雌ラットの性成熟到来に関する研究

 ^3H -エストラジオールの組織への取り込みについて

梅 津 元 昭・竹 内 三 郎

(東北大学農学部)

幼若雌ラットでは、中枢一下垂体一性腺における各機能が生後3週令を境として著しい変化を示すことが知られている¹⁻¹¹⁾。著者らも、幼若雌ラットで、卵巣および卵胞の発達⁹⁾やPMS処理による排卵¹¹⁾がこの時期を境として出現することを観察した。この時期の顕著な性機能系の変化を詳しく検討することは、性成熟到来の機構を知る上で重要と考えられる。今回は、生後約3週令前後の幼若雌ラットで、微量の ^3H -エストラジオールを用いて、組織(子宮、下垂体、視床下部)への取り込みについて検討した。

実験方法

使用動物として、当研究室で累代繁殖しているWistar系ラットを用いた。ラットは照明時間12時間、温度24°Cに調整してある飼育室で育てた。子ラットは分娩日に乳子数を8~9匹とし、21日令に離乳した。実験には17, 21, 25日令のものを使用した。

^3H -エストラジオール[以下 $^3\text{H-E}$](エストラジオール-6,7- ^3H , 39.7 Ci/m mol. 146 mCi/mg 日本放射性同位元素協会)は、20%エタノールに溶かして1 $\mu\text{Ci}/0.1\text{ ml}$ としたものを使用した。

実験Iでは、初めに21日令のラットを用いて、1頭当り $^3\text{H-E}$ 1 μCi を皮下に注射し、5, 30, 60, 240分後に頸部切断により殺し、子宮、下垂体(後葉を除いて)、視床下部(前方は視束交叉、後方は乳頭体の後部、側部は視床下溝にハサミを入れ、厚さは約2 mmとして切り取ったもの)を取り出した。取り出した組織はKATO & VILLE^{12,13)}の方法に従って、エタノール:アセトン(1:1)の溶媒で放射活性を抽出し、シンチレーション・バイアル中で乾固した。さらに、頸部切断のさいに血液を

採取し、遠沈により血清を分離し、その0.1 mlをシンチレーション・バイアルに取り乾固した。17日令と25日令のラットは注射後16分で殺し、以下、21日令のラットと同様に組織を採取し、放射活性を抽出した。

実験IIでは、17, 21, 25日令の各ラットに体重50 g当り1 μCi の $^3\text{H-E}$ を皮下注射し、60分後に殺し、実験Iと同様に組織および血液を採取し放射活性を抽出した。

トリチウムの放射活性の測定は、抽出・乾固した物質を含むシンチレーションバイアルに10 mlのシンチレーション溶液{トルエン1 l中にPPO(2, 5-ジメチルオキサゾン) 4 g, ジメチル POPOP(1, 4-ビス[2-4-メチル-5-フェニルオキサゾリル]ベンゼン) 300 mgを溶かしたもの}を加え、パッカード製シンチレーションカウンターにて測定した。放射活性はcpmで表わし、組織当りおよび組織重量(mg)当りの取り込みを比較した。組織抽出物をバイアルに加えることによる計数効率の低下はみられなかった。

別に、体重50 g当り1 μCi の $^3\text{H-E}$ を注射した17日令の子宮抽出物を用いて、薄層クロマトグラフィーを行なった¹⁴⁾。すなわち、シリカゲルGを吸着させたガラス板(5×20 cm)を3枚用いて、その両側に、エストロン、エストラジオール; エストリオールの標準品の混合液をスポットし、中央のガラス板に試料をスポットし、ベンゼン; エタノール(9:1)で展開し、乾燥後五塩化アンチモン12%を含む四塩化炭素溶液を噴霧し、試料の各スポットにあたる部分のシリカゲル層をかき取って、再び温エタノール:アセトン(1:1)で抽出乾固した。乾固後シンチレーション溶液を加え、シンチレーションカウンターにてその放射活性を比較した。

結 果

実験 I.

1) $^3\text{H-E}$ の取り込みの経時的变化: はじめに、21日令のラットを用いて、 $^3\text{H-E}$ 注射後の各組織への取り込

The uptake of ^3H -estradiol in several tissues in female immature rats.

UMEZU, Motoaki & Saburo TAKEUCHI (Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai 980)

Jap. J. Animal Reprod. 17 (3). 1972.

^3H -estradiol $1\mu\text{Ci}/\text{rat}$ was subcutaneously injected and killed at various time. Each tissue was extracted with acetone : ethanol and serum was collected from each rat. After drying, radioactivity was measured with liquid scintillation counter.

Fig. 1. The relation between ^3H -estradiol uptake on tissues and the time after injection in rats of 21 days.

みの変化を時間を追って検討した。結果は Fig. 1 の通りで、子宮への取り込みは 5, 30, 60, 240 分で、それぞれ 202, 693, 740, 799 cpm で 30 分でほぼ最高に達し、以後 240 分まではほとんど変化がみられなかった。下垂体は、5, 30, 60, 240 分で、それぞれ 20, 21, 48, 36 cpm と 60 分で最高値を示し、240 分の値との間には差がなかった。視床下部における取り込みは、同様、それぞれ 44, 59, 46, 37 cpm と各時間において差がなかった。血清の放射活性は、同様、それぞれ 37, 20, 8, 10 cpm となり、5 分で最高に達した後減少し、60, 240 分では非常にわずかな活性を示した。これらの結果から、すべての組織への ^3H -E の取り込みは、注射後 60 分で平衡状態に達することが認められた。従って、以後の各日令における ^3H -E の取り込みの比較は、注射後 60 分で解剖したラットの組織について行なった。

2) ^3H -E $1\mu\text{Ci}$ 注射時の各日令ラットの組織への取り込み：各日令による体重、組織重量および各組織への ^3H -E の取り込みの測定値を Table 1 に示した。組織のうち卵巢重量は、17, 21, 25 日令の間で顕著な増加を示した。各組織 1 個当りの ^3H -E の取り込みは、まず、子宮では 17, 21, 25 日令でそれぞれ 1111, 815, 1333 cpm となり、17 : 21 日令間および 21 : 25 日令間にそれぞれ有意の差 ($P < 0.01$) がみられ、21 日令で有意の

減少が認められた。次いで、下垂体では各日令でそれぞれ 45, 49, 71 cpm で、17 : 25 日令間 ($P < 0.01$) および 21 : 25 日令間 ($P < 0.02$) で差がみられた。視床下部では各日令でそれぞれ 59, 48, 50 cpm を示し、各日令の間に差はなかった。組織重量 mg 当りに換算した ^3H -E の取り込みは、子宮では 17, 21, 25 日令でそれぞれ 49, 34, 40 cpm で、17 : 21 日令の間に有意の差 ($P < 0.01$) がみられた。下垂体および視床下部への取り込みは、各日令でそれぞれ下垂体 34, 32, 28 cpm 視床下部 3.4, 2.8, 2.7 cpm で両者とも各日令の間に差はみられなかった。組織重量当りの取り込みをみたとき、下垂体での取り込みは各日令とも子宮と同一水準の取り込みを示した。

実験 II.

^3H -E $1\mu\text{Ci}/50\text{g}$, b. w. 注射時の各日令ラットの組織への取り込み：得られた結果は Table 2 の通りである。卵巢重量は 17, 21, 25 日令でそれぞれ 2.8, 9.6, 15.7 mg と実験 I と同様に日令と共に顕著な発達を示した。組織 1 個当りの ^3H -E の取り込みは、子宮においては 17, 21, 25 日令でそれぞれ 709, 742, 1390 cpm で、17 : 21 日令間で差がなく、21 : 25 日令間で有意の差 ($P < 0.01$) がみられた。下垂体においては各日令でそれぞれ 30, 60, 76 cpm で、17 : 21 および 17 : 25 日令間で有意の差 ($P < 0.01$) がみられた。視床下部では各日令でそれぞれ 40, 85, 56 cpm で、17 : 21 日令の間に有意の増加 ($P < 0.05$) がみられた。組織重量 mg 当りに換算した取り込みは子宮では 17, 21, 25 日令でそれぞれ 33, 28, 41 cpm で、17 日令から 21 日令にかけて有意の減少 ($P < 0.02$) を示し、実験 I と同様の傾向を示した。また、21 日令から 25 日令で再び有意の増加 ($P < 0.01$) を示し、この 25 日令の値は 17 日令の値より大きかった ($P < 0.01$)。下垂体では各日令でそれぞれ 27, 28, 33 cpm で、相互の間にいずれも差はなかった。視床下部では各日令で 2.0, 4.2, 3.4 cpm で、17 : 21 日令間で有意の増加 ($P < 0.05$) を示した。下垂体の組織重量当りの取り込みは、実験 I と同様に子宮と同一水準の値を示した。

血清では各日令でそれぞれ 291, 36, 7 cpm で、17 日令で大きな値を示し、日令の進むにつれて急減した (17 : 21, 17 : 25, 21 : 25 日令間 $P < 0.01$)。

17 日令の子宮を用いて、薄層クロマトグラフィーにより分離したエストロジェンは、その約 85% がエストラジオールの型で存在することが認められた。

Table 1. ^3H -estradiol uptake on tissues in immature female rats at various stages (^3H -estradiol $1\mu\text{Ci}/\text{rat}$)

Days of age	No. of rats	Body wt. (g)	Weight of tissues (mg)				Radioactivity (counts per min./tissue)			Radioactivity (counts per min./mg tissue)		
			ovaries	uterus	pituitary	hypo-thalamus	uterus	pituitary	hypo-thalamus	uterus	pituitary	hypo-thalamus
17	18	33.9* ± 2.9 a	3.4 ± 0.8 b	22.8 ± 2.6	1.4 ± 0.5 d	17.6 ± 3.0	1111 ± 343 f	43.3 ± 15.0 h	59.2 ± 20.1	48.9 ± 12.5 j	33.5 ± 11.1	3.4 ± 0.9
21	20	44.8 ± 3.6 a	6.9 ± 2.1 b	24.4 ± 3.5 c	1.8 ± 0.4 d, e	17.6 ± 3.1	815 ± 147 f, g	49.2 ± 19.4 i	48.0 ± 15.6	34.3 ± 6.4 j	31.8 ± 20.0	2.8 ± 0.4
25	12	59.1 ± 3.5 a	14.8 ± 2.2 b	34.3 ± 5.1 c	2.5 ± 0.5 e	19.1 ± 3.0	1333 ± 351 g	70.9 ± 33.1 h, i	49.7 ± 19.2	39.9 ± 8.9	28.0 ± 11.0	2.7 ± 1.2

^3H -estradiol $1\mu\text{Ci}/\text{rat}$ was subcutaneously injected and killed by decapitation 60 minutes after injection. Each tissue was extracted with acetone : ethanol. After drying, radioactivity was measured with liquid scintillation counter.

Note; 1) a, b, c, e, f, g, h, j : means significant difference ($P < 0.01$)

d, i, : means significant difference ($P < 0.02$)

2) *: mean $\pm$ S. D.

Table 2. ^3H -estradiol uptake on tissues in immature female rats at various stages. (^3H -estradiol $1\mu\text{Ci}/50\text{g}$ body weight of rat)

Days of age	No. of rats	Body wt. (g)	Weight of tissues (mg)			Radioactivity (counts per min./tissue)			Radioactivity (counts per min./mg tissue)			Serum (0.1 ml)
			ovaries	uterus	pituitary	hypo-thalamus	uterus	pituitary	hypo-thalamus	uterus	pituitary	
17	9	33.8* ± 1.3 a	2.8 ± 0.7 b	21.2 ± 1.7 c	1.2 ± 0.5 e, f	17.1 ± 2.3	708 ± 120 g	30.0 ± 12.9 i, j	40.1 ± 6.6 k	33.3 ± 4.2 l, n	26.7 ± 13.0	290.5 ± 170.6 p
21	9	44.6 ± 2.7 a	9.6 ± 1.6 b	26.6 ± 3.9 c, d	2.3 ± 0.5 e	16.1 ± 2.4	742 ± 67 h	60.0 ± 21.3 i	83.2 ± 57.7 k	28.4 ± 4.2 l, m	28.2 ± 12.4	35.6 ± 9.1 p
25	9	55.9 ± 4.4 a	15.7 ± 2.6 b	33.6 ± 7.7 d	2.4 ± 0.5 f	16.4 ± 3.7	1390 ± 425 g, h	75.7 ± 21.5 j	55.5 ± 35.2	40.9 ± 7.2 m, n	33.2 ± 14.2	7.2 ± 4.4 p

^3H -estradiol $1\mu\text{Ci}/50\text{g}$ body weight of rat was subcutaneously injected and killed by decapitation 60 minutes after injection. Each tissue was extracted with acetone : ethanol and 0.1 ml serum was collected from each rat. After drying radioactivity was measured with liquid scintillation counter.

Note; 1) a, b, c, e, f, g, h, j, l, n, p : means significant difference ($P < 0.01$)

l, m.: ($P < 0.02$)

d, k, q.: ($P < 0.05$)

2) *: means $\pm$ S. D.

考 察

従来 $^3\text{H-E}$ のラットの標的組織への取り込みをみた報告は多いが、幼若動物への取り込みを日令を追って観察した報告は少ない^{15,16)}。ここでは微量の $^3\text{H-E}$ ($1\mu\text{Ci} \cdot 0.008\mu\text{g}$) を用いて各組織への分布および日令による変化を検討した。

まず、 $^3\text{H-E}$ の組織への取り込みの経時的变化は、 $^3\text{H-E}$ を皮下投与した従来の報告とほぼ一致した¹⁷⁾。各日令における臓器重量の変化では、卵巢重量において実験 I、II とともに顕著な変化を示した。これは著者の前報⁹⁾ と同じく 17, 21, 25 日令の特徴的な発達を示した。この時期の卵巢重量の増加は卵胞の発達と密接な関係があった⁹⁾。

子宮では、 $^3\text{H-E}$ 1 頭当り $1\mu\text{Ci}$ 注射時には、17 日令における子宮 1 個当りおよび組織重量当りの $^3\text{H-E}$ の取り込みが 21 日令より多く、25 日令では 1 個当りの取り込みが 21 日令より増加していた。また、体重 50 g 当り $^3\text{H-E}$ $1\mu\text{Ci}$ 投与の場合、17 日令では子宮重量当りの取り込みが 21 日令より多く、25 日令では 21 日令より 1 個当りおよび単位重量当りの取り込みに増加を示した。ラット 1 頭当り $^3\text{H-E}$ $1\mu\text{Ci}$ および体重 50 g 当り $1\mu\text{Ci}$ 投与を行なった場合、17 日令の子宮は 21 日令のものと比較して子宮 1 個当りおよび重量当りの $^3\text{H-E}$ の取り込みが高かったにもかかわらず、後者の処理では子宮 1 個当りの取り込みは 21 日令のものと比較して差がなかった。また、25 日令の子宮では 1 頭当り $^3\text{H-E}$ $1\mu\text{Ci}$ の処理では、21 日令と比較して子宮組織重量当りの取り込みに差がないにもかかわらず、 $^3\text{H-E}$ 体重 50 g 当り処理では 21 日令との間に組織重量当りでも差がみられた。これらのことは 2 つの処理による $^3\text{H-E}$ 投与量の微妙な差を反映したものと思われる。いずれにせよ、実験 I、II から 21 日令では相対的に $^3\text{H-E}$ の取り込みが少ないことが観察された。この原因については今のところ不明であるが、次のようなことが考えられる。第 1 に、EISENFELD & AXELROD¹⁸⁾ は、成熟ラットの子宮のレセプターを満すには、外部から $0.5 \sim 2\mu\text{g}$ のエストラジオールを投与することを必要としているが、ここで与えられた $^3\text{H-E}$ の量は、子宮のエストロジェン・レセプターを満すには非常に少ない量であり、この時期 (21 日令) に急激に発達する卵胞⁹⁾ から分泌されるエストロジェンと投与した $^3\text{H-E}$ とが競合し、従って $^3\text{H-E}$ の取り込みの減少を来すことである。第 2 に、後述するごとく 17 日令の血清 $^3\text{H-E}$ レベルが高いため、この日令では組織の発達が

21, 25 日令より劣っているにもかかわらず $^3\text{H-E}$ が組織に取り込まれる機会が多くなる。従って 17 日令の子宮の相対的な取り込みが 21 日令より多くなる。しかしながら、これらのことについては以後の研究を待たねばならない。

下垂体では、実験 I、II を通じて各日令とも組織重量当りの取り込みは視床下部よりはるかに多く、エストロジェンの標的組織である子宮と同水準の値を示した。これは、より多量の $^3\text{H-E}$ をラットに投与した従来の報告とよく一致する^{12,13,15,16,18,19)}。下垂体 1 個当りの取り込みは日令が進むに従って増加したが、単位重量当りでは増加がみられなかった。このことは下垂体の発達に伴い下垂体のエストロジェン・レセプターが非常にわずかに増加しないことが考えられる。

視床下部では、実験 II において 17 日令から 21 日令にかけて 1 個当りおよび組織重量当りの取り込みにわずかな増加がみられ、ラットの成長に伴い視床下部のエストロジェン・レセプターがわずかに増加することが考えられた。実験 I では、17 日令の $^3\text{H-E}$ 投与が 1 頭当り $1\mu\text{Ci}$ であり、この $^3\text{H-E}$ 量を体重当りに換算した時に、実験 II の投与量より多かったため、17 日令と 21 日令の間で $^3\text{H-E}$ の取り込みの差が現われなかったものと考えられる。17~21 日令にかけての $^3\text{H-E}$ の取り込みの変化は、 $^3\text{H-E}$ の微妙な投与量の違いにより左右されるわずかな変化と思われる。従ってこの変化をこの時期に生ずる FSH 分泌能²⁻⁵⁾ 等に関する中枢機構の変化と直ちに結びつけるにはなお不十分と思われる。

血清の $^3\text{H-E}$ の放射活性は 17 日令から 21, 25 日令にかけて著しい減少がみられた。従来の報告では、雌ラットの新生、幼若、性成熟、成熟の各時期における血中の放射活性は新生、幼若時では高いが、性成熟時ではわずかに検出される程度にまで減少し、成熟ラットと同様であることが知られている^{15,18-20)}。17 日令で放射活性の血中レベルの高かったことは、WOOLEY ら¹⁵⁾ が 15 日令ラットで観察したものと同様の傾向にあった。この放射活性は 4 日後の 21 日令で急減し、25 日令で成熟ラットの放射活性とほぼ同水準にまで低下することが観察された。実験 I において時間を追って血中の活性の変化を求めたが、17 日令のような高い値は全くみられなかった。このことから、この時期 (17~21 日令) に $^3\text{H-E}$ の体内における代謝および吸収機構に大きな変化があったものと推定される。17 日令においては、血中放射活性の高値にもかかわらず各組織への $^3\text{H-E}$ の取り込みが相対的に高い値を示さなかった。このことは WOOLEY ら¹⁵⁾

の報告と異なるが用いた $^3\text{H-E}$ の量の違いによるものと推察される。

投与した $^3\text{H-E}$ の組織での存在様式を知るため、17日令の子宮で観察したところ、子宮でのエストロジェンの放射性の大部分である約 85% がエストラジオールの型で存在し、 $^3\text{H-E}$ は子宮ではほとんど変化しないことを示した。この結果は従来の報告^{15,17-19)}と一致した。

要 約

17, 21, 25 の各日令の雌ラットを用いて、 $^3\text{H-}$ エストラジオール ($^3\text{H-E}$) $1\mu\text{Ci}$ (1 頭当りおよび体重 50 g 当り) を皮下注射し、1 時間後の子宮、下垂体、視床下部および血清の放射活性の変化を観察した。

1. 子宮では、組織重量当りの取り込みが 17~21 日令にかけて減少し、25 日令では体重換算で $^3\text{H-E}$ を投与した時は組織 1 個当りおよび重量当りの取り込みがともに増加した。

2. 下垂体では、各日令とも組織重量当りの取り込みは視床下部より多く、子宮と同一水準の取り込みを示した。下垂体の 1 個当りの取り込みは日令が進むにつれて増加したが、組織重量当りでは増加はみられなかった。

3. 視床下部では $^3\text{H-E}$ 体重換算投与の場合 17~21 日令にかけてわずかに増加した。

4. 血清の放射活性は、17 日令で高い値を示し、21, 25 日令では 17 日令の約 1/10 の値に減少した。

(1971. 11. 1 受付)

文 献

- 1) CRITCHLOW, V. & M. E. BAR SELA: *Neuroendocrinol.*, **2**, 101, Academic Press, New York & London, 1967.
- 2) LAUSON, H. D., G. B. GOLDMAN & S. E. L. SEVERINGHAUS: *Am. J. Physiol.*, **125**, 396, 1939.
- 3) SHINO, M. & E. G. RENNELS: *Endocrinol.*, **81**, 1479, 1967.
- 4) KRAGT, C. L. & W. F. Ganong: *Endocrinol.*, **82**, 1241, 1968.
- 5) CORBIN, A. & E. L. DANIELS: *Neuroendocrinol.*, **2**, 304, 1967.
- 6) LANE, C. E.: *Anat. Rec.*, **61**, 141, 1964.
- 7) EKSTEIN, B.: *Bull. Res. Council. Israel*, **8**, 109, 1960.
- 8) 梅津(元): 本誌, **16**, 71, 1970.
- 9) ZARROW, M. X., J. H. CLARK & V. H. DENENBERG: *Neuroendocrinol.*, **4**, 270, 1969.
- 10) ZARROW, M. X. & D. L. QUINN: *J. Endocrinol.*, **26**, 181, 1963.
- 11) UMEZU, M., C. KODAMA. & S. TAKEUCHI: *Tohoku J. Agr. Res.*, **19**, 50, 1968.
- 12) KATO, J. & C. A. VILLEE: *Endocrinol.*, **80**, 567, 1967.
- 13) KATO, J. & C. A. VILLEE: *Endocrinol.*, **80**, 1133, 1967.
- 14) 橋本(庸): 薄層クラマトグラフィー, 111, 広川書店, 1962.
- 15) WOOLEY, D. E., C. F. HOLINKA & P. S. TIMIRAS: *Endocrinol.*, **84**, 157, 1969.
- 16) PRESL, J., S. RÖHLING., G. HORSKY & J. HERZMANN: *Endocrinol.*, **86**, 899, 1970.
- 17) JENSEN, E. V. & H. I. JACOBSON: *Recent Progr. Hormone Res.*, **18**, 387, 1962.
- 18) RISENFELD, A. G. & J. AXELROD: *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **150**, 469, 1965.
- 19) RISENBELD, A. J. & J. AXELROD: *Endocrinol.*, **79**, 38, 1966.
- 20) KATO, J., M. INABA & T. KOBAYASHI: *Acta endocrinol.*, **61**, 585, 1969.

Summary

The uptake of ^3H -estradiol in several tissues (uterus, pituitary, hypothalamus) and serum of rats was measured on 17, 21 and 25 days of age.

^3H -estradiol (Estradiol-6, 7- ^3H 39.7 Ci/m mol) was soluted to twenty percent ethanol and 1 $\mu\text{Ci}/0.1$ ml per rat (Exp. I) and 1 $\mu\text{Ci}/0.1$ ml per 50 g body weight (Exp. II) was injected subcutaneously.

The tissue of autopsied rat was extracted with solution of acetoneethanol (1:1). The serum was collected 0.1 ml per rat. These samples were dried and the scintillating solution was added. The radioactivity of these samples was measured with liquid scintillation counter. In order to examine the relation between the time of injection and the time of the slaughter, the radioactivity was measured in rats slaughtered at 5, 30, 60 and 240 minutes after injection of ^3H -estradiol (Fig. 1).

The equilibrium of uptake of ^3H -estradiol reached in all tissues about 60 minutes after injection. Then, the uptake of ^3H -estradiol per whole tissue and tissue weight (mg) was measured at 60 minutes after injection.

The results are as follows:

1. In uterus, the uptake of ^3H -estradiol per tissue weight decreased significantly from 17 to 21 days of age (Exp. I, II). The increased level of counts per both whole tissue and tissue weight was observed at 25 days of age (Exp. II).

2. In pituitary, the uptake of ^3H -estradiol per tissue weight was much higher than the uptake of hypothalamus and nearly equal to that of uterus in each day of age. The uptake of estradiol per whole tissue increased with age, but not for tissue weight (Exp. I, II).

3. In hypothalamus, the slight rise of counts per both whole tissues and tissue weight (Exp. II) was observed from 17 to 21 days.

4. In serum, a higher level of radioactivity was obtained at 17 days of age comparing with the levels of 21 and 25 days. Then, it is probable that the remarkable change in the metabolism of estrogen occurs from 17 to 21 days of age.