オスラットの血中, および下垂体組織中 FSH, LH, Prolactin値におよぼす Ferulic acidの作用

(東京医科歯科大学難治疾患研究所, 内分泌異常部門)

岡 本 良 平, 坂 本 忍

(東京都立墨田産院)

野 口 邦 夫

Effects of Ferulic Acid on FSH, LH and Prolactin Levels in Serum and Pituitary Tissue of Male Rats

Ryohei OKAMOTO¹, Shinobu SAKAMOTO¹ and Kunio NOGUCHI²

¹Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University,
Tokyo 113, Japan

²Metropolitan Sumida Lying-in Hospital

The existence of substances in corn germ, which induce a positive response in pigeon crop test, has been previously reported by Okamoto and Takahashi in 1974. Following this first experiment, one of these substances was identified as ferulic acid by purification. In the present experiment FSH, LH and prolactin levels in the serum and the pituitary tissue of castrated male rats and EP (estradiol benzoate and progesterone) treated male rats were determined by radioimmunoassay at 5 to 180 min. after intravenous injection with 1 mg of ferulic acid. It was noted that FSH release only was promoted significantly at 5 min. after the injection, whereas LH and prolactin releases were inhibited at 5 to 10 min. after the injection. A rebound effect was noted in LH and prolactin releases after the injection.

緒 言

とうもろこし胚芽中にハト嚔囊腺を刺激して嚔乳の分泌を促す物質の存在することは, さきに岡本, 高橋⁽¹⁾が報告した. その後小林, 岡本ら⁽²⁾はこの物質の抽出を試み, その中の一つがFerulic acid (以下F-酸)であることを同定した. 今回はF-酸1mgを去勢, あるいはEP処置のオスラットに静注し, その血中および下垂体組織中FSH, LH, prolactin 値におよぼす影響をradioimmunoassay によって観察した.

実験材料および方法

実験動物としては若い成熟のオスSprague Dawleyラットを用い, 各例5匹づつとした. FSH, LH 測定用ラットでは生後40~45日で去勢し, 去勢後30日を経て実験に供した. またprolactin 測定用ラットの場合

は毎日 estradiol benzoate 1mg と progesterone 10mg を 3 日間注射し, 4 日目に実験を行った。麻酔は urethane ethylcarbamate (150mg/100g 体重) を腹腔内に注射して行い, 麻酔後 2 時間を経てから実験を開始した。

F-酸はその 1mg を 0.5ml の食塩水に溶解して頸静脈内に注射し, 注射前および注射後 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分を経てそれぞれ断頭により血液を採取した。採取した血液は直ちに 4℃ で遠沈し, 血漿は測定時まで -20℃ で保存した。下垂体は摘出後直ちに秤量, 下垂体 10mg/ml の $\text{NaCO}_3\text{--Na}_2\text{CO}_3$ buffer (0.05M, pH 10) 中でホモジナイズしたのち, その 25 μl に 2ml の同じ buffer を加え 1000 $\times$ g で 30 分間遠沈した。さらにその 25 μl に 2ml の 1% BSA-phosphosaline buffer (pH 7.6) を加えて攪拌し, 測定時まで -20℃ で保存した。

radioimmunoassay には NIAMDD (National Institute of Arthritis, Metabolism and Digestive Diseases Rat pituitary Hormone Distribution Program) 提供の Kit を用いその指示通りに行った。すべて測定は 2 回行い, 値は ng/ml で表わしたのち, student t-test によって有意差の有無を検討した。

Table 1. FSH, LH and prolactin content in serum and pituitary tissue of male rat after ferulic acid injection

Hormone Min. after injection		F S H (ng/ml)		L H (ng/ml)		Prolactin (ng/ml)	
Serum	-5'	1475 $\pm$ 127.3		662 $\pm$ 26.5		140 $\pm$ 10.43	
	0'	1470 $\pm$ 130.5		662 $\pm$ 26.5		141 $\pm$ 9.51	
	5'	3000 $\pm$ 107.5	P<0.05	240 $\pm$ 14.15	P<0.05	110 $\pm$ 7.84	
	10'	600 $\pm$ 63.2	P<0.05	135 $\pm$ 28.75	P<0.05	64.7 $\pm$ 13.75	P<0.05
	20'	500 $\pm$ 44.5	P<0.05	160 $\pm$ 21.3	P<0.05	145 $\pm$ 16.80	
	30'	1850 $\pm$ 182.2		145 $\pm$ 10.60	P<0.05	140 $\pm$ 10.13	
	60'	1025 $\pm$ 134.6		195 $\pm$ 3.54	P<0.05	200 $\pm$ 13.28	
	90'	725 $\pm$ 95.2		600 $\pm$ 37.5		125 $\pm$ 7.87	
	120'	1250 $\pm$ 102.5		950 $\pm$ 51.27		140 $\pm$ 15.41	
	150'					200 $\pm$ 16.28	
	180'					205 $\pm$ 19.82	
Pituitary	-5'	900 $\pm$ 70.3		210 $\pm$ 31.8		30.0 $\pm$ 1.65	
	0'	905 $\pm$ 65.3		215 $\pm$ 30.5		30.1 $\pm$ 1.65	
	5'	525 $\pm$ 34.0		60.0 $\pm$ 5.30		24.5 $\pm$ 0.63	
	10'	550 $\pm$ 25.2		108 $\pm$ 7.08		19.0 $\pm$ 0.48	
	20'	1200 $\pm$ 93.4		200 $\pm$ 33.25		20.6 $\pm$ 0.74	
	30'	205 $\pm$ 13.5	P<0.05	295 $\pm$ 8.85		22.5 $\pm$ 1.22	
	60'	950 $\pm$ 24.3		200 $\pm$ 17.68		26.25 $\pm$ 1.12	
	90'	1450 $\pm$ 70.3		155 $\pm$ 17.7		23.50 $\pm$ 1.35	
	120'	725 $\pm$ 37.8		410 $\pm$ 8.85		20.0 $\pm$ 1.18	
	150'					18.0 $\pm$ 0.78	
	180'					23.5 $\pm$ 1.17	

実験成績

1) FSH: 表1 および図1に示すように, 血中FSH値は注射後5分で $1475 \pm 127.3 \text{ ng/ml}$ から $3000 \pm 107.5 \text{ ng/ml}$ と有意の増加を示した. この値は注射後10分, 20分でそれぞれ $600 \pm 63.2 \text{ ng/ml}$, $500 \pm 44.5 \text{ ng/ml}$ と有意の減少を示し, その後有意ではないが増減し乍ら120分で $1250 \pm 102.5 \text{ ng/ml}$ と注射前の値に近く回復した. 一方下垂体中のFSH値は血中のそれと全く相反した傾向を示した. すなわち $900 \pm 70.3 \text{ ng/ml}$ から注射後5分で $525 \pm 34.0 \text{ ng/ml}$ と減少, 20分では $1200 \pm 93.4 \text{ ng/ml}$ と増加, その後血中FSH値とは逆の態度を示し乍ら増減し, 注射後120分で $725 \pm 37.8 \text{ ng/ml}$ と注射前の値に近く回復した. 下垂体FSH値の場合は30分後の減少以外推計学的な有意差は認めなかった.

Fig. 1. Effect of ferulic acid on FSH in serum and pituitary tissue of castrated male rat. Each point is the mean of 5 rats with standard error of the mean.

2) LH: 表1 および図2に示すように, 血中LH値は, 注射後5分, 10分で $240 \pm 14.15 \text{ ng/ml}$, $135 \pm 28.75 \text{ ng/ml}$ と注射前の $662 \pm 26.5 \text{ ng/ml}$ とくらべてそれぞれ有意の減少を示した. この減少は注射後60分まで続き, 90分で $600 \pm 37.5 \text{ ng/ml}$ と略注射前のレベルに回復したのち, 120分で $950 \pm 51.27 \text{ ng/ml}$ に達した. 一方下垂体中のLH値は注射後5分で $210 \pm 31.8 \text{ ng/ml}$ から $60.0 \pm 5.30 \text{ ng/ml}$ と減少, 10分, 20分と増加の傾向を示し30分で $295 \pm 8.85 \text{ ng/ml}$ に達した. さらに60分, 90分と減少したのち, 120分では $410 \pm 8.85 \text{ ng/ml}$ と注射前の値を凌駕した. しかしこの下垂体LH値の変動には推計学的な有意差を認めなかった.

オスラットの血中, および下垂体組織中 FSH, LH, Prolactin 値に
およぼす Ferulic acid の作用 (岡本, 他 2 名)

Fig. 2. Effect of ferulic acid on LH in serum and pituitary tissue of castrated male rat. Each point is the mean of 5 rats with standard error of the mean.

Fig. 3. Effect of ferulic acid on prolactin in serum and pituitary tissue of EP treated male rat. Each point is the mean of 5 rats with standard error of the mean.

3) prolactin : 表1および図3に示すように、血中 prolactin 値は注射前の $140 \pm 10.43 \text{ ng/ml}$ から注射後10分で $64.7 \pm 13.75 \text{ ng/ml}$ と有意の減少を示した。その後推計学的な有意差は認めなかったが、増減し乍ら180分では $205 \pm 19.82 \text{ ng/ml}$ と注射前の値を凌駕していた。一方下垂体中の prolactin 値は注射後10分で注射前の $30.0 \pm 1.65 \text{ ng/ml}$ から $19.0 \pm 0.48 \text{ ng/ml}$ と減少したが、その後大きな変動はなく180分では $23.5 \pm 1.17 \text{ ng/ml}$ であった。下垂体 prolactin 値の変動には推計学的な有意差は認めなかった。

考 按

血中 FSH 値は F-酸注射後5分で有意に増加し、その後増減をくり返して120分では注射前の値に近く回復した。一方下垂体中の FSH 値は有意ではないが注射後5分で減少、その後増減をくり返して矢張り120分で注射前の値近くまで回復した。両者の増減の傾向は図1にみるように経過中全く逆の傾向を示したことから、下垂体中に store された FSH が血中に放出されたものと考えられる。すなわち F-酸には FSH を放出させる作用があるのであろう。しかし LH の場合は図2にみるように、血中、下垂体中とも F-酸注射後5分で減少を認めた。下垂体中の LH 値が10分、20分、30分と増加の傾向を示したのは、F-酸によって血中への放出を抑制された LH が下垂体中に蓄積された結果と考えられる。注射後120分で血中、下垂体中とも有意ではないが、LH 値が注射前の値を凌駕していた。これは rebound による結果であらう。

1971年 Schally ら⁽³⁾⁽⁴⁾ はその精力的な実験の末、ブタの視床下部から LH-RH を分離し、decapeptide としてその構造を明らかにした。しかしこの LH-RH は LH のみでなく FSH の放出をも促すことから、Gonadotropin-Releasing Hormone ともよばれている。⁽⁵⁾ 一方 Bowers ら⁽⁶⁾ が FSH-RH 作用のない LRF 作用のみを有する tetrapeptide を合成したと述べたような報告もみることが出来る。今回の実験で F-酸のような比較的簡単な構造の化学物質を投与して FSH のみの放出をみたことは興味深い。しかし用いた量が 1 mg という大量である点、さらに dose-response の関係について今後検討しなければならない。

この実験は1974年岡本、高橋⁽¹⁾ が発表した如く、とうもろこし胚芽中にハトテスト陽性物質を認めた結果から出発している。今回のラットでの成績をみると、図3のように血中 prolactin は注射後10分で有意に減少した。すなわちハトテストの結果とは相反して prolactin の放出を抑制したと考えられる。しかしこの血中 prolactin 値には rebound の結果と考えられる増加が、注射後60分、150分、180分に有意ではないけれど認められた。ハトテストの場合は4日間の長期にわたって検体を注射し、5日目に反応をみる、その期間中にこの rebound によって増加した prolactin がハト嚙嚢腺に作用したとも考えられる。ラット下垂体中の prolactin 値には多少の変動がみられたが推計学的な有意差は認められなかった。

現在乳汁分泌を止める目的で臨床的に CB-154 以外に、 ℓ -DOPA も使われている。F-酸(4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid) はカテコールアミンの代謝産物と構造が類似している点に着目して小林、菊野⁽⁷⁾ はオスダイコネズミの腹腔内に種々の量の F-酸を注射した結果、脳内カテコールアミンが減少したと報告している。F-酸については Evenari⁽⁸⁾ が1949年に植物種子の Germination inhibitor であることを述べているが、動物に関しては上記の小林、菊野⁽⁷⁾ の報告以外みることが出来ない。

結 語

F-酸 1 mg を去勢、または EP 処置オスラットの頸静脈に注射し、radioimmunoassay によって血中および下垂体中の FSH, LH, prolactin を測定した。

1) FSH : 注射後5分で血中 FSH 値は有意に増加した。血中 FSH 値と下垂体中 FSH 値は明らかに逆の傾向を示したことから F-酸は FSH 放出を促進したと考えられた。

2) LH, prolactin : 血中 LH 値は注射後5分、血中 prolactin 値は注射後10分で有意に減少した。LH および prolactin に関しては F-酸はその分泌を抑制したと考えられた。両者ともに後に rebound による増加がみられたが、さきの実験でハトテストが陽性であったのはこの rebound による結果であらう。

謝 辞

ラット下垂体ホルモンのRIA-KITを提供して下さったNIAMDD, ならびに成石允子氏, 左雨秀治氏の技術的援助に深く感謝致します。尚本研究は文部省科学研究費がん特別研究課題番号901029および日本学術振興会課題番号5 R049の補助金の援助によりました。

文 献

- 1) 岡本良平, 高橋睦子: とうもろこし胚芽中の新物質 (嚙乳分泌物質) 第1報, 日本内分泌学会誌, 50: 5, 920-921, 1974.
- 2) Kobayashi, Y., Suzuki, K.T., Torii, Y., Yamamoto, K., Endo, T., Ohsawa, A., Kumadaki, I., Okamoto, R., Takahashi, M. and Sassa, S.: Grop Gland-Stimulating Substances in the Germ of Zea Mays L. Unpublished.
- 3) Matsuo, H., Bava, Y., Nair, R.M.G., Arimura, A. and Schally, A.V.: Structure of the Porcine LH- and FSH-Releasing Hormone, I. The Proposed Amino Acid Sequence. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43: 1334-1339, 1971.
- 4) Baba, Y., Matsuo, H. and Schally, A.V.: Structure of the Porcine LH- and FSH-Releasing hormone, II. Confirmation of the Proposed Structure by Conventional Sequential Analysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 459-463, 1971.
- 5) Schally, A.V., Arimura, A., Kastin, A.J., Matsuo, H., Baba, Y., Redding, T.W., Nair, R.M.G., Debeljuk, L. and White, W.F.: Gonadotropin-Releasing Hormone: One Polypeptide Regulates Secretion of Luteinizing and Follicle-Stimulating Hormones. Science 173: 1036-1038, 1971.
- 6) Bowers, C.Y., Chang, J-K, Sievertsson, H., Bogentoft, C., Currie, B.L. and Folkers, K.: Activity of a New Synthetic Tetrapeptide in Hypothalamic Luteinizing and Follicle Stimulating Releasing Hormone Assay Systems. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 414-421, 1971.
- 7) 小林隆子, 菊野正隆: 脳内カテコールアミン代謝におよぼすフェルラ酸の影響, 医学と生物学, 77: 6, 237-239, 1968.
- 8) Evenari, M.: Germination Inhibitors. Bot. Rev. XV: 3, 153-194, 1949.