Pituitary and Plasma Levels of Growth Hormone (GH), Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) in Hereditary Dwarf Rats (*rdw/rdw*)

Motoaki UMEZU, Kenji KAWADA, Akemi MIWA, Shinichi ISHII,
and Junji MASAKI

Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University,
1-1 Amamiya, Tsutsumi-dori, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 981, Japan

(Received 5 April 1991/Accepted 26 June 1991)

Koto et al found a new hereditary dwarf mutation from breeding colony of Wistar-Imamichi rat and named '*rdw*'. To characterize endocrinological functions in *rdw* rats, pituitary and plasma levels of pituitary hormones including growth hormone (GH), follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) were compared between *rdw* and normal rats. The hormone levels were estimated with radioimmunoassay (RIA). It was found that pituitary and plasma levels of GH of *rdw* were drastically decreased and those of FSH and LH were inclined to decrease but not remarkable as compared with normal. Rats of *rdw* were, therefore, considered to be useful as a model animal for endocrinological defects. — KEY WORDS : dwarf, FSH, GH, LH, rat

遺伝性侏儒症モデルラット (*rdw/rdw*) の下垂体および血中の 成長ホルモン (GH), 卵胞刺激ホルモン (FSH) と 黄体形成ホルモン (LH) 水準

梅津元昭・川田建二・三輪明美
石井伸一・正木淳二

東北大学農学部家畜繁殖学研究室

古藤らは Csk : Wistar-Imamichi 系ラットの一腹から極端に体型の小さい個体を発見した。彼らはその発症を遺伝的に固定し、新しい侏儒症モデルのラットを作出して *rdw* 系と命名した [4]。古藤らはこのラットで得られた成績のなかで下垂体前葉の組織学的検討を行い、特に成長ホルモン (GH), プロラクチン (PRL) と甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌細胞の減少および分化不全が特徴的であることを報告している [4]。この *rdw* ラットは、近年相次いで発見された GH 単独欠乏の侏儒症ラット [2,8] とは機能的に異なることが伺われるが *rdw* ラットのホルモン水準を量的に測定するに至っていない。

い。本報告ではラット下垂体ホルモンの測定キットを用い、ラジオイムノアッセイ (RIA) により下垂体および血中の GH, 卵胞刺激ホルモン (FSH) と黄体形成ホルモン (LH) を測定し、組織学的に得られた知見との比較を試みた。

材料および方法

動物 : *rdw* 系の発症個体を生むことが確認されている雌雄を交配させて得られた、*rdw* ラットおよび同腹の正常ラット (雌雄各 5 匹 : 計 20 匹) を生後 10 週齢まで飼育

した。

飼育条件：供試動物はカンナ屑を敷いたポリカーボネイト製ケージ（25×40×20cm）に1～5匹を収容して、市販固型飼料（船橋農場F2）および水道水を不断給与し、温度24±2℃、湿度50±5％、人工照明6時点灯、18時消灯に設定された動物室で飼育した。正常ラットでは生後3週齢、*rdw*発症ラットでは5週齢で離乳した。

採血と臓器重量測定：雌雄とも10週齢時の午後1～3時にエーテル麻酔下でヘパリンを含む注射器を用いて心臓より全採血し血漿を遠心分離した。雌ラットの場合には採血前に腔垢検査により *rdw*、正常群ともに発情休止期にあることを確認した。下垂体1個当り0.01Mリン酸バッファー1 mlを加えて、超音波磨砕した後に遠心分離した上清を下垂体抽出液とし血漿と下垂体抽出液をホルモン測定時まで-60℃に保存した。臓器重量として卵巣、精巣、子宮、精嚢腺、副腎、甲状腺、下垂体、肝臓を摘出して秤量した。

RIA：血漿および下垂体抽出液のGH、FSH、LH水準はNIADDより供給されたラット下垂体ホルモンRIAキットを使用して二抗体法RIAにより測定した。標識ホルモンにはそれぞれrGH-I-6、rFSH-I-7、rLH-I-6を用いた。第一抗体にはそれぞれrGH-S-9、rFSH-S-11、rLH-S-10を用いた。標準曲線用のホルモンにはそれぞれrGH-RP-2、rFSH-RP-2、rLH-RP-2を用いた。各ホルモン水準を血漿では1 ml当り、下垂体では下垂体当りおよび下垂体重量当りの量で表した。GH、FSH、LHの最少検知量はそれぞれ0.02、0.4、0.02 ngであった。アッセイ内変動はそれぞれ8.4、5.4、5.7%

であった。

統計分析：*rdw*ラットと正常ラットとの比較のための統計分析にはStudent's tテストを用いた。

成 績

体重および臓器重量

成長曲線に関し、図には示さなかったが、生後2週齢で *rdw* ラットは正常と比べ有意に体重が低くその差は週齢が進むにつれて大きくなった。

生後10週齢における体重および臓器重量の成績をTable 1に示した。*rdw* ラットの体重は正常ラットの1/4～1/3の値を示し、臓器重量も正常ラットの3.9～67.7%と有意に低い値を示した（ $P<0.01\sim0.001$ ）。特に精嚢重量では正常ラットの988.0mgに対し *rdw* ラットは38.4mgであり、最も低い値であった。

下垂体ホルモンの下垂体含量および血中濃度

結果をTable 2に示した。

GH：下垂体含量（下垂体および下垂体重量当り）および血中濃度は *rdw* ラットで極端に低い値を示した（ $P<0.05\sim0.001$ ）。各個体の記録において *rdw* の最高値は正常ラットの最低値に達しなかった。*rdw* の平均値の正常の平均値に対する百分率（ $rdw/N\times100$ 値：Table 3）は下垂体当りおよび下垂体重量当りの値は雌雄併せてそれぞれ2.1、8.7%以下、血中水準で18.5%以下であった。

FSH：雌の下垂体および血中水準では *rdw*、正常両群間に有意の差はみられなかった。しかし雄では両値

Table 1. Body weight and organ weights of *rdw* and normal rats

Item	Female		Male	
	<i>rdw</i>	Normal	<i>rdw</i>	Normal
Body wt. (g)	65.6±5.2***	197.6±14.3	74.6±6.3***	299.8±9.4
Ovaries (mg)	11.8±1.7*** ^{a)}	77.0±6.5	—	—
Testes (g)	—	—	0.8±0.1***	2.9±0.1
Uterus (mg)	60.0±15.2***	285.6±21.8	—	—
Seminal (mg) vesicles	—	—	38.4±8.3***	988.0±90.4
Adrenals (mg)	16.4±1.2***	57.2±2.9	21.0±0.9**	61.6±5.8
Thyroid (mg)	10.6±1.2***	17.3±1.2	13.2±1.5**	19.5±0.9
Pituitary (mg)	3.0±0.0**	6.6±0.6	4.0±0.7**	9.2±0.4
Liver (g)	2.9±0.3***	10.4±0.4	3.3±0.4***	15.9±0.9

a) Mean±S.E.

Rats were autopsied at 10 weeks of age. Each group consisted of 5 rats. Statistical analysis was made with Student's t test between *rdw* and normal rats.

** : $P<0.01$

*** : $P<0.001$

Table 2. Pituitary and plasma levels of GH, FSH and LH in *rdw* and normal rats

Item	Sex	GH		FSH		LH	
		<i>rdw</i>	Normal	<i>rdw</i>	Normal	<i>rdw</i>	Normal
Pituitary: μg/pit (μg/mg pit)	Female	0.08±0.02* (0.02±0.01)*	3.75±1.28 (0.23±0.05)	0.14±0.01 (0.04±0.00)	0.21±0.05 (0.03±0.01)	0.30±0.01 (0.09±0.02)	0.37±0.06 (0.06±0.01)
	Male	0.04±0.01*** (0.01±0.00)**	8.00±1.13 (0.84±0.10)	0.13±0.03*** (0.03±0.01)***	1.76±0.01 (0.19±0.01)	0.58±0.05** (0.17±0.03)	1.56±0.21 (0.17±0.03)
Plasma :ng/ml	Female	1.99±0.23*	10.78±2.28	4.94±0.83	5.29±1.00	0.37±0.13***	1.66±0.20
	Male	2.78±0.73***	17.90±0.90	4.69±0.21*	9.15±0.95	0.74±0.21	1.34±0.13

Hormone levels were estimated using rat pituitary hormone kits for RIA, which were kindly supplied from NIAMDD (NIH), Bethesda, Maryland, USA. These hormone kits included rGH-1-6, rFSH-1-7 and rLH-1-6 of pure hormone for iodination: rGH-S-9, rFSH-S-11 and rLH-S-10 for antibody: rGH-RP-2, rFSH-RP-2 and rLH-RP-2 for standard of hormone. The minimum detectable dose of GH, FSH and LH was 0.02, 0.4 and 0.02ng, respectively and the deviation of intra-assay coefficient was 8.4, 5.4 and 5.7%, respectively. Each group consisted of 5 rats. Statistical analysis was made with Student's t test between *rdw* and normal rats. *: P<0.05 **: P<0.01 ***: P<0.001

Table 3. A percent of mean hormone level of *rdw* rat to that of normal rat (*rdw*/N×100)

Item	Sex	GH (%)	FSH (%)	LH (%)
Pituitary /pit (/pit. mg)	Female	2.1 (8.7)	66.7 (133.0)	81.1 (150.0)
	Male	0.5 (1.2)	7.4 (15.8)	37.2 (100.0)
Plasma	Female	18.5	93.4	22.3
	Male	15.5	51.3	55.2

A mean value of each pituitary hormone corresponded with the value quoted in Table 2.

ともに両群との間で有意な減少がみられた (P<0.001, 0.05)。雄の下垂体当りおよび下垂体重量当りと血中の *rdw*/N×100値はそれぞれ7.4, 15.8, 51.3%であった。

LH: 雌では下垂体含量について *rdw*, 正常両群に差がみられなかった。しかし血中水準では *rdw* に有意の減少がみられ (P<0.001), *rdw*/N×100 値は22.3%であった。雄では下垂体当りおよび血中の水準で有意な減少 (P<0.05~0.01) を示したが55.2%に止まっていた。下垂体重量当りの含量では差がみられなかった。

考 察

ラットの成長は古藤らの成績に比べ, *rdw*, 正常群と

もにやや劣るが両群間での差は2週齢以後で歴然としていた。また, 10週齢で解剖した各臓器重量についても *rdw* で全て有意に低く, 古藤らの成績を裏付けることができた [4]。精囊腺重量が *rdw* で極端に小さいことが今回観察された。雄ラットではこの重量は性成熟期に雄性ホルモンの分泌により急激に増加するので *rdw* ではこの時期になお未熟な状態に留まっていることが裏付けられた。さらに古藤らは *rdw* で下垂体前葉の酸性細胞の減少を認め, 同細胞群の酵素組織化学的な検討から GH, PRL 陽性細胞の著しい減少を示唆しているが [4], 今回のラットの RIA 系を用いたホルモンの量的検討によっても GH に関してはこのことが裏付けられた。すなわち下垂体の GH 含量は *rdw* ラットでは極端に低く, 下垂体当りで正常ラットの0.5~2%であった。血中 GH 水準も *rdw* では正常ラットの約17%と雌雄とも顕著に低く, 下垂体での当該ホルモン合成の減少を反映していた。一方, 前葉の組織化学的検討により, 古藤らは FSH, LH 分泌細胞数は *rdw* と正常ラットに比べ多い傾向があったと報告している [4]。RIA を用いた下垂体当りの FSH, LH 両ホルモンの量的成績では雄で有意の減少を示し, 古藤らの定性的成績と異なった。この原因については不明であり今後の検討を要するが, これらの減少の程度は *rdw*/N×100値にみられるごとく GH の減少ほど顕著ではなかった。FSH, LH の下垂体重量当りの値で *rdw* の雄の FSH 以外は正常ラットとの差は全くなかった。血中水準では *rdw* は雄の FSH, 雌雄の

LH に有意の減少がみられたが、 $rdw/N \times 100$ 値で明らかに GH ほどの顕著な減少ではなかった。

Martin ら [5] は成長遅延がみられる Munich-Wistar ラットで、下垂体 GH 含量は正常ラットと変わらないが血中 GH 水準が極端に少ないことを観察し、このラットには遺伝的 GH 分泌機能障害があることを報告している。また、O'Sullivan ら [9] は大小型により選抜したラットの小型のものは大型のものに比べ GH の下垂体水準は約 1/2、血中水準は 1/2~1/4 に低下することを報告している。

近年、大熊は Sprague-Dawley 系から侏儒症ラットを発見した [8]。彼らはそのラットを用いて下垂体の組織化学 [7]、下垂体培養による下垂体の GRH (成長ホルモン放出ホルモン) に対する反応性 [6] あるいは下垂体 GH を支配する遺伝子の検索 [11] の結果、このラットでは GH mRNA の異常なスプライシングを起こす GH 遺伝子の点突然変異が原因で下垂体 GH 合成が阻害されて侏儒症が生ずることを報告している。

Charlton らは Lewis 系より侏儒症ラットを発見して下垂体ホルモン含量を RIA で測定し、PRL, LH, TSH は正常ラットと差がみられないにもかかわらず、GH のみ著しく低下することを報告した [2]。今回、著者の rdw ラットの下垂体ホルモン測定結果から、 rdw ラットは遺伝的に下垂体性 GH 欠乏ラットがもたらされる侏儒症ラットであることが明らかになった。

マウスでは古くから Snell dwarf [10] が侏儒症として知られ、近年の下垂体ホルモンの測定から GH, PRL, TSH が欠乏していることが明らかにされている [13]。古藤らの成績 [4] から rdw ラットは Snell dwarf マウスと内分泌機能が類似しているように想像される。著者らは今回の実験で rdw ラットの下垂体および血中プロラクチンを測定し両水準とも明らかに低下していることを観察している。しかし採血方法が従来のものと異なる [1, 12] のでさらに検討が必要である。また、TSH についてどのような知見が得られるか今後の検討を待たねばならない。Snell dwarf は疾患モデルとして既に確立されたマウスであり、もし古藤らの下垂体の組織化学的成績が RIA で確認されれば rdw ラットも従来知られている遺伝性侏儒症ラットとは内分泌機能が異なる下垂体ホルモン欠乏の疾患モデルとしての有用性が考えられる。GH はインシュリン様成長因子-1 (IGF-1) を介してその作用を発揮することが知られている [3, 13]。三輪は rdw ラットで GH の欠損により血中 IGF-1 が著しく低下することを観察している [東北大学農学研究科修士論文: 1991]。また、著者は rdw ラットにウシ GH を投

与すると増体効果が得られることを既に確かめている [梅津: 未発表]。従って、 rdw ラットは GH 欠乏のモデル動物としても利用できる可能性が考えられる。

この点も含めて今後なお詳細な検討を試み rdw ラットの特性を明かにしたい。

要 約

古藤らが Wistar-Imamichi 系ラットより発見した遺伝性侏儒症 (rdw) の雌雄 10 週齢のラットの下垂体および血中 GH, FSH, LH を RIA により測定し、同週齢の正常ラットと比較した。その結果、下垂体および血中の GH が rdw ラットでは極端に減少していることが判った。FSH, LH は rdw ラットでは全体的に低い傾向があったが GH ほど著しい減少は見られなかった。これらの結果は古藤らが下垂体の組織化学的検討により得た成績を一部裏付けた。 rdw ラットは下垂体 GH 欠乏の内分泌疾患モデルの一つとして有用性が高いと考えられた。

稿を終えるに当り rdw ラットの種親を供与戴きました、中外製薬 (株) 開発研究所の安達二郎所長に深謝致します。また原稿作成に当り貴重な助言を戴いた同研究所の古藤正男氏に深謝致します。

文 献

- [1] Blake, C. A. (1974). Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rat. *Endocrinology*, **94**, 503-508.
- [2] Charlton, A. E., Cox, B. S., Bugnon, C., and Bloch, B. A. (1988). Growth hormone deficient dwarfism in the rat: a new mutation. *J. Endocr.*, **119**, 51-58.
- [3] Daughaday, W. H., Hall, K., and Raben, M. S. (1972). Somatomedin: Proposed designation for sulfation factor. *Nature*, **235**, 107.
- [4] 古藤正男・佐藤毅司・岡本道夫・安達二郎 (1980). 新しい遺伝性侏儒症モデルラット. *実験動物*, **37**, 21-30.
- [5] Martin, I. B., Harris, C. A., and Dirks, J. H. (1974). Evidence of GH deficiency in the Munich-Wistar rat. *Endocrinology*, **94**, 1359-1363.
- [6] Nogami, H., Takeuchi, T., Suzuki, K., Okuma, S., and Ishikawa, H. (1989). Studies on prolactin and growth hormone gene expression in the pituitary gland of spontaneous dwarf rats. *Endocrinology*, **125**, 964-970.
- [7] 大熊新一 (1984). 自然発症矮性ラットにおける成長ホルモン. *日内分泌学誌*, **60**, 1005-1014.
- [8] 大熊新一・川島正次 (1980). 自然発症矮性ラット. *実験動物*, **29**, 301-304.
- [9] O'Sullivan, O., Millard, W. S., Badger, T. M., Martin, J. B., and Martin, R. Y. (1986). Growth hormone secretion in genetic large (LL) and small (SS) rats. *Endocrinology*, **119**, 1948-1953.
- [10] Snell, G. D. (1929). "Dwarf" a new mendelian recessive character of the house mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **15**, 733-734.

- [11] Takeuchi, T., Suzuki, H., Sakurai, S., Nogami, H., Okuma, S., and Ishikawa, H. (1990). Molecular mechanism of GH deficiency in the spontaneous dwarf rat : detection of abnormal splicing of GH messenger ribonucleic acid by the polymerase chain reaction. *Endocrinology*, **126**, 31-38.
- [12] Terkel, J., Blake, C. A., and Sawyer, C. H. (1972). Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology*, **91**, 49-53.
- [13] Van Buul-Offers, S. (1983). Hormonal and other inherited growth disturbances in the mice with special reference to the Snell dwarf mouse. *Acta Endocrinol.*, **258**, 7-47.
- [14] Van Wyk, J. J., Underwood, L. E., and Hints, R. L. (1974). The somatomedins : A family of insulin-like hormone under growth hormone control. *Recent Prog. Horm. Res.*, **30**, 259-318.