを区別した。彼

等によれば weight factor は下垂体摘出後 1~2 週間を経てから 3 日間注射することによつて効力が判定される。而もその時アスコルビン酸の activity は極めて低いのである。この weight factor が如何なるものであるか、或は GH と関係があるか否かは確かなことはわからない。ACTH (3mg) を正常ラットに注射すれば、被膜細胞から皮質細胞への転化が促進され球状層に於ける mitosis を起させることを Baker (1952) は指摘しているが、之等は何れも weight factor と関係がある。Young (1951) は weight factor が GH そのものではないかと疑っている程である。Stack-Dunne と Young (1951) によれば牛の下垂体粗製エキス 180mg, 純化された GH 22mg は Sayers の test には弱く而も副腎重量は 9mg から 12~15mg まで肥大させることが出来たと報告した。

今回の 2.5mg/日 5~7 日間の注射による ACTH 実験ではやはり重量増加には成功しなかつたし、又 GH+ACTH でもやはり顕著な回復はみられなかつた。このことは注射量及び投与方法に欠陥があり、とくに depo-form の ACTH の注射を必要とし、この点あらためて実験を追加する必要があると思う。然し ACTH 単独投与によつて、組織学的にはかなり細胞の活動力は回復し、寧ろ個々の細胞の内部構造及び球状層に関する限りストレスに曝された如き状態になつたのである。細胞の減少と萎縮とは回復させることは出来ないにも拘らず、その限られた細胞の分泌サイクルを full に回転している様に思ふ。GH+ACTH 同時投与によつて生ずる回復力はやはり最高であり、球状層の縮少、被膜細胞から皮質細胞への転化促進、束状層細胞の配列のより見事な修復、束状層細胞に於ける大きさの一定した脂肪顆粒と可染顆粒との釣合つた同時的出現等が見られたのであり、この点 GH が ACTH の副腎皮質に対する回復作用に協調的に働いていることを示す原因である。

最後に私の所見と Lostroh と Woodward (1958) の記載とを比較する。Lostroh は下垂体摘出 13 日のマウスに 0.02~0.05mg/日 α -ACTH を 7 日間注射したところ、束状層は回復し、球状層には脂肪顆粒が出現し、0.1mg の注射では副腎重量は 100% 回復したと述べた。GH 0.1mg の同日数では下垂体摘出群と大体同じ所見であつたが、GH+ACTH では ACTH 単独よりも副腎重量はよく回復した。即ち対照 1.9 ± 0.1 mg が α -ACTH 単独では 4.2 ± 0.2 mg, GH 単独では 5.1 ± 0.2 mg, ACTH と GH との同時では 7.0 ± 0.3 mg であつた。一方 Sudan Black B の染色の上でも球状層及び束状層のリポイド量は α -ACTH よりも GH+ α -ACTH が著明であり、GH 単独は殆ど陰性であり、即ち GH は代謝面では促進させないことを示している。Lostroh の報告は以上の通にである。これ等の知見は私の得た組織学的所見とは全面的に一致しない。然し変化の方向は一致している。副腎重量の回復は私の実験では全く見られなかつたことは前に言及した通りである。然し GH+ACTH の回復に対する協調的作用は彼等と同じように、之を認める立場に立たざるを得ない。

今回の実験には幾多の不備があり、これを補う実験を目下続行中であり、追つて発表する予定である。

総 括

Wistar 系雄性成熟ラット (生後 60~90 日) の下垂体を摘出し、その後 ACTH と GH の単独及び同時投与を行い副腎皮質を組織学的に検索して、下垂体摘出無処置群と比較観察した結果次の所見を得た。

1) 副腎の重量変化は実験例数の僅少、動物の個体差もからみ合つて複雑な数値を示し確定的な結論には達しないが、今回の測量に従えば下垂体摘出後明かに副腎重量の減少が起るが、ACTH (2.5mg/日, 7, 10 日) のいわゆる maintenance test を行つても殆ど有意の回復を示さない。GH (2mg/日, 7 日) の注射も同様である。又術後 6 日目より ACTH 同量 5 日間、ACTH 及び GH 5 日間の注射を行い repair test を企てたが、これ又有意の回復力を示さない。従つて副腎重量に関しては ACTH, GH はこの投与方式による限り無効である様に考えられる。

2) 然しながら組織学的には一定の回復力がある。対照群では下垂体摘出 7 日後に球状層は部分的にも幅を増し、多少とも束状配列の傾向を示す。脂肪顆粒を豊富に含有する。移行層は幅を増し、核の密集帯となり、若干とも肥大して来る。束状層は細胞の配列は乱れ、細胞索は細く不完全で互に吻合し、多少とも萎縮

性となり、胞体内には脂肪顆粒が豊富に存在するが可染性顆粒は少ない傾向がある。髄質近くでは細胞は扁平となり、周辺に結合織の増生が見られる。下垂体摘出10日後は7日後の所見と略々等しく、唯徐々に上記症状が増強される。

3) 下垂体を摘出後 ACTH を7~10日間投与すれば、皮質そのものの厚さは回復する様な所見はなかったが、球状層は幅を狭め被膜の方に圧迫され、束状層が上方に伸びて来る。従つて肥大した球状層は完全に變形して束状層と球状層とが一続きである。移行層は消失している。皮質表層では脂肪顆粒が乏しく、可染性顆粒(鉄ヘマトキシリン)が豊富である。束状層細胞自身の萎縮及び配列の乱れは ACTH によつても回復されないが、大きな脂肪顆粒は消失し可染性顆粒が増加する。即ち内部構造上の改善がある。下垂体摘出によつて生じた髄質近くの結合織の増生は ACTH によつて完全に迄近く消失する。以上の如く ACTH 投与によつて或る程度の回復は望める。少くともストレス曝露時の所見と似て来る。

4) ACTH の repair test でもやはり maintenance test と大体同じ回復力を示す。勿論主として細胞配列及び代謝面に関係する如き内部構造の変化であつて、細胞の大きさ及び増殖性変化には影響が殆どない。

5) 下垂体摘出後 GH を7日間連続投与した場合(maintenance test)では、下垂体摘出の症状は余り回復しない。然し下垂体摘出群と全く同じ所見ではなく、束状に配列した球状層では特に被膜の近くで可染性顆粒が密集する傾向が強く、球状層の深層で脂肪顆粒が豊富である。又下垂体摘出によつて髄質の近くに見られた結合織の増生は ACTH と同じく GH でも消失させることが出来た。従つて用いた GH 単独でも副腎皮質に全く影響がないわけではなく、やはり軽い刺激作用があることが細胞学的には推定できる。

6) 下垂体摘出後 ACTH 及び GH を5日間にわたり連続的に同時に投与した場合(repair test)では、著しい摘出症状の改善が認められた。即ち球状層の肥大は更に強力に阻止される。ACTH 単独投与と同様束状層が被膜にまで達し、そこでは可染性顆粒が充満している。又正常ラットに見られる様な幼若な糸球が被膜直下に見られる。移行層は消失しているため束状層と球状層とは自然的に移行し、細胞索は連続性である。束状層細胞の配列、萎縮はやはり ACTH 単独と同様に充分に回復しない。然し可染性顆粒の増加と共に小さい大きさの一定した脂肪顆粒が増加していることは同時注射の特徴である。比較的安定した代謝面での刺激症状が起つている様に思われる。更に髄質の近くで見られる細胞の退化、崩壊過程は GH, ACTH 同時投与により最も効果的に阻止されており、その点でも協調的作用があることが推定される。

7) 以上の組織学的観察より、ACTH と GH の同時注射は、下垂体摘出ラットの副腎皮質の cell number, cell volume 等の減少を充分に阻止できないけれども、細胞配列、内部構造の上では最も効果的な協調的改善をもたらす。恐らく与えられた細胞の条件の下で最大のホルモン分泌を履行することが考えられる。

終りにのぞみ、御懇篤なる御指導を賜つた吉村不二夫教授に感謝致します。

文 献

- 1) Baker, B.L. : Recent Prog. in Hormone Research 7 : 331, 1952.
- 2) Bois, P., H. Selye : J. Endocrinol. 15 : 173, 1957.
- 3) Deane, H.W., J.H. Shaw and R.O. Greep : Endocrinol. 43 : 133, 1948.
- 4) Dixon, H.B., F.S. Moore, M. Stack-Dunne and F.G. Young : Nature 168 : 1044, 1948.
- 5) Giroud, C. J.P., J. Stackenko and E.H. Vanning : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92 : 154, 1956.
- 6) Holzbauer, M., M. Vogt : J. Physiol. 138 : 449, 1957.
- 7) Lever, J.D. : Endocrinol. 58 : 163, 1956.
- 8) Lostroh, A.J. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97 : 828, 1958.
- 9) Lostroh, A.J., P. Woodward : Endocrinol. 62 : 498, 1958.
- 10) Maclean, J.P., M.B. Lipsett, M.C. Li, C.D. West and O.H. Pearson : J. Clin. Endocrinol. 17 : 346, 1957.
- 11) Muller, A.F., A.M. Riandel and E.L. Manning : Lancet 271 : 6951, 1021, 1956.

- 12) Kovacs, K., B.M. Kovacs, G.S. Kovacs and G. Petri : *Naturwissenschaften* 44 : 241, 1957. 13) Nagy, A., A. Olah and S. Karady : *Nature* 180 : 1481, 1957. 14) Rosenfeld, G., E. Rosenberg, F. Ungar and R.I. Dorfman : *Endocrinol.* 58 : 255, 1956. 15) Sayers, M.A., G. Sayers and L.A. Woodbury : *Endocrinol.* 42 : 379, 1948. 16) Selye, H. : *Brit. Med. J.* 1 : 263, 1951. 17) Selye, H. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76 : 510, 1950. 18) Selye, H., H. Stone : *On the experimental morphology of the adrenal cortex* 1950. 19) Simpson, M.E., H.M. Evan and C.H. Li : *Growth* 13 : 151, 1949. 20) Stack-Dunne, M.P. : *Ciba Found. Coll. End.* 5 : 133, 1953. 21) Stack-Dunne, M.P., F.G. Young : *Brit. Med. J.* 1 : 1386, 1951. 22) Stein, J.D., L.L. Bennett, A.A. Batts and C.H. Li : *Am. J. Physiol.* 171 : 587, 1952. 23) Venning, E.H., I. Dyrenfurth, C.J.P. Giroud and J.C. Beck : *Metabolism* 5 : 997, 1956. 24) Wexler, B.C., A.P. Rinfret, A.C. Griffin and H.L. Richardson : *Endocrinol.* 56 : 120, 1955. 25) 横須賀篤 : *ホルモンと臨床*, 6 : 251, 1958. 26) 横須賀篤 : 印刷中 (1960) 27) Yoshimura, F. : *Endocrinol. Jap.* 1 : 177, 1954. 28) 吉村不二夫 : *内分泌*, 2 : 191, 1955. 29) 吉村不二夫 : *ホルモンと臨床*, 7 : 95, 1959. 30) Young, F.G. : *Lancet* 2 : 1211, 1951.

附 図 説 明

Fig. 1. Adrenal cortex of a rat, 7 days after hypophysectomy. Cortex is atrophic, and the involution is most pronounced in the fasciculata and reticularis. The connective tissue grows near the medulla. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, T : Transitional zone, F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 100$

Fig. 2. Adrenal cortex of a rat, 7 days after hypophysectomy. The cells of the glomerulosa contain a lot of fat granules. The transitional zone is widened and the boundary between cells is indistinct. The cells appear to be not flat but large polygonal in shape and their dark-shadowy cytoplasm contains a few number of fat granules. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, T : Transitional zone, F : Zona fasciculata. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 3. Atrophic adrenal cortex of a rat, 10 days after hypophysectomy. The glomerulosa became broader than 7 days. The cells of the glomerulosa are rich in fat granules too. The involution is advanced in the fasciculata and reticularis. There is seen the degeneration and disintegration of the cells as well as the hyperplasia of the connective tissue. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, T : Transitional zone, F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 100$

Fig. 4. Zona glomerulosa of adrenal cortex of a rat, 10 days after hypophysectomy. The glomerulosa cells contain a number of fat granules, whereas the cells in transitional zone are devoid of them. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, T : Transitional zone, F : Zona fasciculata. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 5. Adrenal cortex of a hypophysectomized rat treated with 2.5mg/day ACTH for 7 days (maintenance test). The glomerulosa become narrower by the hormone administration. The cells in whole area of cortex are dark on account of the package of stainable granules. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 100$

Fig. 6. Zona glomerulosa of a hypophysectomized rat treated with the same dose of ACTH (maintenance test). The glomerulosa does not show the typical glomeruli, but consists of the cell-strands which contain a majority of stainable granules, in spite of a few fat granules. The transitional zone is no longer present. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 7. A hypophysectomized rat treated with 2.5mg/day ACTH for 10 days (maintenance test).

The glomerulosa become narrower. Its cell-strands extend themselves to the capsule. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 100$

Fig. 8. A hypophysectomized rat treated with ACTH for 10 days (maintenance test). The cell cords of superficial areas are upwards ended into the capsule, so that it is very difficult to distinguish between the glomerulosa and the fasciculata, presenting the mutual transformation. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 9. The reticularis of a hypophysectomized rat treated with ACTH for 10 days (maintenance test). The many sinusoids are dilated and the connective tissue decrease by the replacement therapy. F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 10. Adrenal cortex of a hypophysectomized rat treated with 2.5mg/day ACTH for 5 days from 6th day (repair test). In spite of no restitution of the size of whole cortex, the histological signs of the ablation are sufficiently improved in the zonation and the internal structure of cortical cells beyond the normal level, showing the pattern under the stressful stimuli. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 100$

Fig. 11. The outer part of adrenal cortex of a hypophysectomized rat treated with ACTH for 5 days after the 6th day (repair test). The glomerulosa is extraordinarily atrophic, not forming the typical glomeruli, but consisting of the irregularly existing cells which are either independent or in a fused mass. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 12. The inner part of adrenal cortex of hypophysectomized rat treated with ACTH for 5 days after the 6th day (repair test). The cell-strands of the fasciculata are slender and anastomosed. The connective tissue is absent near the medulla, in spite of the dilation of sinusoids in the reticularis. F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 200$

Fig. 13. Adrenal cortex of a hypophysectomized rat treated with 1mg/day GH for 7 days (maintenance test). The glomerulosa remains to be hypertrophic by the administration, in which is not present the typical glomeruli, but cell-strands. The transitional zone is a kind of cell layer containing a mass of nuclei. The histological symptoms of the extirpation is not enough swept up by the administration. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, T : Transitional zone, F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 100$

Fig. 14. The glomerulosa of a hypophysectomized rat treated with GH (maintenance test). The glomerulosa is composed of cell-strands, which contain a number of the stainable granules, however on the contrary in the innermost area of the glomerulosa appear the fat granules. The transitional zone is unable to disappear completely by GH administration. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, T : Transitional zone. Levi. iron-hemat. $\times 400$

Fig. 15. The inner part of adrenal cortex of a hypophysectomized rat treated with GH (maintenance test). The atrophic changes in cortical cells and irregular arrangement of cell-strands induced by the hypophysectomy are not improved by GH administration, whereas the connective tissue enclosing the medulla is fairly deprived by the hormone therapy. F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 200$

Fig. 16. The outer part of adrenal cortex of a hypophysectomized rat treated with 2.5mg/day ACTH and 2mg/day GH in combination for 5 days after the 6th day (repair test). The glomerulosa consists of cell-strands which are the elongation of the fasciculata, both of which is packed with the stainable granules instead of fat droplets, presumably representing the acceleration in cortical func-

伊 東 論 文 附 図 (その1)

伊 東 論 文 附 図 (その 2)

tion. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, F : Zona fasciculata. Levi. iron-hemat. $\times 200$

Fig. 17. High magnification of the glomerulosa of a hypophysectomized rat treated with ACTH and GH in combination (repair test). The cell-strands are penetrated upwards through the glomerulosa, and contain lots of stainable granules, in particular most abundantly in the uppermost area. C : Capsule, G : Zona glomerulosa, Levi. iron-hemat. $\times 900$

Fig. 18. The inner part of adrenal cortex of a hypophysectomized rat with ACTH and GH in combination (repair test). The picture almost corresponds to the pattern of normal untreated rats and the connective tissue surrounding the medulla disappears by the simultaneous administration. F : Zona fasciculata, R : Zona reticularis, M : Medulla. Levi. iron-hemat. $\times 200$