

ラットの黄体形成ホルモン(LH)の律動性分泌リズムと摂食パターン—摂食パターンを用いた非侵襲的性周期判定法—

治京 玉記¹⁾, 内山 文昭^{1,2)}

1) 中村学園大学薬膳科学研究所分子栄養学部門

2) 中村学園大学大学院栄養科学研究科

キーワード：エストロゲン，サージ状黄体形成ホルモン(LH)分泌，腔垢スメア検査法，性周期判定，摂食パターン

要 約

性周期を観察・分類する判定方法として，腔垢スメア検査法が主に用いられている。しかし，腔垢スメア検査法は，腔垢スメアの採取から乾燥，染色そして鏡検による判定から評価するため時間と手間がかかる。さらに，腔垢スメアを採取時にラットにストレス負荷をかけるため不規則な性周期を示しやすい。

本研究では，エストロゲンの標的組織ギムザ染色法である腔垢スメア検査法と血清中黄体形成ホルモン(LH)量から摂食パターンと性周期の関連性を明らかにし，非侵襲的に性周期を判定する方法について検討を行った。

はじめに

近年，女性の社会進出がめざましくなり，それと同時に若年性更年期障害，月経異常や不妊症等の患者数は年々増加傾向にあり，薬の対症療法だけでは対処できない深刻な社会問題となっている。そこで，原因療法を目的とした手法として，生殖生理機能を調節する漢方療法が欠かせない治療手法になっている。しかし，数ある漢方療法の効能・効果の研究では，*in vitro* レベルでの報告が大半を占め [1-3]，六君子湯 [4, 5] のように動物実験を用いた *in vivo* レベルでの作用機序の解明が切望されている。

生殖生理機能を調節する生殖内分泌系は，視床下部—

下垂体前葉—性腺軸のホルモン情報伝達系により調節されている。視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone; GnRH) や下垂体前葉から放出されるゴナドトロピンである卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone; FSH) および黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) が性周期の発現に主要な役割を果たしている。また，下垂体前葉における GnRH 受容体や卵巣における FSH および LH 受容体が量的に変動することも性周期発現の一因として注目されている。卵巣は女性生殖腺として，性周期に応じて，ステロイドホルモンであるエストロゲンおよびプロゲステロンを産生する [6]。脳下垂体から分泌される FSH は，卵胞の発達とエストロゲン産生を促し，その後の LH の律動性分泌 (LH サージ) により排卵が起きる [7]。排卵後に黄体が形成されると，卵巣からは，プロゲステロンが産生される。

現在，生殖内分泌系の研究で用いられているラットの性周期判定には，エストロゲンの標的組織ギムザ染色法である腔垢スメア検査法が汎用されている [8-10]。しかし，腔垢スメア検査法は，腔垢スメアの採取，乾燥，染色そして鏡検により判定するため時間と手間がかかる。さらに，ラットにストレス負荷をかけず腔垢スメアを採取するためには熟練度が必要とされている。また，腔粘膜上皮の角質層の形成に伴うインピーダンス (交流電気抵抗) 値を指標とする腔インピーダンス法 [11, 12] も性周期判定に用いられているが，腔内にプローブを挿入するため腔垢スメア検査法同様に挿入ストレスにより不規則な性周期を示す。そこで，非侵襲的に性周期を判定する方法が望まれている。

本研究では，9週齢の Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラットに一般的に用いられている CE2食餌を自由摂食で与え，腔垢スメア検査法と血清中 LH 量から摂食パターンと性周期の関係について検討を行った。

連絡先：治京玉記，中村学園大学薬膳科学研究所分子栄養学部門

〒814-0198 福岡市城南区別府5丁目7-1

FAX: 092-851-6712

FAX: 092-841-7762

E-mail: tjikyo@nakamura-u.ac.jp

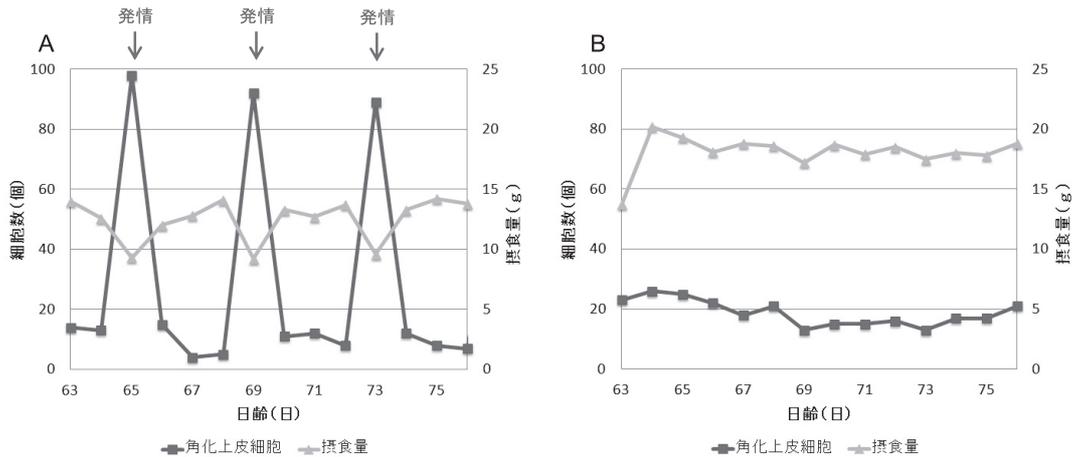


図1 角化上皮細胞数と摂食量
A. 性周期正常ラット, B. 連続非発情ラット

実験方法

実験動物の管理は、中村学園大学アニマルセンター運営規定に基づき行った。

10匹の Sprague-Dawley (SD) 系雌性ラット (9W, 日本チャールス・リバー社) を用いた。ラットは、個別のステンレスケージで、12時間明暗サイクル (7 : 00点灯)、室内一定 (22℃) 下で管理した。水道水、粉末飼料 (CE 2, 日本クレア株式会社) は、自由摂食させた。体重、摂食量は、毎日 8 : 30に重量を測定した。腔垢スメア検査は、毎日 8 : 30~9 : 00の間に腔垢スメアを採取し、ギムザ染色液 (メルク社) にて染色を施し、血球計算盤 (Burker-Turk) を用いた検鏡による角化上皮細胞数と有核上皮細胞数をカウントした。細胞の構成要素により性周期を判定した。

連続非発情ラットは、実験開始14日目の午後16時に、正常周期ラットは、14日間モニタリング後、発情前期の午後16時に断頭屠殺し、それぞれ採血をした。血液は、血清分離した後 -80℃に保存し血中 LH の測定に供した。血清中 LH ホルモンの測定は、三菱化学メディエンス株式会社動物検査センターに依頼し、シバヤギ社レビス®LH-ラット (Sタイプ) キットにて測定した。本測定におけるアッセイ感度は、0.3~10 ng/mLであり、またアッセイ内変動係数 (CV: Coefficient of variation) は、1.3~2.7%, 平均値は1.9 (±0.49) %であった。

有意差検定は、T検定法により行い、P<0.05以下を有意差ありと判定した。統計処理には、統計解析ソフト IBM SPSS Statistics version 19 (IBM社) を使用した。

結果と考察

9週齢雌ラット10匹を用いて、連続14日間における体重、摂食量および腔垢スメア検査法による角化上皮細胞数と有核上皮細胞の変動をモニタリングした。その結果、角化上皮細胞数の変動パターンから10匹中6匹が、正常な性周期を回帰しており、残り4匹においては発情が起こらない連続非発情性の性周期が認められた。また、正常性周期ラットでは、発情期において摂食量が減少し、一方、連続非発情ラットでは、摂食量の変化が認められなかった (図1)。

腔垢スメアは、エストロゲンとプロゲステロンの標的組織である腔粘膜上皮の剥離細胞からなる。そのため、卵巣発育、排卵、黄体形成、黄体退行といった一連の卵巣の変化に伴うホルモン変動に対応して腔垢スメアも変化する事から、腔垢スメアの角化上皮細胞を指標とした性周期の観察を行うことができる。エストロゲンは、腔上皮を多層化し角化を促進させ、プロゲステロンは、腔上皮の角化を抑制し、粘液化させる。ラットの性周期は4日間で発情前期、発情期、発情後期、休止期の4期が順番に繰り返される。発情前期、発情後期では、角化上皮細胞と有核上皮細胞が観察され、発情期では、すべて角化上皮細胞で有核上皮細胞は観測されない。休止期では、粘液化が観測される。腔垢スメア検査法による角化上皮細胞数の変動パターンから、正常性周期ラットでは、エストロゲンが分泌されており、一方、連続非発情ラットでは、エストロゲンが分泌されていないと考えられる。

排卵は、発情前期の15時~18時の間にサージ状の LH 分泌がなされ、原始卵胞の成熟分裂を再開させ、排卵・

発情を引き起こす。正常な性周期を回帰しているラットの LH サージ時での血清中 LH 量と連続非発情ラットの血清中 LH 量を図 2 に示す。正常性周期ラットの血清中 LH 量が、6 ng/mL であったのに対し、連続非発情ラットの血清中 LH 量は、1 ng/mL と差が認められた。LH の分泌パターンは、基礎分泌 (パルス状分泌) と律動性分泌 (サージ状分泌) の 2 つのパターンに分けることができる。生殖生理機能を調節する性腺刺激ホルモン分泌を調整するのは、視床下部からの GnRH 分泌であり、そこで、パルス状 LH 分泌は、パルス状 GnRH 分泌に、サージ状 LH 分泌は、サージ状 GnRH 分泌にそれぞれ支配されている。エストロゲンのポジティブフィードバック作用は、サージ状 GnRH 分泌を促進し、ネガティブフィードバック作用は、パルス状 GnRH 分泌を促進させる [13]。角化上皮細胞の変動パターンと血清中 LH 量の結果から、正常性周期ラットでは、4 日周期でエストロゲンの分泌とサージ状の LH が分泌されることにより排卵・発情が引き起こされているが、一方、連続非発情ラットでは、エストロゲンが分泌されなかったためにサージ状の LH 分泌されず排卵・発情は引き起こされなかったものと考えられる。

ところで、エストロゲンは性ホルモンであるが、摂食調整にも関わっていることが知られている [14, 15]。卵巣除去したラットにエストロゲンを持続投与すると摂食量が減少し、脂肪量減少を伴った体重減少が観測されたことから摂食抑制因子があると考えられている [16]。エストロゲンは、主に成熟卵胞から分泌され、その受容体は全身に分布しているが、脳内では摂食調節に重要な神経核である視床下部弓状核に多く発現している。エストロゲン受容体は核内受容体であり、リガンドであるエストロゲンと結合することで活性化し、ある特定の遺伝子発現を制御する転写因子となる。エストロゲン受容体は、視床下部弓状核に多く分布している。視床下部弓状核には、グレリン、ニューロペプチドおよびアグーチ関連ペプチドなど、摂食調節に係わる内分泌物質のニューロンが局在しており、エストロゲンがこれらニューロンを介して摂食調整に関与していると考えられている [17]。このことは、正常性周期ラットでの発情期における摂食量減少と連続非発情ラットでの摂食量不変化の現象の要因であると考えられる。

本研究では、サージ状 LH が分泌される正常な性周期を回帰しているラットでは、発情期で摂食量が減少し、一方、連続非発情ラットでは、発情期がないため摂食量に変化が認められなかった。これは、エストロゲンのポジティブフィードバック作用により、サージ状 GnRH

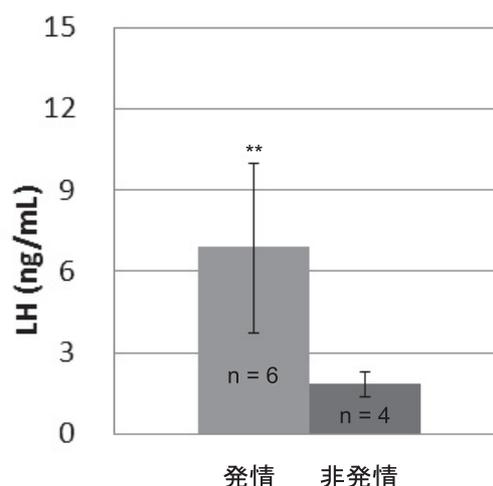


図 2 発情ラットと非発情ラットの血清中 LH 量。(平均±標準偏差, **P<0.01)

分泌を促進され、次いで、サージ状 LH が分泌されることにより発情が起こると同時に、エストロゲン分泌により摂食量が抑制されたためと考えられ、性周期と摂食パターンには、一連の相関性があるといえる。この結果、摂食パターンを用いることでラットにストレス負荷をかけず非侵襲的に性周期を判定することができた。

今後、この摂食パターンを用いた性周期判定が、生殖内分泌系の *in vivo* 研究に役立つことを期待したい。

引用文献

1. Usuki S, Tanaka J, Kawakura Y, Usuki Y (1992) A proposal of ovarian ERAANPS (endothelin-renin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system) and effects of tokishakuyakusan, keishibukuryogan, shakuyakukanzoto and unkeito on the ERAANPS. *Am J Chin Med* 20, 65-74.
2. Tasaka K, Miyake A, Ohtsuka S, Yoshimoto Y, Aono T, Tanizawa O (1985) Stimulatory effect of a traditional herbal medicine, Unkeito on LH-RH release. *Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 37, 2821-2826.
3. Usuki S (1992) Effects of tokishakuyakusan, keishibukuryogan and unkeito on DNA polymerase alpha activity in uteri of pregnant mare's serum gonadotropin-treated immature rats. *Am J Chin Med* 20, 75-82.
4. Matsumura T, Arai M, Yonemitsu Y, Maruoka D, Tanaka T, Suzuki T, Yoshikawa M, Imazeki F, Yokosuka O (2010) The traditional Japanese medicine Rikkunshito increases the plasma level of ghrelin in humans and mice. *J Gastroenterol* 45, 300-307.
5. Kito Y, Suzuki H (2010) Properties of Rikkunshi-to (TJ-43)-induced relaxation of rat gastric fundus smooth muscles. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298, 755-763.
6. Brown-Grant K (1971) The role of steroid hormones in the control of gonadotrophin secretion in adult female mam-

- mals. U.C.L.A. Forum Med Sci 15, 269-288.
7. Yen SS, Tsai CC, Naftolin F, Vandenberg G, Ajabor L (1972) Pulsatile patterns of gonadotropin release in subjects with and without ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* 34, 671-675.
 8. Allen E (1922) The oestrous cycle in the mouse. *Amer J Anat* 30, 297-371.
 9. Long L A, Evans HM (1922) The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memoirs of the University of California* 6, 1-148.
 10. Clauberg C (1931) Genitalcyclus und Schwangerschaft bei der weissen Maus. Dauer des Genitalcyclus. *Archiv f Gynakologie* 147, 549-596.
 11. Bartos L(1975) Oestral cycle phase determination by means of electrical impedance measurements of the vaginal mucous membrane in rats. *Physiol Bohemoslov* 24, 427.
 12. 増田善行, 高倉賢二, 廣瀬雅哉, 中西桂子, 後藤栄, 竹林浩一, 野田洋一 (1999) 自然性周期におけるラット胚の回収と培養—陸インピーダンス法による交配時期に決定と胚培養に用いる培養液の検討—. *産婦の進歩* 51, 179-185.
 13. 船橋利也, 貴呂富久子 (2004) ラット性腺刺激ホルモン分泌の中枢性調節機構. *日本生殖内分泌学会雑誌* 9, 11-14.
 14. Asarian L, Geary N (2002) Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav* 42, 461-471.
 15. Asarian L, Geary N (2006) Modulation of appetite by gonadal steroid hormones. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361, 1251-1263.
 16. Shimizu H, Ohtani K, Kato Y, Tanaka Y, Mori M (1996) Withdrawal of corrected estrogen increases hypothalamic neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in ovariectomized obese rat. *Neurosci Lett* 204, 81-84.
 17. 樋口宗史, 山口 剛, 仁木剛史 (2006) NPY-Y5受容体ノックアウトマウスの摂食ペプチド発現の制御と摂食. *日本薬理学雑誌* 127, 92-96.