小型霊長類, マーモセットの下垂体一副腎皮質機能

(財) 実験動物中央研究所, 内分泌研究室

鳥 居 隆 三, 宇 津 佐知子, 谷 岡 功 邦

Pituitary-Adrenal Function in the Marmoset Monkey

Ryuzo TORII, Sachiko UTSU and Yoshikuni TANIOKA

Laboratory of Endocrinology, Division of Biomedical Science,
Central Institute for Experimental Animals

It was reported previously that marmoset monkeys have extremely high plasma levels of unconjugated cortisol in resting as well as ACTH-stimulated conditions. These findings led us to investigate whether or not marmoset monkeys show the symptoms of Cushing's syndrome. Twenty-three adult marmoset monkeys (cotton topped tamarins) were used with 49 adult rhesus monkeys as controls. Serum total corticoids were measured by a competitive protein binding assay, serum aldosterone by a radioimmunoassay, and glucocorticoid receptor in the liver was determined by a radioreceptor assay.

The standard dexamethasone suppression test ($0.04 \text{ mg/kg/day} \times 2$, $0.16 \text{ mg/kg/day} \times 2$) revealed proper suppression in the rhesus monkeys but no suppression in the marmosets. The latter finding is similar to the situation observed in Cushing's syndrome in man and suggests poor suppression of pituitary ACTH by the excessive glucocorticoids. The adrenocortical histology showed hyperplasia of fasciculata and reticularis cells. The hemogram and blood chemistry in the marmoset monkeys were similar to those in the rhesus monkeys, except for hyperglycemia. The mean resting serum aldosterone level was higher than that in both man and in the rhesus monkey. No hypokalemia was found. It has been reported that marmoset monkeys show extremely high plasma levels of estrogen and progesterone without any clinical symptoms due to the excess of these hormones.

Thus, in the present experiment it was found that the pituitary-adrenocortical relationship in the marmoset monkeys seemed to be compatible with that in Cushing's syndrome in man but was not accompanied by any clinical symptoms due to excessive cortisol.

This may suggest that this unresponsiveness to cortisol in marmoset monkeys is derived from the small amount of glucocorticoid receptor and presumably from the lower function of the post receptor system.

緒 言

小型霊長類のマーモセット類は, A型肝炎ウイルス感染症の研究をはじめとする各種の生化学的研究に有用であることが知られている。我々は先に, マーモセットの血中corticoidsが, ヒトやア

カゲザルに比べ，resting levelにおいて，10～50倍の異常高値を示し，さらに血中の結合蛋白である corticosteroid binding macromolecule は，ヒトやアカゲザルの $\frac{1}{10}$ 以下と少なく，かつ血中の corticoids の大部分が遊離型で存在していることを報告した⁹⁾。今回は，この血中 corticoids の異常高値を示したマーモセットに，corticoids 作用の過剰症状が認められるのか否か，さらにヒトの両側性副腎過形成型の Cushing 症候群(以下，Cushing 症候群は，両側性副腎過形成型の Cushing 症候群を意味する)のモデル動物となり得るのか否か，詳細に検討を行なったので，その成績について報告する。

材料および方法

1) マーモセット (Cotton topped Tamarin: *Saguinus Oedipus*)

成熟マーモセットのメス20頭(体重430～540g)，オス5頭(体重440～560g)を用いた。これらは，マーモセット用固型飼料 (Science Diet for "Marmoset", Riviana Food Inc., U.S.A.) を午前11時に50g/頭，バナナまたはリンゴを午後4時に100g/頭与え，室温 $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度 $55 \pm 5\%$ ，午前7時点灯，午後7時消灯の条件下で，1～1年半の間，当研究所で飼育・維持したものである。

2) アカゲザル (Rhesus Monkey: *Macaca mulatta*)

成熟アカゲザルのメス49頭(体重3.2～7.8kg)を用いた。これらは，サル用固型飼料 (CLEA Japan Inc.) を午後4時に150～200g/頭与え，室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度 $50 \pm 5\%$ ，午前7時点灯，午後7時消灯の条件下で，3～6年間当研究所で飼育・維持したものである。

3) 採血方法

マーモセットおよびアカゲザルの採血は，いずれも飼育室内に入って2分以内に，マーモセットでは大腿静脈より，アカゲザルでは伏在静脈より，各々血液1.0～3.0ml採取，血清を分離し各種血清生化学値および各種ホルモンの測定に供した。

4) Dexamethasone 抑制試験

メスのマーモセットの3頭 (No.32: 455g, No.35: 440g, No.37: 520g) およびメスのアカゲザルの3頭 (No.67: 5.2kg, No.77: 3.5kg, No.80: 5.5kg) を用いた。Dexamethasone は，0.02mg/kg 当て，午前10時と午後4時の1日2回 (0.04mg/kg/day)，2日間連続経口投与し，続いて0.08mg/kg 当て，先と同様に1日2回 (0.16mg/kg/day)，2日間投与した。投与開始前日と，各投与の直前に採血を行ない，血清を分離し，ホルモンの測定に供した。

5) 血液化学検査

成熟メス・マーモセット7頭および成熟アカゲザルのメス26頭を用いて，以下の検査を行なった。

(1) 血液検査：赤血球数，白血球数：自動血球計算法，ヘマトクリット：マイクロヘマトクリット法，ヘモグロビン：シアンメトヘモグロビン法，網赤血球：血液塗沫法，超生体染色法，白血球百分比：血液塗沫法。

(2) 血清生化学検査：血糖：glucose-oxidase 法，総 cholesterol：Roeschlau 法，triglyceride：acetyl-acetone 法，NEFA (non-esterified fatty acid)：久城変法，alkaline phosphatase：Bessey Lowry 法，Na.K：炎光法。

6) 組織検査

成熟メス・マーモセットおよびメスのアカゲザルの副腎を摘出し，ホルマリン固定後，組織標本の作成を行なった。

7) 肝細胞質内 Glucocorticoid receptor の分析

副腎摘出した成熟メス・マーモセット2頭および無処置の成熟マーモセットのオス7頭、メス5頭の肝細胞質内 Glucocorticoid receptor の分析を、Baxter ら²⁾の方法に準じて行なった。即ち、 ^3H -Dexamethasone の $5 \times 10^{-9} \sim 10^{-7} \text{ M}$ 、および、さらに非標識 Dexamethasone を 10^{-4} M 加えたものに、 $105.000 \times \text{g}$ の上清(細胞質分画: cytosol)を加え、 2°C で90分間 incubation を行なった後、dextran coated charcoal により Bound と Free の分離を行なった。specific binding site および association constant は、Scatchard の方法⁷⁾により求めた。

8) 血中 corticoids の測定

血中 corticoids の測定は、Murphy ら⁶⁾の方法に準じた competitive protein binding assay により行なった。本法の最少検出量は 0.1 ng 、変動係数は interassay 8.5% 、intraassay 10.9% であった。

9) 血中 aldosterone の測定

血中 aldosterone の測定は、血清 3 ml を MeCl_2 15 ml にて抽出後、Sephadex LH-20 column ($1.1 \times 40 \text{ cm}$, $\text{CHCl}_3 : \text{EtOH} = 99 : 1$) により aldosterone を分離し、抗 aldosterone-3-BSA 抗血清を用いた radioimmunoassay により測定した。本法の最少検出量は 10 pg 、変動係数は interassay 7.2% 、intraassay 5.9% であった。

Fig. 1. Dexamethasone suppression test in cotton-topped tamarins.

●—● : No. 32, ●---● : No. 35, ●...● : No. 37

Fig. 2. Dexamethasone suppression test in rhesus monkeys.

●—● : No. 67, ●---● : No. 77, ●····● : No. 80

成 績

1. Dexamethasone 抑制試験 (Fig. 1&2)

Fig.1に成熟メス・マーモセット, Fig.2に成熟メス・アカゲザル, 各3頭を用いて, Dexamethasoneを0.04mg/kg/dayおよび0.16mg/kg/dayを各々2日間投与した時の, 血中corticoidsの動態を示した。両Fig.から明らかなように, アカゲザルで血中corticoidsの抑制がみられる0.04mg/kg/dayの量では, マーモセットでは, 抑制が十分でなく, 0.16mg/kg/dayの大量投与においても, なお明らかな抑制効果はみられなかった。

2. 血液化学検査 (Table 1&2)

Table 1に, メス・マーモセット7頭の血液検査値を示し, 同時に, アカゲザルおよびヒトの値を示した。Tableにみる如く, 7頭のメス・マーモセットの平均値は各々, 赤血球数558万/mm³, 白血球数14,600/mm³, ヘマトクリット48%, 網赤血球数は27%であり, 白血球像はTableに示した如くであった。このように, 赤血球および白血球数は, ヒトよりもやや高い値を示していたが, アカゲザルに比べ, 差はみられなかった。さらに, 好酸球の減少もみられなかった。ただ, 網赤血球が, アカゲザル, ヒトに比べて高い値を示していた。血清生化学値はTable 2に示した如く, 総cholesterol, triglyceride, NEFAおよびalkaline phosphataseともに, アカゲザル, ヒトと差がみられなかった。ただ, 食前血糖値が7頭いずれにおいても, アカゲザル, ヒトに比べ, 高値を示していた。

Table 1. Hematology in Female Cotton-topped Tamarin, Rhesus Monkey and Human.
 RBC: red blood cell, WBC: white blood cell, Ht: hematocrit, Hb: hemoglobin,
 Ret: reticulocyte, Ba: band form of neutrophils, Seg: segmented form of neutrophils, M: monocyte, E: eosinophils, B: basophils, L: lymphocyte

	No.	RBC ×10 ⁴	WBC	HT %	Hb g/dl	Ret ‰	Hemogram					
							Ba	Seg	M	E	B	L
Cotton-topped tamarin	1	568	12050	47	14.3	35	5	29	2	0	0	64
	2	508	11380	43	13.4	28	9	40	2	3	1	45
	3	587	13240	50	15.3	31	6	43	6	2	0	43
	4	623	13460	53	16.2	35	6	55	2	2	0	35
	5	525	17050	46	13.3	33	3	51	1	4	0	41
	6	552	19420	45	13.1	10	9	69	1	2	0	19
	7	545	15639	49	14.4	15	6	52	3	2	0	37
	mean ±S.D.	558 ±39	12683 ±6278	48 ±3.4	14.3 ±1.1	27 ±10.1	6 ±2.1	48 ±12.7	2 ±1.7	2 ±1.2	0.1 ±0.4	41 ±13.4
Rhesus monkey	(n=26)	513 ±38	14606 ±1896	40 ±2.3	12.4 ±0.6	5 ±2.8	2 ±2.5	37 ±10.3	1 ±1.3	3 ±2.5	0.5 ±0.8	57 ±11.1
Human	normal range	380~ 530	5,000~ 8,500	35~ 52	12~ 19	3~ 11	4.5	49.0	5.0	3.0	0.5	38.0

Table 2. Blood Chemistry in Female Cotton-topped Tamarin, Rhesus Monkey and Human.

	No.	Glucose (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Non-esterified fatty acid (mEq/l)	Alkaline phosphatase (BLU)
Cotton-topped tamarin	1	149	115	52	0.29	6.7
	2	181	114	64	<0.25	11.6
	3	203	82	55	<0.25	5.8
	4	152	62	52	<0.25	3.7
	5	118	167	66	<0.25	7.7
	6	162	114	54	<0.25	5.6
	7	200	97	54	<0.25	6.0
	mean ±S.D.	166 ±30.4	107 ±32.7	57 ±5.8	—	6.7 ±2.5
Rhesus monkey	normal range	55~ 108	128~ 235	23~ 63	0.23~ 0.48	2.2~ 21.1
Human	normal range	60~ 100	130~ 250	35~ 130	0.18~ 0.59	0.8~ 2.3

Fig. 3. Photomicrograph of adrenal gland in adult female cotton-topped tamarin and rhesus monkey. Hematoxylin and eosin ($\times 20$). A: Cotton-topped tamarin, B: Rhesus monkey

Fig. 4. Serum and urinary Na⁺ & K⁺ concentrations in cotton-topped tamarins.

Fig. 5. Serum aldosterone levels in cotton-topped tamarin and man.

3. 副腎の組織学的所見 (Fig. 3)

Fig.3に、成熟雌マーモセットおよび成熟雌アカゲザルの副腎のhematoxylin-eosin染色における組織像を示した。Fig.3から明らかなように、マーモセットは、アカゲザルに比べ、皮質の球状帯の割合が少なく、束状-網状帯の割合が大きく、かつ充実細胞が多数認められた。

4. 血中および尿中のナトリウムおよびカリウム濃度 (Fig.4)

Fig. 4 の左側に血中の、右側に尿中の、各々ナトリウムとカリウム値を示した。この成績は、食塩制限等の処置は一切加えない通常の条件下で行なった時の値である。Fig.4から明らかなように、血中のナトリウム値は、ヒトの正常域の上限に近い値を示し、また、カリウムは、下限に近い値を示していた。一方、尿中においては、ナトリウム、カリウムともに、ヒトの正常域の上限に近い値を示していた。

5. 血中 Aldosterone 値 (Fig.5)

雌マーモセット 6 頭の血中 aldosterone 値をFig.5に示した。Fig.にみる如く、マーモセットの血中 aldosterone 値は、22~56ng/dl、平均32ng/dlの値を示し、ヒトに比べ高い値を示していた。

6. 肝細胞質内グルコルチコイドレセプター (Table 3)

Table 3 に、副腎摘除した成熟雄マーモセットおよび無処置成熟雄および雌マーモセットの肝細胞質内グルコルチコイドレセプターにつき分析を加えた成績を示し、同時に比較のため、マカカ属サルのアカゲザルと、副腎摘除したニホンザル、およびラットにおける成績も示した。無処置のマーモセットにおいては、雄雌いずれも10fmoles/mg protein 以下の極めて低い値を示した。一方、副腎摘除したマーモセットにおいては、結合数は、31と39fmoles/mg protein を示し、副腎摘除したニホンザルの14fmoles/mg protein と同程度の値を示していた。ラットでは、無処置のものでは結合数は、雄が 124 ± 26 、雌で 121 ± 11 fmoles/mg protein、副腎摘除したものでは、 207 ± 42 fmoles/mg protein を示していた。

Table 3. Specific Binding of ^3H -Dexamethasone to Liver Cytosol in Cotton-topped Tamarins, Macaca Monkeys and Rats.

		sex	n	fmoles/mg protein	K _a ($\times 10^8 \text{ M}^{-1}$)
Normal	Cotton-topped tamarin	male	7	<10	—
		female	5	<10	—
	Rhesus monkey	male	12	<10	—
		female	6	<10	—
	Rat	male	25	124 ± 26	1.76 ± 0.66
		female	12	121 ± 11	2.02 ± 0.75
Adrenal-ectomy	Cotton-topped tamarin	male	2	39, 31	0.25, 0.25
	Japanese monkey	male	1	14	1.12
	Rat	male	28	207 ± 42	2.25 ± 0.96

考 察

Yamamotoらは、マーモセットの血中corticoidsが、ヒトやアカゲザルに比べ、resting levelで10~50倍もの高値を示し、かつ大部分が、遊離型で存在することを報告した⁹⁾。今回はマーモセットの下垂体-副腎皮質機能につき詳細な検討を加えるとともに、マーモセットがヒトのCushing症候群のモデル動物となるか否かの検討も加えた。

Dexamethasoneによる下垂体抑制試験を試みた結果、正常のヒトにおいて、血中corticoidsに完全な抑制が認められる量の0.04mg/kg/day^{4) 5)}の投与では、アカゲザルではヒトと同様に抑制効果がみられたが、マーモセットでは、抑制効果は十分でなく、0.16mg/kg/dayの大量投与により抑制効果が認められた(Fig.1 & 2)。

これは、マーモセットの間脳下垂体系のグルコルチコイドに対する感受性の低下を示唆する成績であった。一方、Yamamotoらは、マーモセットに β^{1-24} ACTH 50 μ gを投与した時、血中corticoidsの有意な増加を認め、マーモセットの副腎皮質がACTHに対して反応性を有することを確認している⁹⁾。今回、副腎皮質を組織学的に検討した結果、corticoids分泌層の束状-網状帯の幅が、アカゲザルに比し広く、かつ分泌亢進を示す充実細胞の増多が認められた(Fig.3)。

以上のように、下垂体-副腎皮質機能検査および副腎の組織学的所見は、ヒトのCushing症候群の両側性副腎過形成(bilateral adrenal hyperplasia)型と同様の傾向にあることが分った。

次に、マーモセットに、グルコルチコイドの量の過剰のみならず、グルコルチコイドの効果の過剰も存在するか否かを検討を行なった。その結果、血液性状においては、アカゲザル、ヒトと比べ大差は認められず、本成績はAndersonら¹⁾の成績ともよく合致していた。中でも、グルコルチコイド過剰に認められる好酸球の著減が認められなかったことは、注目すべきである(Table 1)。また、網赤血球が、アカゲザルやヒトに比べて高値を示していたが、これはマーモセットでは、髄外造血作用(extramedullary hematopoiesis)が活発に行なわれていることが報告されている⁸⁾ことから推して、網赤血球が高値を示していたものと考えられる。

血清生化学値については、総cholesterol, triglyceride, NEFAおよびalkaline phosphataseともに、ヒト、アカゲザルと大差なく、脂肪代謝の異常は認められず、この成績は、Holmesら³⁾の成績ともよく合致していた。ただ、Holmesらも指摘しているが、食前血糖値がヒトやアカゲザルに比べ高い値を示していた。この点については、現在明確でない。一方、血中のcorticoidsの過剰による電解質代謝におよぼす影響を検討した結果、血中および尿中のナトリウム、カリウムは、ヒトの正常値と大差なく、Holmesら³⁾と同様の値を示し、グルコルチコイド過剰による低カリ血症は認められなかった(Fig.4)。以上のように、マーモセットでは、血中のcorticoidsの過剰にもかかわらず、グルコルチコイド過剰効果は認められず、グルコルチコイド感受性の低下が予想された。そこで、グルコルチコイド感受性の低下の機構を検討する為、肝細胞質内のグルコルチコイド・レセプターにつき検討を加えた。その結果、Table 3に示した如く、マーモセットでは、結合数が極めて少ないことが分った。しかしながら、ニホンザルにおいても、同程度の低い値が認められたことから、マーモセットにおいては、レセプター以降の系、即ちpost receptor systemにおける機能の低下が示唆された。これらの成績から、先のcorticoids過剰にもかかわらず、血液性状および血清生化学値に異常がみられなかったのは、組織におけるグルコルチコイドレセプターが極めて少なく、かつ、post receptor systemの機能の低下に基づき、corticoidsに対する感受性が低下しているものと考えられる。

結 語

マーモセットにおいては、血中のグルコルチコイドに異常高値が認められ、ヒトのCushing症候群と同様に、グルコルチコイド過剰が認められた。さらに、グルコルチコイドの感受性についても、feedbackに関係すると思われる間脳下垂体系の反応性は、Cushing症候群と同じく明らかに低下していた。一方、肝の反応性は、マーモセットでは低下しており、従って、グルコルチコイドの効果の過剰がみられないのに対し、Cushing症候群では、反応性が正常であるため、グルコルチコイドの過剰効果がみられるものと考えられる。すなわち、ヒトのCushing症候群では、下垂体と他の組織のグルコルチコイドの感受性が分離したことにより、その特異的な症状が出現するものと考えられる。従って、マーモセットは、内分泌学的には、ヒトの両側性副腎過形成型のCushing症候群のモデル動物となり得るが、臨床症状に関しては、モデル動物とならないことが明らかになった。

稿を終るにあたり、御指導、御助言をいただきました、東大第三内科、大沢仲昭助教授に、心より謝意を表します。

なお、本研究の一部は、文部省科研費、特定研究「実験動物の純化と開発」(No.111505&210705)によった。

文 献

- 1) Anderson, E.T., Lewis, T.P., Passovoy, M. and Trobaugh, F.E.: Marmosets as laboratory animals II. The hematology of laboratory-kept marmosets. *Lab. Anim. Care*, 17: 30-40, 1967.
- 2) Baxter, J.D. and Tomkins, G.M.: Specific cytoplasmic Glucocorticoid hormone receptors in hepatoma tissue culture cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68: 932-937, 1971.
- 3) Holmes, A.W., Passovoy, M. and Capps, R.B.: Marmosets as laboratory animals III. Blood chemistry of laboratory-kept marmosets with particular attention to liver function and structure. *Lab. Anim. Care*, 17: 41-47, 1967.
- 4) 井林 博, 本橋賢二, 大沢仲昭: Dexamethasone 負荷試験。日本臨床, 28: 2771-2783, 1970.
- 5) Liddle, G.W., Estep, H.L., Kendall, J.W., Williams, W.C. and Townes, A.W.: Clinical application of new test of pituitary reserve. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 19: 875-894, 1959.
- 6) Murphy, B.E.P.: Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 27: 973-990, 1967.
- 7) Scatchard, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660-668, 1949.
- 8) Tischendorf, P. and Walfe, L.G.: Extramedullary hematopoiesis in marmosets following blood loss. *Lab. Anim. Care*, 20: 697-702, 1970.
- 9) Yamamoto, S., Utsu, S., Tanioka, Y. and Ohsawa, N.: Extremely high levels of corticosteroids and low levels of corticosteroid binding macromolecule in plasma of marmoset monkeys. *Acta Endocrinol.*, 85: 398-405, 1977.

(受付日: 56. 3. 12)