In Vivo Studies on the Mode of Action of LH

N. OHSAWA

Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki and the Third Department of
Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

The mode of action of LH on testosterone biosynthesis in male rats and mice has been studied in vivo. In rat's experiments, testicular vein blood was collected and testosterone in the plasma was measured by fluorometry of Ohsawa et al (1969). After intravenous administration of LH testosterone output started to increase within three minutes and reached the maximum level in ten minutes. Thus, the effect of LH on testosterone secretion from rat's testis has been revealed to be quite rapid, like the effect of ACTH on adrenal cortex. The similar results have been obtained in mice. After intratesticular injection of LH, the content of testosterone in mouse testis started to increase within three minutes and reached the plateau in ten minutes.

Cyclic-3', 5' AMP, proposed mediator of action of LH in the Leydig cell, has been tested in the same assay system as described above, concerning the capacity of stimulation of testosterone synthesis in the male animals. Administration of cyclic AMP caused a prompt and significant increase in testosterone production in testes of both specieses. Cyclic AMP apparently mimics the action of LH.

Inhibitors of protein and nucleic acid synthesis have also been tested in the same system. Cytosine-arabioside, an inhibitor of DNA synthesis, and actinomycin D, an inhibitor of m-RNA synthesis, have been shown to have no influence on the action of LH on testosterone synthesis. On the contrary, cycloheximide, a known inhibitor of protein synthesis, completely blocks the steroidgenic activity of LH as well as cyclic AMP. From these results, it is postulated that LH exerts its action on the testosterone biosynthesis through the formation of cyclic AMP, followed by rapid synthesis of unknown regulator protein.

(See pp. 645~653)

シンポジウム I ホルモンの作用機序

6. LH の作用機序に関する研究

— in vivo における c-AMP 説の検討 —

実験動物中央研究所, 東大第三内科

大 沢 伸 昭

I 緒 言

LH の作用機序の研究において in vitro の成績は多くみられるが, in vivo の検討は少なく, 殊に睾丸の testosterone 合成におよぼす作用に関しては Eik-Nés ら¹⁾のイヌを用いる成績以外みるべきものがない現状である. その主要な原因の一つは, 小動物(ラット, マウス)を用いて LH の作用を手軽に検定しうる系がないためと考えられる. 今回の報告においては, 雄ラットおよびマウスを用いる新しい LH の作用の検定方法の開発と, これを用いての LH の作用機序の研究, 特にその作用伝達物質と想定される c-AMP

Table 1. Bioassay of LH

1. Rat Ventral Prostate Weight	Greep	1942
2. Rat Ovarian Hyperemia	Farris	1946
3. Weaver Finch	Witschi	1955
4. Rat Ovarian Ascorbic Acid Depletion	Parlow	1958
5. Rat Super Ovulation	Zarrow	1958
6. Rat Ovarian Cholesterol Depletion	Bell	1964
7. Rat Testicular Vein Plasma Testosterone	Ohsawa	1969
8. Mouse Testicular Testosterone	Ohsawa	1969

を中心として検討した成績を述べる.

II ラットおよびマウスの睾丸の testosterone 合成並びに分泌を指標とする LH の作用の検定方法

従来の LH の生物検定法は LH の作用の間接効果(例えば Rat Ventral Prostate Weight Method)あるいは意義の不明な作用(Rat Ovarian Ascorbic Acid Depletion Method)を指標としたものが多い(Table 1). LH の睾丸に対する直接的, 本質的作用は Leydig 細胞を刺激し, cholesterol から睾丸性 androgen (主として testosterone) の合成を促進する処にある (Fig. 1). 我々はこの点に注目しラットおよびマウスの睾丸における testosterone₂ の

Fig. 1. Effect of LH on Testosterone Biosynthesis.

合成分泌を指標とする新しい LH の生物検定法を開発した。

- a) ラットの睪丸静脈血中 testosterone を指標とする LH 検定法 (rat testicular vein blood testosterone method)²⁾

この方法は ACTH における Lipscomb-Nelson 法 (rat adrenal vein blood corticosterone method) に相当するものである。ラットは SD 系の雄、生後 13W 以上のものを用いた。この方法の開発のためには睪丸静脈血の採取法と testosterone 測定法が確立される必要がある。Fig. 2 は我々のラット睪丸静脈血採

Fig. 2. Method for Collection of Testicular Vein Blood of Rats.

取法を示したものである。全身にヘパリン投与後睪丸の上極の部分で左右の静脈の合する点に小切開をほどこし、あふれ出る血液を吸引する。この方法では従来数十分を要していた採血に比し3分間に0.5ml以上の睪丸静脈血の採取が容易であり、従って経時的変化を追及するのに適している。

Table 2 は rat testicular vein blood testosterone method の flow chart である。LH を静注投与一定時間(10分)後3分間睪丸静脈血液を採取、plasma を分離する。plasma 中の testosterone は Table 3 に示す如き、我々が開発した testosterone の赤色硫酸螢光を応用する方法で測定する。(詳細はすでに発表した³⁾)。全操作は一日で行なうことが出来る。

Fig. 3 は NIH-LH-S5 30 μ g を静注投与後のラット睪丸静脈血中 testosterone 濃度の経時的変動を示したものである。一群は5匹平均で、平均値と SE を示す。以下の表も同様である。LH に対するラット睪丸の反応は極めて速かで投与3分後にはすでに testosterone の分泌増加が認められ、10分後には plateau に達する。Fig. 4 は比較のために ACTH に対する副腎の反応を示したものである。下垂体摘出ラットに ACTH 10mU を静注すると数分後に副腎静脈血中の corticosterone の分泌が増加し5~10分後に plateau

Table 2. Bioassay of LH

(rat testicular vein blood testosterone method)	
Treatment	Timing (Min.)
1. Pentobarbital ip.	-15
2. LH or test solution, iv.	0
3. Laparotomy	8
4. Heparin iv.	9
5. Start of collection of testicular vein blood	10
6. End of collection of testicular vein blood	13
7. Plasma subjected to fluorometry	

Table 3. Fluorometry of Testosterone in Rat Testicular Vein Plasma

1. 0.1ml Plasma	} Shaken in 15seconds. Separated by centrifugation.
0.9ml H ₂ O	
0.1ml 0.25N NaOH	
10.0ml CH ₂ Cl	
2. 9.0ml CH ₂ Cl ₂ evaporated to dryness	
3. TLC (Benzene : Ethyl Acetate, 1 : 1)	
4. Testosterone fraction eluted with CH ₃ OH	
5. CH ₃ OH evaporated to dryness	
6. Extracts subjected to fluorometry	
Excitation W.L. 595m μ	
Emitted W.L. 620m μ	

Fig. 3. Changes in testosterone levels in testicular vein blood of rats after intravenous injection of LH.

に達することはよく知られている⁴⁾. LH の作用がこの様に ACTH と全く同様極めて速かであることは, LH の作用機序を検討する際にこの迅速性を説明しうる仮説を立てる必要があることを意味している. 又 LH と ACTH の作用の pattern が極めて類似していることは両者の作用機序が同様の機構を有することを示唆し, 従つて ACTH の作用機序の研究が LH の研究に極めて参考になると考えられる.

Fig. 5 はこの rat testicular blood testosterone method を LH の bioassay に用いた場合の dose-response curve を示したものである. LH 0.25 μ g ~2 μ g の間で standard curve を得る. Fig. 6 は

LH 投与時の睪丸の流血量の増加を示したものである. 卵巣の流血量が LH により増加することは良く知られて居るが睪丸においても同様であることが示された. この機序に関しては, ACTH の副腎流血量増加

Fig. 4. Changes in corticosterone output in adrenal vein blood of rat after intravenous injection of ACTH.

Fig. 5. Dose-response relationship between LH and testosterone output in rat testicular vein blood.

Fig. 6. Effect of LH on rat's testicular plasma flow.

作用の機序と同様に adenosine 仮説が成立し得るか否か検討中である。

b) マウス睪丸中 testosterone を指標とする LH の検定法 (mouse testicular testosterone method)⁵⁾

上述のラットの方法は LH の作用の検定系として優れたものであるが、感度および睪丸静脈血の採取の困難さの点で routine の検定法としては問題があり、マウスを用いる方法が開発された。即ちマウスに LH を投与後睪丸を摘出し、その中の testosterone を測定する。この際 LH の投与方法として全身投与の代りに睪丸内へ直接注入する局所投与方法を採用することにより、著しく感度が上昇した。ラットおよびマウスの睪丸の循環系は、動脈が睪丸の中心を走り、これから四方へ血液が拡散して周囲の被膜下へ達すると静脈が集めて testicular vein となる。従つて睪丸中へ LH を microsyringe で注入すると血液の自然の流れに沿つて四方へ拡散するため、丁度動脈へ投与したと同じ効果をうる事が出来る利点がある。

Table 4 は mouse testicular testosterone method の術式を示したものである。マウスは生後 13W 以上の ICR-JCL 系の雄を用いた LH を 10μl の溶液とし、microsyringe で右の睪丸内へ注入し、10~15 分後その睪丸を摘出し、その中の testosterone を測定する。睪丸 homogenate 中の testosterone の測定には前述の睪丸静脈血中 testosterone の測定法を改変して用いる。即ち混入する大量の sterol を除くため抽出後、石油エーテル/70%メタノール間の分配操作を挿入する。必要に応じ、acetylation および TLC 操作を加える。それ以外はほぼ同様である。

Table 4. Bioassay of LH

(mouse testicular testosterone method)	
Treatment	Timing (Min.)
1. Pentbarbital ip.	- 15
2. Laparotomy, Exposure of r. Testis	- 3
3. Injection of 10μl of LH or Test Solution into r. Testis with Microsyringe	0
4. Removal of r. Testis	15
5. Homogenate of r. Testis subjected to Fluorometry for Testosterone	

Fig. 7. Changes in testosterone content in mouse testis after intratesticular administration of LH.

Fig. 8. Dose-response relationship between LH and testosterone content in mouse testis.

Fig. 9. Dose-response relationship between LH and testosterone content in mouse testis.

Fig. 7 は NIH-LH-S5 $0.1\mu\text{g}$ をマウス辜丸内へ投与した際の辜丸中 testosterone 量の経時的变化を図示したものである。ラットの成績と同じく, testosterone の合成は LH 投与後 3 分で増加が証明され, 10 分で maximum に達する。即ちマウスにおいても LH の作用は極めて速であることが明らかである。

Fig. 8 はこの mouse testicular testosterone method を LH の bioassay に用いた際の dose response curve を示したものである。 $0.1\sim 2.0\mu\text{g}(\text{ng})$ の LH が検出する可能性が認められる。Fig. 9 は同様 LH の bioassay に用いた際に LH を注入した側と, その反対側(対照側)の辜丸中の testosterone 量を比較したものである。投与側の辜丸は $1.0\mu\text{g}$ の LH で十分な反応を示して居る。反対側の辜丸は $100\mu\text{g}$ の LH で反応を示すのが認められる。この反対側の辜丸の反応は, 投与された LH が全身循環にとりこまれた効果と考えられる。辜丸内注入側の検出感度が 100 倍高いことは, 局所投与の有用性を明らかに示すものと考えられる。この mouse testicular testosterone method は現在尚検討中であるが, 完成した際には従来の LH の bioassay の 100~1000 倍高感度の方法が得られることが期待される。又この方法を LH 以外の物質の作用の検討に応用する際に, 微量で反応を証明し得ると共に, 全身循環にとりこまれた場合副作用の出現する物質(例えば c-AMP, 核酸・蛋白合成阻害剤など)においても微量で有効なため, 全身に対する

副作用の心配なく実験を行ないという利点がある。

III LH の作用機序仮説-c-AMP 説

LH が睪丸の Leydig 細胞に作用して testosterone の合成分泌を促進する機構として、LH が細胞内へ入らず、細胞膜の特定部位 (receptor ?) と結合して作用をおよぼすと考えられている。従つて LH が Leydig 細胞内での testosterone 合成を調節するためには細胞内部においてその情報を伝達する mediator が必要である。この mediator として現在注目をあびているのが Cyclic 3',5'-AMP である⁹⁾。即ち Fig. 10 に示される如く、LH は Leydig 細胞の膜において adenylyl cyclase の活性を増強する結果、ATP からの c-AMP 産生が増加し、これが何等かの機構を介して cholesterol から pregnenolone への転換を促進することにより testosterone 合成を増強するとされる。

更に最近 in vitro の研究において、ACTH の作用機構と同様に c-AMP が仮想の作用蛋白 (regulator protein) の産生を促進し、これを介して testosterone 合成を調節するといわれている。我々はこの仮説について、上述のラットおよびマウスを用いる LH の検定法を応用して検討中であるが、今回は予備的成績として 1) c-AMP の効果 2) 核酸・蛋白質合成阻害剤の効果についての成績を述べる。

IV c-AMP の in vivo における testosterone 合成促進効果

まず c-AMP が LH の testosterone 合成促進効果を mimic するか否かを検討した。Fig. 11 はラットに c-AMP 0.1mg および 5 mg を睪丸内注入し、10分後の睪丸静脈血中 testosterone 濃度を測定した成績で c-AMP 5mg の投与で増加が認められる(各群は 4 乃至 5 匹よりなる。以下同様)。Fig. 12 はその際の睪丸内の testosterone 含有量の成績を示すが、同様に c-AMP による増加が認められる。Fig. 13 はマウス

Fig. 10. Proposed mode of action of LH on testosterone biosynthesis.

Fig. 12. Effect of c-AMP on Testosterone Synthesis in Rat's Testis.

Fig. 11. Effect of c-AMP on testosterone secretion in rat.

Fig. 13. Effect of C-AMP on Testosterone Synthesis in Mouse Testis.

において c-AMP を睪丸内に投与した際の testosterone 含有量の変動を示したもので、 $0.1\mu\text{g}$ の c-AMP で有意の testosterone 増加が認められる。この際の睪丸組織内の c-AMP 濃度はマウスの睪丸重量が 100mg 程度として 10^{-6}M 程度の final concentration と推定される。ラットとマウスの間で c-AMP に対する睪丸の反応の強さに大きな差の認められる理由は不明であり、現在検討中である。

Fig. 14 はマウスにおいて c-AMP $1\mu\text{g}$ を睪丸内へ注入した際の睪丸内 testosterone 含有量の時間的変動を示したものである。LH より少しおくれるが、c-AMP 投与後速やかな testosterone 合成の促進が認められる。

以上の成績から c-AMP は LH と同様極めて速かにラットおよびマウスの睪丸における testosterone の合成を促進することが in vivo の実験から想定される。

Fig. 14. Changes in testosterone content in mouse testis after intratesticular administration of c-AMP.

V 核酸および蛋白合成阻害剤の testosterone 合成に及ぼす効果

次に LH の睪丸における testosterone 合成促進作用が、ACTH の如く、c-AMP を第1の mediator とし、次いで作用蛋白 (regulator protein) の合成を介して発揮されるか否かを検討するために、核酸及び蛋白の合成阻害剤の LH の testosterone 合成促進作用に及ぼす効果を検討した。一般に蛋白の新しい合成の際には DNA の合成、m-RNA の transcription の促進を介して ribosome において蛋白合成が促進される。この各 step の阻害剤として DNA 合成に対し Cytosine-Arabinoside、m-RNA の transcription に対し Actinomycin D、ribosome における protein 合成に対し Cycloheximide を検討した (Table 5)。

Fig. 15 は Cytosine-Arabinoside $100\mu\text{g}$ をマウスに静注投与し DNA の合成を抑制したと考えられる状態で10分後に LH $1\mu\text{g}$ を睪丸内に投与し、睪丸中の testosterone 合成を検討した成績を示す。図にみられ

Table 5. Site of Action of Inhibitors

DNA	Cytosine-Arabinoside
m-RNA	Actinomycin D
Protein Synthesis	Cycloheximide

Fig. 15. Effect of Cytosine-arabinoside on Testosterone Synthesis in mouse Testis.

Fig. 16. Effect of Actinomycin D on Testosterone Synthesis in Mouse Testis.

るごとく Cytosine-Arabinoside は LH の作用を阻害しないことが認められる。Fig. 16 は Actinomycin D 0.3mg を腹腔内に投与、1 時間半に LH 1 μ g を睾丸内に投与し、睾丸中の testosterone 合成を検討した成績を示すが、Actinomycin D により m-RNA の transcription が抑制されたと想定される状態でも LH の作用は阻害をうけない。以上の成績から LH の急性の効果の際に新しい核酸合成は必要でない可能性が示唆される。又核酸合成を介する蛋白の合成の際には数十分の lag time を要するが、LH の testosterone 合成促進作用は前述の如く極めて速かである点からもこの機序が関与している可能性は少ないと考えられる。

Fig. 17. Effect of Cycloheximide on Testosterone Synthesis in Mouse Testis.

Fig. 18. Effect of Cycloheximide on c-AMP induced Testosterone Synthesis in Mouse Testis.

此に反し蛋白合成阻害剤である Cycloheximide 100 μ g を睾丸内に注入し、投与30分後に testosterone 合成能を検討した結果、Fig. 17にみられる如く resting level の testosterone 合成を抑制すると同時に LH の testosterone 合成促進作用も阻害するのが認められた。Cycloheximide 1mg を全身に投与しても同様な成績が得られた。更に Cycloheximide の投与は c-AMP の testosterone 合成促進作用も阻害するのが認められた (Fig. 18)。以上の成績から LH の作用機序として Fig. 10 に示された如く、c-AMP の合成を促進し、この c-AMP が核酸合成を介せず、turn over の速かな regulator protein の合成を介して testosterone 合成を促進するという機構の存在の可能性が示唆される。然しながらこれら阻害物質を用いる実験は、それが目的以外の種々の作用を有する可能性があり、従つて以上の成績はあくまで予備的なものであり、今後の詳細な検討を必要とする。

VI 結 語

以上我々は LH の作用機序に関する研究成果を報告したが、要約すると次の通りである。

- 1) 我々はラットおよびマウスにおいて睾丸の testosterone 合成分泌を指標とする新しく、特異的な LH の生物検定法 (rat testicular vein blood testosterone method および mouse testicular testosterone method) を開発し、これを用いて in vivo における LH の作用機序を検討した。
- 2) LH の testosterone 合成促進効果は極めて速かで、ACTH の副胃に対する作用と酷似して居り、従つて LH の作用機序の研究に ACTH の作用機序の研究が極めて参考になることが判明した。
- 3) LH の作用機序として Leidig 細胞における c-AMP の産成促進、c-AMP による turn over の速かな作用蛋白の新生、それに引続く testosterone 合成の促進という仮説と両立しうる予備的実験成績が得られた。
- 4) 今後、この検定系を用いて LH の作用機序の in vivo における検討をつづけたいと考える。

終りに本 symposium 参加の機会を与えられた西川光夫会長、座長の山村雄一、宇井信生両教授に感謝すると共に御指導、御鞭達をいただいた東大中尾教授、井林博士に深謝致します、又協同研究者の影山喜世子

研究員補の労を多と致します。

主 要 文 献

- 1) EIK-NES, K.B. : Endocrinology of the Testis. Colloquia on Endocrinology Vol. 16, P120, J. & A. Churchill Ltd, London (1967).
- 2) 大沢仲昭ほか : 昭和44年6月内分泌学会東部部会例会発表.
- 3) 大沢仲昭ほか : 日本内分泌学会誌, 45 : 516, (1969).
- 4) LIPSCOMB, H.S. and D.H. NELSON : Endocrinology 71 : 13, (1962).
- 5) 大沢仲昭ほか : 第17回日本内分泌学会東部部会総会発表, (1969).
- 6) SUTHERLAND, E.W. et al. : Recent Progress in Hormone Research 21 : 623, (1965).