Changes of Adenohypophysial RNA, Plasma ACTH activity and Plasma Corticosterone following various acute stimuli in Rats

H. YASUI, M. OIMOMI, Y. KOHOZUKI, M. HIGASHI,
H. TANIGUCHI, S. ITOH and S. TSUJI

IIInd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Kobe University
Kobe, Japan

It has not yet been confirmed whether pituitary synthesis of ACTH is actually accelerated under conditions of acute stimuli, or not.

In order to clarify this problem, adenohypophysial RNA, which seems to reflect the intensity of protein synthetic activity, plasma ACTH activity and plasma corticosterone were simultaneously determined after various acute stimuli in rats.

Adenohypophysial RNA was determined by Schmidt-Thaunhauser-Schneider's method based on the spectrophotometric measurement of liberated pentose by orcinol reaction.

Plasma ACTH activity was measured by an in Vitro bioassay using beef adrenocortical slices which was developed in our clinic.

DeMoor's fluorophotometric method was employed for measurement of plasma corticosterone.

The results were summarized as follows:

1). Adenohypophysial RNA content in female rat was slightly higher than in male, but this difference was not statistically significant; the value was $5.26 \pm 0.23 \mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue and $4.39 \pm 0.18 \mu\text{g}/\text{mg}$ in male, respectively.

2). Plasma ACTH activity reached to the highest level at 5 min. after ether-vapour exposure and thereafter declined to control level, but plasma corticosterone reached its highest level at 30 min. after ether. Adenohypophysial RNA content increased significantly at 60 and 120 min. after ether-exposure, their value before the ether and at 60 and 120 min. after were $4.68 \mu\text{g}/\text{mg}$, $6.24 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($P < 0.01$) and $7.17 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($P < 0.02$), respectively.

3). Pituitary RNA, plasma ACTH activity and plasma corticosterone were determined at intervals of 2.5 to 120 min. following laparotomy. Plasma ACTH began to increase at 2.5 min. following incision and continued to stay on its high level up to 120 min.

Adenohypophysial RNA did not increase rapidly after laparotomy, but it increased significantly at 60 and 120 min. following incision. Pituitary RNA content before incision, at 2.5, 60 and 120 min. after incision were $4.29 \mu\text{g}/\text{mg}$, $5.68 \mu\text{g}/\text{mg}$ (n.s.), $7.15 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($P < 0.01$) and $5.80 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($P < 0.05$), respectively.

4). The changes of adenohypophysial RNA content, plasma ACTH activity and plasma corticosterone were observed at intervals of 2.5 to 60 min. following intra-venous

administration of Lysine-8-Vasopressin (100mU/100gm) into tail vein. Plasma ACTH activity was significantly increased at 2.5 min. after injection, but 15 min. later it returned to control level.

Changes of adenohipophysial RNA following L-8-V administration were not so remarkable as compared with changes following ether or laparotomy as above mentioned. Actual adenohipophysial RNA content before L-8-V injection, at 2.5 and 60 min. after injection were 3.75 $\mu\text{g}/\text{mg}$, 4.55 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (n.s.), and 5.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($P<0.05$), respectively.

5). The effect of intermittent bell-ringing continued for 30 min. on adenohipophysial RNA, plasma ACTH activity and plasma corticosterone was investigated. All of these indices were significantly increased after bell-ringing. RNA content changed from 4.69 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of control value to 6.13 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ($P<0.05$) after bell-ringing.

6). As summary, following conclusion could be drawn. Various kinds of stimuli applicated in this report seems to mobilize the endogenous hypothalamic CRF (Corticotrophin Releasing Factor).

The next response is the rapid increase of plasma ACTH activity within 2.5 to 5.0 min., which is to be correlated to the release of ACTH from pituitary, for extended periods of certain time interval.

The increase of adenohipophysial RNA, which is postulated as to reflect the increase of ACTH synthesis, appeared relatively in later period as compared with the increase of plasma ACTH.

(pp. 754~759)

急激な刺激負荷後の下垂体前葉内 RNA 含量と血漿中 ACTH 活性の変動に関する研究

神戸大学 辻内科

安井 博和, 老耜 宗忠, 上月 祥生
谷口 洋, 東 宗則, 伊藤 節子
辻 昇三

(昭和43年8月30日受付)

研究の目的：諸種刺激に対する下垂体よりの ACTH 放出態度と下垂体内での蛋白合成の観察より ACTH 分泌機序の解明を試みた。

方法：急激な刺激負荷後の下垂体内 RNA 含量と Plasma ACTH 活性の変動を測定した。

成績：刺激負荷後 Plasma ACTH は急激に増加するが，下垂体内 RNA 含量は，早期には変動せず，60分目に最高となつた。

結論：刺激負荷後急激な ACTH 放出がまず起こり，遅れて下垂体内 RNA 含量が増加する。

1) 緒 言

蛋白合成における RNA の占める重要性については衆知である。下垂体内 ACTH 合成機構の解析にも，RNA の変動を通して研究した Hess 等¹⁾ Kraicer 等²⁾ の報告がある。一方諸種の急激な外部環境変化に対応して，急激な下垂体よりの ACTH 放出現象が存在する³⁾ 事が認められ，この ACTH 放出の前段階として視床下部 CRF (Corticotropin Releasing Factor) の動員がまず起こる事も確められている⁴⁾⁵⁾。この様な急激な放出現象の中で，合成機転の関与の有無についてはまだ意見が一定していない。この事は一方では下垂体よりの Trophic Hormone の放出因子と称せられている視床下部性 Releasing Factor が合成にも関与するのかどうかという争点にも通ずる問題である。著者らは，Schmidt-Thaunhauser-Schneider 法⁶⁾ にて下垂体内 RNA 含量を測定し，同時に血漿中 ACTH 活性；血漿中 Corticosterone を「いわゆる Stress」下に於ける白鼠について測定し，二，三の興味ある知見を得たので報告する。

2) 方法と材料

a): 体重 100-150gm の Wistar 系純系白鼠を用いた。性差については後述の検討をした結果より，特に区別しなかつた。また白鼠は実験に供する1週間前より研究室にて一定条件下で飼育された。

b): RNA の測定

断頭後直ちに開頭し，下垂体前葉のみを氷冷せる生食水にて三度洗浄し，附着せる血液成分を充分取除き，重量を測定後，氷冷せる蒸溜水にて Homogenize を行なう。一つの実験群について2～3ヶの下垂体前葉をプールした。Homogenize 後氷冷せる 10% T.C.A. を添加，2500回転10分間遠沈する。上清を除き，10% T.C.A. にて再洗浄後，1ml の蒸溜水中に懸濁し，99% Ethanol を加えて攪拌2500回転，10分間遠沈して，上清を捨てる。以後その沈渣を Ether: Ethanol の 1: 3 の混合液にて3回洗浄し脂質成分を除去する。最後の Sediment Fraction に 0.6N の KOH を添加して37°C20時間 Incubation した後に，Orcinol 反応にて，遊離した5炭糖を測定し，それによつて RNA を定量するのである。比色計は Beckman 型 Photometer にて波長は 660m μ とした。RNA 含量は $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue にて表現されている。なお標準

RNA には市販の酵母性 RNA (和光) を用いた。

以上の Procedure は Fig. 1 に示されている。

Fig. 1. Determination of RNA in pituitary gland

c): ACTH 活性の測定

血漿中の ACTH 活性の測定については著者の一人がすでに詳述している^{7,8)} 牛副腎皮質薄片を使用する *in vitro*-Bioassay 法を用いた。4 倍稀釈の血漿を medium にして、牛副腎皮質薄片と接触させ 90 分間の Incubation 後に medium 内に放出された steroids を硫酸蛍光比色法にて測定するもので、血漿中に含まれる ACTH 活性の表現は $\mu\text{g}/\text{gm}/\text{ml}$ でなされている。即ち 1 ml の新鮮検体血漿が牛副腎皮質 1 gm 当りに何 μg の steroids を放出させるかをもつて表わしている。血漿中の ACTH 活性を測定する場合は、同一検体についてフラスコを 3~4 ケ用意し、1 ケのフラスコには副腎皮質薄片は添加せずに 4 倍血漿稀釈液のみを入れ、残りの 2~3 ケのフラスコには副腎皮質薄片を添加する。これは一種の盲検とも称されるもので血漿 1 ml に含まれる蛍光度を、Incubation 後の medium 内に release された steroids の蛍光度から差引く為である。本法はすでに報告しているごとく⁸⁾ に、同時に多量の検体を同一の Assay 系で処理しうる利点がある事より、我々は常に double 或は triple Trial を施行している。

d): 血漿中 Corticosterone

血漿中 Corticosterone は De Moor 等⁹⁾ による Fluorophotometric Method によつた。

3) 結 果

i) 下垂体前葉 RNA 含量の雌・雄差について

Table 1. に示すは体重 100-150 gm の雌・雄無処置白鼠を午前 8~9 時の間に断頭殺した場合の下垂体 RNA 含量である。

推計学的処理を施せば雌・雄に有意な差は認められないが、雌は 19 例平均で 5.26 ± 0.23 (S.E.) $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue 雄は 15 例平均が $4.39 \pm 0.81 \mu\text{g}$ of tissue とやや雌の方が多い傾向である。これは下垂体—副腎皮質系の反応性に Sex-difference が存在するという報告¹⁰⁾ にもあるごとく末梢の Target Organ 即ち卵巣 Hormone の影響が二次的に下垂体内の RNA 含量にも影響を及ぼしているとも考えられる。雌・雄の性差は推計学的には認められなかったが、以下の実験に於ては、同一実験群は同一性を用いるようにした。

ii) 刺激負荷後の RNA の変動:

(1): Ether-Vapour-Stimulus

Fig. 2, Table 2. に於て Ether 負荷後の血漿中 ACTH 活性, 血漿中 Corticosterone, 下垂体内 RNA の変動を示した. Ether Vapour に 1~1.5 分間曝露すれば白鼠は完全に麻酔状態に入る. その状態から 5 分, 15 分, 30 分, 60 分, 120 分の各時点で ACTH 活性と Corticosterone を, 又, 15 分, 60 分, 120 分の各時点で RNA を測定した. ACTH 活性は Fig. 2 より明らかな様に 5 分後に最高値となり 30 分後には完全に前値に戻り, 120 分後に逆同様の状態が続くが, 血中 Corticosterone は ACTH 活性より遅れて 30 分後に最高値になり 60 分後に前値に戻る. 一方 RNA 含量は前値の $4.68\mu\text{g}/\text{mg}$ から 15 分後に $5.68\mu\text{g}/\text{mg}$, 60 分後に $6.24\mu\text{g}/\text{mg}$, 120 分後に $7.17\mu\text{g}/\text{mg}$ と上昇し, 60 分後, 120 分後は前値に比して $p<0.01$, $p<0.02$ と夫々有意に増加している.

(2): Laparotomy-Stimulus

Pentobarbital-Na ($5\text{mg}/100\text{gm}$) を腹腔内注射後 15 分目に腹部正中切開を加え, それ以後 2 分 30 秒目, 15 分目, 60 分目, 120 分目の ACTH 活性, Corticosterone, RNA を測定した. 開腹後 60 分, 120 分目に断頭する群には, 開腹部位が空気に直接触れない様に湿潤した生食水ガーゼをその傷口に当てた. ACTH 活性, Corticosterone の反応性は先述の Ether-Stimulus とは趣を異にしている事がわかる. 即ち刺激後 2 分 30 秒目にすでに上昇を始めた

Fig. 2. Effect of ether vapour on plasma ACTH and plasma corticosterone

Table 1. Sex difference of adenohipophyseal RNA in rat

Exp. No.	Male	Female
1.	4.50	4.08
2.	4.70	4.73
3.	3.92	4.86
4.	6.22	4.28
5.	2.64	4.27
6.	3.98	7.40
7.	3.77	4.86
8.	3.29	5.05
9.	3.97	5.71
10.	5.94	4.91
11.	4.58	3.56
12.	4.33	6.21
13.	3.90	6.07
14.	4.67	6.22
15.	5.93	4.35
16.		6.87
17.		5.52
18.		5.41
19.		5.70
Mean	4.39	5.26
± S. E.	0.81	0.23

Statisticaly: Not significant between male and female

ACTH 活性は 15 分後になお高値に達し, 60 分後, 120 分後にその高値が持続する. 一方 Corticosterone は 2 分 30 秒目にはまだ上昇が認められないが, 15 分後に最高値に達し, 同様に高値が持続している. 一方 RNA 含量は前置の $4.29\mu\text{g}/\text{mg}$ が 60 分後には $7.15\mu\text{g}/\text{mg}$, 120 分後には $5.80\mu\text{g}/\text{mg}$ と何れも有意に増加を認めた.

結果は Fig. 3, Table 3 に示した.

Table 2. Changes of pituitary RNA content after ether vapour $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue

	before	15min.	60min.	120min.
	4.68 ±0.34	5.68 ±0.38	6.24 * ¹ ±0.17	6.17 * ² ±0.88
Exp. No.	5	5	4	4

*¹ $p<0.01$ *² $p<0.02$

Fig. 3. Effect of laparotomy on plasma ACTH and plasma corticosterone

Table 3. Changes of pituitary RNA content after laparotomy $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue

	before	2.5min.	15min.	60min.	120min.
	4.29 ± 0.22	5.68 ± 0.57	6.00	7.15 * ¹ ± 0.46	5.80 * ² ± 0.47
Exp. No.	5	6	2	5	6

*¹ $p < 0.01$ *² $p < 0.05$

Fig. 4. Effect of Lys-8-Vasopressin (100mU/100gm i.v.) on plasma ACTH and plasma corticosterone

Table 4. Change of pituitary RNA content after Lys-8-Vasopressin (100mU/100 gmi.v.) $\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue

	before	2.5min.	60min.
	3.75 ± 0.02	4.55 ± 0.37	5.22 * ± 0.81
Exp. No.	5	4	5

* slightly significant

(3): Lys-8-Vasopressin-Administrations

Pentobarbital-Na (5mg/100gm) を腹腔内投与後15分目に、Lys-8-Vasopressin (100mU/100gm) を尾静脈より投与し、2分30秒、7分、15分、30分、60分目の ACTH 活性と Corticosterone、並びに2分30秒、60分目の RNA を測定した。ACTH 活性、並びに Corticosterone は Fig. 4 より明らかな様にまず著明な ACTH 活性の上昇が認められ、遅れて Corticosterone の上昇が認められる。ACTH 活性は30分後には前値に復する。一方 RNA 含量は Table 4 に示した如く前値の $3.75 \mu\text{g}/\text{mg}$ から60分後に $5.22 \mu\text{g}/\text{mg}$ と推計学的にはそれ程有意ではないが増加の傾向が認められた。

(4): Ether-Laparotomy-Stimulus

この場合の刺激負荷方法は、Ether 麻酔後直ちに開腹し、腹膜に切開が及んだ後再び直ちに縫合して放置し、2時間後に断頭殺したものである。Ether Vapour 単独負荷では、Fig. 2 で示した様に60分後にすでに ACTH 活性、Corticosterone 値は前値に復している状態である。又 Laparotomy 単独負荷の場合と異なり、切開部位を直ちに縫合して腹腔内容が直接空気へ曝露されない条件下である。Table 5 に示した如く、

ACTH 活性は Control に比してまだ増加の傾向にあり, Corticosterone は著明に増加している. 一方 RNA 含量も前値の $4.68\mu\text{g}/\text{mg}$ より 2 時間後には $6.54\mu\text{g}/\text{mg}$ と推計学的に有意に増加を認めた.

(5) : Bell-Ringing-Stimulus

白鼠のケージ内に大型ベルを入れた状態で 30 分間放置した群を Control とし, そのベルを間歇的に 30 分間ならしたものを刺激群とした. 即ち 30 分間ベルをならした後直ちに断頭殺した場合であるが, Table 6 に示した如く, ACTH 活性, Corticosterone はいずれも有意の増加を認め, 一方 RNA 含量も Control の $4.69\mu\text{g}/\text{mg}$ から $6.13\mu\text{g}/\text{mg}$ とやはり有意に増加を認めた.

Table 5. Effect of 2 hours after ether-laparotomy on pituitary RNA, plasma ACTH and plasma corticosterone

	Exp. No.	Pituitary RNA $\mu\text{g}/\text{mg}$	Plasma ACTH $\mu\text{g}/\text{gm}/\text{ml}$	Plasma corticosterone $\mu\text{g}/\text{dl}$
Control mean $\pm$ S.E.	5	4.68 ± 0.34	20.82 ± 1.90	51.2 ± 1.60
Ether-Lap. mean $\pm$ S.E.	6	6.54 * ± 0.72	30.72 ± 3.91	81.9 * ± 5.75

* $P < 0.01$

Table 6. Effect of bell-ringing on pituitary RNA, plasma ACTH and plasma corticosterone
(Intermittent bell-ringing was continued for 30 minutes)

	Exp. No.	Pituitary RNA $\mu\text{g}/\text{mg}$	Plasma ACTH $\mu\text{g}/\text{gm}/\text{ml}$	Plasma corticosterone $\mu\text{g}/\text{dl}$
Control mean $\pm$ S.E.	6	4.69 ± 0.64	17.34 ± 1.13	27.80 ± 3.83
Bell ringing mean $\pm$ S.E.	6	6.13 * ¹ ± 0.38	34.99 * ² ± 3.89	88.30 * ² ± 11.45

*¹ $P < 0.05$ *² $P < 0.01$

4) 考 按

急激な外部環境変化に適応して下垂体からの急峻な ACTH 放出が起こる事は, Verniko-Dannelis³⁾, 老根⁴⁾等によりすでに報告されている. この下垂体前葉からの ACTH 放出現象に, 下垂体内での ACTH 合成が関与しているのかどうか, 或は関与しているならばどの時期に関与しているのか等の問題に関して現在未解決である. 諸家は蛋白合成阻害剤を前処置した条件下で acute-Stimulus を負荷したり¹⁰⁾, 或はアミノ酸に Radio Isotope を labell したものを前投与した後に acute-Stimulus を加え, そのアミノ酸の下垂体内 ACTH 分画への incorporation の変化の解析¹¹⁾をしたりすることによつて, この acute-Stimulus の状態下での“分泌”の背景の“合成”を問題として取上げている. この事は帰納的にいえば, 内因性の CRF が単なる放出因子なのか, 或は合成にも関与する因子なのかという点に連続するものである. 即ち acute-Stimulus 負荷短時間後に視床下部中央隆起部の内因性 CRF の活性が著増する⁴⁾⁵⁾が, 一方その様な条件下でやはり迅速に血漿中 ACTH 活性の上昇が認められ, 引続いて血漿中 Corticosterone の上昇が認められる. その様な連続せる反応様式の中で下垂体内の ACTH にも何等かの変化が来るであろうと推測されるのは当然である. その変化を“合成”の問題の level で捕えるには下垂体内での ACTH の存在形式¹²⁾¹³⁾に焦点を当てるべきだと思われる. 著者等の指標の一つとして採用した RNA は, いう迄もなく蛋白合成機転の

核となるものであり、従つてその増加は蛋白合成機転亢進を意味する事も又自明である。しかしながら刺激負荷後の一定時間後に上昇した RNA-level をみたとしても、これがたとえ血漿中 ACTH、血漿中 Corticosterone の上昇に連続している変化であつても、それが直ちに下垂体内での ACTH 合成の増加を意味すると断定しうる特異性はない。Estep 等¹⁰⁾も ^{14}C -Valine を投与した直後に Laparotomy-Stimulus を負荷し、刺激後30分、60分、120分の各時点で下垂体前葉の T.C.A. precipitate 群への ^{14}C -Valine の incorporation を観察し、時間の経過と共に incorporation の増加が認められる事を述べ、ACTH 合成の断面を捕え得た事を報告している。著者らの実験でも、用いられた諸種の刺激負荷後、60分目に下垂体内前葉 RNA が最高となつている。Ether-Stimulus、或は Lys-8-Vasopressin 投与等の場合の様に血漿中 ACTH 活性が負荷後早期に上昇するが短時間内に前値に復するパターンをとる場合には、ACTH 活性が上昇している時期に RNA の増量は認められず、遅れて増加を来す。一方 Ether-Laparotomy 後2時間目、Bell-30分間負荷後、Pentobarbital-Laparotomy 後60分目というように刺激がある時間連続的に負荷されている状態では ACTH 活性は持続的な上昇を来し、血漿中 ACTH 活性が高値である時期に RNA が増加している。刺激負荷の方法によつて下垂体からの ACTH の放出パターンに差があり、従つて下垂体内での ACTH の動員の様式にも差があると推察されるが、RNA の増加がある一定時間後でないとも認められないということは興味ある点である。即ち刺激負荷後、その刺激によつて動員された内因性 CRF が直接下垂体内 RNA の増量の方に作用したとするよりは、動員された内因性 CRF がまず下垂体からの biological active な ACTH の放出に作用し、RNA が増加するのはこの放出の結果二次的に起こる現象と解される。

ACTH の放出現象があれば、それに相応した合成機序の関与があつて下垂体内での ACTH に平衡関係が成立している事は当然考えられる。しかしその機序の解明の為にまずなされねばならぬ事は下垂体内での ACTH の存在形式の研究であらう。

5) 結 び

Wistar 系白鼠を用いて、下垂体前葉内 RNA 含量と血漿中 ACTH 活性の変動を諸種の acute-Stimulus 負荷後について検討した。

- i) 下垂体前葉内 RNA 含量の雌雄差は統計学的には有意でないが、雌の方がやや多い。
- ii) Ether Vapour, Laparotomy, Ether-Laparotomy, Bell-Ringing, Lys-8-Vasopressin 等の acute-Stimulus によつて下垂体前葉内 RNA は負荷後早期には上昇せず、60分目に最高値をとる。
- iii) 刺激負荷によつて動員された視床下部内 CRF は下垂体前葉よりの ACTH 放出に作用する事が第一義的であり、下垂体前葉内 RNA の増量はその結果として起こる現象と解釈した。
- iv) Ether Vapour 1分負荷、Lys-8-Vasopressin 投与等では血漿中 ACTH は一過性に上昇し、連続して血漿中 Corticosterone も同様に一過性に上昇し、短時間内に前値に復するが、Laparotomy 負荷、或は Bell-Ringing 30分間負荷等では持続せる ACTH 活性の上昇が認められる。刺激負荷の方法によつて ACTH の放出のパターンに差があると推察された。

(本論文の要旨は第7回日本医学会シンポジウム (於：盛岡：1968. 7) に於て著者の一人によつて発表された。)

文 献

- 1) HESS, M. et al : Pro. Soc. Exp. Biol. & Med., 106 : 420. (1961.)
- 2) KRAICER, J. et al. : Am. J. of Physiology, 214 : 158, (1968).
- 3) VERNIKOS-DANELIS, J. : Endocrinology, 72 : 574, (1963).
- 4) 老初宗忠 : 日本内分泌学会雑誌掲載予定.
- 5) 広重 力 : 第17回日本医学会学術講演集, III : 318, (1967).
- 6) SCH NEIDER, W.C. : J.B.C., 164 : 747, (1946).
- 7) 安井博和 : 日本内分泌学会雑誌, 41 : 643, (1965).
- 8) 辻, 安井等 : 総合臨床, 17 : 742, (1968).
- 9) DeMOOR, P. et al : Acta Endocrinologica, 33 : 297, (1960).
- 10) ESTEP, H. et al : Endocrinology, 80 : 719, (1967).
- 11) JACOBOWITZ, D. et al : Endocrinology, 72 : 592, (1963).
- 12) CURRIE, A.R. et al : Acta Endocrinologica, 42 : 69, (1963).
- 13) DASGUPTA, P.R. et al : Acta Endocrinologica, 53 : 31, (1967).