去勢ラットを老化モデルとした長期間の内分泌動態

東京医科歯科大学, 難治疾患研究所, 機能調節疾患研究部門 (内分泌)

左 雨 秀 治, 張 洪, 岡 本 良 平

Long Term Observation of Serum Hormone Fluctuations
in Aging Model of Gonadectomized Rat

Shuji SASSA, Hong ZHANG and Ryohei OKAMOTO

Department of Endocrinology, Division of Functional Disorder Research, Medical Research Institute,
Tokyo Medical and Dental University

Serum LH increased rapidly in both sexes after gonadectomy, showing a peak at the 8th week. Afterwards, LH decreased gradually until the 75th week. In general, LH values in males were lower than those in females. FSH, as well as LH, increased rapidly after gonadectomy. In male serum FSH reached a peak at the 8th week and then decreased showing two peaks at the 34th and 92nd weeks. Serum FSH level decreased remarkably after the 96th week in males. In females FSH increased gradually with a subsequent rapid increase from the 28th week and reached a peak at the 42nd week. Afterwards, this FSH level was maintained to the 128th week. Serum progesterone (P_4) decreased after gonadectomy in females, whereas it increased to 4 fold in males. In males this high level was maintained to the 66th week. Serum estradiol (E_2) decreased in both sexes until the 3rd week after gonadectomy. However, in males the serum E_2 level increased at the 4th and 5th weeks and reached the level of the 1st week after gonadectomy. Afterwards, the E_2 level decreased to 10pg/ml at the 40th week which was maintained to the 128th week. In females, E_2 increased from the 5th to 22nd week and decreased again from the 33rd week, and then the E_2 level decreased rapidly to about 10pg/ml which was maintained to the 128th week.

The present experiment indicated two results in male rats. 1. Serum FSH decreased remarkably after the 96th week of gonadectomy. 2. Serum P_4 increased in spite of gonadectomy.

Keywords: aging and serum hormone, gonadectomy and serum hormone

I 緒 言

両側卵巢摘出後や更年期には, 性ステロイドが減少し, 血中ゴナドトロピンの増加が見られる^{1)~4)}。しかし, 正常または去勢ラットでの長期に渉る血中ゴナドトロピンや性ステロイドの動態について, さらには性差による差についての研究報告は, 知る限りでは血中ゴナドトロピンについて一報あるのみである⁵⁾。今回, 我々は同一グループのオスとメスラットを去勢し, これを老化モデルとして去勢直後から去勢128週におよぶ長期間の血中LH, FSH, estradiol (E_2) およびprogesterone (P_4) の動態について検討した。

II 材料および方法

1) 実験動物

動物は、Sprague-Dawley系ラットのオスとメスを各30匹用い、8週齢で両側卵巢および精巣の摘出を行った。飼育は、1日14時間（午前6時～午後8時）照明下で、固形飼料と水は自由に摂取させた。

血中のホルモンを測定するために、オスとメスの各30匹のラットを5匹ずつ6群に分けローテートさせながら採血した。採血方法は、去勢後10週までは毎週、以後は隔週で去勢128週（生後136週齢）まで午後1時半から2時半の間にエーテル麻酔下で心臓穿刺により各2.5ml採血し、ヘパリンを添加して3,000rpm、4℃で20分間遠心して血清を得た。血清は、ホルモンの測定時まで-30℃で保存した。なお、採血時にはエーテル刺激を長時間与えると血中ホルモンに影響があるため、5分以内に採血を完了させた⁷⁻¹⁰⁾。なお、採血時には体重の測定も行った。

2) ホルモンの定量

血中LHおよびFSHの定量には、National Institute of Diabetes and Digestive, and Kidney Disease (NIDDK) 提供によるrat LHおよびFSHの各キットを用いて二抗体法にて行った。血中E₂およびP₄の定量には、市販のradioimmunoassay (RIA) キットを使用した。

(i) LHおよびFSHの標識

標識用抗原は、NIDDK提供のLH (Rat LH-I-5) およびFSH (Rat FSH-I-4) を用いた。

¹²⁵Iの標識には、試薬としてNa¹²⁵I (Amersham:IMS-30), Lactoperoxidase (Boehringer Mannheim 山之内: 107174), 過酸化水素 (三菱瓦斯化学), サッカロース (ナカライ化学) およびヨウ化カリウム (和光純薬) を用い、Lactoperoxidase 法により標識を行った。また、B/Fの分離には、Sephadex G-75 (Pharmacia) を用いたcolumnで行った。

(ii) LHおよびFSHの定量

測定は、RIAによる二抗体法で行い、標準品としてNIDDK提供のRat LH-RP-1, Rat FSH-RP-1を、抗血清はNIDDK提供によるAnti-Rat LH-S-5とAnti-Rat FSH-S-10を用いた。また、第二抗体は第二抗体抗ウサギ山羊血清‘栄研’キット (栄研ICL:I-RX17) を使用した。

(iii) E₂およびP₄の定量

E₂, P₄とも第一ラジオアイソトープ社製のE₂キット「第一」およびプロゲステロンキット「第一」を用いて測定した。

なお、測定結果はmean ± SEで示した。

III 結 果

血中LH値は、Fig.1に示す。初めにメスラットについて見ると、去勢後1週で384.3 ± 89.1ng/mlと性周期における静止期 (D:diestrus) の約6倍に急増し、去勢後8週まで漸次増加して1353.2 ± 63.9ng/mlとピークを認めた。その後減少傾向を示し去勢後14週で762.2 ± 44.6ng/mlとなった。しかし、去勢後16週から去勢後44週までは大きく変動しながらも全体的には減少傾向を示し、去勢後44週では497.3 ± 13.8ng/mlとピーク時の半分以下となった。その後、大きな変動は見られなかったが去勢後92週頃まで減少傾向が続いた。去勢後92週の血中値は、222.3 ± 53.2ng/mlであり、去勢後128週まで同様の値が続いた。次にオスラットでは、去勢後1週で血中値は595.9 ± 16.7ng/mlとメスラットよりさらに急増し、去勢前の23.0 ± 3.7ng/mlに比し約25倍の高値となった。増加は、さらに続き去勢後8週で1397.7 ± 216.4ng/mlと1つのピークを認めた

が、去勢後9, 10週と急減し、去勢後10週では $737.7 \pm 81.5 \text{ ng/ml}$ とピーク時に比べて半減した。この減少傾向はさらに続き去勢後22週では $389.9 \pm 56.9 \text{ ng/ml}$ の低値となった。以後周期的変動が去勢後60週まで続いたが、全体的には減少傾向を示し、去勢後60週では $184.0 \pm 25.5 \text{ ng/ml}$ となった。その後は 150 ng/ml 前後の値が去勢92週まで続き去勢後96週では $104.7 \pm 12.8 \text{ ng/ml}$ と減少した。以後最終128週までは変動もあまり認めず 100 ng/ml 以下の低値であった。

Fig. 1. Changes in serum LH concentrations following gonadectomy in male and female rats. Each point is the mean $\pm$ S.E. from 5 rats.

血中FSH値の変動は、Fig.2に示す。メスラットでは、去勢後1週が $795.5 \pm 81.5 \text{ ng/ml}$ と性周期Dの約4.5倍に急増後、大きな変動もなく同様の値が去勢後24週まで続き、去勢後26週から漸次増加を示し去勢後36週では $1653.7 \pm 99.5 \text{ ng/ml}$ となり性周期Dに比して9倍もの高値を示し、さらに去勢後42週で $1839.3 \pm 55.0 \text{ ng/ml}$ のピークを認め、高値が去勢後48週まで続いた。その後急激な減少を示し去勢後54週で $1036.9 \pm 70.2 \text{ ng/ml}$ となった。しかし、去勢後68週でもう一度急増して $1814.5 \pm 43.2 \text{ ng/ml}$ とピークを認めた。以後大きな変動もなく漸次減少傾向が去勢後128週まで続き、去勢後128週での値は $1156.5 \pm 496.5 \text{ ng/ml}$ であった。また、オスラットは去勢後1週で $863.7 \pm 62.0 \text{ ng/ml}$ と去勢前 ($180.1 \pm 22.6 \text{ ng/ml}$) の5倍に急増、その後も漸次増加し去勢後8週で $1414.4 \pm 125.0 \text{ ng/ml}$ と小さなピークを認めた。その後減少したが、去勢後16週からは、また増加傾向を認め、去勢後30, 34週でそれぞれ $1692.4 \pm 56.9 \text{ ng/ml}$, $1760.7 \pm 121.0 \text{ ng/ml}$ とピークを示し、去勢後36, 38週と減少して去勢後48週まではほぼ 1400 ng/ml であったが、去勢後50週からは変動しながら増加傾向を示し去勢後92週で $1890.8 \pm 57.6 \text{ ng/ml}$ のピークを認め、その後急減して去勢後112週で $468.9 \pm 206.3 \text{ ng/ml}$ となったが、去勢後116週からはゆるやかな増加傾向を示して去勢後128週を迎えた。去勢後128週の血中値は $794.6 \pm 20.8 \text{ ng/ml}$ であった。

Fig. 2. Changes in serum FSH concentrations following gonadectomy in male and female rats. Each point is the mean $\pm$ S.E. from 5 rats.

血中 P_4 値は, Fig.3に示す。メスラットは, 去勢後1週が $41.3 \pm 6.6\text{ng/ml}$ で性周期Dの0.7倍と減少し, さらに去勢後5週で $13.4 \pm 6.6\text{ng/ml}$ にまで減少した。しかし, 去勢後6週で $24.3 \pm 4.7\text{ng/ml}$ と増加し, 小さな変動をしながら 20ng/ml 前後の値が去勢後40週まで続いた。さらに, 次の去勢後42週では $43.6 \pm 7.4\text{ng/ml}$ と去勢後40週 ($18.1 \pm 1.2\text{ng/ml}$) の2.5倍の高値を示したが, 去勢後46週では $18.1 \pm 4.2\text{ng/ml}$ と増加前のレベルに戻り, その後は小さな変動はあるものの同様の値が去勢後92週まで続いた。また, 去勢後96週で $11.4 \pm 1.8\text{ng/ml}$ と半減し, そのまま変動もなく去勢後128週に至った。一方, オスラットは去勢後1週が $15.2 \pm 1.7\text{ng/ml}$ で去勢前の $3.9 \pm 0.7\text{ng/ml}$ に比して4倍に増加し, 去勢後64週までは, 10.0ng/ml から 20.0ng/ml の間を変動した。しかし, 去勢後68週で $8.9 \pm 2.9\text{ng/ml}$ と減少し, 以降大きな変動もなく去勢後128週まで 10.0ng/ml 以下であった。

Fig. 3. Changes in serum P_4 (progesterone) concentration following gonadectomy in male and female rats. Each point is the mean $\pm$ S.E. from 5 rats.

血中 E_2 値は, Fig.4に示す如く, メスラットにおいては去勢後1週で $44.4 \pm 1.9\text{pg/ml}$ と性周期Dの0.8倍程度に減少し, さらにこの傾向が続いて去勢後4週で $21.8 \pm 2.6\text{pg/ml}$ となった。その後ゆるやかな増加傾向を認め去勢後22週で $47.4 \pm 7.8\text{pg/ml}$ となり, この値が去勢後32週まで続いた。去勢後34, 36週と急激な減少を示し, 去勢後36週での値は $15.4 \pm 2.7\text{pg/ml}$ と半減した。去勢後38週から去勢後128週までは小さな変動はあったが, 全体的には 10pg/ml 前後の低値であった。また, オスラットは去勢後3週まで減少し, 去勢前値の $50.9 \pm 4.3\text{pg/ml}$ に対して去勢後3週で $33.8 \pm 1.6\text{pg/ml}$ となった。さらに去勢後5週で $42.9 \pm 2.0\text{pg/ml}$, 去勢後22週で $29.7 \pm 1.5\text{pg/ml}$ と小さなピークは認められたが全体的には減少傾向を示し, 去勢後32週では $11.1 \pm 2.6\text{pg/ml}$ となった。その後も大きな変動はなく 10pg/ml 前後の値が去勢後128週まで続いた。

Fig. 4. Changes in serum E_2 (estradiol) concentration following gonadectomy in male and female rats. Each point is the mean $\pm$ S.E. from 5 rats.

IV 考 察

去勢の血中ゴナドトロピンに対する影響については、去勢初期ではBlackwell R.E.^{ら⁹}やBadger T.M.^{ら²⁾}等と同じ傾向を示した。しかし、長期間にわたって見るとFSHについて、Linkie D.M.^{ら⁵⁾}の報告ではオス・メスとも高値のままであったが、我々の研究では去勢後92週以後オスラットがメスラットに比して減少傾向を示した。また、LH値は、メスとオスラットとの動態が非常によく似ていて去勢直後から去勢後8週にかけては増加した。しかし、去勢後9週から去勢後90週位までは減少傾向を示し、以後去勢後128週までは、低値のまま変動はなかった。ただ、オスラットの方が、去勢後10週以降メスラットに比して全体的に低値であった。

人間の場合、男性は更年期の障害というものがほとんど無いが、女性では更年期の障害の原因の大部分が性ステロイドの減少により起こる、このゴナドトロピンの増加と同時期にあらわれる精神・神経症状とあいまって起こると考えられる。

FSHについて見ると、メスとオスラットとの動態では、去勢初期と終期の部分でかなりの相違が見られた。オスラットでは、LH同様去勢後8週で1つのピークが認められたが、メスラットでは、このようなピークが認められず漸次増加傾向を示した。これは、Moguilevsky J.A.^{ら³⁾}の結果と一致している。また、終期部分でメスラットは、去勢後72週から去勢後128週にかけて非常にゆるやかな減少傾向を示したが、去勢後128週でも、なお1000ng/ml以上と去勢後10週よりも高値であったのに対してオスラットが去勢後92週で減少傾向を示して5000ng/ml前後となった。これはメスラットに比して低値で、Linkie D.M.^{ら⁵⁾}の報告とは一致しなかった。

一方、去勢によるステロイドホルモンへの影響はメスとオスラットではかなりの相違が認められた。メスラットは去勢により P_4 が急減し、その後20ng/ml前後が去勢後92週まで維持されたが、去勢後96週で半減して性周期Dの6分の1程度の値となり、去勢後128週までは同レベルであった。しかし、オスラットは、去勢により P_4 値が去勢前に比して4倍にも増加した。これは、去勢後メスラットのレベルとほぼ同じで去勢後64週まで維持された。Piva F.^{ら⁶⁾}の報告は、去勢後3週間までであるが我々の結果と一致している。つまり、オスラットにおいては去勢により副腎が活性化されたのではないかと推察される。なお、メスラットの去勢後42、44週での P_4 の高値は、エーテル麻酔の影響が考えられる。一般に、ラットではエーテル刺激をすると、血中 P_4 値の増加が認められる。なお、Prolactin、ACTHやCorticosteroneもエーテル刺激により血中値の増加が、LH値は減少が報告されている⁷⁻¹⁰⁾。

E_2 値は、メスとオスラットで去勢後40週位までは大きな相違が見られた。オスラットは、去勢によって減少の一途を辿るのに対してメスラットのそれは、去勢後一時的に減少するが去勢後7週から増加傾向を示し去勢後20週位から去勢後32週にかけて40pg/ml以上と去勢後1週と同レベルに回復したが、その後去勢後40週にかけて急激な減少が見られた。一般に去勢をすると、性腺でのコレステロール代謝が無くなるため体重に著しい増加が認められる¹¹⁾。その大部分は脂肪の蓄積でありその脂肪内に存在する芳香化酵素（アロマトラーゼ）の代償作用によるものではないかと推察される。それ以降は互いに大きな変動も見られず10pg/ml前後の低値で去勢後128週の最終週に達した。

V 結 語

LH値はメス、オスラットともピークは同時期にほぼ同レベルまで増加したが、それ以降メスラットに比してオスラットの方が低値で変動が小さかった。FSH値は、メスラットが去勢後128週まで1000ng/ml以上

の高値を示したのに対してオスラットは，去勢後96週から減少してメスラットの2分の1位の値になった。 P_4 値は，メスラットでは去勢後減少し，正常性周期Dの2分の1程度の値で推移したのに対しオスラットは，去勢により値が4倍に増加した。これは去勢後のメスラットの血中レベルとほぼ同じであり，この値が去勢後64週まで続いた。この P_4 値の増加は，オスラットの副腎が去勢によって活性化されたことを示唆すると思われる。 E_2 値は，オスラットにおいて去勢後から去勢後40週まで漸次減少し去勢前の5分の1となり，この値が実験終了まで続いた。しかし，メスラットでは，去勢後4週まで急減した後増加傾向を示し去勢後1週のレベルに回復したが去勢後34週から去勢後36週にかけて急減し性周期Dの5分の1の値となった。この値の増加は脂肪の蓄積によるアロマターゼ量の増加によるのではないかと推察される。その後は大きな変動もなく去勢後128週を迎えた。

文 献

- 1) Blackwell RE, Amoss MS Jr. A sex difference in the rate of rise of plasma LH in rats following gonadectomy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971; 136: 11—14
- 2) Badger TM, Wilcox CE, Meyer ER, Bell RD, Cicero TJ. Simultaneous changes in tissue and serum levels of Luteinizing hormone, Follicle-Stimulating hormone, and Luteinizing hormone/Follicle-Stimulating hormone releasing factor castration in the male rat. *Endocrinology* 1978; 102: 136—141
- 3) Moguilevsky JA, Faigon MR, Scacchi P, Szwarcfarb B. Effect of castration on serum gonadotropin levels in androgenized male and female rats. *Neuroendocrinology* 1979; 29: 323—328
- 4) Nequin LG, Alvarez JA, Campbell CS. Alterations in steroid and gonadotropin release resulting from surgical stress during the morning of proestrus in 5-day cyclic rats. *Endocrinology* 1975; 97: 718—724
- 5) Linkie DM, Furth J, Kourelakos D. Gonad-gonadotrope interactions: Plasma gonadotrophin levels and tumour induction in long-term castrated rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1981; 97: 181—185
- 6) Piva F, Gagliano P, Motta M, Martini L. Adrenal progesterone: Factors controlling its secretion. *Endocrinology* 1973; 93: 1178—1184
- 7) Ajika K, Kalra SP, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM. The effect of stress and Nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1972; 90: 707—715
- 8) Wuttke W, Meites J. Effects of ether and pentobarbital on serum prolactin and LH levels in proestrous rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 135: 648—652
- 9) Chi HJ, Shin SH. The effect of exposure to ether on prolactin secretion and the half-life of endogenous prolactin in normal and castrated male rats. *Neuroendocrinology* 1978; 26: 193—201
- 10) Cook DM, Kendall JW, Greer MA, Kramer RM. The effect of acute or chronic ether stress on plasma ACTH concentration in the rat. *Endocrinology* 1973; 93: 1019—1024
- 11) Kakolewski JW, Cox VC, Valenstein ES. Sex differences in body-weight change following gonadectomy of rats. *Psychol Rep* 1968; 22: 547—554

(受付日：'93. 6. 2)

(採択日：'93. 8.23)