Effect of Testosterone and Progesterone on the Adrenal X-Zone in Female Mice

Masao ASARI, Koosaku FUKAYA, Yasunobu EGUCHI
Shiichi NISHIDA and Yutaka KANO

*Department of Veterinary Anatomy, Azabu Veterinary College,
Fuchinobe, Sagamihara-shi, Kanagawa 229*

(Received for publication August 14, 1978)

Abstract. In order to extend studies on roles of androgen and progesterone in the degeneration of the X-zone, 30-day-old ICR female mice were used. The X-zone was degenerated by 6-days' treatment with progesterone as well as with testosterone. Testosterone had strong effects on the X-zone, leading to its complete disappearance at any daily dose of 2.5, 1.0, 0.5 and 0.1 mg. Progesterone had less effects; the X-zone disappeared in 8 of 9 mice daily given 2.5 mg, and in only one of 6 mice daily given 1.0 mg; the X-zone remained unchanged in all mice daily given 0.5 mg in many cases. Degenerative changes of the X-zone caused by testosterone differed from those caused by progesterone in such a way that the testosterone-induced degeneration was followed by a gradual juxta-medullary fibrous replacement while the progesterone-induced degeneration appeared fatty in nature. Due to some exceptions in which, testosterone induced fatty degeneration and progesterone induced fibrous replacement, the differences mentioned above was not strictly specific. To eliminate endogenous hormones from the ovary and conversion of progesterone to androgen in the gland, some mice were ovariectomized and given 2.5 mg progesterone. As a result, the X-zone was relatively well maintained. This means that progesterone does not exert any destructive effect directly on the X-zone, but does so via the ovary, in which progesterone may be converted in part into testosterone.

雌マウス副腎 X 帯に及ぼすテストステロンおよび プロジェステロンの効果

浅利昌男・深谷幸作・江口保暢・西田司一・鹿野 胖
麻布獣医科大学家畜解剖学教室

マウス副腎皮質の最内層に認められる X 帯は雌雄で消失時期、消失様相が異なることが知られている。雄では性成熟に達した時点で退行が急速に始まり、皮・髄質間に線維膜を形成して消失する。また、消失後去勢すると再び X 帯が出現する。一方、雌では未経産であれば性成熟期に達しても X 帯は依然発達しており、50~60 日齢以降より徐々に X 帯細胞が脂肪変性を起こ

しながら退行し、100 日齢以降では多くの例で脂肪変性細胞が X 帯の大部分を占めるようになる。また、最初の妊娠で、X 帯は妊娠 7~12 日の間で急速に消失する [10]。

X 帯に対する外因性の性ステロイドホルモンの影響を知ることは、X 帯の内分泌支配を明らかにする上で重要であり、従来多くの研究が行なわれている。

Deanesly ら [2] はマウスに androgen を投与し、X 帯が完全に消失することを認めており、その後多くの研究者によってX 帯退行と androgen の密接な関係が確認されてきた [6, 8, 10]。また、progesterone, estrone はX 帯退行に直接関係を及ぼさないことが報告されている [7, 15]。一方、以上のうち、特に雌のX 帯の消失について Holmes ら [4] は雌マウスに各種のホルモンを投与し、主に退行に伴う形態的特徴（脂肪変性細胞の出現）から卵巢より出される progesterone が原因であるとし、以前より考えられてきた androgen 説を否定した。今回の実験は雌の副腎皮質X 帯の本態研究の一環として、雌のX 帯に対する testosterone と progesterone の影響を検討し、雌のX 帯についての androgen 説、progesterone 説を考察した。

材料と方法

本研究では、30日齢の ICR 処女雌マウスを用い、動物はオリエンタル固型飼料と水を自由に与えることによって飼育した。飼育環境は温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 60%、照明時間を午前6時から午後6時までの12時間とした。使用した日齢のマウスでは、浅利ら [1] が雌マウスの生後発達を検討して得られた成績によればX 帯は退行せず十分発達している。実験は無投与対照群、溶剤投与対照群、testosterone 投与群、progesterone 投与群、卵巢摘出群、卵巢摘出後 progesterone 投与群の6群とした。ホルモンは Sigma 社製 testosterone, progesterone を使用し、corn oil を溶剤とし溶剤 0.2 ml に目的とする投与量が含まれるように調整した。投与期間は1日1回連続6日間で、投与部位は腰部皮下とした。卵巢を摘出していないホルモン投与群は Table 1 に示すように設定した。卵巢摘出群は、術後2日目より同様な量および期間、処置した (Table 1)。動物はそれぞれ投与期間終了後エーテル麻酔下で直ちに断頭放血し、両側の副腎を摘出し、周囲組織を注意深く除去した後に Müller 100 ml, formalin 5 ml, acetic acid 5 ml [13] で固定した。固定後型のとおり paraffin 包埋を施し、 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ の連続切片を作製して、ponceau-fuchsin-anilin blue 染色 [13]、あるいは Marolloy-azan 染色を施し、X 帯を皮質他層と分別した。

成 績

無投与対照群、溶剤投与対照群 (Table 1, 第1群, 2群)

この2つの群のいずれにおいても、すべての個体でX 帯は強く酸フクシンに染まり暗調であって、明調な束状帯と際立った対比をなして皮質内層に発達していた。X 帯は、円形または卵円形の核を有する酸好性の小型細胞が塊状あるいは不規則な束状に集まってできており、不規則に走る血管洞を含んでいた。X 帯に外接する束状帯細胞の多くは、多量の脂質小滴を含んで海綿状を呈して明調であるのに反し、X 帯細胞には脂質小滴はほとんど含まれていなかった (Figs. 1, 2)。

Testosterone 投与群 (Table 1, 第3群)

2.5, 1.0, 0.5, 0.1 mg 投与群のすべての個体でX 帯は完全に消失しているか、また退行経過中の状態を呈していた。多くのX 帯細胞には核濃縮がみられ、胞体も萎縮し濃染する傾向にあった。皮・髄質境界部には変性萎縮したX 帯細胞を混じて、膠原線維性の線維膜あるいは線維層が形成され、線維膜間にはやや拡張した血管洞が存在していた (Figs. 3, 4)。また testosterone 投与群の一部の例でX 帯細胞のあるものに空胞形成が認められた (Fig. 5)。

Progesterone 投与群 (Table 1, 第4群)

2.5 mg 投与群で9例中8例、1.0 mg 投与群で6例中1例にX 帯の退行が認められた。0.5 mg 投与群では全例でX 帯の退行は認められなかった。X 帯の退行様相は testosterone 投与群と異なり、皮髄質境界部に集中して多くのX 帯細胞が空胞変性化を示していた。同時に、これらの変性細胞に接して、それと髄質との境に膠原線維性の線維膜も形成されている所見が得られた (Fig. 6)。さらに 2.5 mg 投与群の一部の例では完全な線維層の膜形成によりX 帯が消失していた (Fig. 7)。

卵巢摘出群 (Table 1, 第5群)

すべての例で、対照群に類似してよく発達したX 帯細胞が認められた。X 帯細胞は強く酸フクシンに染まり暗調で、皮質他層、髄質細胞と明らかに区別できる状態に発達していた (Fig. 8)。

卵巢摘出後 progesterone 2.5 mg 投与群 (Table 1, 第6群)

この群5例のうち4例にX 帯に発達していた。その形態は、対照群のそれと類似していたが、一部のものが束状帯とX 帯との境界部に結合組織性の線維膜形成が認められた。第4群の無処置 progesterone 2.5 mg 投与群に見られた空胞形成はここでは認められなかった (Fig. 9)。残りの1例は皮・髄質境界部に明瞭な線維膜が形成され、X 帯が完全に消失していた。

Table 1. Difference in pattern of degeneration of the X-zone according to various daily doses of hormones for 6 days in the normal and the ovariectomized mice

Group	Experimental condition		Daily dose of hormone (mg)	No. of mice examined in the group	No. of mice showing the degenerating X-zone
	Operation	Hormone			
1	Intact	Nothing	—	5	—
2	Intact	Oil	—	5	—
3a	Intact	Testosterone	2.5	8	8
3b	Intact	Testosterone	1.0	4	4
3c	Intact	Testosterone	0.5	4	4
3d	Intact	Testosterone	0.1	4	4
4a	Intact	Progesterone	2.5	9	8
4b	Intact	Progesterone	1.0	6	1
4c	Intact	Progesterone	0.5	4	—
5	OVX	Oil	—	4	—
6	OVX	Progesterone	2.5	5	1

考 察

X 帯の消長についての Jones [8, 9, 11] の成績によれば, (i) 雌雄ともに下垂体性 LH が X 帯維持に重要な役割を持つ, (ii) 雄における性成熟時の X 帯の消失は精巣から分泌される androgen の直接作用による, (iii) 去勢後の X 帯の再出現は血中 androgen の減少に反応した下垂体性 LH の増加のためであるという. X 帯の消失が androgen の直接作用によるということは今回の雌マウスに対する testosterone 投与実験によってみられた現象からも容易に推定することができる. すなわち 2.5, 1.0, 0.5, 0.1 mg の各投与群で明瞭な X 帯の退行を認め, その様相が雄マウスの生理的な消失時の様相と類似しており, androgen が X 帯の退行に対して強力な作用をもつことは明らかである. また Jones [10] は雌の X 帯の退行について, X 帯をもつ雌マウスに trophoblast を移植する実験により, 最初の妊娠時の消失は受精後発育した trophoblast から黄体刺激物質が分泌されて, それにより卵巣内で生産された progesterone が androgen に転換され, この卵巣性 androgen が X 帯に作用して X 帯が退行すると説明している. また Jones [10] は trophoblast と前立腺を雌マウス前眼房に移植し, 宿主の卵巣のあるなしによって前立腺の態度が異なることから, trophoblast が卵巣を刺激して androgen を出させることを確認し, また未経産マウスの X 帯の退

行についても同様に性周期の開始に伴う血中 androgen の緩徐な増量から起こると推論した. その後 Vinson ら [14] は *in vitro* で, 妊娠マウス卵巣が progesterone を androgen に転換することを認め, Jones [10] の結果を支持している. さらに Kirby [12] も最初の妊娠時の X 帯の退行について同様な実験を行ない, trophoblast の他に blastocyst を移植した場合に卵巣摘出マウスにも X 帯の退行を認めている. これらの場合には, X 帯の退行は trophoblast の影響が下垂体を介して, そこから gonadotrophin を分泌させ, それが卵巣を刺激して卵巣性 androgen を分泌させること, および卵巣をもたない動物では blastocyst の影響が下垂体を介して ACTH を分泌させ, それが副腎を直接刺激して副腎性 androgen を分泌させることを推論している. このように Jones の見解と Kirby の見解にはいく分の相違が見られるが, この消失の本質は両者とも, 卵巣性であれ, 副腎性であれ, androgen によるものであるということで一致している. この論拠の背景には progesterone, estrone の単独注射, 同時注射によっては X 帯が退行しないという報告 [7, 15] があることを念頭においておく必要がある.

雌の X 帯の退行についてのもう 1 つの説は Holmes ら [4, 5] のいう progesterone 説である. このことは, Howard ら [7], Waring [15] が progesterone は X 帯の退行に関与しないと述べたことと相反している. にもかかわらず, Holmes ら [4, 5] によれば

progesterone 投与によって X 帯は退行するのであるがその退行の様相は最初の妊娠時や性成熟後の消失時に特徴的に認められる空胞変性化（脂肪変性化）と同じであって、testosterone 投与時には、この空胞変性が認められないということと対比して、Holmes ら [4] は雌の X 帯の退行は progesterone によると確信している。さらに Holmes ら [5] は同様な所見を幼若な雌マウスへの trophoblast 移植によっても認めており、これに加えて退行時の生理的諸現象、すなわち性成熟以後および妊娠時の progesterone の増量という点をも progesterone 説の主張根拠としている。

今回のわれわれの観察では、progesterone 2.5 mg 投与群に明瞭な空胞形成による X 帯の退行が認められ、この点では Holmes ら [4] が報告した結果と一致している。しかしながら、Holmes らの用いた 2.5 mg の progesterone の投与量は卵巣の有無にかかわらず循環血液中の progesterone の生理的レベルに比較しては過量と考えられる。卵巣摘出した妊娠マウスの妊娠維持は日量 0.2 mg の progesterone で十分であるという [3]。したがって、投与量を 1.0 mg, 0.5 mg と減少させた時の X 帯の態度を調べる必要があった。その結果 X 帯の退行は 1.0 mg 投与群 6 例中 1 例にのみ認められたにすぎず、0.5 mg 投与群では全例、X 帯は完全に維持されていた。この結果はむしろ、Howard ら [7], Waring [15] の progesterone 無効説を支持するものである。次に Jones [10] が報告したように、trophoblast からの刺激が卵巣内で progesterone を合成させ、それを androgen に転換してその卵巣性 androgen が X 帯の退行を導くとするならば、卵巣の存在が X 帯の退行に少なからず関係すると思われる。そこで今回卵巣を摘出し、卵巣の影響を除いて、progesterone 2.5 mg を投与した。その結果、実験例 5 例中、4 例に明瞭な X 帯が認められ、卵巣摘出無投与マウスと同様な所見を示した。この現象の解釈に 2 つのことが考えられる。第 1 に、内因性の progesterone の影響が除かれ、progesterone の量が減じて X 帯に直接効果を及ぼさなかった。第 2 に、progesterone から androgen に転換する機構が卵巣摘出により除かれ、X 帯を消失させるであろう androgen が分泌されなかった。しかし第 1 の解釈は、内因性の progesterone が除かれた状態であっても、体重 18~22 g の 30 日齢雌マウスに対する progesterone 2.5 mg の投与量は生理的な量よりはるかに高い量と考えられ、それに対して X 帯が多くの例で退行しなかったのであるか

ら、可能性の低い推論であると思われる。よって第 2 の解釈に考慮を払う必要がある。

Testosterone 投与と progesterone 投与による退行様相の差は、今回の観察でも明らかに認められた。すなわち testosterone 投与群では皮・髄質境界部に結合組織性の線維膜を形成し、progesterone 投与群では X 帯細胞の空胞変性化が出現しており、それらは各投与群の主徴となった。しかし testosterone 投与群の一部に X 帯細胞が空胞変性を起こしている所見が、また progesterone 投与群の一部で X 帯が線維膜を形成して完全に消失している所見が得られた。Testosterone, progesterone を投与した場合、完全に区別できる 2 つの退行様相が見られるが、中にわずかな例外も認められたので、退行様相の違いはホルモンの種類による本質的な差ではないように思われる。むしろ testosterone 投与および progesterone 投与によっては本質的には同じ X 帯退行がもたらされると考える方がよりよいと思われる。すなわち、progesterone 投与では、X 帯は徐々に退行し、その途中経過として X 帯細胞の空胞変性化がおこり、testosterone 投与ではその作用が強く速やかに X 帯細胞は空胞変性を経過して、線維膜形成にまで至るのであろう。このような考え方は卵巣を除去したマウスへの progesterone 投与で多くの場合に X 帯が維持残存していたことから導かれるように、X 帯の退行は progesterone そのものによるというよりも、卵巣を経由して卵巣で転換された androgen によるという考えに、一致するものである。卵巣を摘出したにもかかわらず、progesterone 投与で X 帯が消失した 1 例は、progesterone が副腎そのものによって androgen に転換され、この androgen が働くという可能性を示唆するように思われる。

要 約

マウス副腎皮質 X 帯に及ぼす種々の濃度の testosterone, progesterone の影響を知るために 30 日齢の ICR 処女雌マウスを用いて検討した。さらに、卵巣摘出マウスに progesterone を投与してその影響をも検討し、次の成果を得た。

1) Testosterone 投与では、2.5, 1.0, 0.5, 0.1 mg 投与群のすべての例で、X 帯は退行過程および消失様相を呈し、その形態的特徴は一部の例外を除き皮・髄質境界部での膠原線維の集積であった。

2) Progesterone 投与では、2.5 mg 投与群で 9 例中 8 例で、X 帯は退行過程および消失様相を呈してい

たが, 1.0 mg 投与群では6例中1例のみ退行したに過ぎなかった. さらに, 0.5 mg 投与群では全例でX帯は完全に維持されていた. 消失様相の形態的特徴は一部の例外を除きX帯細胞の空胞変性化であった.

3) 卵巣除去によって内因性の影響を除いたマウスに progesterone 2.5 mg を投与した場合, 5例中4例でX帯が明瞭に維持され, 残存していた. これらの結果から, 雌マウスX帯に対する progesterone の退行性効果は, ほぼ卵巣を仲介するものであり, 本質的には androgen 性であることが示唆される.

文 献

- [1] 浅利昌男・深谷幸作・西田司一・鹿野 胖 (1977). 雌マウス副腎X帯の生後発達について. 麻布獣医大研究報告 2, 341-353.
- [2] Deanesly, R., and Parkes, A. S. (1937). Multiple activities of androgenic compounds. *Quart. J. exp. Physiol.* 26, 393-402.
- [3] 江口保暢 (1963). マウス胎生期副腎皮質に関する実験的研究. 大阪府大紀要 14, 211-247.
- [4] Holmes, P. V., and Dickson, A. D. (1971). X-zone degeneration in the adrenal glands of adult and immature female mice. *J. Anat.* 108, 159-168.
- [5] Holmes, P. V., and Dickson, A. D. (1971). The effect on the mouse adrenal X-zone of blastocysts transplanted under the kidney capsule. *J. Reprod.* 25, 111-113.
- [6] Howard, E. (1940). Regarding the effects of desoxycorticosterone acetate and of testosterone on the adrenal X-zone. *Anat. Rec.* 77, 181-191.
- [7] Howard, E., and Gengradon, S. (1940). The effects of ovariectomy and administration of progesterone on the adrenal X-zone and the uterus. *Endocrinology* 26, 1048-1052.
- [8] Jones, I. C. (1949). The action of testosterone on the adrenal cortex of the hypophysectomized, prepuberally castrated male mice. *Endocrinology* 44, 427-438.
- [9] Jones, I. C. (1949). The relationship of the mouse adrenal cortex to the pituitary. *Endocrinology* 45, 514-536.
- [10] Jones, I. C. (1952). The disappearance of the X-zone of the mouse adrenal cortex during first pregnancy. *Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* 398-410.
- [11] Jones, I. C. (1955). The adrenal cortex in reproduction. *Brit. med. Bull.* 2, 156-160.
- [12] Kirby, D. R. S. (1966). The difference in response by the mouse adrenal X-zone to trophoblast derived from transplanted tubal eggs and uterine blastocysts. *J. Endocr.* 36, 85-95.
- [13] Nishida, S., and Mochizuki, K. (1960). Differential staining of the X-zone of mouse adrenal cortex. In *Festschrift Prof. Schreiber 1960, der "Wiener Tierärztl. Mschr."*, 81-87.
- [14] Vinson, G. P., and Jones, I. C. (1963). The conversion of progesterone into testosterone by the mouse ovary and its relation to adrenal X-zone degeneration. *J. Endocr.* 26, 407-414.
- [15] Waring, H. (1942). Effect of hormones on degeneration of the X-zone in the mouse adrenal. *J. Endocr.* 3, 123-131.

Explanation of Figures

- Fig. 1. Adrenal gland from an intact female mouse. The X-zone stands out against the rest of the cortex by virtue of its intense staining. F, fascicular zone of the cortex; X, X-zone; M, medulla. Ponceau-fuchsin-anilin blue stain. $\times 185$.
- Fig. 2. Adrenal gland from a female mouse given corn oil. Note the wide band of densely staining X-zone cells. Marolly-azan stain. $\times 185$.
- Fig. 3. Adrenal gland from a female mouse daily treated with 2.5 mg testosterone. Fine fibers can be seen closely to the medulla, constituting a connective tissue capsule around the medulla. Marolly-azan stain. $\times 185$.
- Fig. 4. Adrenal gland from a female mouse daily treated with 1.0 mg testosterone. Note the narrow, fibrous X-zone lacking in fatty degeneration with nuclear pycnosis. Marolly-azan stain. $\times 185$.
- Fig. 5. Adrenal gland from a female mouse daily treated with 2.5 mg testosterone, having cells of fatty degeneration (arrows) in the fibrous region of the X-zone. M, medulla. Ponceau-fuchsin-anilin blue stain. $\times 385$.
- Fig. 6. Adrenal gland from a female mouse daily treated with 2.5 mg progesterone. Vacuolated cells can be seen in the degenerative X-zone, constituting a sign of fatty degeneration. Marolly-azan stain. $\times 185$.
- Fig. 7. Adrenal gland from a female mouse daily treated with 2.5 mg progesterone. The X-zone has been replaced by a connective tissue capsule around the medulla. Ponceau-fuchsin-anilin blue stain. $\times 385$.
- Fig. 8. Adrenal gland from an ovariectomized mouse. The X-zone stands out against the rest of the cortex by virtue of its dense staining. Marolly-azan stain. $\times 185$.
- Fig. 9. Adrenal gland from an ovariectomized mouse daily treated with 2.5 mg progesterone. Note the persistence of the wide band of densely staining X-zone cells. Marolly-azan stain. $\times 185$.