Effects of Vegetable Fat Administration on the Pituitary-Adrenal Axis of Pregnant Albino Rats

1. Effects on the Adrenal Gland

Michizo MIKI

Department of Gynecology and Obstetrics, Kyoto University School of Medicine, Kyoto, Japan
(Director : Prof. Toshio Nishimura, M.D.)

Remarkable advances have been made in the recent studies of lipid metabolism by Kinsel et al., Ahrens et al., Oliver and other investigators. They have confirmed that the quantity of cholesterol in the blood decreases when vegetable fat is administered to patients with hypertension. It is therefore presumed that cholesterol, a precursor of steroids, may be readily influenced by the vegetable fat rich in essential fatty acids. Furthermore, the vegetable fat is supposed to have an effect on the adrenal, ovary, and other hormonal organs as well as on the level of cholesterol in the blood.

In the present study, the changes of the pituitary-adrenal milieu following treatment with sesame oil, 0.2 g daily per 100 g body weight, for 10 consecutive days in pregnant and non-pregnant albino rats were compared with those of the controls to which no sesame oil was administered.

As for the effects on the adrenal, the contents of lipid and ascorbic acid were measured. Cholesterol and ascorbic acid were found to increase in the rats treated with vegetable fat, and this was evident especially in the non-pregnant rats. Besides, the histological findings on these animals were consistent with the biochemical data mentioned above.

The results obtained in the pregnant rats showed exactly the same tendency as those of the non-pregnant ones, but the variations were generally slight. (pp. 1090~1097)

脂質投与が妊娠個体の下垂体副腎系機能に 及ぼす影響についての実験的研究

(第1報) 副腎機能についての推移

京都大学医学部婦人科学産科学教室 (主任 西村敏雄教授)

三 木 通 三

(昭和41年3月16日受付)

緒 言

1905年 Knoop の β -oxidation 説を嚆矢として、以後の脂質研究は長速の進歩をとげ、脂質が極めて重要な生体エネルギー源であることが知られるようになった。しかし最近では脂質はエネルギー源にとどまらずホルモンとして、或いは constant element (保全素) としての立場からも検討され始めた。即ち内分泌学的には副腎皮質や、卵巣がステロイド合成源であることは既に衆目の認めるところであり、しかもこれらステロイド化合物がコレステロールを始め他の多くの脂質と密なる関係にあることも亦多くの研究により良く知られている。

一方脂質を constant element の立場より見た場合、これは既に古くから Burr & Burr¹⁾, Burr & Burr²⁾ Burr, Burr & Miller³⁾, Evans & Lepkorsky⁴⁾ らがリノール酸、リノレン酸並びにアラキドン酸らの不飽和脂質の欠乏が実験動物に対し成長を阻害することより、これら脂質に所謂ビタミン様作用のあることを知った。かれらはこれを“Vitamin F” 或いは体内合成不能なる事実より必須脂質とも呼んだ。

その後 Kinsell (1954)⁹⁾, Ahrens (1954)¹⁰⁾, Shapiro (1955)¹¹⁾ らが必須脂質に富む植物脂肪の大量投与が本態性高血圧、粥状動脈硬化症らの一連の hypercholesteremia を伴う症候群に対し抗血脂作用(脱コレステロール作用)を示すことを報告した。以来この分野の研究は急速に進歩し、constant element としての必須脂質にとどまらず、このものが何らかのかたちで生体の内分泌環境に影響しているのではなかろうかと予想され始めた¹²⁾¹³⁾。即ち Holman¹⁴⁾ は必須脂質の雄白鼠性器に及ぼす影響を、Deuel¹⁵⁾ は妊白鼠の授乳状態に対する影響を調べており、また日笠ら¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾は植物脂肪乳剤の静脈内注入に成功し、副腎を始め各種臓器に対する影響を詳細に研究している。

以上の如く脂質の研究には、ホルモンや、constant element の立場をもちや無視することは出来ないが、更に最近の脂質研究の方向はホルモンや、constant element といった個々の範ちゆうに帰依せず両者を併せた総合的な視野に立脚した研究方向に進んでいることも見逃すことの出来ない事実である。

そこで著者も constant element としての作用をもつ必須脂質が生体の内分泌環境に及ぼす影響を調べ、特にホルモン環境において大きな変動の起りうる妊娠個体を対象とし、その下垂体副腎系機能について系統的に検討した。この際、影響の大なることが予想される妊娠の後半期を特に選び、この期間中連日脂質を大量に与え続けた場合の内分泌環境の変動を、非妊と対比のもとに検討した。

第1章 実験動物の飼育方法並びに脂質の投与方法

実験対象は生後70～90日の Wistar 系成熟雌白鼠を用い、性周期が整調にして妊娠可能なる体重140～190gのものをを選び、全実験を通じてオリエンタル標準食飼料と水道水を与え、網底のある丸形金物かごに動物

を入れ、糞尿への接近を避けて常にかごを清浄に保ち、恒時 20°~25°C の室温中に飼育した。白鼠の購入に当っては健康なるものを選び、購入後10~15日間その環境にならし、1日2回12時間ごとに膣脂膏の変化を調べ、性周期が整調に安定した状態を確認してから実験を開始した。

妊娠に関しては比較的同体重の成熟雄白鼠1匹に雌3~4匹を同じかごに入れ、雌白鼠の膣脂膏中に精虫が認められた時を一応妊娠成立とみなし、その日を妊娠第1日として、以後妊白鼠のみを隔離し飼育を続けた。

使用した脂質材料は京大青柳外科創製¹⁶⁾¹⁷⁾のゴマ油乳剤（精製ゴマ油の水中油型滅菌乳剤で1ml力価0.2gのもの）で、これを白鼠体重100g当り0.2g（1ml）1日1回定期的に連続10日間腹腔内に注入し、投与終了の翌日断頭屠殺して後述の諸検査を行った。

さてこのゴマ油乳剤負荷による妊娠個体の下垂体副腎系機能を調べるために、主としてその影響の大なることが予想される妊娠の後半期を特に対象とし、Dueulらの方法に準拠して実験を行った。即ち白鼠の妊娠状態の確認出来る前半期の終頃より実験を開始し、実験開始前日における測定値を投与前値（Early Preg.）とし、これより10日間、全く乳剤を負荷せずにそのまま後半を観察したもの（Late Preg.）を対照とし、乳剤を連続10日間投与したもの（Late Preg. Dosed Fat）との差異を調べた。

また一方、妊、非妊における脂質投与による影響の差をみるために、非妊時の成績も検討した。即ち対照として静止期の白鼠を調べ、この期における測定値を投与前値（Diestrus）とし、この期より乳剤を連続10日間投与したもの（Fat Dosed）との差を検討した。なお発情期の成績も併せて対照の参考に供しておいた。

第2章 妊、非妊白鼠に脂質を負荷した場合の副腎機能についての推移。

副腎は下垂体前葉より分泌される ACTH の支配を受けており、外界刺激に対する生体防禦反応に欠かすことの出来ない臓器である。

Stress 作因によつて起る副腎の活動は下垂体前葉の ACTH 分泌を介して二次的に惹起されたものであれ、或いはまた副腎に対する直接的な刺激作用であれ、常に急速、かつ特異的である。この副腎の活動状態を調べるには種々の方法があるが、しかし何れも完全なものなく、単一の方法にのみ頼つて検索することは極めて不充分である。ために著者は次の4つの観点より総合的に副腎機能を検討した。

第1節 副腎重量

従来からそれが如何なる機序によるものであれ、stress 作因下で副腎はその重量を増し⁷⁴⁾、逆に去勢⁷⁵⁾⁷⁶⁾77)78)下垂体剔除⁷⁹⁾⁸⁰⁾らの諸条件の下においては重量が減少するといわれている。また雌性動物では性周期の変動によつても影響され、⁸¹⁾⁸⁴⁾⁸⁵⁾妊娠では増すこと⁸²⁾も知られている。

このように副腎重量の増減はその機能を視る一指標となりうる⁷¹⁾⁷²⁾とはいえ、Hartman⁷³⁾の報告にもみられる如く stress 作用下の副腎肥大はその細胞の肥大増殖にもよるが、しかし血液、水分らの異常増加も無視出来ないことを示唆していることより、副腎重量の推移のみにてその機能を判断することは、いささか危険である。しかしながら一応脂肪乳剤投与による副腎機能への影響を調べる一手段としてこれを調べてみた。

第1項 実験方法

妊白鼠では妊娠状態の確認出来る前半期の終りに投与前値をとり、これに乳剤を連続10日間投与したもの、この間、乳剤を負荷せずにそのまま観察した対照群の夫々について、また非妊白鼠では静止期における投与前値を対照にとり、これより10日間乳剤を連日投与したもの、なお対照の参考にまで求めた発情期などの各種条件下の白鼠を断頭屠殺し、直後ただちに開腹して両側の副腎を剔出し、その重量を torsion blanche にて計量し、絶対重量並びに白鼠体重100g当りの相対重量を求めた。

なお妊娠時では、胎仔の関係から絶対重量のみが意義をもつが、相対重量の値も一応示しておいた。

第2項 実験成績

副腎重量の推移は Table 1 に示す通りであり、非妊時においては投与前値は発情期における値とも相変らず、脂肪乳剤を投与したものとの間に、絶対重量、相対重量ともども有意差が認められなかつた。妊娠

Table 1. Adrenal weight (mg)

		Body weight	No.	Adrenal weight	Adrenal weights per body weight 100g.
Non-preg.	Diestrus	120~190	18	43.2±5.6	26.7±2.1
	(Estrus)	(100~180)	(18)	(43.5±4.3)	(28.8±1.9)
	Fat Dosed	125~200	20	43.4±3.8	28.0±2.3
Preg.	Early pregnancy	140~195	10	47.4±4.0	29.4±1.9
	Late pregnancy	230~295	10	73.4±3.8	29.9±2.0
	Late pregnancy doses fat	200~290	7	74.3±4.7	29.6±1.4

N.B. Non-preg. (=Non-pregnant rats) Preg. (=Pregnant rats)

時では投与前値に比べ、対照も乳剤投与したものも共に相対重量において大差なく、絶対重量においては増加が認められたが、対照と乳剤投与群との間には著差はみられなかった。

第2節 副腎アスコルビン酸含量

副腎アスコルビン酸の演ずる役割は未だによくわかっていないが、stress 作因や、ACTH 投与、或いは下垂体前葉抽出物の投与でこのものが減少することが知られている。従つて今日では副腎アスコルビン酸の消長は前葉 ACTH の放出状態を知る指標となるのみならず副腎自体の機能状態の一端を知る上にも欠くことの出来ない事項である。ことに実験対象が白鼠の場合には甚だ有利であるといえる⁸⁶⁾⁸⁷⁾⁸⁸⁾。

第1項 実験方法

前節に述べた剔出副腎を torsion balance にて 0.1mg まで正確に秤量し、Roe⁸⁹⁾の方法により、dehydro ascorbic acid の所謂 osazone 反応による呈色反応を用いて比色定量を行つた。

第2項 実験成績

既に副腎重量測定の際において述べた如く、妊、非妊白鼠の各種条件下における副腎重量 100g 当りのアスコルビン酸含量 (mg) を示すと、Table 2, Fig. 1 の如くである。

非妊時では、投与前値(静止期)に比べ発情期のそれは軽度ながら減少しているが、統計学的にはあくまで有意ではない。しかし乳剤を投与すると大きく著増することが有意に認められた。

Table 2. Adrenal ascorbic acid contents (mg per rat adrenal body 100g)

		Body W.	Left adren.		Right adren.		Mean ± S. E.
			Adren. W.	Ascorb. A.	Adren. W.	Ascorb. A.	
Non-Preg.	Diestrus	180	36.0	396.0	34.0	373.3	381.4 ± 14.8
		170	34.0	376.0	29.2	384.7	
		138	26.3	358.9	24.0	399.0	
	Estrus	182	23.0	326.1	22.0	324.6	(343.8 ± 29.2)
		140	31.4	315.5	31.2	322.2	
		160	29.0	391.3	27.5	383.3	
	Fat Dosed	165	24.0	485.5	23.0	483.7	492.1 ± 15.4
		183	27.5	506.3	27.5	515.4	
		142	27.4	480.6	26.1	481.4	

Preg.	Early preg.	157	19.0	333.4	19.5	313.9	314.5±15.3
		158	21.5	292.7	20.8	300.0	
		166	16.9	330.5	15.5	316.4	
	Late preg.	280	35.4	295.5	31.4	289.3	295.6±5.7
		295	50.0	285.0	36.0	312.5	
		270	36.2	296.2	44.4	295.3	
	Late preg.	255	33.2	370.4	30.8	377.7	379.8±5.6
		278	31.1	380.3	31.6	380.0	
		280	36.5	384.4	36.5	385.6	

妊娠時には静止期，発情期含めての非妊時よりも一般に値が低く，しかも妊娠経過とともに次第に減少している。

しかるにこの間，乳剤を投与したものでは逆に増加している。即ち程度の差こそあれ，妊，非妊ともに乳剤の負荷により副腎アスコルビン酸は増すことが認められた。

第3節 副腎総プレステロール，磷脂質並びに総脂酸の各含量

副腎アスコルビン酸と共に今一つ副腎機能検索に重要な指標となるものに副腎コレステロールがある。元来副腎コレステロールは副腎皮質ステロイドの precursor と考えられ，ACTH に対する反応もアスコルビン酸よりはむしろ適確，合理的であるといわれている。⁹⁰⁾⁹⁸⁾

しかしアスコルビン酸に比べて反応の発現時期が遅れることや，未だ定量法に充分なものがないなどの理由から尚検討せねばならない余地が多い。しかしながら Long et al⁹¹⁾ は ACTH 作用下における副腎アスコルビン酸の減少とコレステロールの減少がほぼ平行することを指摘している。著者もこの方法を採用して副腎機能探索に更により以上の手がかりを得べく努力した。なお併せて他の脂質，特に生体内代謝においてコレステロールと密接な関係にある磷脂質並びに総脂酸も測定した。

第1項 実験方法

副腎重量や，副腎アスコルビン酸の各節において述べた如く，各種条件下の白鼠より副腎を剔出し，下記の方法を用いて副腎100mg当りのmg含量を各脂質について求めた。

(1) 副腎総コレステロール含量の測定法

コレステロールの測定法には種々なものがあるが，⁹²⁾⁹³⁾⁹⁴⁾ 精度と，実験の迅速，簡便さから Bloor⁹³⁾ 法を選び，斉藤氏変法⁹⁵⁾に従い測定を行った。

(2) 磷脂質含量の測定法

Fig. 1. Adrenal ascorbic acid contents (mg per rat adrenal body 100g)

Gomori⁹⁸⁾法にて湿性灰化後、無機磷として測定し、その25倍を磷脂質含量とした。

(3) 総脂酸含量の測定法

Stern et Shapiro 法⁹⁷⁾を用いた。

第2項 実験成績

副腎内各脂質含量の成績は Table 3, Fig. 2 に示す通りである。

Table 3. Adrenal cholesterol, phospholipid, & fatty acids contents (mg per rat adrenal body 100mg)

		Cholesterol			Phospholipid			Fatty Acids		
		B.W.	No.	Contents	B.W.	No.	Contents	B.W.	No.	Contents
Non-Preg.	Diestrus (Estrus)	120~ ~190	18 (18)	3.27±0.00 (3.22±0.38)	120~ ~190	18 (18)	2.13±0.78 (2.27±0.84)	120~ ~190	18 (18)	7.62±0.64 (7.48±0.39)
	Fat dosed	125~ ~200	20	3.86±0.23	125~ ~200	20	2.28±0.84	125~ ~200	20	7.65±0.43
Preg.	Early preg.	140~ ~195	10	2.39±0.21	140~ ~195	10	2.63±0.96	140~ ~195	10	5.46±0.19
	Late preg.	230~ ~295	10	2.35±0.19	230~ ~295	10	2.65±0.24	230~ ~295	10	5.23±0.13
	Late preg. dosed fat	200~ ~290	7	2.43±0.22	200~ ~290	7	2.61±0.03	200~ ~290	7	5.35±0.48

N.B. Non-preg. (=Non-pregnant rats) B.W. (=Body weight of albino rat)

Preg. (=Pregnant rats)

(1) 総コレステロール含量

非妊時では、投与前値(静止期)は発情期に比して大差なく、脂肪乳剤投与によつて僅かながら有意の増加を示した。しかるに妊娠時では非妊時に比して総コレステロール含量は有意に減少してゐるが、乳剤を投与するとやはり非妊時と同様、増加する。しかしその差は有意ではない。大ざつばな傾向としてはアスコルビン酸の場合に良く類似している。

(2) 磷脂質並びに総脂酸含量

磷脂質は非妊時に比び妊娠時では多少の増加傾向がみられるが、有意ではなく、また妊、非妊とも脂肪乳剤による影響はみられない。

逆に総脂酸では非妊時に比べ妊娠時では軽度ではあるが減少し、その差は有意である。

しかし、この際も妊、非妊ともに脂肪乳剤による影響は認められない。

以上の諸成績より妊娠時では一般に副腎内の磷脂質は多少の増加傾向を示すが、非妊時と大差なく、総脂酸は逆に妊娠時に軽度ながら減少することが知られたが、ともに脂肪乳剤投与による影響は妊、非妊とも認められなかつた。しかしコレステロールの場合、妊娠時では非妊時に比して有意に減少し、乳剤投与による影響も非妊時の如く有意ではなかつたが、やはり増加傾向を示した。このコレステロールの動態はアスコルビン酸が示した傾向と軌を一にしている。

第4節 副腎皮質の組織学的所見

副腎皮質の機能を組織学的に検索する方法は、既に古くからなされており、皮質の細胞核並びに胞体内顆粒を染め分け、その所見より皮質機能を覗わんとするものであるが、胞体内 corticosteroids, 又は ketostn-roids らを特異的に染め分ける方法は未だ完成されたものなく、現今ではなお脂肪染色、ことに Sudan 染色法によるのが皮質機能を論ずる場合、最も合理的であるとされてお¹⁰⁰⁾、Sayers et al.⁷⁴⁾ はこれのみで十分に皮質機能を覗い得ると主張している。しかし反面、Deane et Greep¹⁰²⁾、Dempsey et Wislocki¹⁰³⁾ らは Sudan 染色のみでは不十分であり他の方法も併せて¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾¹⁰¹⁾、多角的に検討すべきであると述べている。何れにしても組織所見のみで皮質機能を判断することはいささか早計の感あり、著者も既述の諸種測定、或

Fig. 2. Adrenal cholesterol, phospholipid, fatty acids contents (mg per rat adrenal body 100mg)

いは後述の尿中 17-ketosteroids らの成績を更に裏付けすべく、これを実施した。

第1項 実験方法

既節において述べた如き各種条件下の白鼠について、その副腎を剔出し、これを凍結し、その最大周囲径に相当する部位の切片について、Sudan III, 並びに hematoxylin 後染色を施して検鏡した。

第2項 実験成績

非妊時の副腎皮質組織像は Photo. 1~3 に示す如くである。投与前(静止期)では Photo. 1 の様に球状層、束状層ともに胞体内 Sudan 好染顆粒に富み、その大きさはやや粗大である。網状層は一般に不規則にして顆粒も乏しい。なお発情期では Photo. 2 の如く球状層では静止期と余り変らないが、束状層において顆粒が全体として少なく、微細であり、この層から網状層にかけて中等量の微細顆粒がびまん性にみられる。脂肪乳剤を負荷すると Photo. 3 の如く、粗大化した Sudan 淡染性の脂肪顆粒が増し、束状外層部に著明な空胞形成と、更に球束移行部の処々に所謂 transitional zone が出現してくる。

(Photo. 1) Diestrus (×100 with Sudan III)

(Photo. 4) Early preg. (×100 with Sudan III)

(Photo. 2) Estrus (×100 with Sudan III)

(Photo. 5) Late preg. (×100 with Sudan III)

(Photo. 3) Fat dosed (×100 with Sudan III)

(Photo. 6) Late preg. dosed fat ×100 with Sudan III)

G : Zona glomerulosa F : Zona fasciculata R : Zona reticularis M : Medulla

妊娠時では Photo. 4~6 に示す通りで、投与前の組織所見は Photo 4 の如く、全層において顆粒が欠除している。

これが後期になると Photo. 5 の如く、束状層の中層部以下に微細顆粒が若干増してくる。しかし脂肪乳剤を与えたものでは束状外層部にやはり空胞形成がみられ、粗大化した Sudan 淡染顆粒が出現してくるが、transitional zone は認められない。

以上要るに、脂肪乳剤の負荷が妊、非妊白鼠の副腎皮質細胞内顆粒の粗大化並びに空胞形成を惹起せしめ、非妊時では一部に所謂 transitional zone の出現が認められたなどの所見は甚だ興味の多いことである。

第5節 小括並びに考按

非妊白鼠に脂肪乳剤を負荷した結果、副腎の重量、燐脂質並びに総脂酸の推移においては目立つた変化は

なかつたが、アスコルビン酸、コレステロール含量には増加がみられ、また組織所見でも皮質全層にわたる細胞内顆粒の粗大化と、束状外層部の空胞形成並びに球束移行層の一部に transitional zone が認められた。

さて副腎内の脂質分画に関しては既に Popjak¹⁰⁸⁾, Ludewig et Chanutin¹⁰⁹⁾, Sayers et al¹⁰⁷⁾ らが ACTH, Stress 作図において実際の顕著な変動を示すのはコレステロールのみで磷脂質その他の脂質は余り変らないとし、特にコレステロールのみの動きを重視している。また組織所見では Weaver et Nelson¹⁰⁹⁾, Deane et Greep¹¹⁰⁾, Deane, Shaw et Greep¹¹¹⁾ らが胞体内顆粒の粗大化を指標とし、Deane et Greep¹¹²⁾, Deane, Shaw et Greep¹¹¹⁾ らは transitional zone の生理的意義を指標として皮質機能を検討し、彼らはこの状態を機能の抑制像とみている。これらの見解はまた今日では副腎皮質機能を知るための基準的な事項となっており、従つてアスコルビン酸並びにコレステロール含量の増加と、これら組織所見を併せ考えると皮質機能は脂肪乳剤の投与により一応抑制されたものと考えることが出来る。

一方妊娠時では、脂肪乳剤による影響がアスコルビン酸と組織所見より得られ、前者における乳剤投与による増加並びに後者における胞体内顆粒の粗大化と、空胞形成らは明らかに非妊時同様、皮質機能の抑制像を示すものと解されるが、その程度は非妊時に比べて軽微であつた。

(参考文献) 第3報に掲載