— Note —

Urinary Total Polyamines Levels in Estrous Cycle and during Pregnancy in Female Rats

Ryuzo TORII and Nakaaki OHSAWA*

*Institute for Experimental Animals, Shiga University of Medical Science, Ohtsu,
Shiga 520-21, Japan and *Third Department of Internal Medicine, Faculty
of Medicine, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113.*

(Received 2 February 1988/Accepted 27 May 1988)

Urinary total polyamines; putrescine, spermidine and cadaverine, levels were determined in the estrous cycle and during the pregnancy in female Wistar rats. Urinary total polyamines level in 12 estrous cycles in 4 female rats revealed the definite cyclic changes, showing high levels at estrous and low levels at diestrous stage. After the ovariectomy those cyclic changes disappeared. Urinary total polyamines levels were constantly low during the first half of the pregnancy of 8 female rats, whereas the levels increase abruptly from 10 days before parturition. After fetusectomy at 15th and 17th days of the pregnancy, those levels decreased gradually. These data suggested that the urinary total polyamines levels were closely related with the pituitary-ovarian function and the growth of fetus of rats.

ラットの性周期および妊娠期における 尿中総ポリアミン値の動態

鳥居 隆三・大沢 伸昭*

滋賀医科大学医学部附属動物実験施設

*東京大学医学部第三内科

ポリアミンは、細胞の構成成分として植物を含むあらゆる生命細胞に普遍的に存在する生体内アミンとして古くから知られているが、1971年 Russell らが悪性腫瘍患者の尿中のポリアミン量が健康人に比べ高値を示すことを報告[13]して以来、最近では腫瘍マーカーの一つとして注目を浴びてきている。さらに、このポリアミンは、多岐にわたる生物活性を有し、とくに細胞分裂、核酸合成、蛋白合成に大きく関与している[5, 11]ことから、

腫瘍マーカーとしての意義にとどまらず、細胞増殖因子として各種生理・生体機能をうかがう指標の一つになることが考えられる。しかしながら、各種実験動物の生理的变化に伴うポリアミンの動態は、測定法が高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) 法、アミノ酸分析法、ガスクロマトグラフィー法など、煩雑でルーチンに使用することが困難であったため、いまだ十分な成績が得られてい

い。そこで今回、我々が開発した簡便な酵素法[9]によりラットの性周期および妊娠期の尿中総ポリアミンの測定を行い、生理・生体機能をうかがう指標としてのポリアミンの意義、有用性について検討を加えた。

用いたラットは、Jcl: Wistar の17週齢メスで、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、午前8時点灯の12時間照明の飼育室にて、オートクレーブ滅菌飼料[CE-2、日本クレア(株)]および給水瓶により水を与えたラット用代謝ケージ内で飼育した。尿は、アジ化ナトリウムをあらかじめ入れた容器内(0.01%/24時間尿)に、24時間尿として午前8時に採取した後、測定に供するまで -20°C にて保存した。なお性周期の判定は、膣垢像の観察によった。すなわち、午前8時に24時間尿を採取する際同時に膣垢像を採取、観察し、多数の角化細胞が認められた時採取した尿を発情期の尿とした。一方、妊娠期においては、オスと一夜同居後精子が確認された日を妊娠 day 0 とした。尿中のポリアミンは、我々の開発した方法「ポリアミン・テスト・エンザイム」キット、徳山曹達(株)を用いて、プトレッシン、スペルミジン、カダベリンの総量として測定し、尿中クレアチニン[1]補正を行い求めた。

まず、本キットがラット尿中のポリアミン測定に用いることができるのかを検討すべく、HPLC 法と酵素法を用いる本キットとによる測定値の比較を行った。なお HPLC 法は、Kubota ら[9]の方法を一部改変した方法により行った。その結果、Fig.1 に示すように HPLC 法と本キット(酵素法)との相関係数は、0.999 を示し有意な相関がみられたことから、酵素法を用いる本キットが、ラット尿中のポリアミン測定に用いることができることが分かった。また本キットによる変動係数は、inter-assay 1.2%、intra-assay 2.3%であった。

性周期における尿中総ポリアミンの動態は、Fig.2 に示したように4匹のラットのいずれにも、発情期に高値(135~209 nmol/mg creatinine)を示し、発情休止期に低値(71~112 nmol/mg creatinine)を示す明瞭な性周期内変動がみられた。さらに、これらのラットをネブプタール麻酔下にて両側の卵巣を摘除したところ周期性の変動の消失を認めた。これらの成績は、尿中ポリアミンが、下垂体-卵巣機能と密接な関連を有することを示している。すなわち、発情前期には FSH, LH のゴナドトロピンおよびエストロゲンの分泌が高まり[15, 16]、これに伴い有核上皮細胞、角化上皮細胞が増加することが知られている。一方、ポリアミンの生合成過程における律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ornithine

Fig. 1. Correlation between the enzymatic assay and HPLC assay of rat urinary total polyamines

Fig. 2. Changes of urinary total polyamines levels during estrous cycle and after ovariectomy (OvX) in four female Wistar rats. E shows estrus.

decarboxylase: ODC) は、ゴナドトロピン、エストロゲン、アンドロゲン等のホルモンによって活性化されることが知られ[3, 7, 8, 11]、事実ラットの性周期における卵巣内の ODC 活性は、発情期に高い値を示すことが報告されている[3, 8]。これらのことから発情期にみられた尿中総ポリアミン値の増加は、下垂体-卵巣系の性ホルモンの上昇に伴い卵巣内の ODC 活性が上昇したことによると考えられる。一方、性周期内の摂餌量、摂水量および尿量と尿中総ポリアミン値との関連性についてみると、摂餌量は性周期を通じてほとんど変化はなく、また摂水量および尿量はわずかに変動するものの性周期に伴う変動は認められなかった。これらのことから性周

Fig. 3. Changes of urinary polyamines levels during pregnancy in eight female Wistar rats

期内の尿中総ポリアミン値の変動は、摂餌量、摂水量および尿量の変化に伴うものではなく、下垂体-卵巣機能に密接に関連しその変化に伴って変動を示すことから、下垂体-卵巣機能を反映する一つの指標になり得ることが示唆された。

次に、妊娠期における尿中総ポリアミン値の動態につき検討したところ、Fig.3に示すように8匹のラットにおいていずれも分娩10日前頃まではその動態にほとんど変化がなく低値（50～120 nmol/mg creatinine）を示していたがその後急激な増加を示し、分娩1～3日前に最高値（350～690 nmol/mg creatinine）に達した後減少し分娩後には低値に至った。このような妊娠後期にみられる尿中総ポリアミン値の急激な増加をもたらす要因について、まず胎仔の発育との関連につき検討した。妊娠10日目から2日間隔で21日目までの妊娠ラット各5匹計35匹を用いて各々ネブタール麻酔下にて開腹し子宮を摘出した後、胎仔、胎盤およびその他の胎仔付属物の重量の推移を検討した。なお、妊娠10日目と12日目について

Fig. 4. Changes of weight of fetus, placenta and whole weight including fetus, placenta, membranes, fluids and others during pregnancy in female Wistar rats. Each value represents the mean $\pm$ SD of 59-67 samples. The value at 10th and 12th days of pregnancy represent the mean $\pm$ SD of whole weight.

は胎仔と胎盤の分離が十分に行えなかったため総重量として測定した。その結果、Fig.4に示したように胎仔、胎盤およびその他の胎仔の付属物の重量は妊娠14日目以降急激な増加を示し、妊娠21日目には14日目に比べ胎盤重量が約4倍の増加を示したのに比して胎仔重量は約30倍もの増加となっていた。そこで次に尿中ポリアミン値の急激な増加がみられる妊娠15日目と17日目においてネブタール麻酔下にて開腹後胎仔のみの全摘出を試みたところ、Fig.5に示すように尿中ポリアミン値は摘出後速やかに減少を示した。これらの成績より、妊娠期における尿中ポリアミン値は胎仔の発育に大きく関連しているこ

Fig. 5. Changes of urinary total polyamines levels before and after fetusectomy (FeX) in two pregnant female Wistar rats

とがうかがわれた。

ところで、ラットの妊娠期の性ホルモンの動態ではプロゲステロンは妊娠12～19日目にわずかに増加した後減少を示し、また LH, FSH およびエストロゲンは妊娠20日目ごろにわずかな増加を見るにとどまっている[10, 11]。しかし卵巣内の ODC 活性は妊娠10日目頃までは低い値を示すが胎盤形成が始まる12日目頃から急激な増加がみられている[3]。これらのことから、妊娠後期にみられた尿中総ポリアミン値の急激な増加は、母体の卵巣機能の亢進とともに胎仔の急激な発育を示していると考えられる。なお、妊娠期における尿中総ポリアミン値と摂餌量、摂水量および尿量との関連を見ると、摂餌量は妊娠期を通じてほとんど変化はなく、また摂水量および尿量は妊娠後半に漸増をみるにとどまっている。これらのことから、妊娠期の尿中総ポリアミン値は、摂餌量、摂水量および尿量の変化に伴うものではなく、胎仔—胎盤機能に密接に関連しているものと考えられる。一方ヒトにおいては妊娠後期プロゲステロンやエストロゲンが急激に増加する[17]のに対して尿中ポリアミンの増加は漸増を示す程度にとどまっている[6]。すなわち、妊娠期における尿中ポリアミンは母体機能の亢進とそれに伴う胎仔の急激な発育に密接な関連があり、多胎動物でありしかも妊娠期間の短いラットにおいてはヒトに比べてその増加が顕著にあらわれたものと考えられる。

以上ラットの性周期および妊娠期における尿中総ポリアミン値の動態につき検討した結果、下垂体—卵巣機能、胎仔—母体機能および胎仔の発育などをうかがうことのできる指標としてその有用性が明らかとなった。また、尿を測定材料として用いることから採血の困難な小動物において採血、保定などの外的刺激によるストレス

を与えることなく長期にわたって生理・生体機能を把握することができ、しかも簡易化された再現性の高い酵素法によって測定できることから実際の測定時間も約2時間以内で行うことができるなどの利点を有している。今後尿中ポリアミンは腫瘍マーカーとしての意義にとどまるだけでなく、動物の発癌実験[2, 14]、制癌剤のスクリーニングなどをはじめとする腫瘍マーカーとしての意義はもとより、各種疾患[2]および各種の生理・生体機能[4]をうかがうことのできる、しかもルーチンに用いることのできる新しい指標になり得るものと考えられる。

要 約

ラットの性周期および妊娠期における尿中総ポリアミン値(プトレッシン, スペルミジン, カダベリン)の動態につき検討を行った。その結果、尿中総ポリアミン値は性周期においては発情期に高値を発情休止期に低値を示す明瞭な性周期内変動が認められ、さらに卵巣摘除により周期性変動が消失した。一方、妊娠期においては妊娠後期に急激な増加がみられたがこの変化は胎仔重量の推移と近似し、また胎仔を摘出することにより減少を示した。これらの成績より、尿中総ポリアミン値は下垂体—卵巣機能および胎仔—母体機能に密接に関連していることが明らかとなり、尿中総ポリアミン値は生殖生理機能を示す指標の一つとして有用であることが示唆された。

最後に本研究に多大のご協力を頂いた石橋国夫氏、並びに「ポリアミン・テスト・エンザイム」キットの御提供、HPLC 測定の御協力を頂いたシノテスト㈱、徳山曹達㈱に厚く御礼申し上げます。

文 献

- [1] Folin, O. (1904). *Z. Physiol. Chem.*, **41**, 223-242.
- [2] 藤田啓介・永津俊治・新保 寛 (1981). 蛋白質・核酸・酵素, **26**, 1884-1894.
- [3] Guha, S. K. and Janne, J. (1976). *Acta Endocr.* **81**, 793-800.
- [4] 岩崎裕治・高木 康・五味邦英・石井 暢 (1984). 臨床病理, **59**, 89-96.
- [5] Janne, J., Poso, H., and Raina, A. (1978). *Biochim. Biophys. Acta*, **473**, 241-293.
- [6] 加来隆一・我妻 堯 (1984). 臨床病理, **59**, 69-76.
- [7] Kaye, A. M., Ickson, I., Lamprecht, S. A., Gruss, A., Tsafiriri, A., and Lindner, H. R. (1973). *Biochemistry*, **12**, 3072-3076.
- [8] Kobayashi, Y., Kupelian, J., and Maudsley, D. V. (1971). *Science*, **172**, 379-380.
- [9] Kubota, S., Okada, M., Imahori, K., and Ohsawa,

- N. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 2363-2367.
- [10] Labhsetwar, A. P. and Watson, D. J. (1974). *Biol. Reprod.*, **10**, 103-110.
- [11] Msudsley, D. V. (1979). *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 153-161.
- [12] Morishige, W. K., Pepe, G. J., and Rothchild, I. (1973). *Endocrinology*, **92**, 1527-1530.
- [13] Russell, D. H. (1971). *Nature New Biol.*, **233**, 144-145.
- [14] Seiler, N., Graham, A., and Bartholeyns, J. (1981). *Cancer Res.*, **41**, 1472-1573.
- [15] Shaikh, A. A. (1971). *Biol. Reprod.*, **5**, 297-307.
- [16] Taya, K. and Igarashi, M. (1973). *Endocr. Japon.*, **20**, 199-205.
- [17] Tulchinsky, D., Hobel, C. J., Yeager, E., and Marshall, J. R. (1972). *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **117**, 884-893.