

思春期発動前の卵巢機能調節における 甲状腺ホルモンの制御機構

田村和広*, 向後博司*

1. はじめに

成熟した卵の産生とステロイドホルモン合成は哺乳類の卵巢の基本的かつ重要な生理機能である。これらの機能は、厳密なホルモン制御下、複雑な過程である卵胞の発育・成熟過程で行われる(1)。下垂体から放出される性腺刺激ホルモン(ゴナドトロピン)のFollicle-stimulating hormone: FSH, Luteinizing hormone: LHは卵胞の発育と分化の調節に主要な役割を果たすが、これらホルモンに加えて他の多くの古典的ホルモン(endocrine)や成長因子・サイトカインもまた卵巢卵胞の発達に影響していることが示唆されている(2-4)。近年、循環血中レベルの甲状腺ホルモン(チロキシン: T_4 , トリヨードチロニン: T_3)が正常な女性生殖機能にかなり重要な役割を演じていることが明らかになってきた。事実、臨床的に甲状腺機能が異常な婦人では、高率に卵巢機能障害を伴うと同時に妊娠が成立しても高い流産率を示す(統計的に流産率は正常人の13%高い)など、ヒトと動物で血中甲状腺ホルモンレベルの変化が月経障害、不妊、ゴナドトロピン分泌の変動を起こす(5, 6)。さらに、 T_3 は、*in vitro*でのブタ(7, 8)やヒト(9, 10)の顆粒膜細胞のステロイド合成に対するFSHやLH作用を直接変化させることが可能であることも示されている。これらの知見は、さらに哺乳類の顆粒膜細胞や卵巢間質細胞における T_3 受容体mRNA並びにその結合部位の同定により支持される(11-13)。最近、ヒト卵丘細胞や卵母細胞にも T_3 受容体の存在が示唆されている(14)。しかしながら、卵胞の初期発育を中心とした卵巢機能に対する T_3 の作用の本質に関する知見はほとんど見当たらない。そこで本総説では、雌ラットの初排卵誘起モデルの視床下部-下垂体-性腺系について概説した後に、 T_3 の卵巢機能、特に卵胞発育への関与について甲状腺摘出動物を用いた筆者らの研究を主体にして述べる。

2. ラットの初排卵誘起モデルとその内分泌動態

未成熟ラットの初排卵並びに陰開口は、通常、生後35日目付近で起こるが、これより若い動物(24~30日令)の午前中に低用量の5 IUのequine chorionic gonadotropin (eCG; PMSG)を単回投与すると投与後3日目早朝に排卵を惹起できる(15)。これは、eCGのもつ持続的かつ強いFSH様作用により、また弱いLH様作用も加わって一次卵胞(直径が100 μ m程の卵子とそれを囲む2層以上の顆粒膜細胞及び外側の基底膜からなる卵胞)から卵胞腔又は卵胞液の存在する2次卵胞(胞状卵胞とも呼ぶ)、成熟卵胞を経てより大きな成熟卵胞(グラフ卵胞)の形成が促進され(図1)、eCG投与後2日目午後(16:00-20:00)に自発性の排卵性性腺刺激ホルモンの大量放出(LHサージ)が誘発されるからである。このLHサージ後9-12時間(eCG投与後3日目の早朝)で排卵が起こる。未成熟ラットを用いて筆者が報告したこのeCG投与後初排卵が誘発されるまでの生殖関連ホルモンの分泌動態(15)を図2に示す。図に示すようにeCG投与後12時間で卵胞ホルモン(エストラジオール)の血中レベルの増加が見られ56時間後(即ち2日目午後)にピークを示す。血中インヒビンレベルも26時間後から56時間まで高値を示す。卵巢内のエストラジオールとインヒビン含量も基本的と同様の変動を示す。エストラジオールは、

* 第二薬理学教室

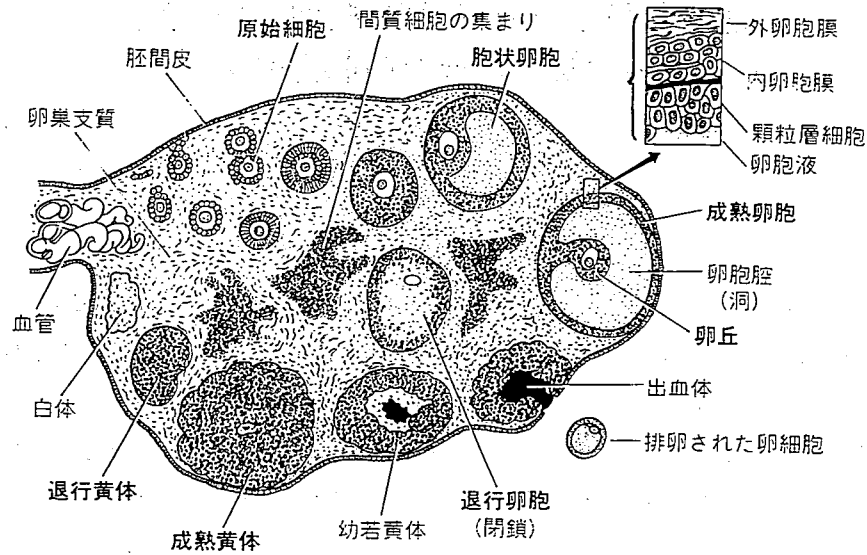


図1. 哺乳類の卵巢 (Review of Medical Physiology, 14th Edition Ganong WF 著, 1989 より改変)
原始卵胞から胞状卵胞を経て成熟卵胞への発達, そして黄体の退行過程を示した。

Groups	Size of follicles (μm)			
	200 ~ 400	> 400	Total > 200	Atretic follicles > 200
<u>0h</u> Intact	55.0 \pm 2.88	13.4 \pm 1.72	68.4 \pm 2.29	51.8 \pm 4.84
Tx	44.6 \pm 3.62	9.0 \pm 0.89	53.6 \pm 9.06	36.0 \pm 3.90 *
<u>48h</u> eCG	41.4 \pm 3.12	11.8 \pm 1.53	53.2 \pm 3.79	61.6 \pm 8.80
Tx+eCG	44.2 \pm 6.37	24.4 \pm 1.47 **	68.6 \pm 5.30	43.8 \pm 3.22
Tx+eCG+T4	40.3 \pm 7.31	10.7 \pm 2.19 ##	51.0 \pm 8.02	56.3 \pm 5.49

表1. eCG 処置未成熟ラットの卵胞サイズと卵胞数に対する甲状腺摘出 (Tx) とチロキシン (T₄) 投与の効果
eCG 投与後 48 時間で卵巢を摘出し連続切片を調製した。各動物の 300 枚の標本について 200 μm 以上の卵胞を全て数えた。Atretic follicles; 閉鎖卵胞。各値は 3~5 匹の動物から得られた平均値 \pm SE を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Intact 又は eCG 群との有意差。
$P < 0.01$, Tx + eCG 群との有意差。

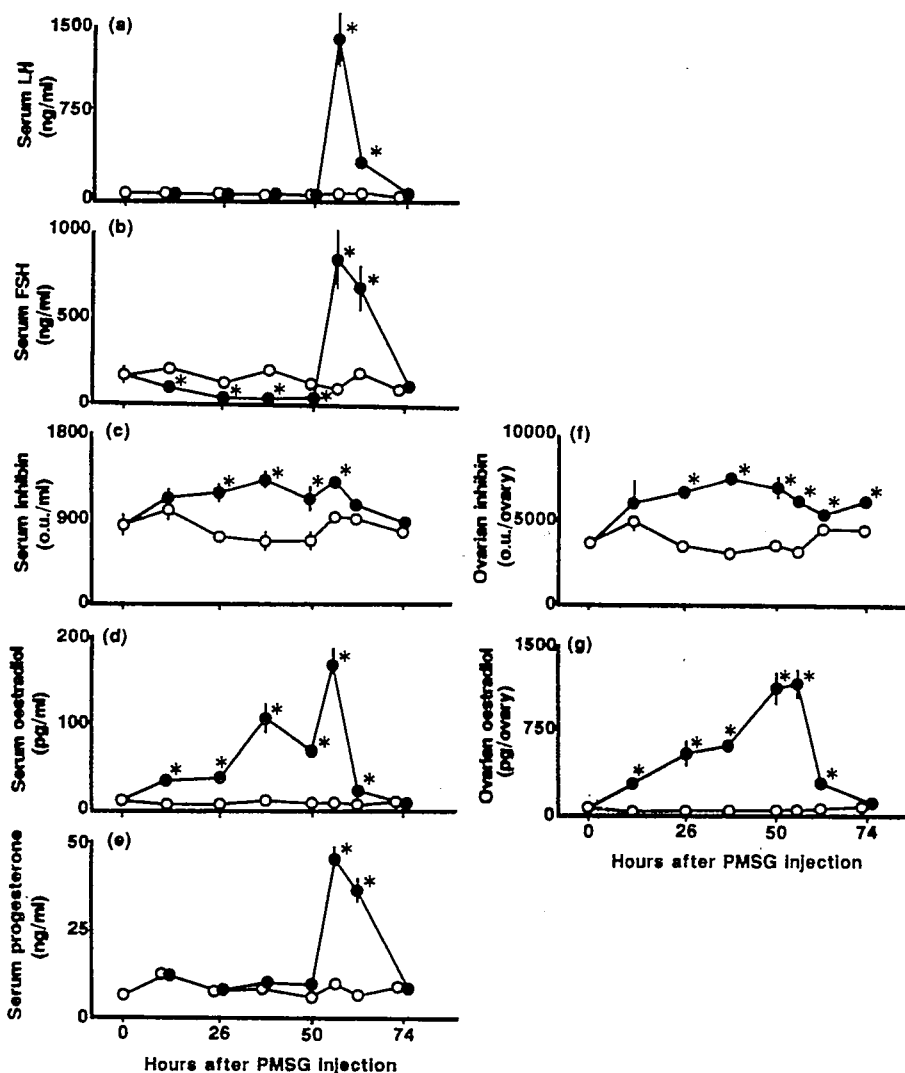


図2. eCG (PMSG) 処置未成熟ラットの血中ゴナドトロピン (a, b), インヒビン(c), エストラジオール (d), プロゲステロン (e), 卵巢内インヒビン (f) とエストラジオール (g) 含量の変化

26日令の午前9:00に5IUのeCG (PMSG)を投与した。各値は5~10匹の動物から得られた平均値±SEを示す。●点は、eCG投与群、○点は対照群を示す。血液は腹部大動脈からエーテル麻酔下で採取した。

*P<0.05: 対照群との有意差を示す (unpaired Students t-test or Cochran-Cox test)。

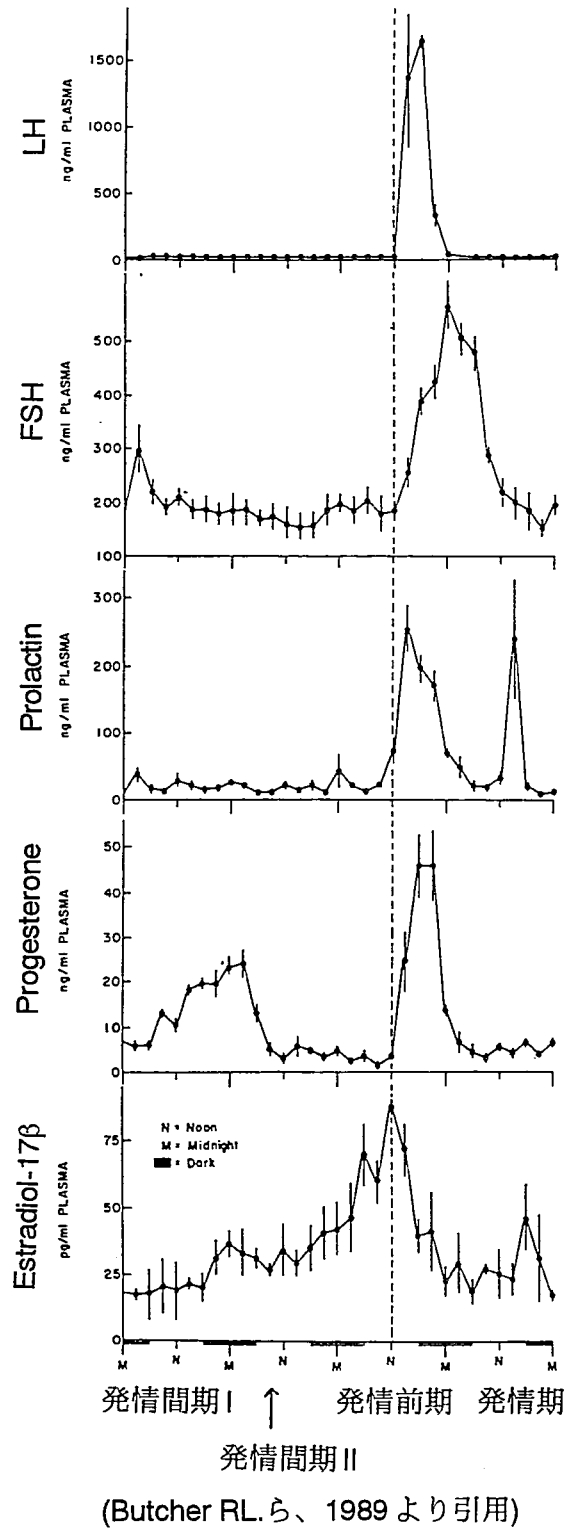


図3. 4日の発情周期をもつ成熟ラットの血中ゴナドトロピン, プロラクチン, インヒビン, プロゲステロン, エストラジオールの変化

発情間期1日目3:00から3時間間隔で各時間5匹で測定した。

思春期発動前の卵巣機能調節における甲状腺ホルモンの制御機構

ンドロステンジオン, テストステロン, 17-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ, アロマターゼが仲介して発育卵胞の顆粒膜細胞で合成される主要な卵胞ステロイド (C-18) で女性副生殖器 (子宮, 膣, 卵管) 及び乳腺の発育を促す重要なホルモンである。また, インヒビンは, 1つの α 鎖と非常にホモロジーの高い2つの β 鎖 (β_A, β_B) のうちの1つが結合した糖蛋白であり, このヘテロダイマーのペプチドは循環ホルモンとして下垂体からのFSH分泌を抑制するのみならず卵巣細胞の増殖及びステロイド産生を調節する最も重要な局所性調節因子の1つである (17-20)。健全な卵胞の顆粒膜細胞は, 洞卵胞前の段階でエストロゲン分泌が起こるよりも初期からインヒビンを分泌し, 卵胞の成熟過程で分泌を継続する。未成熟ラットの初排卵までのこれらのホルモン変動は, 発情周期をもつ成熟動物の排卵前のホルモン動態と基本的に同じである (図3) (21)。血中エストラジオールは発情間期第2日目の午後から増加し始め発情前期の午前にピークをつくり, その後夜にかけて急激に減少する。エストロゲンのピークはLHのピークに先行している。これは, 発情前期における成熟卵胞から大量に生成・分泌されたエストロゲンの血中レベルの急激な上昇が, 特異的に視床下部-下垂体系にポジティブフィードバックをかけ, 視床下部の黄体形成ホルモン放出ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone: LH-RH) ニューロンの興奮を引き起こし, LH-RH分泌の増大により下垂体からの一過性の大量のゴナドトロピンの分泌が誘起されるためである。上述した未成熟ラットの初排卵モデルにおいてもeCG投与後2日目におけるこのエストロゲン産生レベルの上昇 (図2では38, 50時間のレベル) が同日午後のLHレベルの上昇を惹起している。このように, エストロゲン, インヒビンを測定することは卵胞の発育状態を知る良い指標となる (22, 23)。

3. 卵巣卵胞の発育と初排卵の誘導における甲状腺ホルモンの役割について

3-1. 甲状腺摘出動物における卵胞発育並びにホルモン分泌動態

私共は近年, eCG投与により誘起される卵胞の発育過程での卵巣ホルモンの分泌が甲状腺摘出 (Thyroidectomy) により顕著に高進されるという興味ある結果を得た (図4) (24)。図は22日令に甲状腺を摘出した動物に26日令で5 IUのeCGを投与した時の血中インヒビン (右) とエストロゲン (左) のレベルの変化を示すが, 甲状腺摘出動物 (以後Tx動物と略す) へのeCG投与は, 両ホルモン共に対照群 (eCG投与した正常動物群) と比べてその血中レベルの著明な増加を引き起こす。eCG処置したTx動物の血中インヒビンレベルは24時間以内に最大となりそのレベルは少なくとも48時間まで維持される。一方, 血中エストラジオールレベルは24時間から48時間にかけて顕著に増加する (eCG投与48時間での両ホルモンレベルは対照群と比べて約3倍)。また, この時点における卵巣重量も増加する (eCG: 32 ± 1.3 mg vs. Tx + eCG投与群: 37 ± 2.1 mg, $P < 0.05$)。なお, このTx動物でのホルモンレベルの上昇に対してチロキシシン (T_4) の補充投与はそれらのレベルを対照群レベルまで回復させる (図5)。卵巣重量も同様に T_4 投与により正常レベルまで戻る (Tx + eCG + T_4 投与群: 31 ± 0.7 mg vs. Tx + eCG投与群: 37 ± 2.1 mg, $P < 0.05$, eCG投与群: 32 ± 1.3 mg)。このように, Tx動物での卵巣ホルモンの血中レベルの増加はeCG投与後のみにみられることから卵胞発育に関連したゴナドトロピン作用に対する何らかの T_4 との相互作用が推察される。このeCG投与後のTx動物でのインヒビン産生の高進のメカニズムを調べる目的でパラフィン包埋切片を用いた卵巣の形態変化の解析を行うと, 表1のようにeCG投与前には甲状腺摘出群で閉鎖卵胞の減少が見られるが, eCG投与後48時間では直径が $400 \mu\text{m}$ 以上の大きな成熟した洞卵胞の数が対照群に比べて甲状腺摘出群で約2倍に増加していることが判る。よって, 大きな洞卵胞の数の増加がeCG投与後48時間でみられた血中インヒビン値とエストラジオール値の上昇と関連しているものと考えられる。また, 1つの可能性として甲状腺摘出群でのeCG投与前の閉鎖卵胞の数の減少がこのような健全卵胞の増加に関与しているかもしれない。卵巣内のインヒビン α サブユニットの免疫染色を行うと, 陽性染色は, 様々なサイズの発育・閉鎖

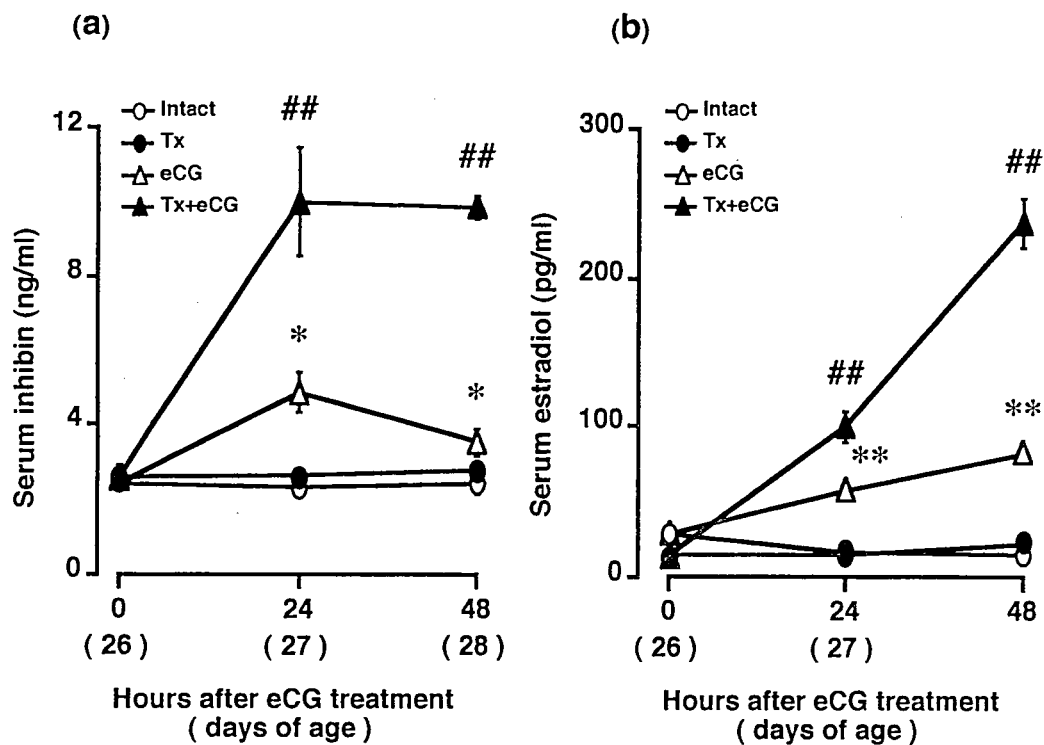


図4. eCG 処置未成熟ラットにおける血中インヒビン (a), エストラジオール (b) レベルに対する甲状腺摘出 (Tx) の効果

26日令の動物に5IUのeCGを皮下投与し、24時間又は48時間後に血液を採取した。各点は5~6匹の動物から得られた平均値±SEを示す。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, Intact群との有意差。## $P<0.01$, eCG群との有意差。

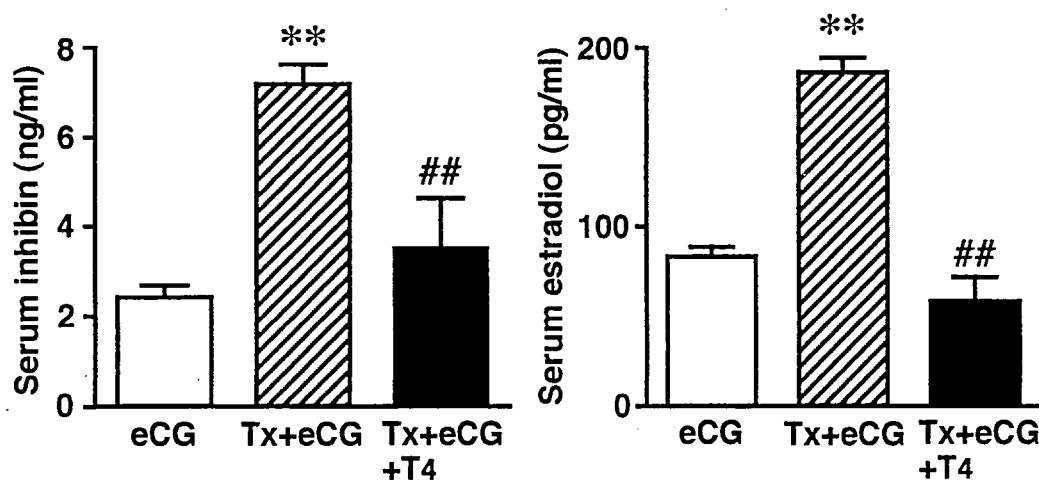


図5. 甲状腺摘出 (Tx) 未成熟ラットの血中インヒビン (a), エストラジオール (b) レベルに対するチロキシシン (T_4) 投与の効果

22日令での甲状腺摘出後、 T_4 (5mg/rat) を6日間1日1回腹腔内投与し eCG 処置後48時間で血液を採取した。各カラムは5~6匹の動物から得られた平均値±SEを示す。* $p<0.01$, eCG群との有意差。## $P<0.01$, Tx+eCG群との有意差。

卵胞にみられるが卵胞莢膜、間質細胞にも染色がみられる(図6)。また、Tx動物で増加した直径 $400\mu\text{m}$ 以上の大洞卵胞にも陽性染色がみられる。図7は甲状腺摘出がインヒビンの遺伝子の転写レベルに影響するか否かについて卵巣内インヒビンmRNA発現量をノーザン解析にて検討した結果である。インヒビン α サブユニットと β_A サブユニットmRNA量は甲状腺摘出により各々、1.5倍、2.3倍に増加しているが、そのレベルは T_4 投与により対照群レベルに抑制される。このことから、Tx動物で観察される血中インヒビンの増加は、卵胞の数の増加によるのみならず卵胞におけるインヒビンmRNA発現レベルの高進も寄与していることが推察された。このことと関連して、Woodruffら(20)はリコンビナントヒトインヒビンをラットに投与すると卵胞の直径が増加することを報告しており、Tx動物の卵巣でのインヒビンの局所的レベルの増加が卵胞発育を促進した可能性もある。エストロゲンに関しては我々の実験結果はないが、培養ラットセルトリ細胞(25)並びにブタ卵巣顆粒膜細胞(7)を用いた実験により基底レベルとFSH誘導性のアロマターゼ活性が甲状腺ホルモンにより阻害されるという結果が報告されている。さらに我々の報告に次いでつい最近、FSHで刺激される未成熟マウスの顆粒膜細胞のアロマターゼ活性とそのmRNA発現及び卵成熟が T_3 添加により抑制されるという知見が報告された(図8)(26)。未熟な顆粒膜細胞の培養系においてFSHで刺激されたエストロゲン産生は T_3 の添加により抑制され(図上段)、またアロマターゼmRNA発現も T_3 の添加で抑制される(図下段)。これらの知見を合わせると、甲状腺摘出による血中 T_3 、 T_4 の低下は一部、mRNA発現レベルの上昇を介したアロマターゼ活性の上昇によってエストロゲン産生を高進するものと考えられる。また、 T_4 投与による回復実験から内因性の甲状腺ホルモンが直接顆粒膜細胞や莢膜細胞の甲状腺ホルモン受容体を介してホルモン分泌に影響していることが推察される。しかしながら、甲状腺摘出によってその血中レベルが増加することが知られている血管作動性腸管ポリペプチド(VIP)(27)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)(28)のような因子の卵巣への直接的効果も否定できない。以上述べたように甲状腺摘出はインヒビンとエストラジオール分泌の上昇を誘起するが、このことは必ずしも正常な卵胞発育とホルモン分泌を高めたというわけではない。CopmanとAdams(29)も最近、未成熟動物の甲状腺機能の低下はFSH結合能の増加などの卵巣のゴナドトロピンに対する感受性の変化を引き起こし多嚢胞性の卵胞を持つ卵巣を形成させると報告している。もし、本モデルでのTx動物の卵巣がそのような異常なFSHに対する反応性を獲得しているならば卵巣ホルモン分泌能の上昇は、ゴナドトロピンに対する卵巣の感受性の増大によると考えられる。関連した実験として卵巣の発達における6-プロピル-2-チオウラシル(PTU)の慢性的効果が検討されている(30)が、その報告によると著者らは、生後0~40日までのPTUの連続投与で甲状腺ホルモン産生を障害させると膣開口前の動物の顆粒膜細胞の分化(増殖ではない)が抑制されて卵胞形成の異常が出現すると述べている。また、春期発動前にPTUを処置された雄ラットは成熟期に精巣サイズの増大と精子形成の高進が起きる(31-35)。この精巣サイズの増加はセルトリ細胞の増殖期の延長、即ち、分化の遅延によるものであることも示唆されている。また、精巣サイズの増大を起すための臨界期間が春期発動前に存在する(36)ことから精巣機能に対して甲状腺ホルモンは精巣発育過程に対して抑制的調節をしていると考えられる。それゆえ、甲状腺摘出により誘起される増加した卵胞内の顆粒膜細胞の分化の停滞とインヒビンmRNA発現と分泌量の増加との関連性があるかもしれない。丸尾ら(12)は、以前、甲状腺ホルモンが直接、成熟ブタ卵巣顆粒膜細胞の分化と分泌機能に促進的に影響しうることを示した。同様に、甲状腺ホルモンは、*in vitro*で精巣の成熟と産生を刺激するという報告もある(37)。これらの結果は、上述した我々の実験成績と異なる結果である。この矛盾の理由は不明であるが、*in vitro*と*in vivo*での実験系の違いや用いた T_4 の用量の違い等も考慮しなければならないが、我々は卵巣や精巣細胞の成熟度の相違が密接に関連していると考えている。

以上の結果をまとめると甲状腺を摘出した動物にゴナドトロピンを作用させると洞卵胞の数、インヒビン産生、卵巣重量が増加することが判明した。また、その動物のインヒビン産生の促進は一部 T_4 によって抑制されるイン

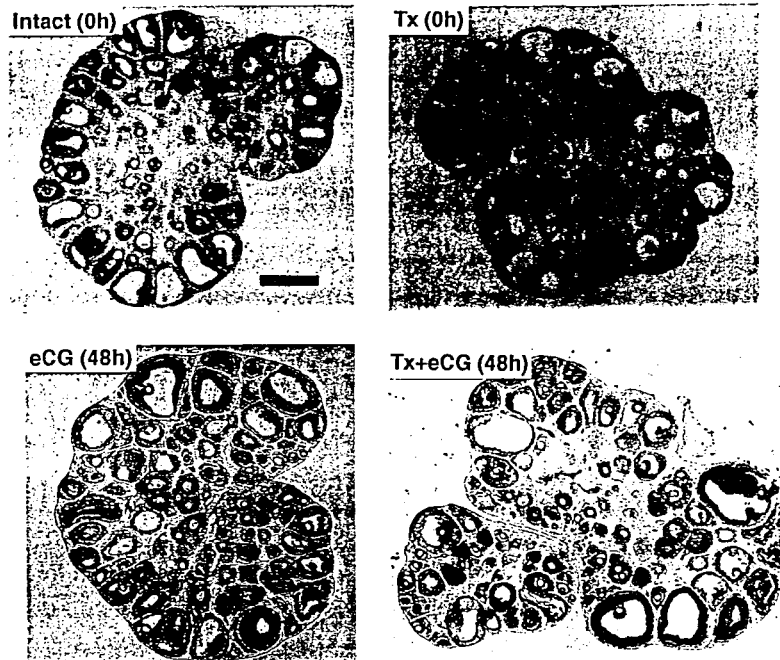


図6. 甲状腺摘出 (Tx) した未成熟ラット卵巢のインヒビン α サブユニットの局在性

eCG 投与後 48 時間で卵巢を摘出し連続切片を調製した。図中の黒線は 500 μ m を示す。写真は全て同倍率である。

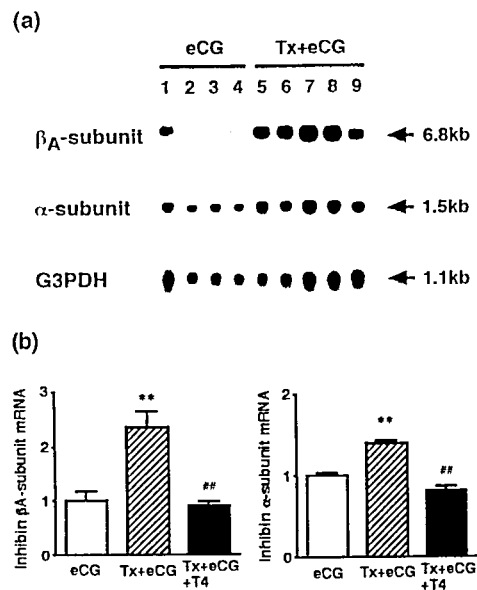
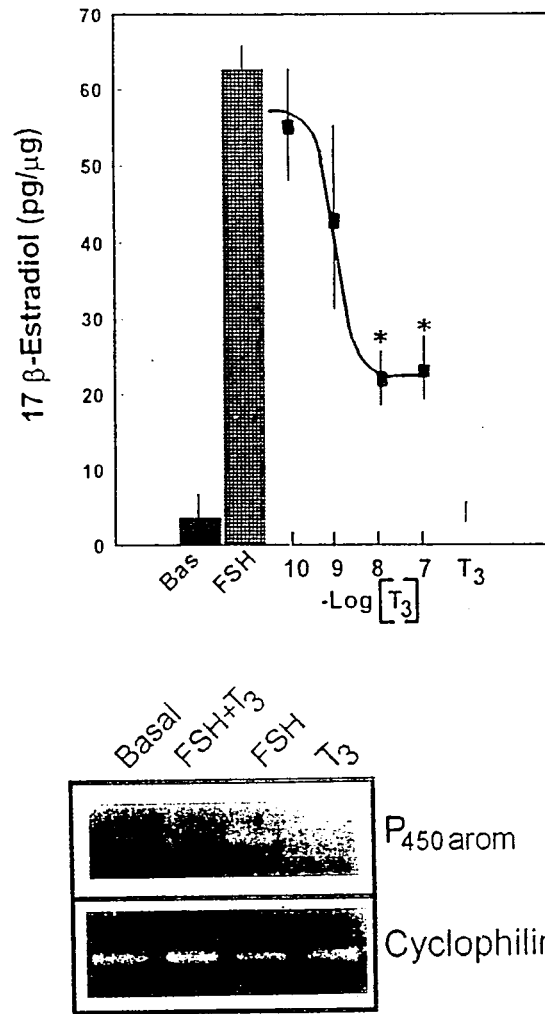


図7. eCG 処置未成熟ラットのインヒビン α , β サブユニット mRNA 発現に対する甲状腺摘出 (Tx) とチロキシン (T₄) 投与の効果

eCG 投与後 48 時間において卵巢から抽出した 20 μ g の total RNA を用いてノーザンブロットを行った。各レーンは個体別の結果を示す。(a) 典型的な解析結果の 1 例 (b) 上の 3 回の実験結果を densitometer で測定したもの。各カラムは 9-10 匹の値。* * $P < 0.01$, eCG 群との有意差。# # $P < 0.01$, Tx+eCG 群との有意差。

思春期発動前の卵巣機能調節における甲状腺ホルモンの制御機構

ヒビンサブユニット mRNA の発現の高進によるものである。



(Cecconi S.ら、1999 より引用)

図8. 未成熟マウス卵巣顆粒膜細胞の FSH 刺激下のアロマターゼ活性及びアロマターゼ mRNA (P450arom) レベルに対する T₃ の作用

(上段) 顆粒膜細胞を 2%血清含有 DMEM 中 24 時間, 引き続き血清を除いた DMEM で 24 時間培養した。その後, FSH (100 ng/ml) 又は FSH と T₃ (0.1-100 nM) の存在下で 6 日間培養し, 培養を終える 16 時間前に 19OH-アンドロステジオンを加えた。培養液中のエストラジオールは RIA にて測定した。各点は 3 ウェルを用いた 2 回の実験の平均±SE を表わす。*P<0.01, FSH 添加群との有意差。

(下段) FSH (100 ng/ml) と T₃ (100 nM) の存在下で 6 日間培養した顆粒膜細胞から抽出した 0.5 μg の total RNA を用いて RT-PCR 解析を行った。

3-2. 甲状腺摘出動物における初排卵の阻害とその機序について

上述したごとく甲状腺摘出はeCGによって発育する洞卵胞の数の増加をもたらす。この発育した成熟卵胞は、表2に示したように外因的に投与したヒト胎盤性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin, hCG) によって排卵を起すことができる卵胞であることを確認している(24)。表は26日令のeCG投与の翌日(eCG投与後33時間)に内因性LHサージのLH作用とほぼ等価である10 IUのhCGを投与して強制的に排卵を28日令で起させた結果である。排卵数は、Tx動物においては対照群と比較して1.7倍に増加している。そこで、次にeCG処置後3日で誘起される自発性初排卵の出現に対する甲状腺摘出の影響を検討し、甲状腺ホルモンが初排卵と排卵過程でのホルモン変化にいかなる影響を及ぼすのかについて解析した(38)。その結果、甲状腺摘出は初排卵の誘起を抑制し(Tx-eCGの排卵している動物は40%)、その抑制機序は主に排卵性LHサージの阻害に起因するものであると結論づけた。なぜならば、この排卵阻害が排卵前日の午後(28日令午後)の10 IUのhCGあるいは1 μ gのLHRH投与によって排卵率は80%以上に回復されるからである(表3)。排卵しているラットにおける卵の数はeCG群と同様だった。排卵性のゴナドトロピン分泌に及ぼす甲状腺摘出の影響とさらにLHRHの効果を確認する目的で、28日令の午後5時に血中LHとFSHを測定すると図9に示すようにTx動物の血中LHとFSHのレベルは対照群(Intact-eCG群)と比べて有意に低値であった。そして、このTx動物に対するLHRH投与は対照群レベルの方向にLHレベルを有意に増加させたが、FSHレベルは回復しなかった。甲状腺機能低下は、ヒトで無排卵の頻度を増加させることが知られている高プロラクチン血症と関連するという知見(39)があるので、プロラクチン(PRL)レベルを測定してみると、甲状腺摘出群においては28日令午前における血中PRLレベルは、対照群の2.2倍に上昇していた(図10)。この結果と関連した知見として、卵巣を摘除したTx動物での血中PRLレベルの上昇がエストロゲン投与によりみられるという報告がある(40, 41)。ヒトにおいて血中プロラクチンレベルの上昇はLHレベルの抑制を起し(42)、またラットにおいてはLHRHに対する下垂体の反応性を減少させる(43, 44)。よって、PRLレベルの上昇により仲介されるLHRH分泌の抑制が本研究モデルにおける排卵性LH分泌の阻害に部分的にせよ関係しているのではないかと推察される。また、排卵性のFSH分泌の抑制並びにLHRHを投与してもFSHレベルの抑制が上昇しなかった理由としては高値を示す血中インヒビンが関与していると考えられる。FSH分泌レベルは循環インヒビン量に強く依存するためである。しかし、近年、LHRHの分泌パターンの頻度の違いがLHとFSHのサブユニットmRNAの発現レベルを制御しているという知見(45)もあるので、甲状腺摘出によるゴナドトロピン分泌抑制にLHRHの分泌パターンの変化も関与しているかも知れない。表4に示すように、28日令の午後4時で測定した血中インヒビンレベルは、Tx動物で高く、このレベルもLHRH投与で影響されない。我々の結果はTx動物でのLHサージの抑制にはたぶん視床下部でのLHRH阻害と、あるいはLH放出のための下垂体のLHRHに対する反応性の減少が寄与していることを示唆している。前章でも述べたように、甲状腺機能低下は下垂体でのVIPの濃度を増加させる(26)。また、甲状腺刺激ホルモン放出因子Thyrotropin-releasing hormone: TRH(46)とVIP(47, 48)はPRL分泌の調節因子として機能していると考えられるので、視床下部におけるTRHの増加に加えて下垂体でのVIPの増加がPRL上昇を生じさせている可能性も考えられる。またさらに、副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRH)、これはチオウラシル(49)やPRL処置(50)によってそのレベルが増加することが知られているが、CRHがラット視床下部のLHRH放出の阻害因子として機能する可能性もある(51, 52)。図11には、今回用いたモデルでのTx動物の排卵阻害に関連したホルモン変化からみた機序の概要・推察を示した。即ち、循環血中の甲状腺ホルモンレベルの低下はまず1. 一部TRH, CRHそしてVIPの増加によって介在される下垂体のPRLレベルの増加を来す。2. このPRLレベルの上昇はLHRH分泌を阻害するか又は下垂体からのLH分泌に対するLHRHの作用を阻害する。3. さらに、前節に述べたように甲状腺摘出は、エストロゲンとインヒビン

Groups	Ovulating rats/ rats examined	No. of oocytes in ovulating rats	Ovarian weight (mg)
eCG	5 / 5	9.4 ± 1.40	37.5 ± 1.46
Tx + eCG	5 / 5	16.4 ± 0.81 ***	40.4 ± 1.35

表 2. 甲状腺摘出 (Tx) 未成熟ラットへの hCG 投与で誘起した強制排卵における卵胞数と卵巣重量
26 日令の eCG 投与翌日の 27 日令 17:00 に 10 IU の hCG を投与し, 28 日令 8:00 で排卵を確認した. 各値は 5 匹の動物から得られた平均値±SE を示す. ***P<0.001, eCG 群との有意差.

	Groups	Ovulating rats /rats examined	Rate of ovulation (%)	No. of oocytes in ovulating rats	Ovarian weight (mg)
Intact	eCG	10 / 10	100	10.1 ± 0.48	36.0 ± 2.46
	eCG+hCG	10 / 10	100	9.4 ± 0.43	33.1 ± 3.93
Tx	eCG	4 / 10	40	11.5 ± 0.29	39.2 ± 2.56
	eCG+hCG	14 / 17	82	14.3 ± 1.97	49.0 ± 1.86**
	eCG+LHRH	4 / 5	80	11.3 ± 1.38	41.0 ± 2.06

表 3. eCG 処置未成熟ラットの初排卵に対する甲状腺摘出 (Tx) の効果と hCG および LHRH 処置の効果
22 日令で甲状腺を摘出, 26 日令での 5 IU の eCG の投与後 56 時間と 57 時間で各々 LHRH(1 µg, iv) と hCG (10 IU, ip)を投与した. 29 日令の午前 8 時に排卵数を確認した. 各値は 5~17 匹の動物から得られた平均値 ±SE を示す. **P<0.01, Intact-eCG 群との有意差. ##P<0.01, Intact の eCG + hCG 群との有意差.

Groups	Inhibin (ng/ml)
Intact-eCG	1.9 ± 0.17
Tx-eCG	2.5 ± 0.18 #
Tx-eCG+LHRH	2.5 ± 0.14 #

表 4. eCG 処置未成熟ラットの血中インヒビンレベルに対する甲状腺摘出 (Tx) の効果と LHRH 処置の効果
LHRH(1 µg, iv)は eCG 投与後 56 時間(28 日令の午後 4 時)で投与し, 投与後 1 時間(午後 5 時)でホルモンレベルを測定した. 各値は 5~17 匹の動物から得られた平均値±SE を示す. #P<0.05, Intact-eCG 群との有意差.

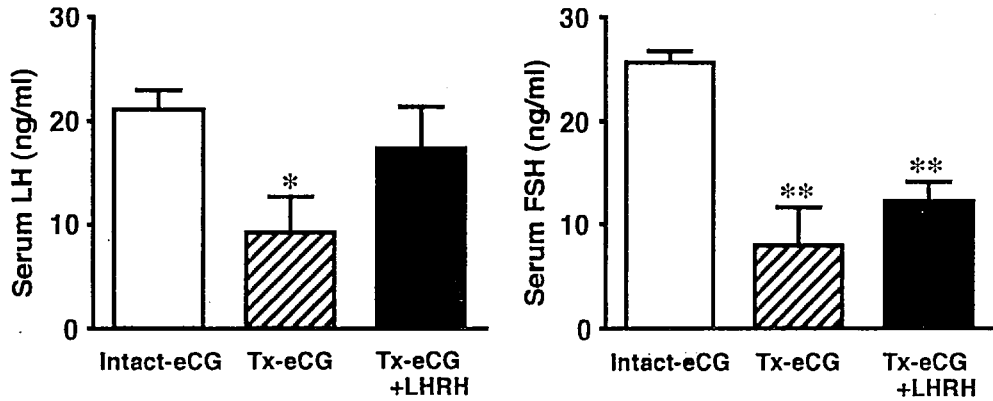


図9. 甲状腺摘出 (Tx) 未成熟ラットの血中 LH と FSH レベルに対する LHRH の作用

1 μ g の LHRH を eCG 投与 56 時間後 (28 日令の午後 4 時) に尾静脈投与し, 投与後 1 時間でホルモンレベルを測定した. 各値は 3~4 匹の動物から得られた平均値 \pm SE を示す. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, Intact-eCG 群との有意差.

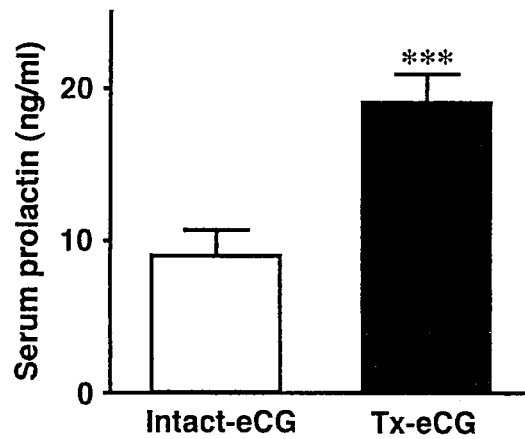


図10. eCG 処置未成熟ラットにおける血中プロラクチンレベルに対する甲状腺摘出 (Tx) の効果

eCG 投与後 48 時間で血液を採取した (28 日令の午前 8 時). 各値は 12 匹の動物から得られた平均値 \pm SE を示す. *** $P < 0.001$, Intact-eCG 群との有意差.

思春期発動前の卵巣機能調節における甲状腺ホルモンの制御機構

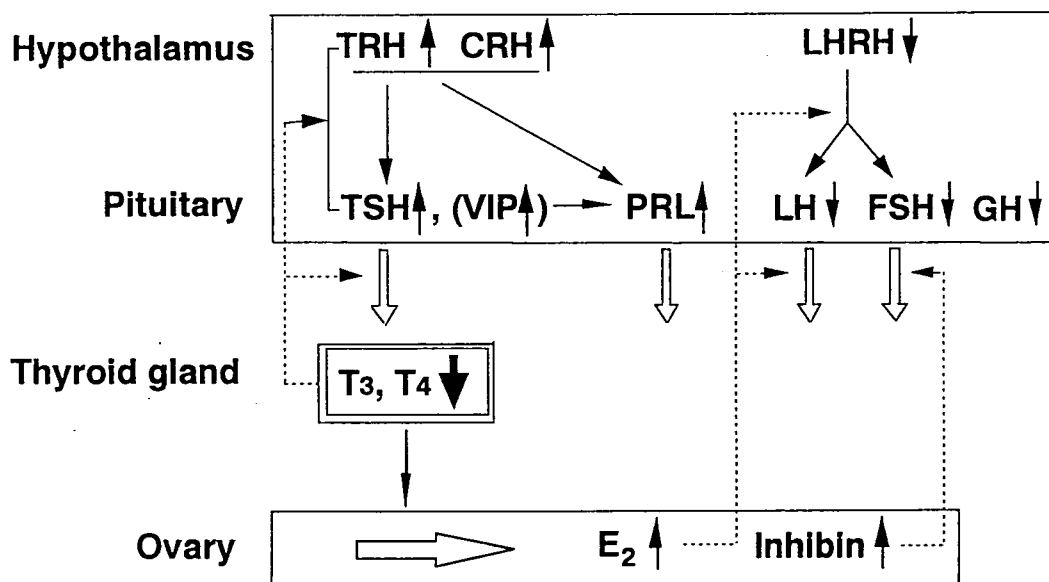


図11. 思春期発動前の甲状腺摘出ラットのホルモン変化

白抜き矢印; 分泌を表わす。細い矢印と波線; 各々、正常時の刺激と抑制を表わす。↑と↓; 甲状腺摘出によるホルモンレベルの増加と減少。TRH, thyrotropin-releasing hormone; CRH, corticotropin-releasing hormone, TSH; thyroid-stimulating hormone; VIP, vasoactive intestinal peptide; T₃, triiodothyronine; T₄, thyroxine; GH, growth hormone; PRL, prolactin; E₂, estrogen.

産生を高進する。エストロゲンは、ネガティブフィードバック機構により視床下部での LHRH レベルを抑制し、インヒビンは下垂体からの FSH 分泌を抑制する。前述したように Tx 動物では eCG 投与後 33 時間の時点で排卵可能な卵の数は、対照群の 1.75 倍だったにもかかわらず、eCG 投与 57 時間後においてはその排卵した数は対照群とほぼ同じであった。このように排卵数に対する甲状腺摘出の効果が eCG 処置後の時間に依存して変化する理由は詳細に検討していないが、前節でも述べたように、未成熟動物の一過性の甲状腺機能低下が精巣肥大(30)・精子形成(31)の増加を引き起こすことに加えて、過剰量の 3, 5, 3-トリヨードチロニン (T₃) 投与がセルトリ細胞の分化を促進し、細胞増殖の期間を減ずる(32) ことが報告されているので、未成熟ラットの甲状腺摘出は一時的にかつ異常にゴナドトロピン誘導性の卵胞発育とそのライフスパンを加速化するために正常な成熟度をもつグラーフ卵胞の数が LH サージの時刻付近 (eCG 投与後 57 時間) で減少するかもしれない。また排卵前付近での血中 PRL 値の上昇と排卵数の減少はかなり密に関連しているらしい。事実、兎の灌流卵巣の排卵が灌流液中への PRL の添加によって阻害されること(53)や、PRL は *in vitro* でのラット顆粒膜細胞の黄体化を阻害すること(54) が報告されている。また、ヒト顆粒膜細胞のステロイド産生を減少させることも知られている(55)。よって、血中レベルで高値を示した PRL は hCG を投与した Tx 動物の排卵に対して直接抑制をかけているかもしれない。Tx 動物の 20% はたとえ hCG 又は LHRH を投与しても排卵しなかった。このように排卵しているラットの排卵数の低下 (初排卵において強制排卵における排卵数と比べて減少しているという点) と排卵した動物数の減少が、甲状腺摘出で誘起される hCG と LH に対する卵巣の感受性を低下させる高 PRL 血症と関連しているかもしれない。血中 PRL レベルの変化に加えて、甲状腺摘出は成長ホルモン (GH) の合成と分泌レベル(56, 57) や下垂体での GH 放出因子受容体の遺伝子発現を低下させること(58) も知られている。また、GH はラット卵巣においても GH 受容体を介

して卵巣細胞の分化に多彩な作用を発揮する(59)。たとえば、GHは顆粒膜細胞のFSH誘導性のLH受容体発現(60, 61)や排卵酵素の1つとして認識されている組織型プラスミノゲンアクチベーター活性(62)を刺激するのでパラクライン因子として排卵に関与することが示唆されている。従って、正常な血中レベルのGHが維持できなくなった状況下で排卵機能が影響をうけ排卵が抑制された可能性も考えられる。さらに、甲状腺摘出はeCG投与後の正常な子宮重量の増加をも血中エストロゲンレベルの上昇がみられるにもかかわらず抑制する。T₃はエストロゲン誘導性の子宮重量の増加を増強することが示唆されているので(63)、エストロゲン作用に対するT₃の許容作用的な役割が推察される。

以上の実験結果から、甲状腺機能低下はゴナドトロピン前処理未成熟ラットの初排卵を阻害すること、またその阻害は主に排卵性LHサージの抑制を介しているがその阻害機序には卵巣ホルモンの分泌異常と下垂体性調節因子の変化が関与していることが示唆された。

4. まとめ

甲状腺は哺乳動物において個体の成長、細胞の分化促進、糖質代謝・脂質代謝等の物質代謝を調節する重要な役割を担っている内分泌器官である。甲状腺と生殖腺との関連性については甲状腺機能の障害により卵巣機能が変化することから推察されていた。たとえば、成熟ラットの甲状腺を摘出すると性周期は不規則となり卵巣の形態に影響がみられる。しかしながら、性的に未熟な思春期発動過程前の卵巣機能獲得に対して甲状腺ホルモンの役割は不明であった。ここに思春期前の未成熟ラットを用いて思春期発動における卵胞発育とそれに伴う卵巣ホルモン生成・分泌、初排卵の誘発等一連の重要な卵巣過程に対して甲状腺が如何なる役割を演じているのかを検討した結果を中心に紹介した。甲状腺を摘出したeCG処置未成熟ラットでは血清中卵巣ホルモン(インヒビン、エストロゲン)レベルが増加すること、また、これらのホルモンレベルの上昇は、卵巣の卵胞発育促進に由来する大卵胞数の増加と密接に関連すること、さらに転写促進による産生系の高進が関与していることが明らかとなった。また、甲状腺機能低下はゴナドトロピン前処理未成熟ラットの初排卵を阻害し、その阻害には排卵性LHサージの抑制が主に介在している。従って、甲状腺ホルモンは性周期回帰前における生殖機能の抑制的因子として重要な役割を持つことが示された。

5. おわりに

本研究は、当時(平成7-8年度)、大学院生であった初田稔氏、また東京農工大学・農学部・獣医学科の田谷一善教授及び渡辺元助教授をはじめとする方々と共に行った共同研究であり、ここに厚く御礼申し上げます。また、本研究内容について平成10年度の吉田伸子記念研究賞をいただきましたことに深く感謝いたします。

文献

1. Greenwald, G.S., Roy, S.K. Follicular development and its control. The physiology of Reproduction. in Knobil E, Neill. (eds.) pp.629-724, Raven Press, New York (1994)
2. Tonetta, S.A., and Di Zerega, G.S. (1989) *Endocr. Rev.* **10**, 205-229.
3. Mondschein, J.S., and Schomberg, D.W. (1981) *Science* **211**, 1179-1180.
4. Adashi, E.Y. (1990) *Endocr. Rev.* **11**, 454-464.
5. Longcope, C. (1991) The male and female reproductive systems in hypothyroidism. in The Thyroid: A fundamental and Clinical Text. Braverman, R.D. Utiger, R. D., Utiger, Werner S.C., Inber S.H. eds.

- Lippincott, Philadelphia: pp. 1052-1055.
6. Stradtman EW. (1993) Thyroid dysfunction and ovulatory disorders. *in* Textbook of Reproductive Medicine. Carr, B.R., Blackwell R.E. (eds) Appleton, Norwalk, CT, pp. 297-321.
7. Chan, W.K., and Tan, C.H. (1986) *Endocrinology* **119**, 2353-2359.
8. Maruo, T., Hayashi, M., Matsuo, H., Yamanoto, T., Okada, H., and Mochizuki, M. (1987) *Endocrinology* **121**, 1233-1241.
9. Wakim, A.N., Polizotto, S.L., and Burholt, D.R. (1995) *Hum. Reprod.* **10**, 2845-2848.
10. Goldman, S., Dirnfeld, M., Abramovici, H., and Kraiem, Z. (1993) *Mol. Cell. Endocrinol.* **96**, 125-131.
11. Wakim, N.G., Ramani, N., and Rao, C.V. (1987) *Am. J. Obstet. Gynecol.* **156**, 237-240.
12. Maruo, T., Hiramatsu, S., Otani, T., Hayashi, M., and Mochizuki, M. (1992) *Acta. Endocrinol.* **127**, 152-160.
13. Wakin, A.N., Polizotto, S.L., Buffo, M.J., Marrero, M.A., and Burholt, DR. (1993) *Fertil Steril* **59**, 1187-1190 (1993).
14. Zhang, S.S., Carrillo, A.J., and Darling, D.S. (1997) *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 555-562.
15. Cole, H.H. (1936) *Am. J. Anat.* **59**, 299-331.
16. Kogo H., Takasaki K., Takeo S., Watanabe G., and Taya K., (1992) *Eur. J. Pharmacol.* **221**, 289-295.
17. Woodruff, T.K., and Mayo, K.E. (1990) *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 807-821.
18. Ying, S-Y., Becker, A., Ling, N., Ueno, N., and Guillemin. R. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**, 969-972.
19. Hsueh, A.J.W., Dahl, K.D., Vaughan, J., Tucker, E., Rivier, J., Bardin, C.W., and Vale, W. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 5082-5086.
20. Woodruff, T.K., Lyon, R.J., Hansen, S.E., Rice, G.C., and Mather, J.P. (1990) *Endocrinology* **127**, 3196-3205.
21. Butcher, R.L., Collins, W.E., and Fogo, N.W. (1989) *Endocrinology* **94**, 1704-1708.
22. Watanabe, G., Taya, K., and Sasamoto, S. (1990) *J. Endocrinol.* **126**, 151-157.
23. Hamada, T., Watanabe, G., Kokuho, T., Sasamoto, S., Hasegawa, Y., Miyamoto, K., and Igarashi, M (1989) *J. Endocrinol.* **122**, 697-704.
24. Tamura, K., Hatsuta, M., Watanabe, G., Taya, K., and Kogo, H. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **242**, 102-108.
25. Ulisse, S., Jannini, E.A., Carosa, E., Piersanti, D., Graziano, M.F., and Darmiento, M. (1994) *J. Endocrinol.* **140**, 431-436.
26. Cecconi, S., Rucci, N., Scaldaferrri, L., Masciulli, M.P., Rossi, G., Moretti, C., Darmiento, M., and Ulisse, S. (1999) *Endocrinology* **140**, 1783-1788.
27. Lam, K.S.L., Lechan, R.M., Minamitani, N., Segerson, TP., and Reichlin, S. (1989) *Endocrinology* **124**, 1077-1084.
28. Akamizu, T., Ikuyama, S., Saji, M., Kosug, S., Kozak, C., McBride, O.W., and Kohn, L.D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 5677-5681.
29. Copmann, TL., and Adams, WC. (1981) *Biol. Reprod.* **25**, 115-119.

30. Dijkstra, G., G-De Rooij, D., H-De Jong, F., and Van-Den Hurk, R. *Eur. J. Endocrinol.* **134**, 649-654. (1996)
31. Cooke, P.S., and Meisami, E. (1991) *Endocrinology* **129**, 237-243.
32. Cooke, P.S., Hess, R.A., Porcelli, J., and Meisami, E. (1991) *Endocrinology* **129**, 244-248.
33. Van Haaster, L.A., De Jong, F.H., Docter, R., and De Rooij, D.G. (1992) *Endocrinology* **131**, 1574-1576.
34. Janini, EA, Ullisse, S, and D'Armiento, M. (1995) *Endocrine Reviews* **164**, 443-459.
35. Van Haaster, L.A., De Jong, F.H., Docter, R., and De Rooij, D.G. (1993) *Endocrinology* **133**, 755-760.
36. Meisami, E., Sendra, T.J., and Clay, L.B. (1992) *J. Endocrinol.* **135**, 495-505.
37. Cooke, P.S., Zhao, Y.D., and Bunick, D. (1994) *Biol. Reprod.* **51**, 1000-1005.
38. Tamura, K., Hatsuta, M., Watanabe, G., Taya, K., and Kogo, H. (1998) *Am. J. Physiol.* **275** (Endocrinol. Metab. **38**), E380-385.
39. Thomas, R., and Reid, R.L. (1987) *Obstet. Gynecol.* **70**, 789-798.
40. Pan, J-T., and Chen, C-W. (1990) *Endocrinology* **126**, 3146-3152.
41. Yang, J-Y., and Pan, J-T. (1994) *Neuroendocrinology* **59**, 520-527.
42. Cheung, C. Y. (1983) *Endocrinology* **113**, 632-638.
43. Lu, K.H., Chen, H.I., Grandison, L., Huang, H.H., and Meites, J. (1976) *Endocrinology* **98**, 1235-1240.
44. Smith, M.S. (1978) *Endocrinology* **102**, 114-120.
45. Dalkin, A.C., Haisenleder, D.J., Ortolano, G.A., Ellis, T.R., and Marshall, J.C. (1989) *Endocrinology* **125**, 917-924.
46. Harris, A.R.C., Christianson, D., Smith, M.S., Fang, S-L., Braverman, L.E., and Vagenakis, A.G. (1978) *J. Clin. Invest.* **61**, 441-448.
47. Abe, H., Engler, D., Molitch, M.E., Bollinger-Gruber, J., and Reichlin, S. (1992) *Endocrinology* **116**, 1383-1390.
48. Nagy, G., Mulhahney, J.S., and Neill, J.D. (1988) *Endocrinology* **122**, 364-366.
49. Tohei, A., Watanabe, G., and Taya, K. (1998) *J. Endocrinol.* **156**, 395-400.
50. Weber, R.F.A., and Calogero, A.E. (1991) *Neuroendocrinology* **54**, 248-253.
51. Calogero, AE., Weber, RFA., Raiti, F., Burrello, N., Moncada, ML., Mongioi, A., and D'Agata, R. (1994) *Neuroendocrinology* **60**, 291-296.
52. Kooy, A., de Greef, WJ., Vreeburg, JTM., Hackeng, WHL., Ooms, MP., Lamberts, SWJ., and Weber, RFA. (1990) *Neuroendocrinology* **51**, 261-266.
53. Hamada, Y., Schlaff, S., Kobayashi, Y., Santulli, R., Wright, K.H., and Wallach, E.E. (1980) *Nature* **285**, 161-163.
54. Adashi, E.Y., and Resnick, C.E. (1987) *Fertil. Steril.* **48**, 131-139.
55. Cutie, E., and Andino, N.A. (1988) *Fertil. Steril.* **49**, 632-637.
56. Martin, D., Epelbaum, J., Bluet-Pajot, M-T., Prelot, M., Kordon, C., and Durand, D. (1985) *Neuroendocrinology* **41**, 476-481.
57. Mirell, C.J., Yanagisawa, M., Lau, R., Pekary, A.E., Chin, W.W., and Hershman, J.M. (1987) *Mol.*

Endocrinology 1, 408-412.

58. Miki, N., Ono, M., Murata, Y., Ohsaki, E., Tamitsu, K., Ri, T., Demura, H., and Yamada, M. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217, 1087-1093.
59. Carlsson, B., Nilsson, A., Isaksson, O.G.P., and Billig, H. (1993) *Mol. Cell. Endocrinol.* 95, 59-66.
60. Jia, X.C., Kalmijn, J., Hsueh, A.J.W. (1986) *Endocrinology* 118, 1401-1409.
61. Hutchinson, L.A., Findlay, J.K., and Herington A.C. (1988) *Mol. Cell. Endocrinol.* 55, 61-69.
62. Apa, R., Lanzone, A., Miceli, F., Caruso, A., Mancuso, S., and Canipari, R. (1994) *Mol. Cell. Endocrinol.* 99, 153-159.
63. Dipippo, V.A., Lindsay R., and Powers CA. (1995) *Endocrinology* 136, 1020-1033.