

原 著

ラットにおける妊娠時の視床下部・下垂体・ 甲状腺系に関する研究

小 島 章

信州大学医学部順応医学研究施設内分泌内科 (主任: 山田隆司教授)

STUDIES ON HYPOTHALAMIC-PITUITARY-THYROID AXIS IN THE PREGNANT RAT

Akira KOJIMA

Department of Endocrinology, Institute of Adaptation Medicine
Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. T. YAMADA)

Key words: 妊娠ラット (pregnant rat), TRH, TSH, 甲状腺ホルモン (thyroid hormone),
エストロゲン (estrogen)

I. 緒 言

妊娠時の内分泌動態の変化は下垂体・甲状腺系へも影響を及ぼすと考えられる。Galton¹⁾は妊娠ラットにおいて T_4 の plasma clearance が増加している事を報告しているが、これまで妊娠ラットにおけるこの下垂体・甲状腺系の機能を知る為にラット TSH, T_3 および T_4 の正確な測定は報告されていない。そこで今回それらを radioimmunoassay により測定し、更に微量の純化された ^{125}I 標識ラット TSH を投与して、妊娠時のラット TSH の分泌量を測り、妊娠ラットにおける下垂体・甲状腺系について検討した。更には妊娠時に分泌の増加する estrogen の下垂体・甲状腺系に対する影響を調べる為に、雄ラットを用い、血中 TSH, T_3 および T_4 値, TRH に対する血中 TSH の反応に関しての estrogen の作用についても研究した。

また Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) の合成以来、視床下部・下垂体・甲状腺系の相互作用を解明するため、人間や成熟動物を用い、幾多の研究がなされてきた²⁾⁻⁴⁾。こうした形態学および生化学的事実を総括すると、甲状腺は出生時すでに TSH の刺

激下で機能を営んでいると⁵⁾ 考えてよいであろう。しかし出生前、または出生後の早い時期に TRH がどの程度 TSH 分泌調節を行っているかについては十分な研究が行なわれていない。既に妊娠21日目のラット母体に投与された TRH は母体と胎子の甲状腺コロイド小滴形成を刺激する事実は報告された⁶⁾ が、今回更に出生前および新生時期の視床下部・下垂体・甲状腺系への TRH の影響を検討し、その機序に考察を加え、ここに報告する。

II. 実験材料および方法

妊娠した Sprague-Dawley ラットに水を自由に与え、普通食にて飼育し、妊娠21日目に至って、実験に使用した。血液はエーテル麻酔下に心臓穿刺により採取した。合成 TRH, ^{125}I 標識 T_3 および T_4 は Abbott 社より入手した。また妊娠ラット胎子および新生仔に投与した TSH は World Health Organization Laboratory (International Bovine Thyrotropin) より入手した。血中および下垂体内ラット TSH の測定は NIH より支給されたラット TSH とその抗体を用い radioimmunoassay にて実施した⁷⁾。血中 T_3 ⁸⁾ および T_4 ⁹⁾ の測定は2重抗体法による radioimmu-

noassay により行い、標準曲線用のアッセイ試験管には T_3 と T_4 のフリー血清を加えた。NIH より支給された NIAMD rat TSH-I-1 を Greenwood らの方法¹⁰⁾によりヨード化し、約 $100\mu C/\mu g$ の活性ある ^{125}I 標識ラット TSH を得た。ドレーサー量としてその $0.1\mu C/ng$ を 8 匹の妊娠ラットと 7 匹の非妊娠ラットの尾静脈へ投与した。その投与前、および投与後 1, 3, 6, 10, 15, 20, 30, 45分と経時的に $50\mu l$ の血液を頸静脈より採取した。これらの処置前後にヘマトクリットを調べ、その変化が 1% 以内である事を確認した。これらの血液サンプルは計測用試験管に入れられ、10% の trichloroacetic acid (TCA) により沈澱した部分の放射能活性が測定された。その測定結果を半対数表にとり、linear least squares の方法により ^{125}I 標識ラット TSH の減衰曲線を書き、その曲線より直接に半減期を求めた。また以下に述べるごとく投与された標識ラット TSH は胎盤を通過しないので、妊娠ラットの体重から全胎仔の体重を差し引いたものを、妊娠母体の体重として、平均血流量を Schermer の報告¹¹⁾により体重 (BW) の 6.5% として、血漿量 V_D を $V_D = 0.65 (1 - \text{ヘマトクリット値}) BW$ の式より求めた。 ^{125}I 標識ラット TSH の plasma clearance rate (PCR) は computer program を用いて、model-free の積分法にて行い、投与後 0 分から 45 分まで、各点における放射能活性をもとに 0 分における放射能活性を血漿量で割り、その投与量の 100% として、投与 t 分後の放射能活性を同じく % dose/ml にて表わし、

$$PCR = \frac{100}{\int_0^{\infty} c^*(t) dt} \frac{ml}{min}$$

の式より求めた。いいかえれば、 dt という時間には $PCR \times dt$ という血液量から、投与された ^{125}I 標識 TSH が除去されるわけであるから、この時の放射能濃度を $c^*(t)\%$ とすれば $PCR \times c^*(t) \times dt \%$ の放射能活性が除去されるわけで、 $100 = \int_0^{\infty} PCR \times c^*(t) \times dt$ となり、上の式が得られる。ラット TSH の分泌量は PCR に血漿中 TSH 値を乗じて求めた。

つぎに estrogen の下垂体・甲状腺系への影響を見る実験においては、雄の Sprague-Dawley ラットを用い、腹腔内へ estradiol を 2 週間毎日投与した。Beta-estradiol-3-benzoate は Sigma Chemical Company より入手した。用いた投与量は 100g 体重あたり、0.01 μg 、0.1 μg および 1 μg であった。0.01 μg estradiol/

100g 体重は正常雌ラットの estrogen 分泌にほぼ等しいと考えられ¹²⁾、0.1 μg estradiol/100g 体重は妊娠ラットにおける estrogen 値にほぼ等しいと推定され¹³⁾、1 μg estradiol/100g 体重はその薬理学的作用を検討する為に用いた。血中 TSH 値、 T_3 および T_4 値の測定の為、estradiol 投与開始後 1 週間と 2 週間目に心臓穿刺により血液を採取した。その後 10 μg の TRH を静注し、30 分後に再度血液を採取した。estrogen 投与の影響を調べる為に下垂体、甲状腺および睪丸は摘出された。

ラットにおける母体、胎仔、新生仔の下垂体・甲状腺に対する合成 TRH の作用を調べる実験においては、TSH または TRH 投与後、母体、胎仔および新生仔の甲状腺は気管と一緒に取り出され、直ちに Bouin 液に浸し、paraffin 包埋し、4 μ の厚さに切り、periodic acid Schiff 試薬にて染め、更にコロイド小滴を算定し易くする為に hematoxylin にて染めた。染められた甲状腺組織を全体に観察した後、25 個の濾胞内のコロイド小滴を算定した。胎仔腹腔内へ、または Porter ら¹⁴⁾による微小細管を用いての臍静脈への試験物質の投与の際には、臍帯中の血流状態を正常に保つように注意して、胎仔は帝王切開により子宮より取り出され、母体腹部上のガーゼの上に置かれ、母体と TRH 等の試験物質が直接接触しないように注意した。ラットはエーテル麻酔され、血液は成熟ラットでは心臓穿刺により、胎仔および新生仔においては胸部切開により集められた。統計学的処理には Student の t テストを用いた。

III. 結 果

妊娠後期に増加する LH および FSH と TSH との免疫交叉反応性を調べた結果を図 1 に示すが、ラット TSH はラット FSH と重量比で 1 : 1000 の割合にて極く弱く交叉反応性を示し、ラット LH はラット TSH と免疫交叉反応性を示さなかった。いずれにせよ妊娠後期の生理的的正常増加範囲のこれらのホルモン値では TSH との免疫交叉性は無視できる事を示した。

1. 妊娠時の甲状腺ホルモン値と TSH 分泌

妊娠 21 日目のラットの血清中の T_3 、 T_4 、10 μg TRH を静脈内投与前および 30 分後における TSH 値を、非妊娠雌ラットのそれらと比較して表 1 に示した。妊娠ラットにおける平均の血清中 T_3 値は 30.2 $ng/100ml$ にて、非妊娠ラットのそれの 52.0 $ng/100ml$ より有意に低値を示した。また妊娠ラットにおける血清中 T_4

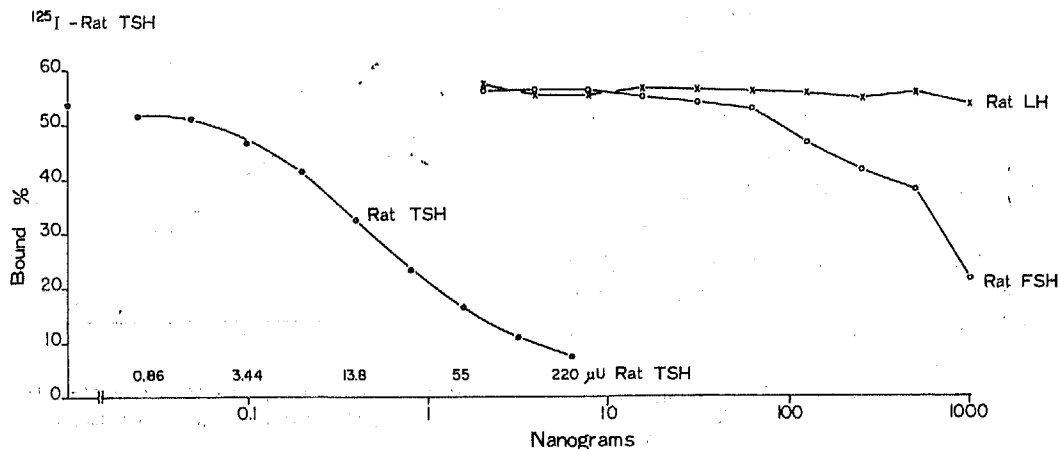


Fig. 1 Cross-reaction of highly purified rat LH and rat FSH in the radioimmunoassay of rat TSH.

Table 1. Serum TSH levels before and 30 minutes after administration of 10 μ g TRH iv, total serum T₃ and T₄ levels and T₃/T₄ ratio in non-pregnant females and pregnant rats on the 21st day of gestation.

	Serum TSH (μ U/ml)		Serum T ₃ (ng/100ml)	Serum T ₄ (μ g/100ml)	Serum T ₃ / Serum T ₄ \times 1000
	Before TRH	30 min after 10 μ g TRH			
Non-pregnant females	17.9 \pm 1.6 (19)	152.0 \pm 19.9 (10)	52.0 \pm 4.1 (24)	5.8 \pm 4.2 (24)	9.4 \pm 0.32 (24)
Pregnant rats (21st day of gestation)	30.3 \pm 2.9* (20)	292.8 \pm 32.7* (20)	30.2 \pm 2.2* (22)	3.2 \pm .34* (22)	11.7 \pm 1.44 (22)

\pm Standard errors; number of rats in parentheses.

* $p < 0.01$ when compared with levels of non-pregnant female controls.

値も 3.2 μ g/100ml と control ラットのそれの 5.8 μ g/100ml よりも有意に低い値を示した。しかし血清中 T₃/T₄ 比に関しては両群において差はなかった。妊娠 21 日目のラットにおける平均の血清中 TSH 値は 30.3 μ U/ml と非妊娠ラットのそれ 17.9 μ U/ml より有意に高い値を示し、更には 10 μ g TRH 静注 30 分後の血中 TSH 値を比べると、全例において血中 TSH 値は上昇し、その増加量は妊娠 21 日目のラットの方が多かった。妊娠 21 日目のラットにおける 10 μ g TRH 静注 30 分後の血中 TSH 値は 293 μ U/ml にて、非妊娠ラットのそれ 152 μ U/ml より有意に高い値を示した。つぎに妊娠 21 日目のラットにおける下垂体内 TSH 含量、下垂体重量、甲状腺重量を非妊娠雌ラットのそれらと比較して示すと図 2 のごとくにて、これらの値の間にはいずれも有意の差はなかった。下垂体内 TSH 含量

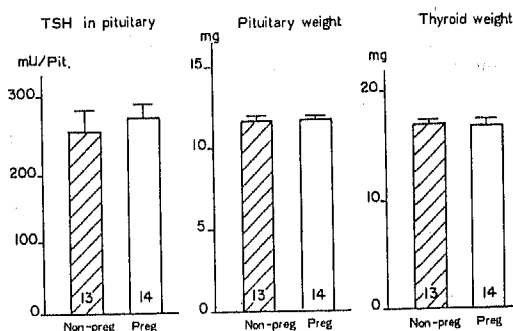


Fig. 2 Pituitary TSH content, pituitary weight and thyroid weight of pregnant rats on the 21st day of gestation compared with non-pregnant female controls. The numerals in the bars indicate the number of rats and the small bars show the SE.

は妊娠21日目のラットにおいては $273 \pm 19.5 mU$ /下垂体、非妊娠雌ラットにおいては $245 \pm 28.8 mU$ /下垂体であった。妊娠後期に表1に示したごとく血中 TSH は高いにもかかわらず、両群の甲状腺重量はほぼ同じであった。図3に control の雌ラットへ $0.1 \mu C/ng$ の ^{125}I 標識ラット TSH 静注後の血中放射能活性の典型的減衰データを示した。各々の点は $50 \mu l$ の血液を 10% trichloroacetic acid にて処理し、その沈澱物中の放射能活性を示した。各点における TCA 可溶性の放射能活性は低く、 ^{125}I 標識ラット TSH 静注後少くとも45分はほとんど無視できた。この消退曲線は厳密には一直線ではなく、その傾斜は初期には幾分急になっていた。8匹の妊娠ラットおよび7匹の非妊娠雌ラットにおける ^{125}I 標識ラット TSH の半減期、plasma clearance rate、および血中ラット TSH 値と分泌量を示すと表2のごとくにて、普通用いられているように

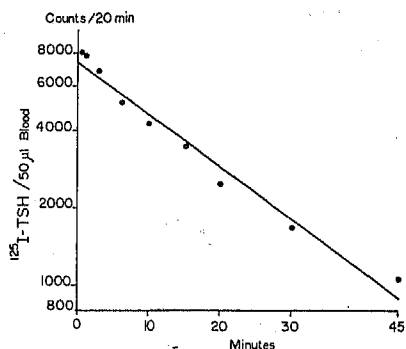


Fig 3 Typical disappearance of ^{125}I -rat-TSH. $0.1 \mu C/ng$ ^{125}I -rat-TSH was injected iv at zero time. Plotted values indicate the amount of radioactivity (^{125}I -rat-TSH) precipitated by trichloroacetic acid in $50 \mu l$ blood.

Table 2. Summary of results of ^{125}I -rat-TSH disappearance studies in pregnant rats on the 21st day of gestation and non-pregnant female controls.

	Body wt* (g)	Plasma volume (ml)	t $\frac{1}{2}$ (min)	Serum TSH ($\mu U/ml$)	Plasma clearance rate (ml/min \pm R. E. \pm)	Endogenous TSH secretion rate (mU/day)
Pregnant rats						
1	468	18.9	23.3	33.0	$1.09 \pm .023$	51.8
2	445	18.4	23.2	60.5	$1.12 \pm .024$	97.6
3	345	13.9	19.2	23.1	$1.14 \pm .024$	37.9
4	353	14.2	28.4	39.6	$0.75 \pm .016$	42.8
5	437	18.0	22.2	51.7	$1.05 \pm .022$	78.2
6	346	13.6	23.4	24.2	$0.94 \pm .034$	32.8
7	434	16.3	18.8	66.0	$1.24 \pm .044$	88.4
8	365	14.5	19.9	63.8	$0.93 \pm .033$	85.8
mean \pm SE	399 ± 18	16.0 ± 1.1	22.3 ± 1.1	45.2 ± 6.2	$1.03 \pm .05$	64.4 ± 9.1
Non-pregnant controls						
1	277	9.5	14.1	20.7	$1.14 \pm .021$	34.0
2	233	10.0	15.0	32.6	$0.89 \pm .031$	41.8
3	236	10.1	14.3	41.8	$0.86 \pm .030$	51.8
4	225	7.6	12.5	32.3	$0.70 \pm .025$	32.6
5	274	9.8	14.8	37.4	$0.89 \pm .019$	47.9
6	326	10.8	18.0	26.4	$0.91 \pm .019$	34.6
7	282	9.9	19.3	38.3	$0.73 \pm .016$	40.3
mean \pm SE	265 ± 14	$9.7 \pm .38$	$15.4 \pm .90$	32.8 ± 2.8	$0.87 \pm .05$	40.4 ± 2.8

Comparison :

pregnant vs. non-pregnant (p < .01) (p < .01) (p < .01) (p < .1) (p < .03) (p < .025)

* Body weights of pregnant rats were corrected for fetal weights.

† Range Errors.

linear least squares の方法で計算した減衰曲線より直接求めたラット TSH の半減期は妊娠ラットでは22分にて、非妊娠ラットの15分より有意に長かった。この結果だけからでは妊娠時ラット TSH の plasma clearance rate は減少しているように見えるが、妊娠ラットの血漿量は16mlと非妊娠ラットの9.7mlより有意に多く、model-free の積分法により求めた plasma clearance rate は妊娠ラットにおいては1.03 ml/minにて、非妊娠ラットでは0.87ml/minであった。ラット TSH の分泌量は妊娠ラットでは64mU/日と非妊娠ラットの40mU/日より有意に高い値を示した。

2. estrogen の下垂体・甲状腺系への作用

2週間 estradiol 投与前後における各群の雄ラットの体重を図4に示した。1 μ g estradiol/100g 体重の投与群(4群)において、この間体重増加が一番少

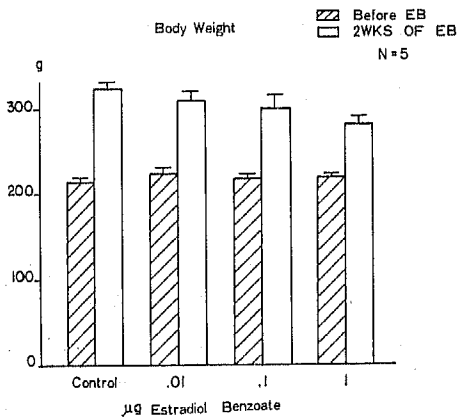


Fig. 4 Body weights of male rats before and after daily treatment with estradiol (μ g/100g BW) for two weeks, 5 rats per group.

Table 3. Weight of pituitary, thyroid and testis per 100 g body weight after treatment with estradiol for two weeks.

Groups	Injected materials (per 100 g body weight)	Pituitary weight (mg)	Thyroid weight (mg)	Weight of testis (mg)
1	Sesame oil (control)	2.93 \pm .11	5.53 \pm .56	3.11 \pm .12
2	0.01 μ g Estradiol	1.93 \pm .03	5.88 \pm .29	3.15 \pm .05
3	0.1 μ g Estradiol	3.16 \pm .14*	5.31 \pm .14	3.23 \pm .12
4	1 μ g Estradiol	5.18 \pm .55*	6.76 \pm .46	2.89 \pm .16

\pm Standard errors; 5 rats per group.

* $p < 0.01$ when compared with pituitary weight of control.

かった。estradiol 投与後の下垂体重量、甲状腺重量、睪丸重量を表3に示したが、体重100gあたりの下垂体重量は0.1 μ g estradiol/100g 体重の投与群(3群)と4群において有意に増加していた。しかし甲状腺重量や睪丸重量にはこれらの estradiol の投与量では有意の差は認められなかった。4群における体重100gあたりの甲状腺重量はやや増加していたが、その絶対値は全ての群において同じであった。睪丸重量の絶対値は4群において減少していたが、4群の体重増加が少い為体重100gあたりの睪丸重量には有意の差は認められなかった。2週間毎日 estradiol の投与後の下垂体 TSH 含量、estradiol 投与開始後1週間と2週間目の血中 TSH 値および10 μ g TRH 静注30分後の血中 TSH 値を表4に示した。下垂体内 TSH 含量には各群に一貫した変化は認められなかった。estradiol 投与開始後7日と14日目における血中 TSH 値は control 値と有意の差は認められなかった。10 μ g TRH 投与30分後の control 群(1群)の血中 TSH の反応は3, 4群の反応と同じであった。0.01 μ g estradiol/100g 体重の投与群(2群)における反応は少なめであったが、有意でなかった。血中 T₃, T₄ 値および T₃/T₄ 比を表5に示したが、各値ともどの群においても有意の差は認められなかった。4群における血中 T₃ と T₄ 値は control 群と比べ、幾分高い値を示したが、限られたラットの数では有意でなかった。

3. ラットにおける母体、胎仔、新生仔の下垂体・甲状腺系に対する合成 TRH の作用

すでに報告されたごとく、妊娠21日目のラットに投与した TRH は胎仔の甲状腺濾胞内コロイド小滴形成を刺激するが、図5は母体尾静脈へ10 μ g TRH、または、controlとして生理的食塩水(以後生食と略す)

Table 4. Pituitary TSH content, serum TSH levels after injection of estradiol for 7 days, 14 days, and then 30 minutes after administration of 10 µg TRH iv.

Groups*	TSH content of pituitary (mU/pituitary)	Serum TSH (µU/ml)		
		7 days	14 days	30 min after 10 µg TRH
1	132.9 ± 20.9	91.8 ± 16.2	109.1 ± 4.8	506 ± 57
2	161.5 ± 17.8	91.5 ± 16.9	78.2 ± 7.8	431 ± 41
3	200.0 ± 25.4	94.1 ± 16.9	104.9 ± 13.1	501 ± 86
4	194.5 ± 49.2	100.4 ± 13.9	85.3 ± 11.0	501 ± 78

± Standard errors ; 5 rats per group.

* For treatment of rats, see Table 3.

Table 5. Total serum T₃ and T₄ concentrations and T₃/T₄ ratio of male rats after administration of estradiol for 14 days.

Groups*	Serum T ₃ (ng/100ml)	Serum T ₄ (µg/100ml)	Serum T ₃ Serum T ₄ ×1000
1	43.8 ± 6.5	4.2 ± .27	10.4 ± 1.4
2	43.0 ± 5.7	4.1 ± .44	10.5 ± 1.0
3	40.0 ± 6.3	3.8 ± .58	11.3 ± 1.4
4	66.4 ± 7.0	5.4 ± .48	12.5 ± 1.1

± Standard errors ; 5 rats per group.

* For treatment of rats, see Table 3.

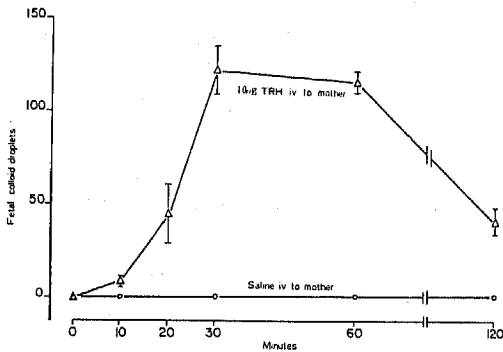


Fig. 5 Time-response curve of intracellular colloid droplets per 25 follicles in fetal thyroid before and after iv injection of 10µg TRH or saline as control into the mother on the 21 day of gestation.

を投与後の胎仔の25個甲状腺濾胞内コロイド小滴数の経時的反応曲線である。胎仔のコロイド小滴形成はTRH投与20分にて有意に増加し、30分後に120個と最高になり、以後漸減した。母体の尾静脈、胎仔腹腔内、あるいは微小細管を用いて臍静脈へ、10µg、

TRH、0.5U TSH、またはcontrolとして生食を投与30分後のコロイド小滴数は表6のごとくにて、母体へ投与されたTRHは母体と胎仔のコロイド小滴形成を刺激したが、母体へ投与した0.5U TSHは母体のコロイド小滴形成を著明に刺激したが、胎仔のそれには影響なかった。対照的に直接臍静脈または胎仔腹腔内へ投与されたTRHは胎仔のコロイド小滴を増加させず、母体のコロイド小滴形成のみを刺激した。別の実験において0.1µgから100µgのTRHを直接胎仔に投与し、その投与30分から2時間後までコロイド小滴形成を観察したが、それは刺激されなかった。胎仔の腹腔内へ投与された0.2U TSHは胎仔のコロイド小滴を増加させたが、母体のコロイド小滴形成には影響を及ぼさなかった。つぎに生後1日目から7日目までの新生仔ラット腹腔内へ10µg TRHを投与し、その30分後のコロイド小滴反応は図6に示した。生後3日目またはそれ以上の新生仔ラットにおいてはコロイド小滴形成は著明に刺激されたが、生後1日目および2日目のラットにおいては、コロイド小滴増加はみられなかった。

Table 6. Intracellular colloid droplet response in the maternal or fetal rat thyroids 30 min after injection of TRH, b-TSH, or saline as control.

Site of injection	Material injected	Site of response	No. of animals	CD/25 follicles (mean ± SE)
Mother iv	saline	mother	3	15 ± 3
		fetus	10	1 ± 1
above	0.5U b-TSH	mother	4	580 ± 32*
		fetus	10	1 ± 1
above	10µg TRH	mother	4	442 ± 20*
		fetus	10	129 ± 11**
Fetus umbilical vein	10µg TRH	mother	3	589 ± 47+
		fetus	9	1 ± 1
Fetus ip	saline	mother	3	4 ± 2
		fetus	12	2 ± 1
above	200mU b-TSH	mother	2	16 ± 11 §
		fetus	6	87 ± 8 §†
above	10µg TRH	mother	7	280 ± 90+
		fetus	24	4 ± 2

- * p < 0.01 when compared with saline injected into maternal tail vein.
- ** p < 0.01 when compared with fetal CD (colloid droplets) after saline was given to mother.
- + p < 0.01 when compared with maternal CD after saline was given to the fetus ip.
- † p < 0.01 when compared with fetal CD after saline was given to the fetus ip.
- § Values 2 hr after injection of b-TSH.

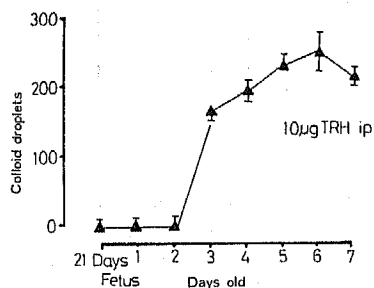


Fig. 6 Intracellular colloid droplet response per 25 follicles in the 21 day fetus and one to seven day old newborn rat thyroid 30 min after ip injection of 10 µg TRH.

つぎに血中 TSH 値について調べると、10µg TRH または control として生食を母体尾静脈内、胎仔腹腔内、あるいは臍静脈へ投与し、その30分後の母体血中の TSH 値は表7に示した。母体または胎仔へ投与した TRH は母体の血中 TSH を高めた。10µg TRH の腹腔内投与30分後の胎仔と新生仔の血中 TSH は表8のごとくにて、生後3日目までコロイド小滴形成は先に図6に示したように刺激されなかったにもかかわらず、胎仔または新生仔の血中 TSH 値は TRH により有意に増加していた。母体と胎仔の下垂体内 TSH 含量については図7のごとく、TRH を投与されたラットにおいてわずかに減少しているかのようにみえるが、10µg という TRH 量は母体および胎仔の下垂体

Table 7. TSH levels in maternal serum 30 min after injection of 10 µg TRH or saline.

Site of injection	Material injected	No. of animals	TSH level µU/ml ± SE
Mother iv	saline	3	20 ± 1.6
above	10µg TRH	5	442 ± 112*
Fetus ip	saline	3	17 ± 2.0
above	10µg TRH	7	343 ± 77*

- * p < 0.05 when compared with control TSH level of rats injected with saline.

Table 8 Serum TSH levels in fetus and enborns 30 min after injection of 10 μ g TRH ip; no. of rats in parentheses.

Age	Body Weight	Serum TSH (μ U/ml)	
		Control	30min after 10 μ g TRH
Fetus-21 day	5.4 \pm 0.1	28.9 \pm 2.5 (4)	216.6 \pm 16.4* (6)
1	6.5 \pm 0.1	24.6 \pm 2.8 (3)	366.9 \pm 19.6* (4)
2	7.8 \pm 0.2	22.4 \pm 0.9 (4)	259.3 \pm 24.3* (6)
3	9.3 \pm 0.2	24.6 \pm 1.5 (3)	241.6 \pm 18.9* (3)
4	11.7 \pm 0.3	21.6 \pm 4.1 (3)	267.3 \pm 24.4* (3)
6	15.4 \pm 0.6	15.4 \pm 2.8 (3)	262.2 \pm 112.3 (3)

\pm Standard errors.

* $p < 0.01$ when compared with control TSH levels of each day of age.

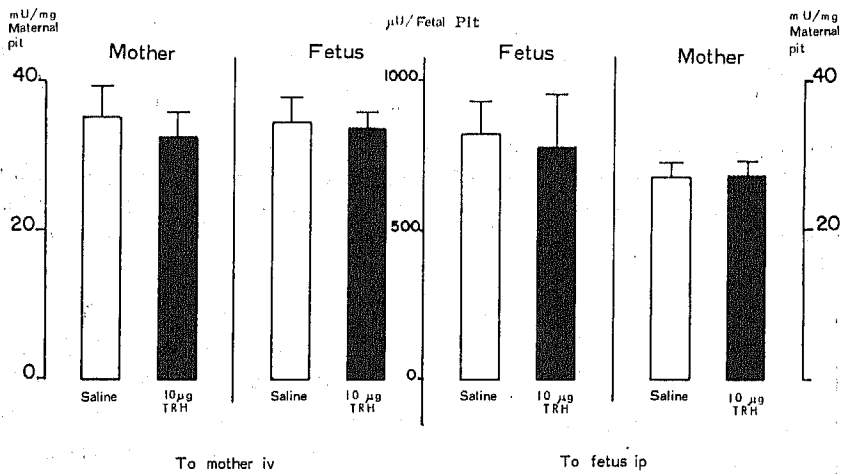


Fig. 7 TSH content of the maternal and fetal pituitary after injection of 10 μ g TRH or saline as control to mother iv or to fetus ip on the 21 day of gestation. Note the middle scale is for the fetal pituitary TSH and the outer scale is for the maternal pituitary.

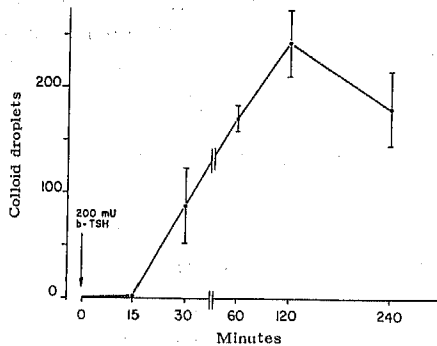


Fig. 8 The time-response curve of colloid droplet formation in one day old rats before and after ip injection of 200 mU b-TSH.

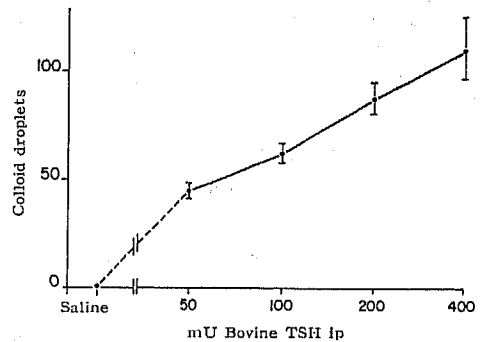


Fig. 9 The dose-response curve of fetal (21 day of gestation) colloid droplet formation 2 hr after administration of b-TSH ip.

内 TSH 含量を有意に減少させなかった。生後1日目の新生仔ラット腹腔内へ 0.2U TSH を投与すると図8のごとく、その投与2時間後にコロイド小滴は最大に刺激され、TSH 投与2時間後の妊娠21日目胎仔のコロイド小滴形成の dose-response curve は図9のごとく、50mU 以上の TSH はその量に比例して、胎仔のコロイド小滴形成を刺激した。

IV. 考 案

1. 妊娠時の甲状腺ホルモン値と TSH 分泌

以上述べたごとく妊娠ラットにおいては、非妊娠ラットに比べ、血中 TSH 値は高く、TRH への血中 TSH の反応も多く、TSH の分泌量も多かった。また血中の T_3 および T_4 値は低い値を示した。妊娠ラットにおけるこれらの結果は甲状腺機能低下状態、または末梢組織における甲状腺ホルモンの利用度の増加等を示唆している。表1に示した非妊娠雌ラットの血中 T_3 と T_4 値は最近 Abramsら¹⁹⁾が報告した値と良く一致している。妊娠21日目のラットにおける血中 T_3 と T_4 の減少の程度は単に妊娠時の生理的な血液の希釈では説明が難かしいと思われる。これらの結果と対照的に妊娠婦人においては、血中 TSH 値は正常範囲にあり⁴⁾、血中 T_3 と T_4 値は増加している事¹⁰⁾は確認されているが、これらの人間とラットにおける相違は妊娠時における甲状腺ホルモンと結合する血中蛋白、またはその結合能の相違¹⁷⁾や、甲状腺ホルモンの turn over の相違¹⁸⁾によるものと思われる。Galton は妊娠ラットにおいて甲状腺ホルモンの末梢組織での利用が高まり、甲状腺ホルモンの合成は増加しているけれど、その血中レベルを保つには不十分にて、血中の甲状腺ホルモン値の低下を来すと報告した¹⁾。分娩後数日間にて血中 T_4 値と plasma T_4 clearance は正常にもどると報告されている¹⁾。

feedback 機構による TSH の分泌調節は血中の全甲状腺ホルモン値よりむしろフリーの血中蛋白と結合していない甲状腺ホルモン値によりなされていると考えられ¹⁷⁾、妊娠ラットにおける free T_4 値は正常範囲にあると報告されている¹⁾。しかし今回妊娠ラットにおいては非妊娠ラットに比べ血中 TSH 値は有意に高い事を認めたので、現在妊娠ラットにおける free T_3 値は測定されていないが、TSH の分泌調節に血中全 T_3 と T_4 濃度の減少もかなりの役割を演じていると思われる。妊娠後期に血中 TSH 値が上昇しているにもかかわらず、下垂体内 TSH 含量は増加していない

という事実はこの時点では TSH 分泌の増加の割合が丁度 TSH の合成増加とつりあいをとっていると考えられる。同様のことは PTU をラットに投与後数週間見られた¹⁹⁾。表2に示した TSH の一日分泌量より計算するとラットにおいては毎日下垂体 TSH 含量の25~40%が turn over されている事になる。また妊娠ラットにおいて血中 TSH が高いにもかかわらず、甲状腺重量には非妊娠ラットと比べ差がなかったが、1単位以上の TSH を5日間投与してもラットにおいては甲状腺重量は33%しか増加せず²⁰⁾、TSH 分泌の指標としては甲状腺重量は感度が悪い事を示している。

表2に示したラット TSH の半減期は最近 Fangら²¹⁾により報告された値と一致している。今回は標識されたラット TSH の半減期を決定する為に、普通用いられている linear least squares の方法を用いたが、減衰曲線は初期に急峻となり、敵密には一直線ではなく、単なる半減期をもとにホルモン動態を述べるべきでない事を示している。

2. estrogen の下垂体・甲状腺への作用

先に述べた結果は妊娠ラットにおいて得られた血中 T_3 、 T_4 、TSH 値や TRH への TSH 反応等の変化が、妊娠時に分泌の増加する estrogen によるものでない事を示唆した。体重 100g あたり 0.01 μ g から 1 μ g の estradiol 量は、雄ラットにおいて血中 TSH 値や下垂体内 TSH 含量を変化させない事を示したが、D'Angelo²²⁾は血中 TSH 値や下垂体内 TSH 含量に対する estrogen の影響には性差がある事を報告している。4群において血中 T_3 と T_4 値が有意でないが増加している事実は、estrogen 投与後血中 PBI がわずかに増加したという Grosvenor²³⁾の報告と一致している。また既に報告されているように²⁴⁾²⁵⁾、高濃度の estrogen はラットの体重増加を抑える事を示したが、これは体重 100g あたり 1 μ g の estradiol は toxic な量なのかもしれない事を示唆している。

3. ラットにおける母体・胎仔・新生仔の下垂体・甲状腺系に対する合成 TRH の作用

TRH は簡単に両方向にラット胎盤を通過し、母体および胎仔の下垂体を刺激し、血中 TSH 値を増加させる。しかし母体のコロイド小滴形成の反応は血中 TSH 値と一致するが、TRH が胎仔へ投与された時は、胎仔の血中 TSH 値が上昇しているにもかかわらず、生後3日目まではコロイド小滴形成は刺激されなかった。

この妊娠末期または生後早期におけるラットのコロイド小滴の TRH への反応欠除を説明するいくつかの可能性が考えられる。まず胎仔または生後早期のラットの TSH は生物学的活性が弱いのではないかという点であるが、TSH を bioassay するには十分量の胎仔または新生仔ラットの血液を集めるのが困難なため、施行できなかった。つぎに TSH の刺激による甲状腺 endocytosis の感度に関する点であるが、表 6 と図 9 に示すように、成熟ラットにおけるよりも胎仔においてはその感度が悪い。特に母体の体重 $477 \pm 11g$ と比較して、胎仔の平均体重 $5.4 \pm 0.1g$ を考慮し、用いた TSH 量の体重あたりの量を検討するとその感が強い。生後 3 日目またはそれ以上のラットは TRH の腹腔内投与により著明なコロイド小滴形成を示したが、Florsheim と Rudko²⁶⁾ は生後 4 日目までに下垂体前葉の血流が成熟ラットなみになる事を報告し、他方、Ekpechi と Van Middlesworth²⁷⁾ は新生仔時期、特に生後 4 日目以内では、新生仔ラットはヨード欠乏状態に対し十分適応できないこと、すなわち、ヨード不足の新生仔ラットにおいては、甲状腺重量、¹²⁵I uptake および labeled MIT/DIT 比の増加があるにもかかわらず、甲状腺内のヨード含量と labeled T₃ の量が低いことを報告している。このような一連の結果はラットの視床下部・下垂体・甲状腺系は生後数日間機能的成熟過程にあることを示唆している。

これらの可能性も母体の尾静脈へ投与した TRH が妊娠 21 日目の胎仔のコロイド小滴形成を刺激したことに対する説明にはならず、母体内で作られ主として母親から胎仔へ移行する co-factor を仮定し、その存在を確かめる試みを行った。すなわち、あらかじめ内因性 TSH を抑えるために 3 日間毎日 $50 \mu g$ T₃ を投与した雌のラットに 200 から $500 \mu g$ の TRH を投与し、その投与 1 分から 5 分後に採血し、4°C にて血漿を分離し、直ちにその血漿を胎仔または生後 1 日目の新生仔に投与したが、そのコロイド小滴形成は刺激されず、この co-factor の存在を明確にすることはできなかった。

また先にも報告したように下垂体性 TSH はラットの胎盤を通過しないが、人間の胎盤由来の甲状腺刺激物質 (chorionic TSH) の存在が報告されている²⁸⁾ が、それも TRH により分泌を刺激されず²⁹⁾、ラットの胎盤中に TSH の存在を示す根拠もなく、この研究においては胎盤性 TSH が何らかの役割をはたしている可能性は少ないと考える。

母体へ投与された $10 \mu g$ の TRH 量では母体および胎仔の下垂体内の TSH 含量に有意の減少を引き起こさず、このことは Martin と Reichlin³⁰⁾ の報告に一致し、下垂体内 TSH 含量の有意の減少をみるためには D'Angelo ら³⁰⁾ が報告したように $500 \mu g$ の TRH をくり返し投与するような大量の TRH が必要と思われる。

V. 結 語

ラットにおける妊娠時の下垂体・甲状腺系に関して、および合成 TRH の母体、胎仔および新生仔の下垂体・甲状腺系に対する作用、更には estrogen のそれらへの影響に関して検討した。

妊娠 21 日目のラットにおいては、非妊娠ラットに比べ、血中 TSH 値は高く、TSH の 1 日分泌量も多く、TRH による血中 TSH 分泌も多かった。また血中 T₃ および T₄ 値は低い値を示した。下垂体内 TSH 含量、甲状腺重量には差はなかった。妊娠時甲状腺ホルモンの末梢組織での利用の増加が血中甲状腺ホルモンの低下をもたらし、下垂体による TSH の合成、分泌増加をきたしたと考えられる。ラットにおける妊娠時の下垂体・甲状腺系の動態は人間における妊娠時のそれとは全く異なることを報告した。

妊娠ラットにおけるこれらの値の非妊娠ラットの値との相違は、妊娠時に分泌の増加する estrogen によるものでないことを示した。

TSH はラット胎盤を通過せず、TRH は容易に両方向へ胎盤を通過する。胎仔または新生仔へ直接 TRH を投与した場合、血中 TSH 値の増加にもかかわらず、生後 3 日目までコロイド小滴形成の増加はみられない。このことはラットの視床下部・下垂体・甲状腺系は生後数日間機能的成熟過程にあることを示唆している。妊娠ラットの胎盤のそれへの影響についてはなお不明である。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導を賜りました University of California in Los Angeles の内科教授 Dr. Hershman, また computer program をくみ、データの分析を賜った UCLA の Dr. DiStefano に深謝致します。同時に懇切なる御助言、御教示を頂いた山田隆司教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Galton, V. A. : Thyroxine metabolism and thyroid function in the pregnant rat. *Endocrinology*, 82 : 282-290, 1968
- 2) Martin, J. B. and Reichlin, S. : Plasma thyrotropin (TSH) response to hypothalamic electrical stimulation and to injection of synthetic thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology*, 90 : 1079-1085, 1972
- 3) Anderson, M. S., Bowers, C. Y., Kastin, A. J., Schalch, D. S., Schally, A. V., Snyder, P. J., Utiger, R. D., Wilber, J. F. and Wise, A. J. : Synthetic thyrotropin-releasing hormone, a potent stimulator of thyrotropin secretion in man *New Eng. J. Med.*, 285 : 1279-1283, 1971
- 4) Hershman, J. M. and Pittman, J. A., Jr. : Utility of the radioimmunoassay of serum thyrotropin in man. *Ann. intern. Med.*, 74 : 481-490, 1971
- 5) Deanesly, R. : Foetal endocrinology. *Brit. med. Bull.*, 17 : 91-95, 1961
- 6) Kajihara, A., Kojima, A., Onaya, T., Take-mura, Y. and Yamada, T. : Placental transport of thyrotropin releasing factor in the rat. *Endocrinology*, 90 : 592-594, 1972
- 7) Kojima, A. and Hershman, J. M. : Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in maternal, fetal and newborn rats. *Endocrinology*, 94 : 1133-1138, 1974
- 8) Chopra, I. J., Ho, R. S. and Law, R. : An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in serum : Its application to clinical and physiological studies. *J. Lab. clin. Med.*, 80 : 729-739, 1972
- 9) Chopra, I. J. : A radioimmunoassay for measurement of thyroxine in unextracted serum. *J. clin. Endocr.*, 34 : 938-947, 1972
- 10) Greenwood, F. C., Hunter, W. M. and Glover, J. S. : The preparation of ¹³¹I-labeled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.*, 89 : 114-123, 1963
- 11) Schermer, S. : The blood morphology of laboratory animals (3rd ed.) F. A. Davis Co., Phila., 1967
- 12) Littleton, G. K. and Anderson, R. R. : Characterization of ¹⁷β-estradiol-³H single-injection disappearance curves in rat plasma and red cells. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 140 : 1015-1020, 1972
- 13) Yoshinaga, K., Hawkins, R. A. and Stoker, J. F. : Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*, 85 : 103-112, 1969
- 14) Porter, J. C., Mical, R. S., Kamberi, I. A. and Grazia, Y. R. : A procedure for the cannulation of a pituitary stalk portal vessel and perfusion of the pars distalis in the rat. *Endocrinology*, 87 : 197-201, 1970
- 15) Abrams, G. M. and Larsen, P. R. : Triiodothyronine and thyroxine in the serum and thyroid gland of iodine-deficient rats. *J. clin. Invest.*, 52 : 2522-2531, 1973
- 16) Hotelling, D. R. and Sherwood, L. M. : The effects of pregnancy on circulating triiodothyronine. *J. clin. Endocr.*, 33 : 783-786, 1971
- 17) Robbins, J. and Rall, J. E. : Proteins associated with the thyroid hormones. *Physiol. Rev.*, 40 : 415-489, 1960
- 18) Ingbar, S. H., Braverman, L. E., Dawber, N. A. and Lee, G. Y. : A new method for measuring the free thyroid hormone in human serum and an analysis of the factors that influence its concentration. *J. clin. Invest.*, 44 : 1679-1689, 1965
- 19) Wilber, J. F. and Utiger, R. D. : Immunoassay studies of thyrotropin in rat pituitary gland and serum. *Endocrinology*, 81 : 145-151, 1967
- 20) Fraenkel-Conrat, J., Fraenkel-Conrat, H., Simpson, M. E. and Evans, H. M. : Purification of thyrotropic hormone of anterior pituitary. *J. biol. Chem.*, 135 : 199-212, 1940
- 21) Fang, V. S., Lim, V. S. and Refetoff, S. : Sustained thyrotropin elevation in patients with renal failure : Studies of mechanism in azotemic rats. 49th meeting of the American Thyroid Association, Seattle, Wa., 1973 T-6

(abstract)

- 22) D'Angelo, S. A. : Simultaneous effects of estradiol on TSH secretion and adrenocortical function in male and female rats. *Endocrinology*, 82 : 1035-1041, 1968
- 23) Grosvenor, C. E. : Effects of estrogen upon thyroidal I^{131} release and excretion of thyroxine in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 70 : 673-678, 1962
- 24) Yamada, T., Takemura, Y., Kobayashi, I. and Shichijo, K. : Re-evaluation of the effect of estrogen on thyroid activity in the rat and its mechanism. *Endocrinology*, 79 : 849-857, 1966
- 25) Fisher, J. A. and D'Angelo, S. A. : Stimulatory and inhibitory action of estradiol on TSH secretion. *Endocrinology*, 88 : 687-691, 1971
- 26) Florsheim, W. H. and Rudko, P. : The development of portal system function in rat. *Neuroendocrinology*, 3 : 89-98, 1968
- 27) Ekpechi, O. L. V. and Van Middlesworth, L. : Iodinated compounds in the thyroids of the offspring of rats maintained on low-iodine diet. *Endocrinology*, 92 : 1376-1381, 1973
- 28) Hershman, J. M. and Starnes, W. R. : Extraction and characterization of a thyrotropin material from the human placenta. *J. clin. Invest.*, 48 : 923-929, 1969
- 29) Hershman, J. M., Kojima, A. and Friesen, H. G. : Effect of thyrotropin-releasing hormone on human pituitary thyrotropin, prolactin, placental lactogen, and chorionic thyrotropin. *J. clin. Endocr.*, 36 : 497-501, 1973
- 30) D'Angelo, S. A., Wall, N. R. and Bowers, C. Y. : Maternal-fetal endocrine interrelations : Demonstration of TSH release from the fetal hypophysis in pregnant rats administered synthetic TRH. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 137 : 175-178, 1971

(1974. 8. 17 受稿)