

①

ラット脳下垂体前葉の
プロラクチン産生細胞および
成長ホルモン産生細胞に関する研究

1992年3月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）
生物環境科学専攻（主指導教官 能村哲郎教授）

新海 正

目次

序論	1
I. 個体レベルでの研究	
I. 1 緒言	4
I. 2 血中PRL濃度の加齢変化	6
I. 3 脳下垂体前葉におけるPRL産生細胞および GH産生細胞の加齢変化	12
I. 4 結論	39
II 培養細胞レベルの研究	
II. 1 緒言	40
II. 2 PRL産生細胞およびGH産生細胞の単離と 培養法の確立	41
II. 3 各種生理活性物質の添加効果	55
II. 4 PRL産生細胞およびGH産生細胞におよぼす GRFの効果	63
II. 5 PRL産生細胞およびGH産生細胞におよぼす LHRHの効果	72
II. 6 結論	83
総括	84
要旨	88
謝辞	91
引用文献	92

序論

ラットの脳下垂体前葉には数種類のペプチド性の刺激ホルモン産生細胞が存在している。それらの細胞は、魚類、両生類、爬虫類および鳥類などにみられるように特定の領域に局在することなく、他の哺乳類と同様に前葉全体に混在している（図1）（1）。これらの細胞のうち、プロラクチン(PRL)産生細胞と成長ホルモン(GH)産生細胞は、共にエリスロシンやフロキシシンなどの酸性色素によく染まる好酸性細胞であり（2）、産生するホルモンの分子量やアミノ酸配列などの化学構造も類似していることがよく知られ、脊椎動物の進化の過程で、共通の祖先ペプチド分子から派生したのではないかと考えられている（3）。さらに、PRLとGHの両方を含んだ細胞の存在も、超微形態学的技法や生化学的技法により認められていることから（2,4,5,6,7,8,9,10）、PRL産生細胞とGH産生細胞との間の密接な関係が想定されている。

これまでも、この二種類のホルモン産生細胞の関係について研究されているが（4,7,8）、それらはいずれも胎仔や新生仔など発生初期の動物を実験材料に使った研究である。この時期の脳下垂体前葉のホルモン産生細胞は、幹細胞からホルモン産生細胞への変換期にあたり、細胞自身が特殊な状態にあるため（3,11,12）、得られた実験結果をそのまま若齢、中年齢、老齢のラットの成熟したホルモン産生細胞に当てはめて考えることはできない。

ラットでは、老齢になると血中PRL濃度が増加するという報告や（13,14,15,16,17,18）、脳下垂体前葉細胞の中でPRL産生細胞の占める割合が増加するという報告がある（13,19）。しかし、PRL産生細胞が全脳下垂体前葉細胞中に占める相対数の増加を、そのまま細胞の絶対数の増加とみなすことはできない。最近、いくつかのホルモンを含めたある種の生

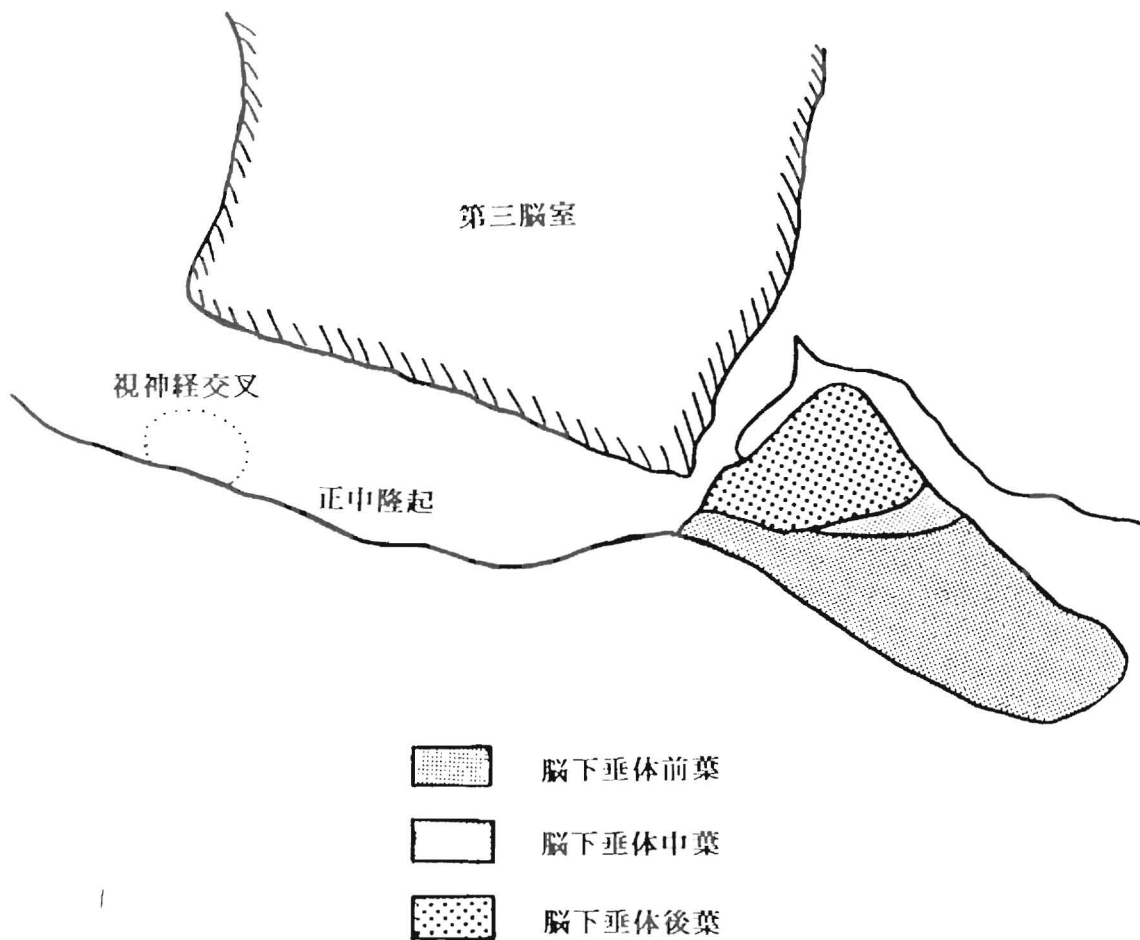


図 1 ラット脳下垂体の正中断面図

みなすことはできない。最近、いくつかのホルモンを含めたある種の生理活性物質や脳ペプチドが、脳下垂体ホルモンの合成や放出に関与するだけでなく、*in vivo* (20, 21, 22, 23) や *in vitro* (5, 24, 25, 26, 27) で、ホルモン産生細胞の増殖を促進したり抑制したりすることも報告されている。

そこで、本研究ではラットを用いて、まず、*in vivo*で脳下垂体前葉のPRL産生細胞とGH産生細胞の実数が、加齢と共にどのように変動しているのかを調べ、次ぎに、この変動が何に起因するのか、すなわち、細胞分裂による変動なのか、あるいは、PRL産生細胞とGH産生細胞との間の細胞機能の表現型の移行 – ある産生細胞が他の産生細胞へと変化すること – による変動なのかを明らかにするために、各生理活性物質に対するPRL産生細胞およびGH産生細胞の細胞増殖応答の差に着目し、脳下垂体前葉細胞の初代培養実験により*in vitro*での解析を行った。

I . 個体レベルでの研究

I. 1 緒言

ラットの血中PRL濃度が加齢に伴い増加することについては、既にいくつかの研究報告がある(13,14,15,16,17)。しかしながら、これらの報告はいずれもPRL濃度を月齢毎にまとめた平均値として表しているために、実際に各個体のPRL濃度の経齡的な変動がどの程度であったかわからない。多くの研究結果は、老齡ラットのPRL濃度の平均値が若齡ラットに比べ上昇すると共に、標準偏差も非常に大きくなることを示している(13,14,15,16,17)。この大きな標準偏差は、老齡ラットにおいて、血中PRL濃度が低レベルの個体から高レベルの個体まで幅広く分布していることを示唆している。

これまでのところ、電子顕微鏡による観察から、若齡ラットのPRL産生細胞と老齡ラットのPRL細胞の間には、超微形態学的に差異が存在することが報告されており(13)、これも、PRL産生細胞の生理機能面に加齢に伴う変化が生じていることが予想される。

PRL産生細胞とGH産生細胞は相互によく似た組織化学的性質を持つことや、それらの細胞が産生する両ホルモンの化学構造も類似していること、またPRLとGHの両方を含んだホルモン産生細胞の存在も認められていることなど、両ホルモン産生細胞の生理機能面での密接な関係が推測されている。そこで、本研究では先ず、若齡、中年齡から老齡までの各月齡のラットを、個体毎に血中PRL濃度を測定し、また、これに併行してPRL産生細胞の超微形態学的観察も行い、この両者の関係について、個体毎に比較しながら検討を行った。次いで、各ラットの血中PRL濃度の高低とG

II産生細胞の超微形態像との間にどのような関連がみられるのかという点について調べた。更に、脳下垂体前葉の中に占めるPRL産生細胞数とGH産生細胞数の関係についても研究を行った。

1.2 血中PRL濃度の加齢変化

材料および方法

動物

実験には、雄の場合は、3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 19, 23, 24, 27, 28, 29, 32カ月齢、雌の場合は、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 32カ月齢のウイスター系のラットを用いた。これらの動物は東京都老人総合研究所の実験動物施設で繁殖および飼育されたものである。動物の飼育室は温度22°Cに保たれ、明12時間、暗12時間の明暗周期（明期；6:00-18:00、暗期；18:00-6:00）を維持された状態で管理されていた。1つのケージ内に同腹、同性の動物を3個体収容し、水道水および固形試料（CRF-1：日本チャールス・リバー）を自由摂取の条件下で飼育した。

ラジオイムノアッセイ（RIA）

ラットを飼育室内から実験室に10:00-12:00の間に移した後、エーテルで軽く迅速に麻酔し、断頭により採血した。この際、血液凝固を防ぐために、ヘパリンを壁面に塗布した試験管を用いた。これら一連の作業は2分以内に終了した。採血と同時に脳下垂体の状態を確認し、明らかに脳下垂体腫瘍を持つと思われる個体については実験から除外した。血液は1000xg、10分間の遠心により血球分画と血漿分画とに分離し、血漿分画を凍結保存用サンプルチューブ（Sampling tube, 1.5ml: Bio Bic）に入れ、液体窒素中ですばやく凍結した後、-70°Cの超低温冷凍庫内で保存した。その後、血漿試料を室温で融解し、NIADDK（National Institute of Arthritis, Diabetes, Digestive Diseases and Kidney: Bethesda,

U. S. A.) より供与をうけたラットPRL測定キット (NIADDK-anti-rPRL-S-9、NIADDK-rPRL-RP-3)、¹²⁵I標識rPRL (NEN) および第二抗体 (抗ウサギIgG, H+L鎖: MBL) を用いてRIAを行い、 γ カウンター (Auto Well Gamma System, ARC-300: Aloka) により測定し、血中PRL量を算出した。

統計処理

雌雄のラット間で、PRL濃度の高低に有意な差が認められるかどうかを調べるために、2試料 χ^2 検定法を用いて解析を行った。

結果

雄ラットの場合、血中PRL濃度は若齢 (14カ月齢未満) と中年齢 (14カ月齢以上24カ月齢未満) では殆どの個体が、血漿1ml当り5-40ngの範囲の値であった。しかし、老齢 (24カ月齢以上) になると個体間の血中PRL濃度のばらつきが非常に大きくなり、若齢、中年齢と同様に5-40ng/mlの個体が依然として多いが、40ng/mlを越える個体も出現し、100ng/mlを越える個体もあらわれた。(図2)

雌ラットの場合、血中PRL濃度は若齢では5-70ng/mlの範囲であり、雄のラットよりも広い範囲に分散していた。しかし、中年齢になると70ng/mlに達するような個体はみられなくなり、雄ラットの中年齢と同様のPRL濃度となった。老齢ラットでは、雄の場合以上に個体間のばらつきが大きくなり、若齢、中年齢と同じPRL濃度の個体もみられたが、70ng/mlを越える個体、さらには、100ng/mlを越える個体もあらわれるようになった(図3)。また、高PRL濃度の個体があらわれる頻度を、 χ^2 検定により検討してみると、雌の方が雄よりも高いことがわかった (有意水準: $p < 0.05$)。

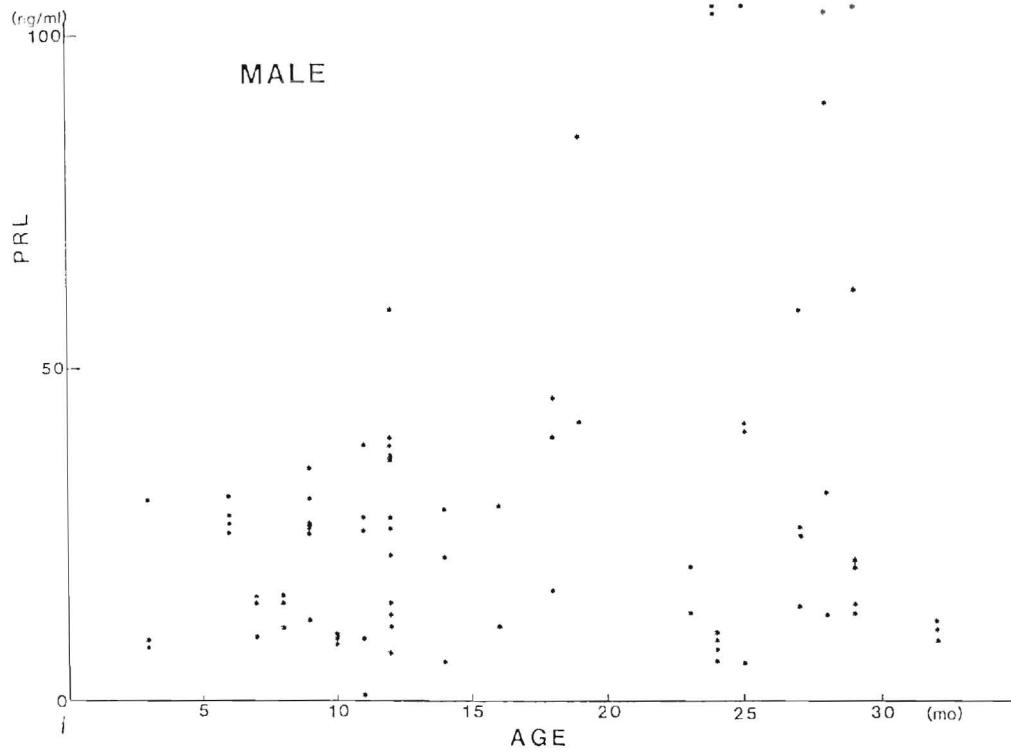


図 2 雄ラットの血中PRL濃度

*は各個体の血漿1mlあたりのPRL濃度を示す。

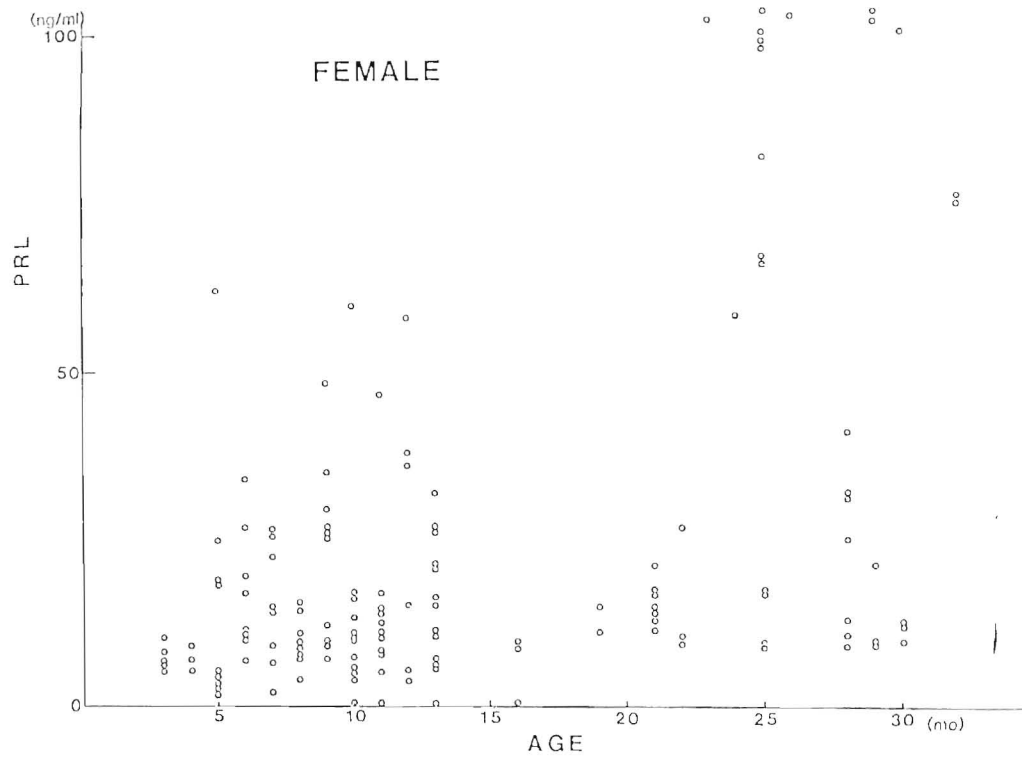


図 3 雌ラットの血中PRL濃度

○は各個体の血漿1mlあたりのPRL濃度を示す。

考察

RIAにより測定したラットの血中PRL濃度は、雌雄の若齢、中年齢ともに今までに報告されている値と一致した(13、14、15、16、17)。

若齢の雌ラットは同齢の雄に比べ、PRL濃度の振れ幅が大きかったが、中年齢になると雌のPRL濃度は雄と同様に40ng/ml以上を示す個体がなくなくなることがわかった。これは、若齢では規則的な発情周期に伴いPRL濃度が大きく変動するのに対し、中年齢になると発情周期の規則性が不明瞭になるために、PRL濃度も70ng/ml程度にまで高まる個体はみられなくなると思われる。

老齢になると、雌雄とも非常に高いPRL濃度を示す個体が現れるようになった。しかしながら、全ての個体が高濃度を示したのではなく、依然として若齢、中年齢と同程度のPRL濃度にとどまる個体も存在していた。老齢の雄ラットでは系統により血中PRL濃度が上昇するという報告(14、15、16)と上昇しないという報告(13)がある。このようにラットの場合、血中PRL濃度は動物の系統間で違いがあることが知られているが、本研究で使用したウィスター系ラットは、雌雄ともに加齢に伴い上昇することがわかった。高PRL濃度の個体があらわれる頻度を雌雄のラット間で比べてみると、有意水準5%で雌の方が高かった。この有意水準は、検定する個体の数を多くすることにより、さらに小さくすることができると思われる。

本研究では、肉眼による観察で脳下垂体腫瘍が認められた個体の試料はすべて排除したが、血中PRL濃度が100ng/mlを越えるような高濃度の個体に、一般的な観察では見逃すほどの小さなPRL産生腫瘍やPRLを多く産生・放出する細胞群—これは、前癌段階とも考えられるが—が存在していた可能性も考えられる。実際、この系統のラットでは老齢になると

1/3以上の個体にPRL産生腫瘍が発生することが報告されている（28）。
そこで、微小な腫瘍の存在を確認するためには、脳下垂体前葉のPRL産生細胞について、組織化学や細胞化学的見地からの解析を行うことが必要であり、それらの点を考慮にいれて次の研究を行った。

1

I. 3 脳下垂体前葉におけるPRL産生細胞およびGH産生細胞の加齢変化

材料および方法

動物

血中PRL濃度の測定用の採血と同時に電子顕微鏡観察用の試料として、いくつかの個体の脳下垂体前葉を固定した。また、その固定試料を用いて、脳下垂体前葉の重量も測定した。

免疫細胞化学（図4）

ラット脳下垂体をKarnovsky法にしたがってパラフォルムアルデヒド（Paraformaldehyde: TAAB）－グルタルアルデヒド（Glutaraldehyde: TAAB）の混合固定液により1日間、1次固定をした。この際、細胞内のPRLとGHの抗原性を維持するために、グルタルアルデヒドを原法より低濃度にして、1%濃度で使用した。PRL産生細胞およびGH産生細胞は脳下垂体前葉に分散しているが、ある程度の局在が考えられるため、M. C. PooleおよびF. M. Perezの方法（29, 30）の変法により、脳下垂体から中葉および後葉部分を除いた後、脳下垂体前葉を正中線にそって半切し、その半切部をさらに6つの小片に切り分け、あらためて1%オスミウム酸（Osmium [VIII]-oxid: Merck）で1時間、2次固定をした。固定が完了した試料をアルコール系列およびプロピレンオキサイドにより脱水した後、エポキシ樹脂（Quetol-812: 日新EM）に包埋した。

重合により硬化した試料から超薄切片を作成し、それをニッケルグリッド（Veco Grid, Ni 200: Nisshin EM）上に貼つけ実験に用いた。飽和メタ過ヨウ素酸ナトリウム（Sodium Metaperiodate: 和光純薬）の飽和水溶液と過酸化水素水（三菱瓦斯化学）により切片からの脱樹脂を行っ

た。この操作により、切片表面はエッチングされ、免疫電顕のための抗原と抗体の反応がよりスムーズとなった。

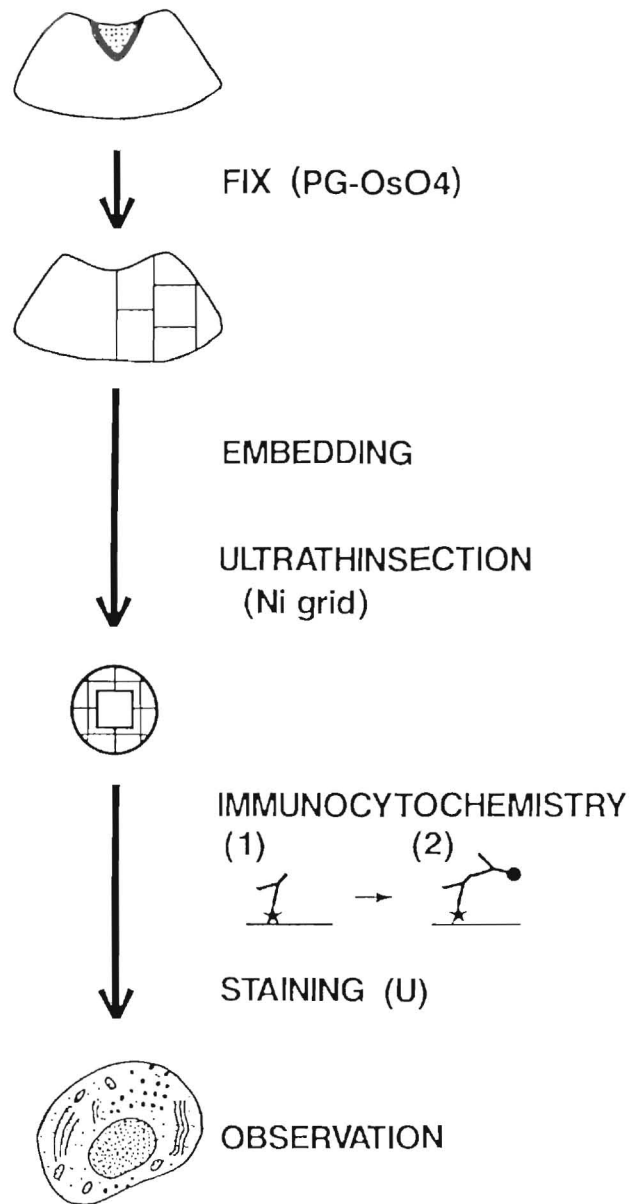
免疫細胞化学用の抗血清（Rabbit Anti-rat prolactin serum [HAC-RT26-01RBP85]、Rabbit Anti-rat growth hormone serum [HAC-RT25-01-RBP85]：群馬大学内分泌研究所）を使用し、脱樹脂をした超薄切片上で1次反応させた後、Frensの金コロイド法にしたがって作成した金コロイド標識第2抗体（抗体部分－抗ウサギIgG、H+L鎖：MBL）を2次反応させ、処理を行った。また、金コロイドの検出を容易にするため、電子染色は酢酸ウラニルのみとし、電子顕微鏡（JEM-100S：JEOL）により観察を行った。

電子顕微鏡観察

脳下垂体前葉の6つの小片すべての試料について、100から200個程度の超微形態学的にホルモン産生細胞と思われる細胞－分泌顆粒の存在が認められた細胞－だけを無作為に選び出し、免疫電顕法により金コロイド粒子が明確に付着しているPRL産生細胞およびGH産生細胞と、そうでない細胞とに選別した。これをもとに、脳下垂体前葉のホルモン産生細胞のうち、PRL産生細胞およびGH産生細胞の占有する割合を調べた。そして、各個体の血中PRL濃度の結果と電子顕微鏡観察の結果とを対比させて解析した。

統計処理

脳下垂体前葉重量とPRL産生細胞およびGH産生細胞の脳下垂体前葉細胞に対する占有率の有意差を検定するために、t-検定法として、Cochran-Cox法を用いた。



☒ 4 脳下垂体前葉細胞の免疫細胞化学

結果

脳下垂体重量

脳下垂体前葉の重量は、若齢および中年齢ラットに対し老齢ラットで有意に増加していた ($p < 0.01$)。この傾向は雌雄ともに認められた。しかし、若齢と中年齢のラットの間には、有意な脳下垂体重量の増減はなかった。また、若齢および中年齢ラットでは、ともに脳下垂体重量の平均値は、雄ラットのほうが雌ラットを上回っていたが、統計的には有意な差ではなかった (図5)。

電顕免疫細胞化学による観察

(1) 脳下垂体前葉細胞

ラット脳下垂体前葉細胞には、超微形態学的観察により、数種類のホルモン産生細胞が混在していることがわかった。これは、雌雄いずれのラットの若齢、中年齢および老齢でも同様な結果であった。また、脳下垂体前葉内のホルモン産生細胞とそれ以外の細胞（繊維芽細胞や血管内皮細胞など）の割合を比較してみると、雌雄間においても、若齢、中年齢および老齢間においても、形態学的に著しい変化は認められなかった (図6、図7)。

(2) PRL産生細胞

ラットのPRL産生細胞は粗面小胞体やゴルジ装置の発達度合と分泌顆粒の大きさや形状によりPI (粗面小胞体やゴルジ装置の発達度合は悪く、分泌顆粒の直径は100-150nm、数は少ない)、PII (粗面小胞体やゴルジ装置の発達度合は中程度で、分泌顆粒は球形あるいは楕円球形で径は250-350nmで中形)、PIII (粗面小胞体やゴルジ装置は非常によく発達し、

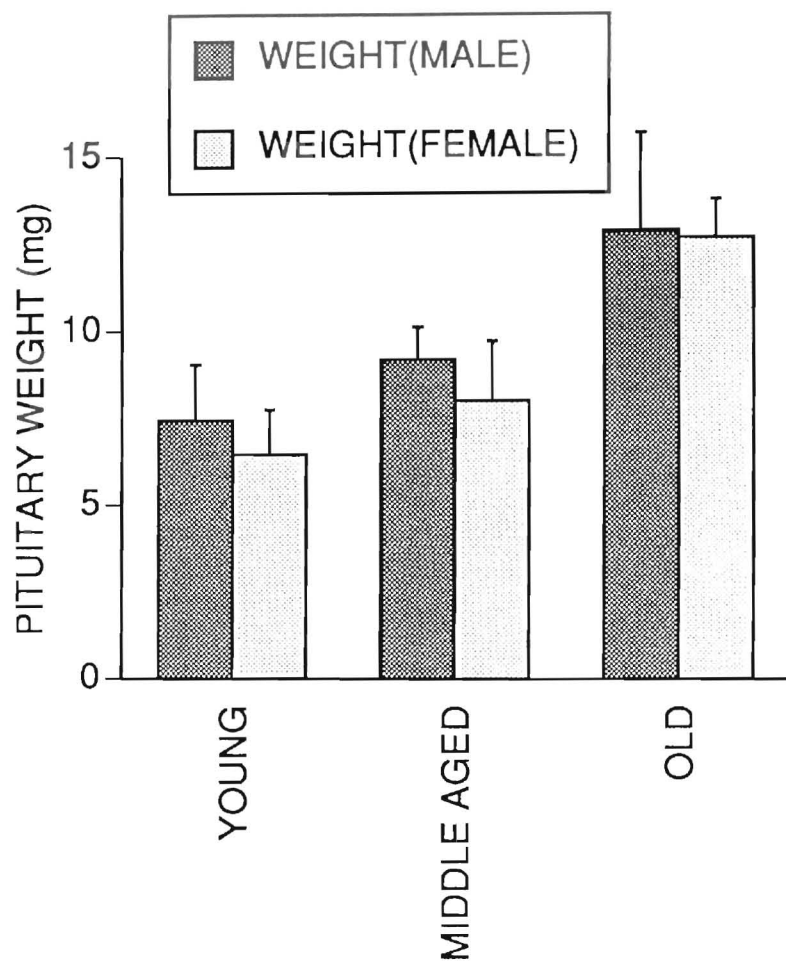


図 5 雌雄ラット脳下垂体前葉の重量

YOUNG : 若 齡

MIDDLE AGED : 中 年 齡

OLD : 老 齡

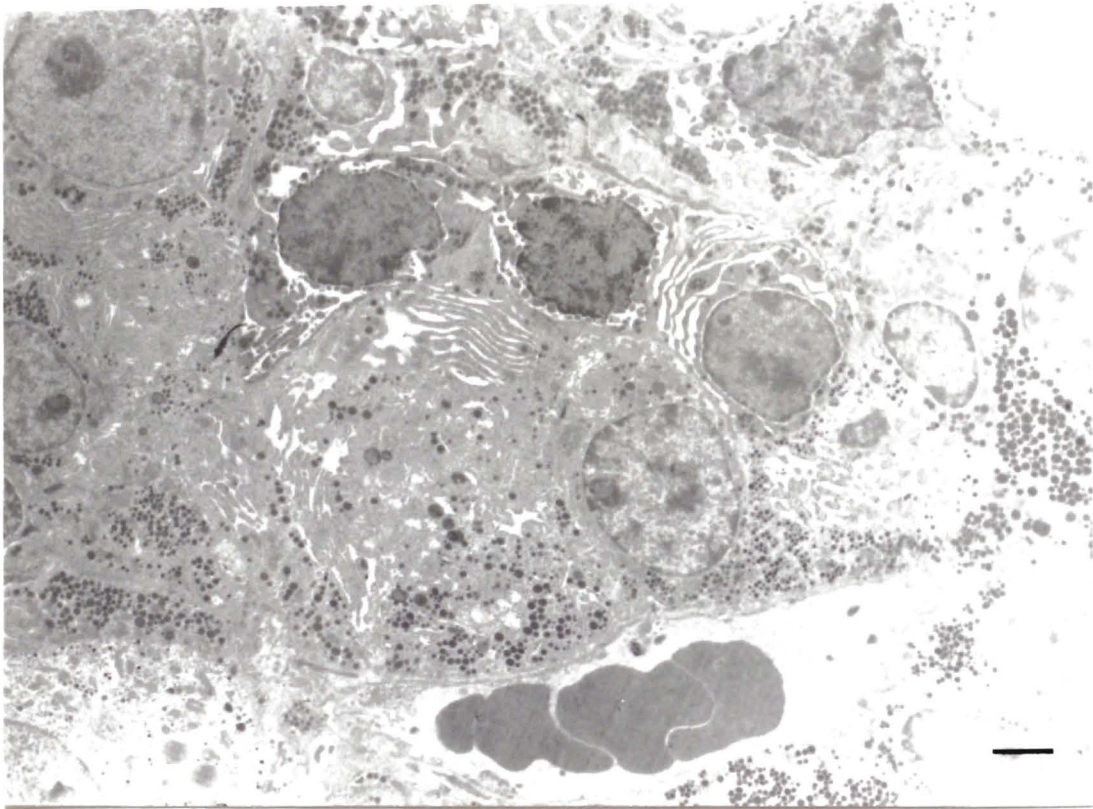
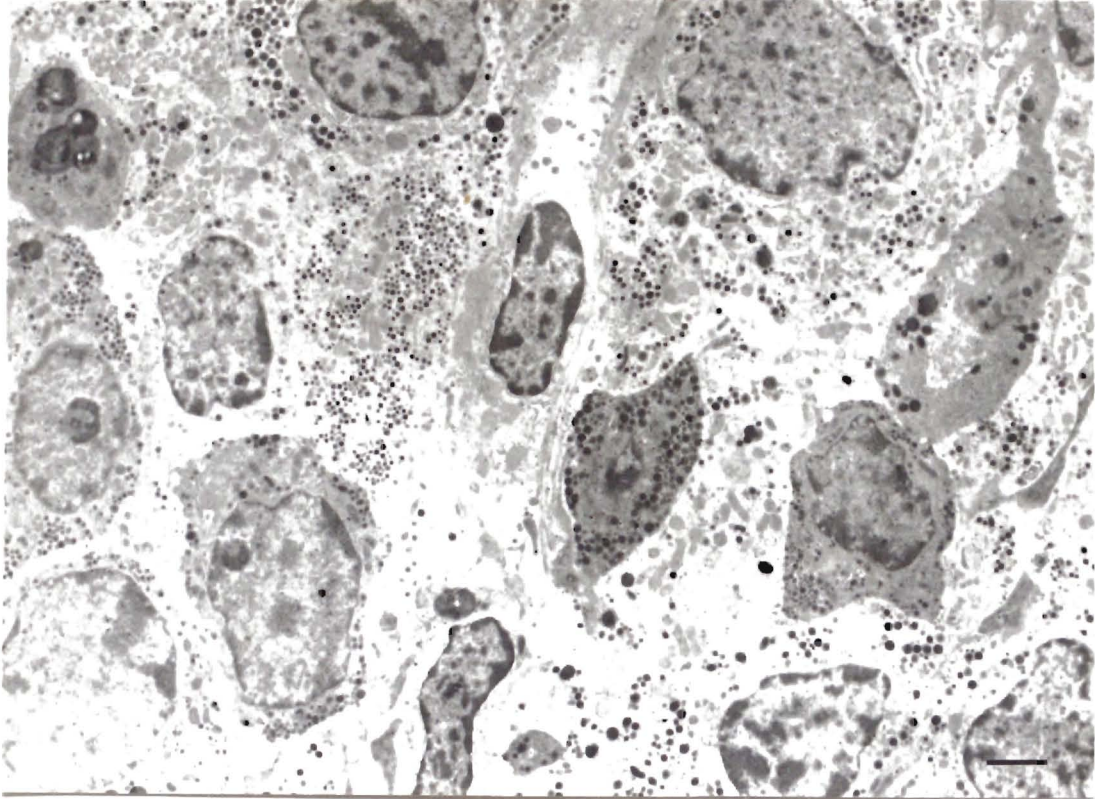


図 6 若齢雄ラットの脳下垂体前葉細胞

分泌顆粒などの微細構造から、数種類のホルモン産生細胞に分類できる。

x 4000、スケールは $2\mu\text{m}$



☒ 7 老齡雄ラットの脳下垂体前葉細胞

分泌顆粒などの微細構造から、数種類のホルモン産生細胞に分類できる。

x 4000、スケールは2 μ m

多重の層構造がみられ、分泌顆粒は大形不整型で長径は550-1000nm、数も豊富でありエクソサイトーシス像も観察される)の3タイプに大別できた(図8)。そして、これらの3タイプのPRL産生細胞は、雌雄ともに、すべての月齢のラットの脳下垂体前葉で確認できた。PIとPIIの中間タイプのPRL産生細胞がいくつか存在したので、本研究ではPIとPIIは同じタイプの細胞としてあつかうことにした。

雄ラットの場合、若齢では、脳下垂体前葉のホルモン産生細胞に対するPRL産生細胞の占める割合は平均するとおよそ35%であり、この値と血中PRL濃度との間には関係が認められなかった。中年齢では、血中PRL量とPRL産生細胞の占める割合との間に相関関係がみられ、血中PRL濃度が40ng/ml以上の個体では40ng/ml未満の個体に比べ、PRL産生細胞の占める割合が増加していた(図9)。また、PRL産生細胞の占める割合は、血中PRL濃度の高い個体(20ng/ml以上)と低い個体(20ng/ml未満)との間に違いは認められなかったが、PRL産生細胞の3タイプの比率には変化がみられ、PRL濃度が高い個体ではPIIIの細胞の占める割合が有意に高く($p < 0.05$)、一方、低い個体ではPI、PIIの占める割合が有意に高い($p < 0.05$)ことがわかった(図10)。

老齢では、血中PRL濃度とPRL産生細胞の占める割合との間には相関関係がみられ、PRL濃度が10ng/ml以下の個体では若齢、中年齢の同PRL濃度の個体と同じく、PRL産生細胞の占有率は40%以下であったが、PRL濃度の上昇と共にPRL産生細胞の占有率も増加し、PRL濃度が40ng/ml以上の個体では、占有率はすべて60%以上であった(図9)。老齢ラットのタイプ別PRL産生細胞の占有率は、若齢、中年齢に比べ、PI、PIIが有意に増加していた($p < 0.01$)。また、高PRL濃度(20ng/ml以上)の個体での、PI、PIIの占有率の増加の方が、低PRL濃度(20ng/ml未満)の個体での増加よ

図8 3タイプのPRL産生細胞

A : PI

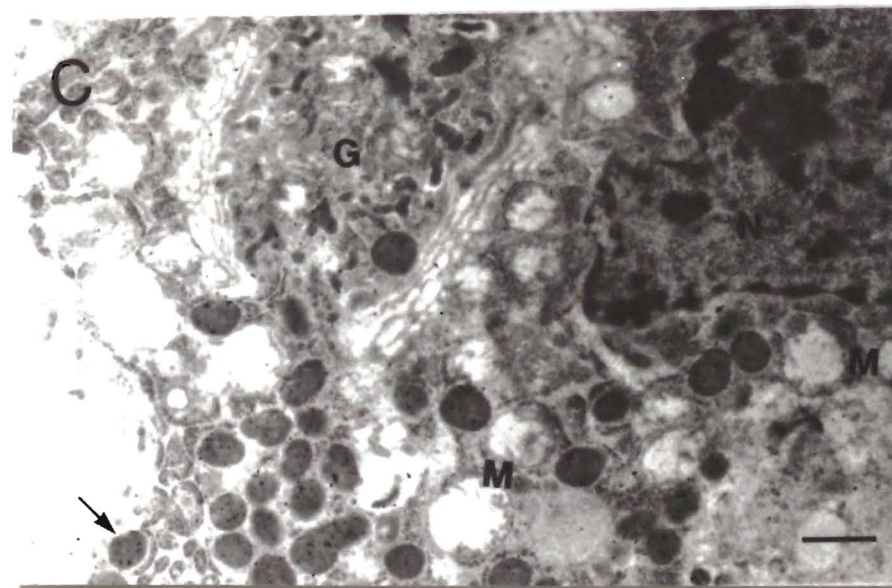
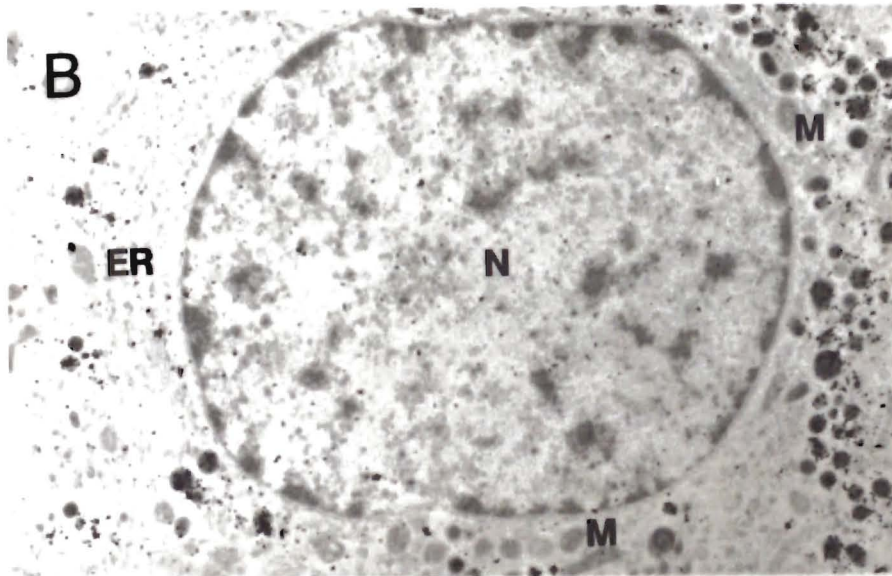
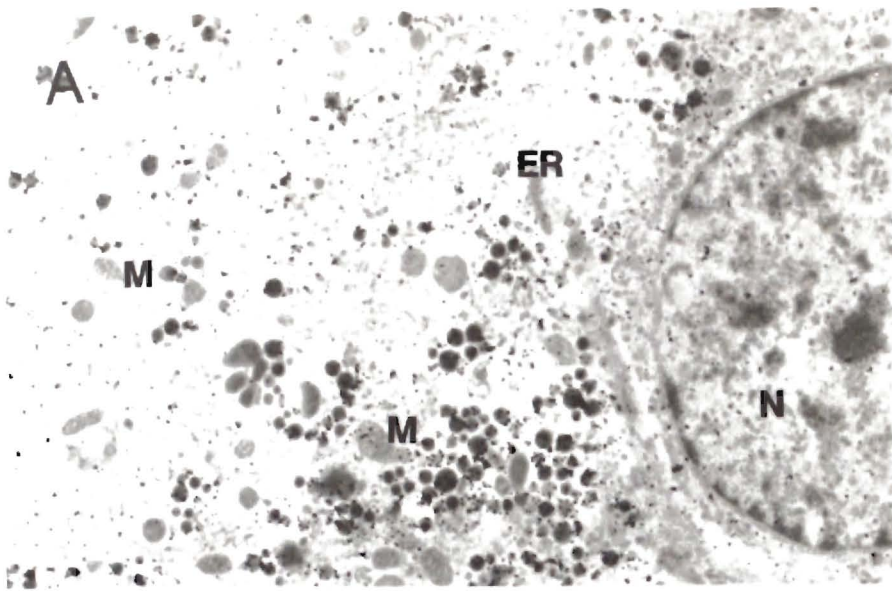
B : PII

C : PIII、矢印は開口分泌像を示す。

PRL産生細胞の分泌顆粒上に金コロイドが付着する。

N:核、M:ミトコンドリア、ER:粗面小胞体、G:ゴルジ装置

x 10000、スケールは1 μ m



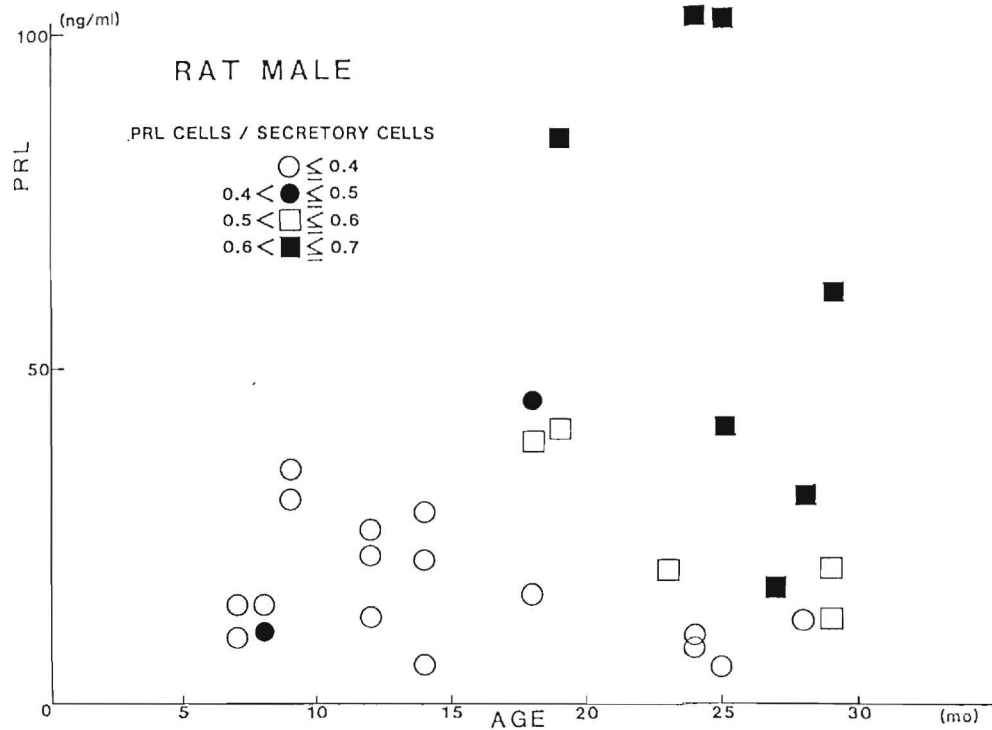


図 9 雄ラットPRL産生細胞の占有率と血中PRL濃度との関係

マークは脳下垂体前葉のホルモン産生細胞に対しPRL産生細胞の占有する割合を示す。

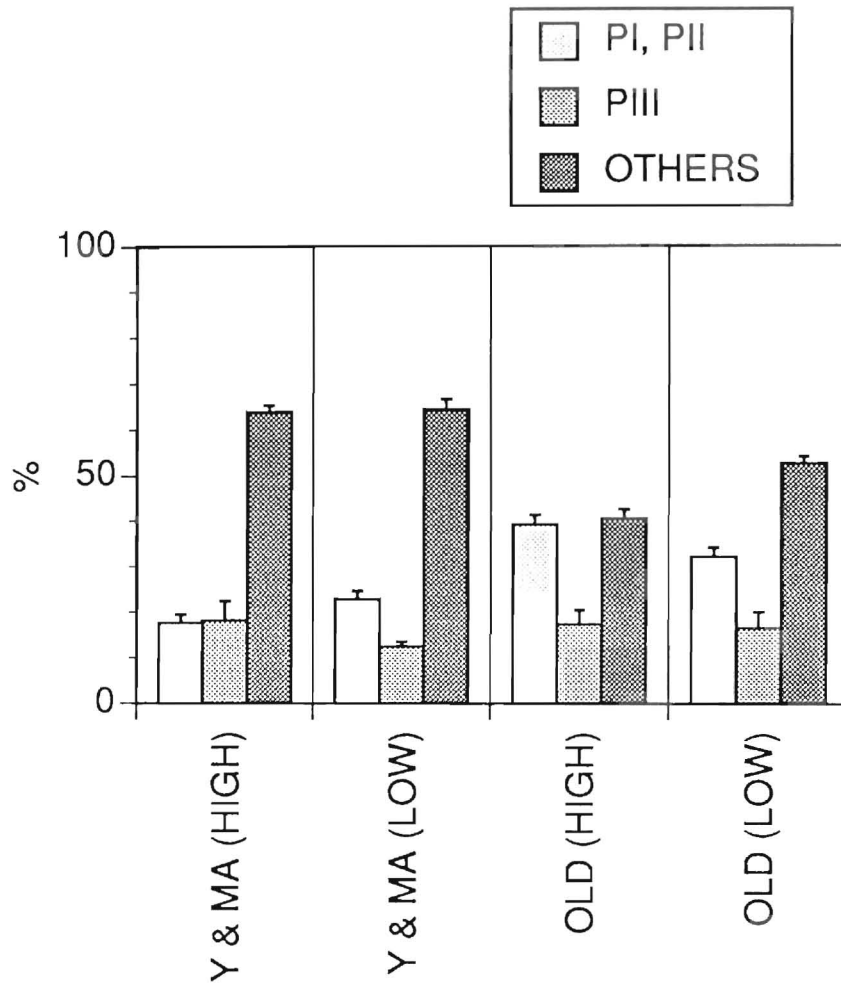


図 1 雄ラットのタイプ別PRL産生細胞の占有する割合と血中PRL濃度との関係

Y: 若齢、MA: 中年齢、O: 老齢

HIGH: 高PRL濃度、LOW: 低PRL濃度

りも著しかった ($P < 0.01$)。しかし、PIIIの占有率は、高低いずれのPRL濃度の場合でも、若齢、中年齢と比べても増減は認められなかった (図10)。PIIIの微細構造を検討してみると、若齢、中年齢では、ゴルジ装置や粗面小胞体が良く発達し、ホルモンの合成および放出が活発な像を示したのに対し、老齢では、若齢、中年齢に比べ不活発な像が観察された (図11)。また、どの個体のPRL産生細胞の超微形態像からも、微小なPRL腫瘍は観察されなかった。

雌ラットの場合、若齢および中年齢のPRL産生細胞の占める割合は、50%を越える個体が多かったが、血中PRL濃度とPRL産生細胞の占める割合との間には相関関係は認められなかった (図12)。またPRL産生細胞の占有率は、雄の同年齢の占有率に比べ明らかに高かった ($p < 0.01$)。この時、PRL濃度が40ng/mlを越える高PRL濃度の個体ではそれ以下の個体に比べ、PIIIの細胞が多くみられた ($p < 0.01$)。一方、低PRL濃度の個体ではPI、PIIの割合が高濃度の個体に比べ有意に高くなっていた ($p < 0.01$) (図13)。

老齢になると、高PRL濃度の個体ではPRL産生細胞の占める割合は80%近くにも達し (図12)、また、PI、PIIは高濃度の若齢および中年齢個体に比べて増加し、PIIIも同程度の割合であった (図13)。しかし、PIIIの形状はゴルジ装置や粗面小胞体の発達度合あるいは分泌顆粒の量はいずれも、若齢、中年齢のものに比べると劣っていた。低PRL濃度の個体でのPRL産生細胞の占める割合は、若齢、中年齢に比べても、ほとんど差は認められなかった (図12)。また、PRL産生細胞のタイプを若齢、中年齢の低PRL濃度の個体と比べてみると、PIIIタイプの増加がみられたが (図13)、やはり、これも高PRL濃度の場合と同様に不活発なゴルジ装置や粗面小胞体および分泌顆粒像を示していた。

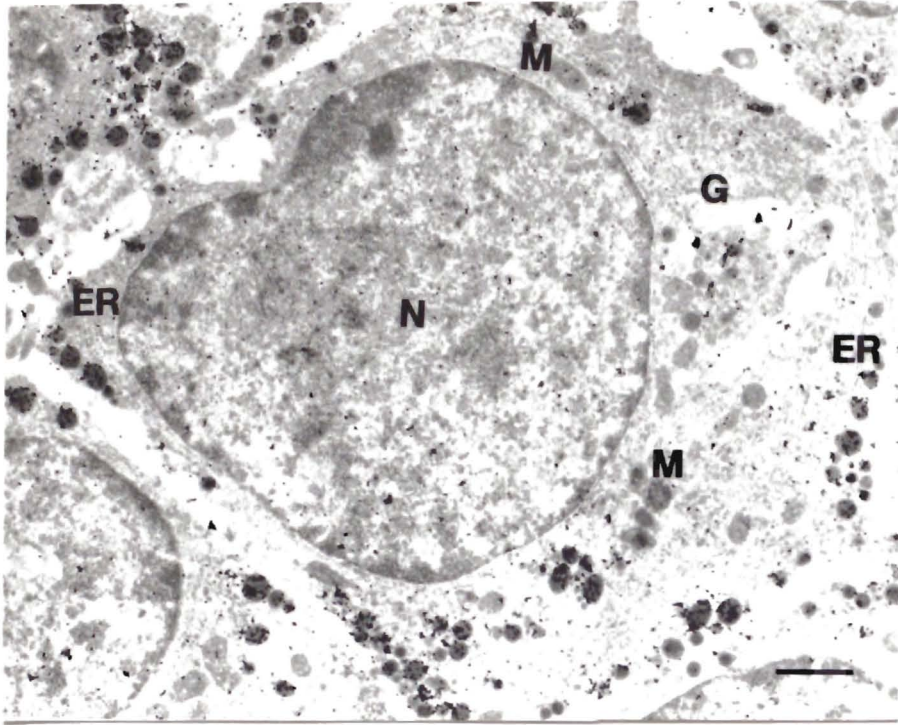


図 1 1 老齡ラットのPRL産生細胞 (PIII)

若齡、中年齡に比べると、細胞活動の不活発な像を示す。

PRL産生細胞の分泌顆粒上に金コロイドが付着する。

N:核、M:ミトコンドリア、ER:粗面小胞体、G:ゴルジ装置

x 10000、スケールは1 μ m

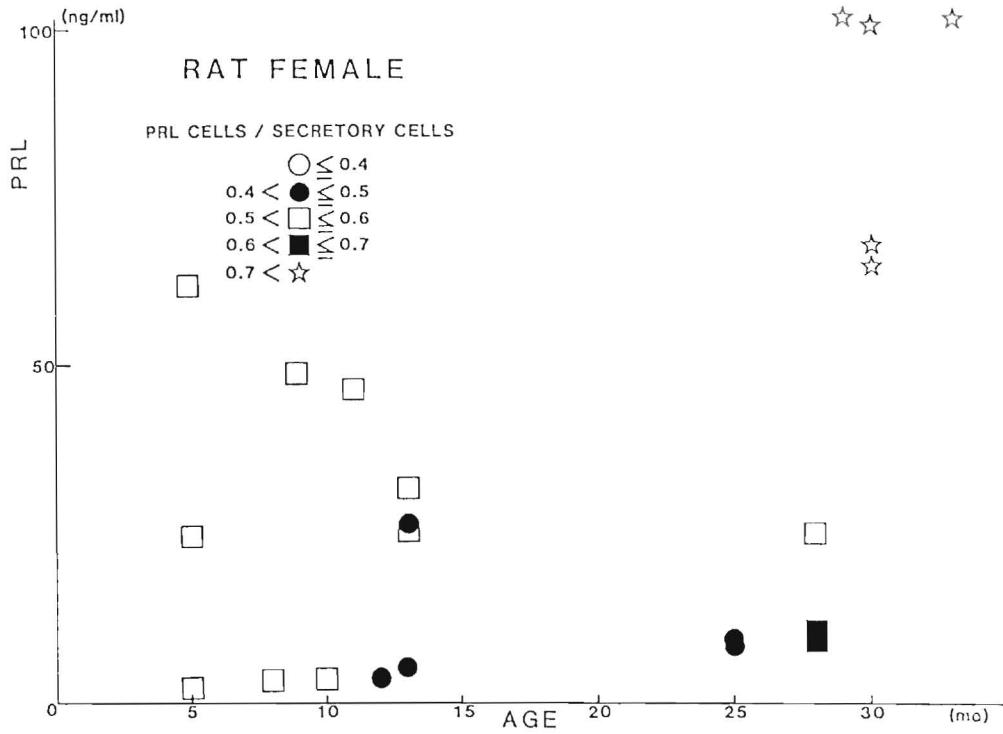


図 1 2 雌ラットPRL産生細胞の占有率と血中PRL濃度との関係

マークは脳下垂体前葉のホルモン産生細胞に対しPRL産生細胞の占有する割合を示す。

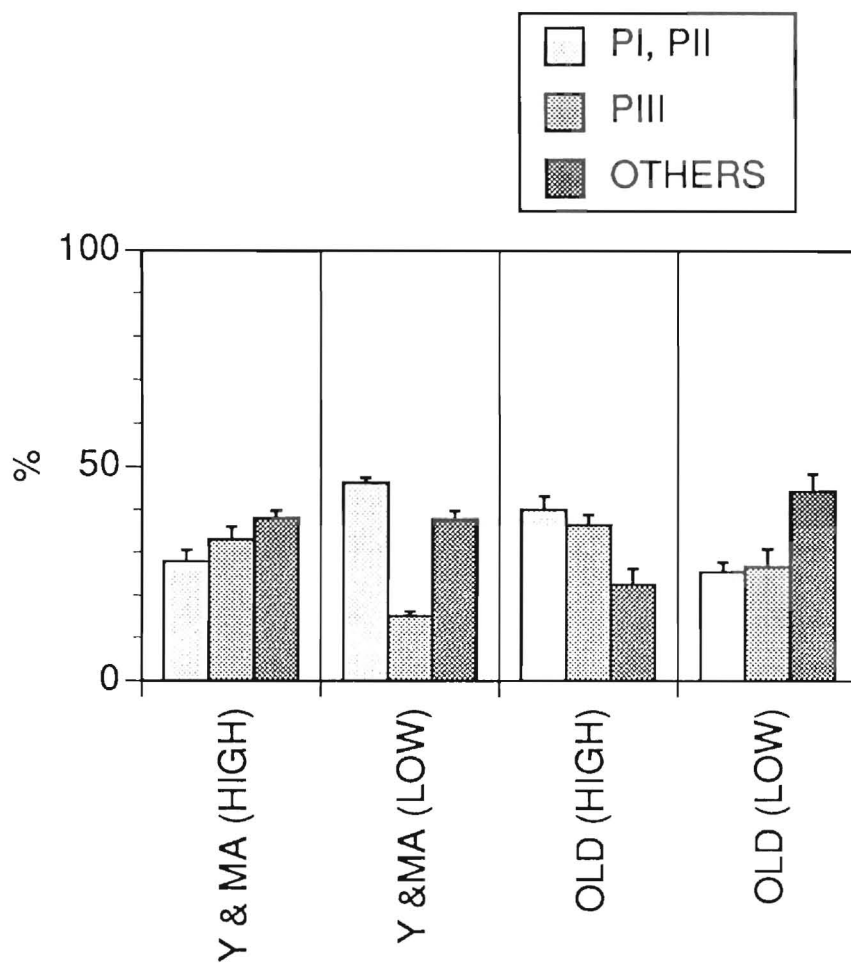


図 1 3 雌ラットのタイプ別PRL産生細胞の占有率と血中PRL濃度との関係

Y : 若齢、MA : 中年齢、O : 老齢

HIGH : 高PRL濃度、LOW : 低PRL濃度

(3) GH産生細胞

ラットのGH産生細胞を、粗面小胞体やゴルジ装置の発達度合と分泌顆粒の大きさによりG1（粗面小胞体やゴルジ装置の発達度合は悪く、分泌顆粒の直径は150-250nmで数は少ない）、GII（粗面小胞体やゴルジ装置の発達度合は良く、分泌顆粒の径は300-400nmで中形、数も豊富）の2つのタイプに大別した（図14）。これらの2タイプの細胞は実験に使用したすべての個体の脳下垂体前葉において観察できた。

若齢および中年齢のラットでは、雌雄ともに脳下垂体前葉のホルモン産生細胞のうちおよそ30%を占め（図15、16）、また、ホルモンの合成および放出の盛んなGII像が多くみられた（図17）。一方、老齢ではGH産生細胞の割合の平均値は20%以下となり（図15、16）、細胞の働きの活発なGII像は減少していた（図17）。血中PRL濃度とGH産生細胞との間には、著しい相関関係は認められなかったが、100ng/mlを越えるような高PRL濃度の個体ではGH産生細胞の占める割合は10%以下であることがわかった。

脳下垂体前葉内の全ホルモン産生細胞に対するPRL産生細胞およびGH産生細胞の占める割合を各個体毎に調べてみると、雌雄ともに、両細胞の間には明かな負の相関関係が認められた（雄： $y = -0.97x + 74.0$ 、雌： $y = -0.75x + 73.3$ ）（図18、19）。

考察

ラット脳下垂体前葉は若齢、中年齢に比べ老齢で、雌雄とも重量の増加が認められた。この結果は、他の研究者の報告と一致する（19）。しかし、脳下垂体重量においては、本研究の結果の方が低い値を示した。この原因として、本研究では脳下垂体を電子顕微鏡観察にも用いたために、細胞の微細構造および抗原性の維持のための化学的固定後に、重量

図 1 4 2 タイプのGH産生細胞

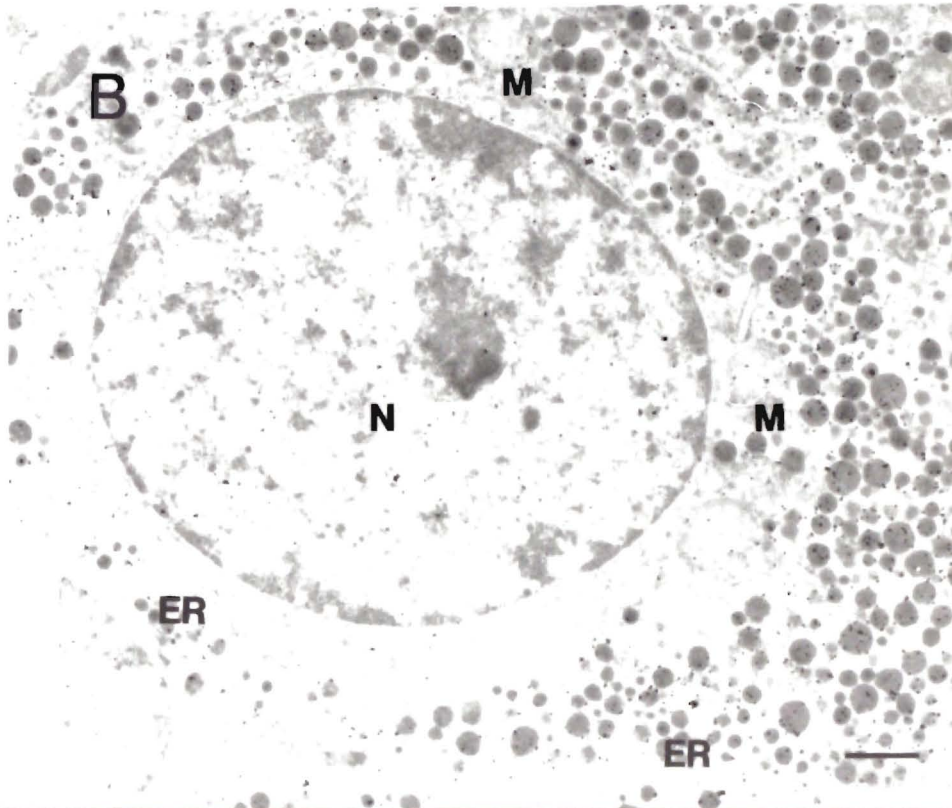
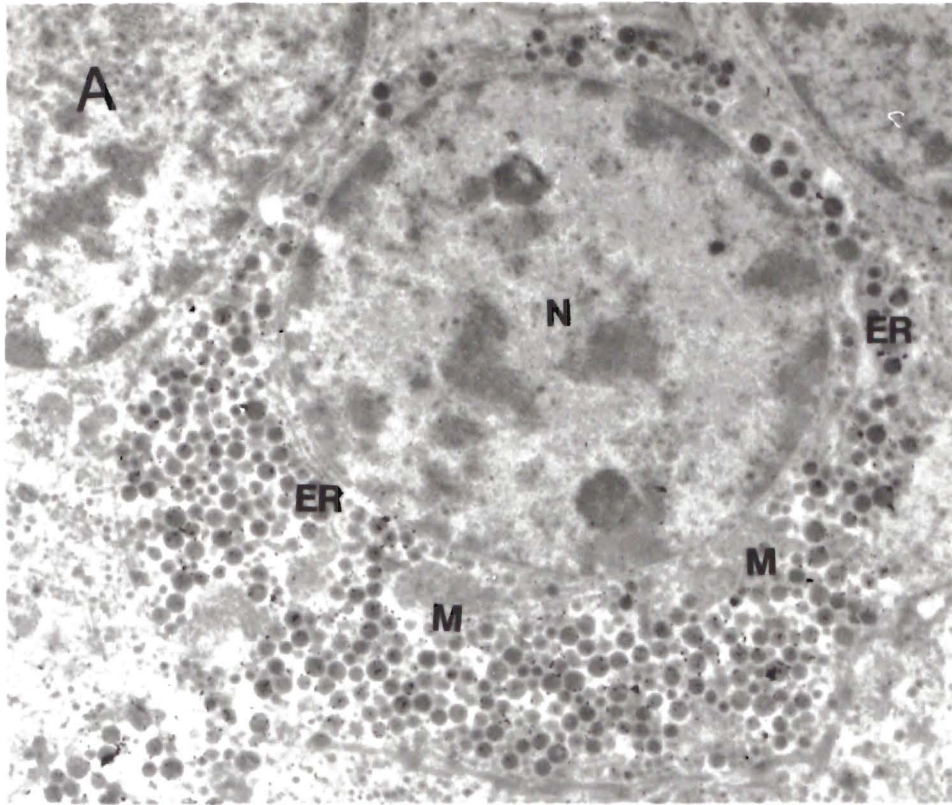
A : GI

B : GII

GH産生細胞の分泌顆粒上に金コロイドが付着する。

N:核、M:ミトコンドリア、ER:粗面小胞体、G:ゴルジ装置

x 10000、スケールは1 μ m



☒ 1 4

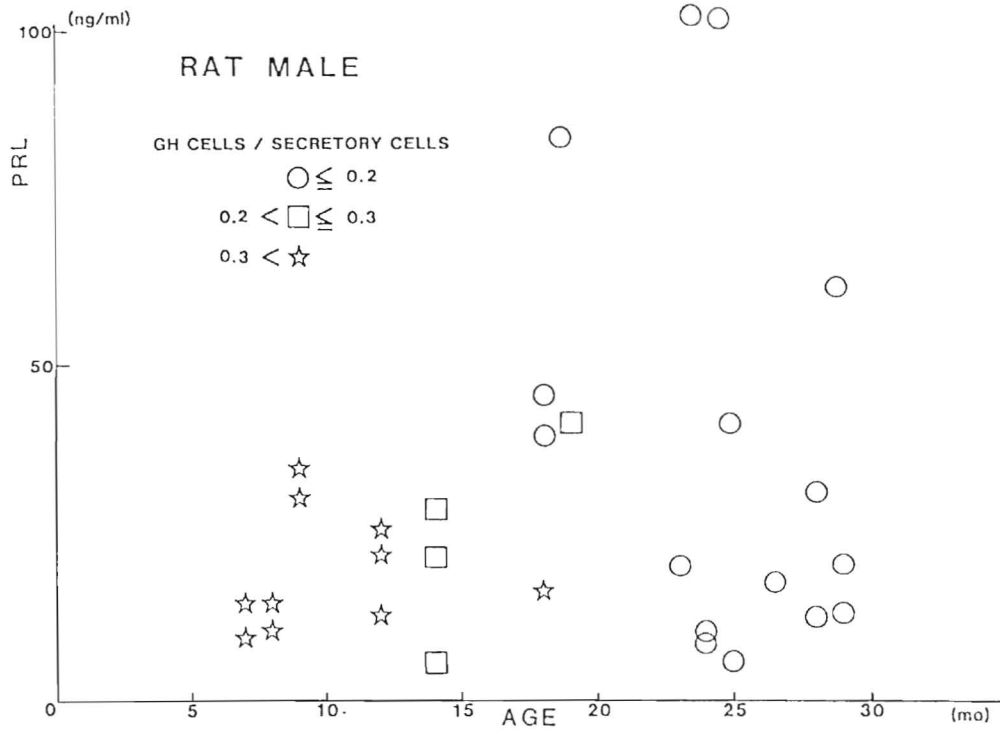


図 1 5 雄ラットGH産生細胞の占有率と血中PRL濃度との関係

マークは脳下垂体前葉のホルモン産生細胞に対しGH産生細胞の占有する割合を示す。

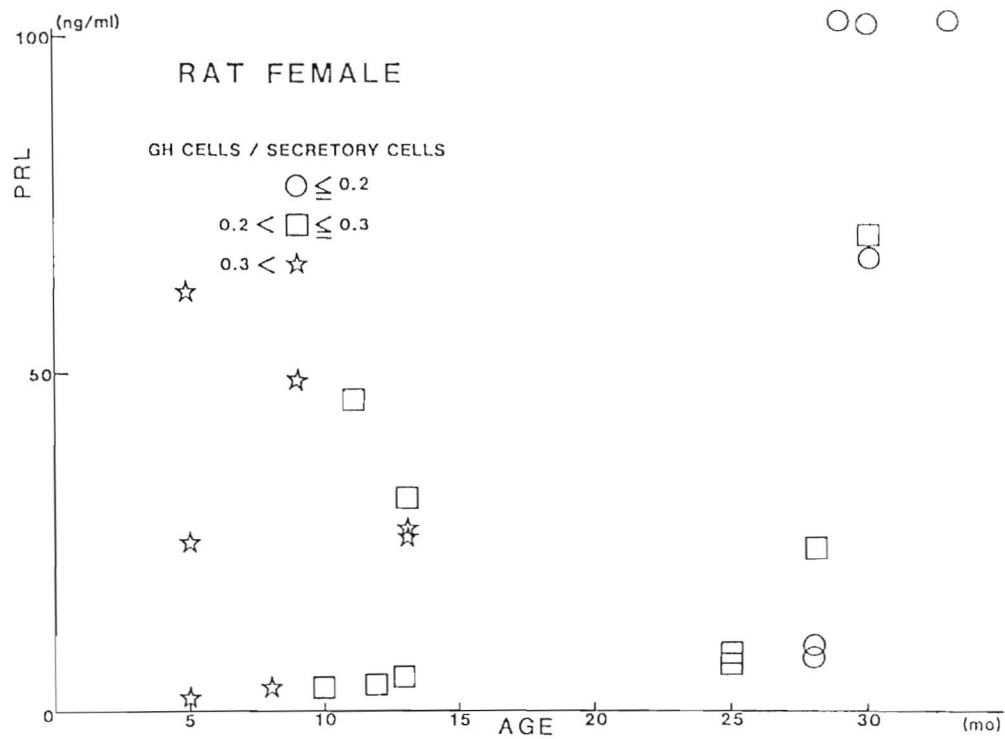


図 1 6 雌ラットGH産生細胞の占有率と血中PRL濃度との関係

マークは脳下垂体前葉のホルモン産生細胞に対しGH産生細胞の占有する割合を示す。

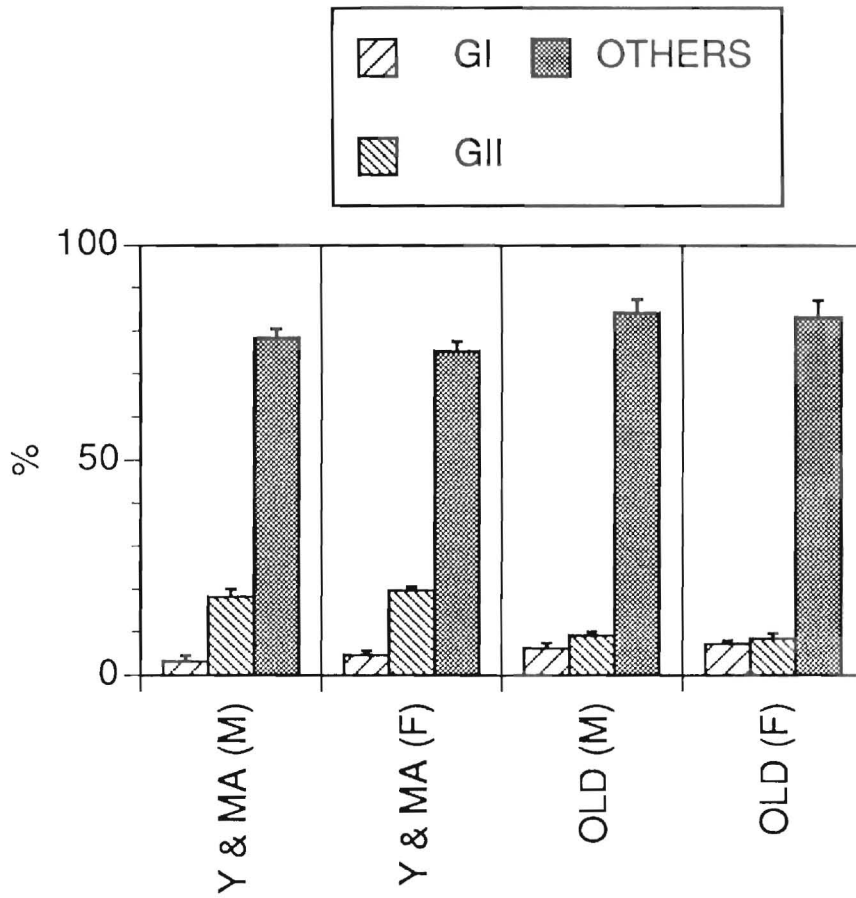


図 1 7 雌雄ラットのタイプ別GH産生細胞の占有する割合

Y: 若齢、MA: 中年齢、O: 老齢、M: 雄、F: 雌

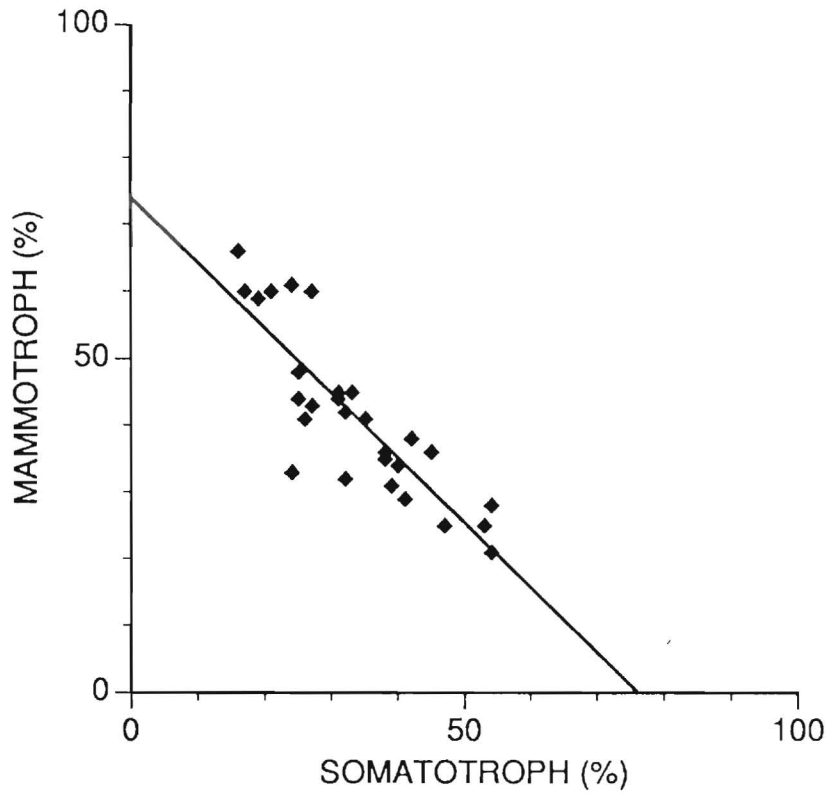


図 1 8 雄ラット間でのPRL産生細胞およびGH産生細胞の占有する割合の関係

◆は個体毎のPRL産生細胞とGH産生細胞の占有率を示す。

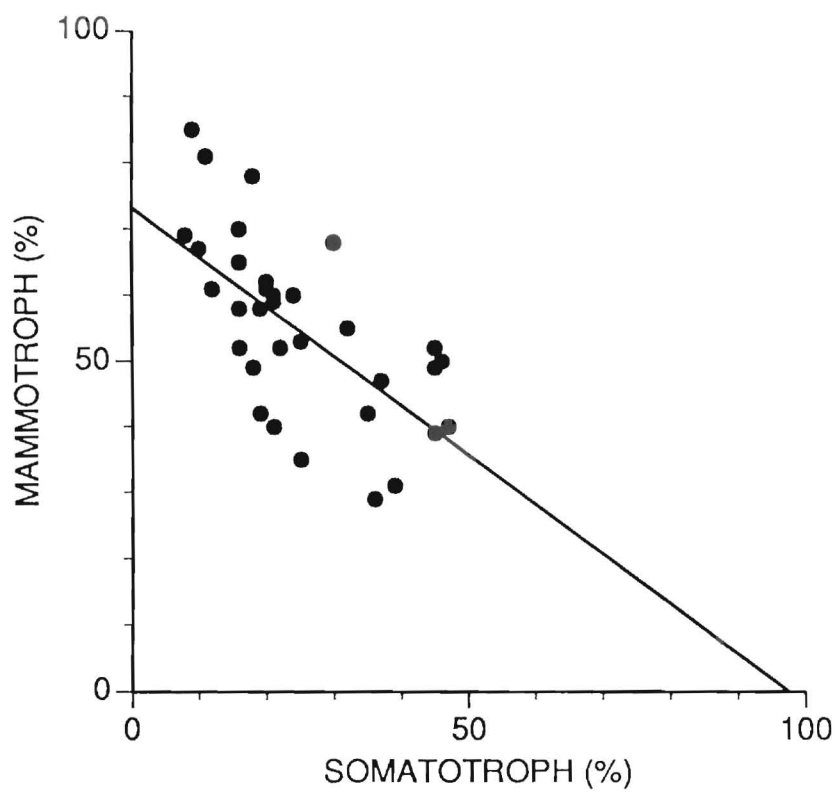


図 19 雌ラット間でのPRL産生細胞およびGH産生細胞の占有する割合の関係

●は個体毎のPRL産生細胞とGH産生細胞の占有率を示す。

測定を行ったが、他の研究（19）では、固定していない生の脳下垂体の重量の測定値であるために異なると考えられる。あるいは、研究に用いたラットの系統の相違かも知れない。

形態学的には、脳下垂体前葉の構成細胞の体積やホルモン産生細胞とその他の細胞の占める割合には、若齢、中年齢および老齢の間で著しい変化はみられなかった。このことと、脳下垂体重量の加齢による増加とを考えあわせると、脳下垂体前葉のホルモン産生細胞は、老齢になると、ある程度は細胞数が増加すると考えられる。しかしながら、その増加率は本研究の結果だけからは正確にはわからない。

脳下垂体前葉のPRL産生細胞のタイプ分けは既に報告されており、本研究の結果と同様に、PRL産生細胞については3タイプ（31,32）、GH産生細胞については2タイプ（31）が確認されている。本研究で、加齢とPRL産生細胞およびGH産生細胞の関係について調べた結果、若齢および中年齢では、血中PRL濃度と脳下垂体前葉のホルモン産生細胞に対するPRL産生細胞の占有率との間に相関関係は認められなかったが、血中PRL濃度とPRL産生細胞のタイプの間には関係が存在するように思われた。すなわち、血中PRL濃度が高い個体では、形態学的に細胞の生理活性の高いPIIIの細胞が増加していることがわかった。この血中PRL濃度の増加はPRL産生細胞の活発なホルモンの合成と放出によるものであると考えられる。一方、老齢でのPRL濃度の増加は、PRL産生細胞占める割合がPRL濃度の非常に高い個体で増加しており、また、若齢および中年齢に比べてホルモンの合成や放出が不活発な細胞像を示すことから、PRL産生細胞の活発な活動の結果というよりは、むしろPRL細胞数の増加によるものであらうと思われる。また、加齢によるPRL産生細胞の増殖も報告されている（13,19）。以上の結果は、中年齢期と老齢期の境と考えられる24カ月齢前後を分岐

点として、ラット脳下垂体前葉のPRL産生細胞が機能の面で変化を起こしていることを示唆している。

GH産生細胞の占める割合は若齢から中年齢、さらに老齢へと移るにしたがって減少する傾向がみられた。そして、この現象は雌雄ともに同様であった。他の研究者の報告では、GH産生細胞の脳下垂体前葉に占める割合には雌雄差が認められたとしているが(19,20,21)、これらの研究報告に使用されたラットはすべて4カ月齢以下である。一方、本研究で使用したラットは最も若齢のラットでも3カ月齢であり、研究には主に6カ月齢以降の個体を多数使用した。このラットの月齢の違いが、若い成長期の成長の差に伴うGH産生細胞の占有率の雌雄差が、本研究で認められなかった原因と思われる。あるいは、実験に使用したラットの系統の違いによることや、GHの抗原性やGH抗体の特異性に何らかの問題があったことも考えられる。ところで、本研究により、老齢ラットではホルモン産生細胞の数がある程度増加することがわかったが、この細胞数の増加とGH産生細胞の占有率の減少とを組み合わせると、老齢ラットのGH産生細胞の数は増減がないか、あるいは多少減少しているものと考えられる。

老齢ラットのうち、PRL産生細胞の占有率の高い個体では、PRL産生細胞とGH産生細胞の占める割合を合計すると100%近くになる個体も存在した。以前からPRLとGHの両方のホルモンを産生している細胞の存在が知られているが(2,4,5,6,7,8,9,10)、この細胞の隣接切片に対し、PRL抗体とGH抗体を別々に使用して電顕免疫細胞化学処理をすると、細胞はどちらの処理に対しても反応し、一つの細胞がPRL産生細胞であると同時にGH産生細胞にもなってしまう。そのため、見かけ上、両細胞の合計が100%近くになったとも考えられる。しかし、このような両ホルモンを産生す

る細胞は全細胞の5%以下という報告が主であり（5,6,8）、占有率に大きな変動を与えることはないと思われる。また、GH産生細胞がGHとPRLを産生する細胞を経てPRL産生細胞に変化するというin vitroでの報告がある（33,34）。しかし、本研究で、老齢ラットでは脳下垂体前葉のホルモン産生細胞の数が増加することがわかり、その結果から、脳下垂体前葉内のPRL産生細胞の占有率の増加は、細胞数の増加によると考えられる。

I. 4 結論

ラットでは、各個体間でのPRL産生細胞の占有率とGH産生細胞の占有率との間に、負の相関関係の存在が認められた。また、若齢、中年齢から老齢へと加齢に伴い脳下垂体のホルモン産生細胞数が増加する中で、PRL産生細胞の占有率は増加し、一方、GH産生細胞の占有率は減少することもわかった。このことを、細胞数で見ると、PRL産生細胞の数は大幅に増加し、GH産生細胞の数は増減がないか、あるいは僅かながら減少することになる。以上ことは、GH産生細胞がPRL産生細胞へと変化するためPRL産生細胞の占有率は上昇し、GH産生細胞の占有率は低下するというだけでは説明がつかず、PRL産生細胞が増殖を開始すると、GH産生細胞は細胞分裂を停止してしまうという関係を示唆していると思われる。したがって、ラットでは、老齢になり血中PRL濃度が増加する個体では、中年齢期から老齢期へ移る時期に、PRL産生細胞の数を増やすと同時に、GH産生細胞の増殖を止めるための何らかの生理的な機構が働いているものと考えられる。

II. 培養細胞レベルの研究

II. 1 緒言

脳下垂体前葉のホルモン産生細胞は、視床下部に存在する生理活性物質の働きにより、ホルモンの合成や放出が促進されたり抑制されたりするなど、細胞の生理機能が調節されていることが知られている。最近、ある種の生理活性物質が、脳下垂体前葉のホルモン産生細胞の増殖にも関与していることがin vivo (20,21,22,23) およびin vitro (5,24,25,26,27) の研究からわかってきた。前章に示したin vivoの研究結果から、ラットの脳下垂体前葉のPRL産生細胞に細胞増殖機構が働いて、細胞数が増加する可能性と、GH産生細胞の増殖を抑制する機構が存在する可能性とが示唆された。そこで、それらの機構を解明するために、PRL産生細胞およびGH産生細胞の生理機能の調節に関与すると考えられている種々の生理活性物質の細胞増殖機能について、脳下垂体前葉から単離し、in vitro系に移した両産生細胞の初代培養細胞を用いて検討を行った。

II. 2 PRL産生細胞およびGH産生細胞の単離と培養法の確立

緒言

前章のIn vivo系の研究により得られた結果を解析するためには、できるだけ他の種類の細胞が混在せず、しかも、細胞環境を人為的に制御できる単純なin vitroの系で実験を行う必要がある。したがって、多種類の細胞が複雑に関与し合っている脳下垂体をそのまま器官培養するのではなく、単一種類に分離したPRL産生細胞およびGH産生細胞の細胞培養系を確立することが最初に解決すべき課題である。現在のところ、脳下垂体前葉細胞の培養法は、一定の決まった方法が確立しておらず、各研究者はそれぞれの実験に適した方法（21、26、27、35、36、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50）で行っている。また、実験結果の解析法においても、培養細胞の数的変化については、目的とする細胞の絶対数の増減というよりはむしろ、全体に占める割合の変化として論じられているものが多いため（10、20、25、27、37、38）、数の変化と割合の変化とが混同されて論じられている傾向がある。

そこで、先ずラット脳下垂体前葉のPRL産生細胞およびGH産生細胞を単離する方法、培養に最適な条件を確立し、次ぎに培養した細胞の数の計測も可能な方法を確立することを試みた。

材料および方法

動物

実験には8-10カ月齢の雌のウィスター系ラットを用いた。これらの動物は温度が22℃に保たれ、室内の明暗周期が明12時間、暗12時間（明期；6:00-18:00、暗期；18:00-6:00）に維持されている実験動物施設で、

自由摂水および自由摂餌の条件下で飼育されていた。この齡のラットは脳下垂体が十分に発達しており、まだ脳下垂体にホルモン産生腫瘍の発生もほとんど見られないことから、PRL産生細胞およびGH産生細胞を効率よく多量に得るのには適している。脳下垂体採取に際して、ラットの発情周期は考慮せずに行った。

脳下垂体前葉細胞の単離 (図20)

細胞実験のために、ラットをエーテルで軽く麻酔した後、断頭して速やかに脳下垂体を摘出した。この脳下垂体を冷やしたハンクス溶液の中に入れて、脳下垂体の中葉および後葉を除去し、一定数の脳下垂体前葉を集めるまで一時的に冷却保存した後、クリーンベンチ内に移して実験を継続した。

培養細胞に対するエストロジェンの影響を排除するため、エストロジェン作用の混在が疑われているフェノールレッド (pH指示色素) を含まないEagle's minimum essential medium (MEM、#2: Nissui) に炭酸水素ナトリウム (0.15%: 和光純薬) とグルタミン (0.03%: Nissui) を加えた溶液 (MEM培地) 中にdispase (1.2U/ml, grade I: Boeringer Mannheim) を添加した溶液中で摘出した脳下垂体前葉を細切し、37°Cの恒温箱内で5分間インキュベートした。さらにcollagenase (0.15%, type I: Cooper Biochemicals) およびDNase (0.00001%: Worthington Biochemical) を加えて15分間インキュベートした。その後、パスツールピペットを用いてピペティングにより細胞浮遊液を作製した。

得られた細胞浮遊液を、細胞濾過選別用のフィルター (#80: 池本理科工業) にかけて単離細胞以外を除去した後、4°C、400x gで5分間遠心し、上澄み液を除去して脳下垂体前葉細胞のペレットを得た。その後、この

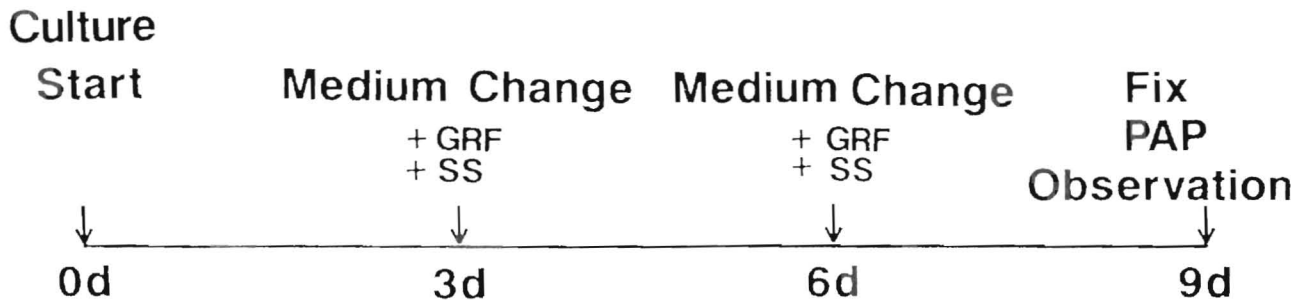
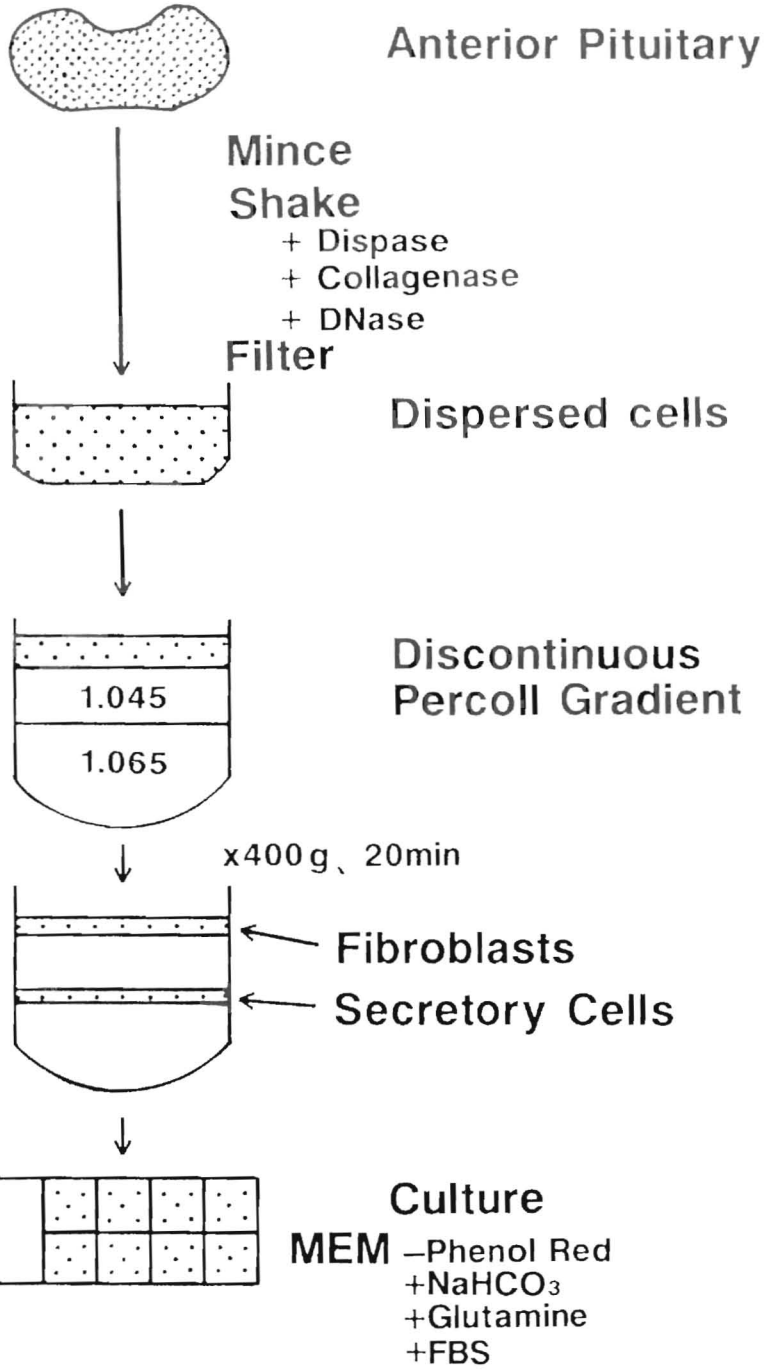
細胞ペレットをMEM培地に牛胎仔血清（FBS: HyClone）を10%添加した培養液（MEM・FBS培地）中入れ、軽く振とうさせて再浮遊させた。これらの単離細胞は0.2%ニグロシン染色により生存率が高いことを確認した後、培養実験に用いた。

脳下垂体前葉細胞の培養および免疫細胞化学（図20）

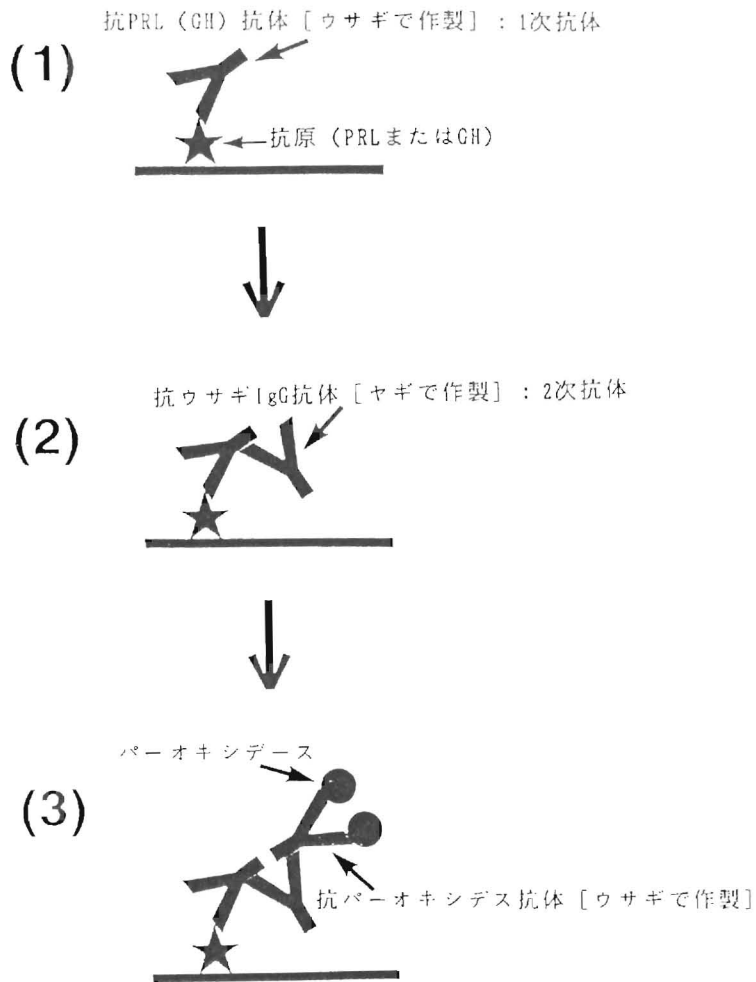
培養液にはMEM・FBS培地を用いて、細胞培養用チャンバー（8 chamber/slide、8mmx8mm、#4818: Lab-Tec）あたりおよそ 2×10^3 個/400 μ lの細胞を播種し、37°Cの恒温箱内で5%CO₂を含む空気相の下で培養した。そして、培養開始後3日目に培養液の交換を行い、さらに培養開始後6日目にもう一度、培養液の交換をして、合計で9日間続けて培養した。生理活性物質を添加する場合は、培養開始から3日目まではMEM・FBS培地で培養して細胞を安定させ、培養開始後3日目に目的とする生理活性物質を添加した培養液と交換し、6日目にも同様の添加培養液での交換をして、無添加培養の場合と同様に、合計で9日間の培養を行った。

これらの培養細胞は培養終了後、光学顕微鏡観察用として、ブアン固定液を用いて室温で12時間固定し、その後、70%エタノール中に移し換えて冷所保存した。保存中もエタノールの交換を数回行った。また、電子顕微鏡観察のために、試料をKarnovskyの変法により固定し、冷エタノール中に保存した。

固定試料は、抗血清（Rabbit Anti-Rat PRL serum, HAC-RT26-01RBP85 および Rabbit Anti-Rat GH serum, HAC RT25-01-RBP85: 群馬大学内分泌研究所）を用いて免疫細胞化学的技法（Peroxidase-antiperoxidase、PAP）（図21）によりPRL産生細胞とGH産生細胞を染色し、光学顕微鏡観察用としてはグリセリン中に封入し、電子顕微鏡観察用としてはエポキ



☒ 2 O 脳下垂体前葉細胞の単離および培養



ジアミノベンジジンと過酸化水素水でパーオキシデースを発色後、
 光学顕微鏡で観察

- (1) 抗原 (PRLまたはGH) に対し1次抗体を反応させる。
- (2) 1次抗体に対し2次抗体を反応させる。
- (3) パーオキシデースと結合した抗パーオキシデース抗体を反応させ、
 免疫反応複合体を作製する。以上の操作により、抗原 (PRLまたはGH) の存在する部位にパーオキシデースが付着する。

☒ 2 1 P A P 法

シ樹脂中に包埋した後、超薄切片を作成した。

光学顕微鏡観察の結果、脳下垂体の繊維芽細胞が急速に増殖してチャンバーの底面いっぱいに広がるために、増殖速度に劣るPRL産生細胞およびGH産生細胞の培養に影響を及ぼす可能性が懸念された。そこで、細胞を選別する試みとして、Percoll (Pharmacia) を用いて密度1.045と密度1.065の非連続密度勾配を作成し (51)、400x g、4°C、15分間の遠心により、密度1.045と1.065の接面に集まった細胞のみを集めて細胞を培養し、固定および免疫細胞化学を行った。この方法により、繊維芽細胞の多くが除去され、ホルモン産生細胞の増殖に与える影響は少なくなったと思われるので、以後の研究ではPercollによる細胞選別を行った後に、細胞培養実験を行うこととした。

統計処理

PAP法により染色した試料を、光学顕微鏡下で升目入り接眼マイクロメーターを使用して観察し、チャンバーあたりのPRL産生細胞およびGH産生細胞の全細胞数と各細胞の形態変化について調べた。得られた計測値は、培養細胞が安定したと考えられる培養3日目 (図22) の細胞数を100とし、その値を基準にして、6日目あるいは9日目の細胞数を相対値で表した。t-検定としては、Student's t-testおよびCochran-Cox法を用い、 $p < 0.01$ あるいは 0.05 の有意水準で統計処理し、解析を行った。この処理のためにパーソナルコンピューター用統計処理プログラム (Programs of statistical methods for biologists by N88-Basic: 培風館) を使用した。

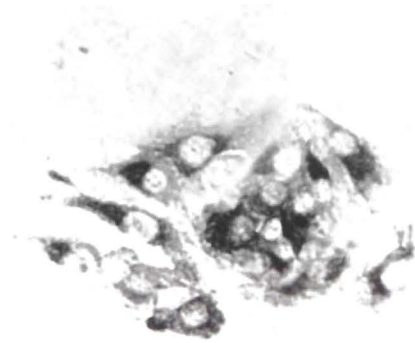


図 2 2 培養開始後 3 日目の PRL 産生細胞像

培養皿底面に接着していることがわかる。しかし、まだ充分には伸展していない。

PAP 染色、 $\times 160$ 、スケールは $50 \mu\text{m}$

結果

上記の方法でPRL産生細胞を培養すると、培養9日目では細胞はチャンバーの底面に密着し伸展する形態を示した。また、細胞質全体が染まる細胞や、核付近の細胞質しか染まらない細胞など、PAPの反応性には違いが観察された。さらに、単離して培養した細胞が増殖し、コロニーを形成する傾向もみられた（図23）。これらの細胞を電子顕微鏡で観察すると、*in vivo*での結果と同様にPI、PII、PIIIすべてのタイプのPRL産生細胞が確認できた（図24）。このような培養PRL産生細胞のタイプ分けの報告は、これまで他の研究者によっては行われていない（30）。

GH産生細胞はチャンバー底面に密着した形を取らずに、球形のまま他の細胞の上に乗る傾向を示した（図25）。また、GH産生細胞の電子顕微鏡像もまた*in vivo*と同じく、GI、GIIのタイプの細胞の存在が認められた（図26）。

考察

形態学的観察により、*in vitro*でのPRL産生細胞およびGH産生細胞は、微細構造が*in vivo*の結果とよく類似していることがわかった。このことは、*in vitro*の実験結果は*in vivo*の細胞の性状を反映しているものと考えられ、この培養法を用いての実験は、以後の研究を進める上で有意義であると思われる。

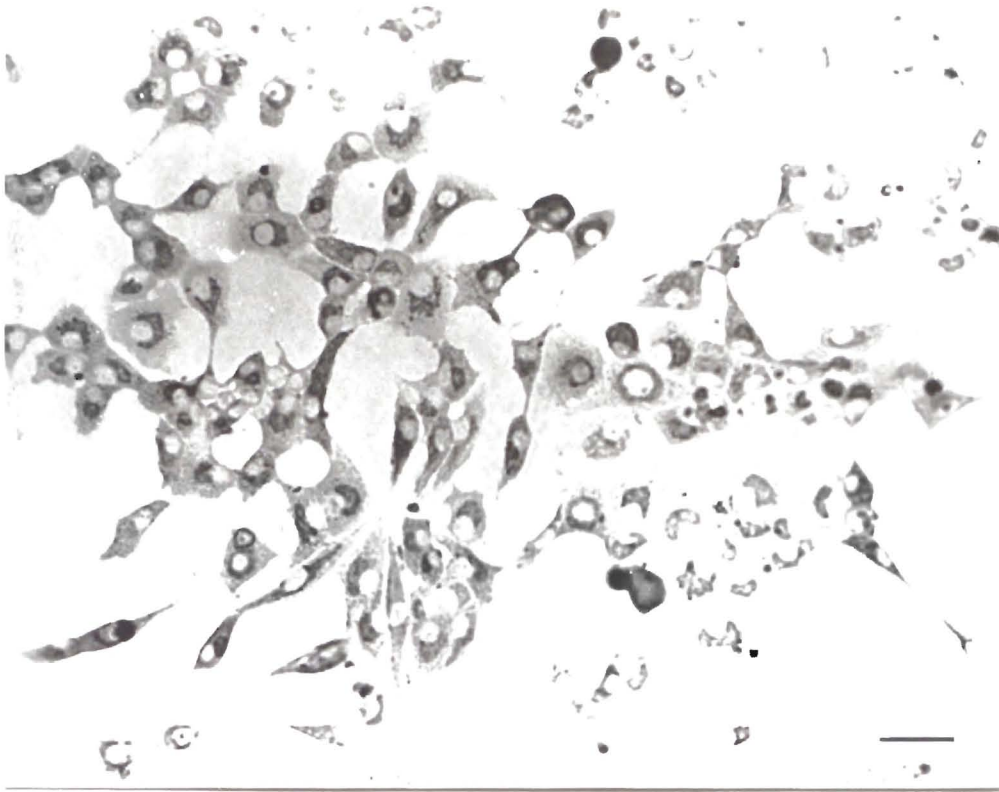


図 2 3 培養開始後 9 日目の PRL 産生細胞像

PRL 産生細胞は培養皿底面に密着し、伸展している。PRL 産生細胞の PAP に対する反応性に違いがみられる。

PAP 染色、 $\times 100$ 、スケールは $100 \mu\text{m}$

図24 3タイプの培養PRL産生細胞

A : PI

B : PII

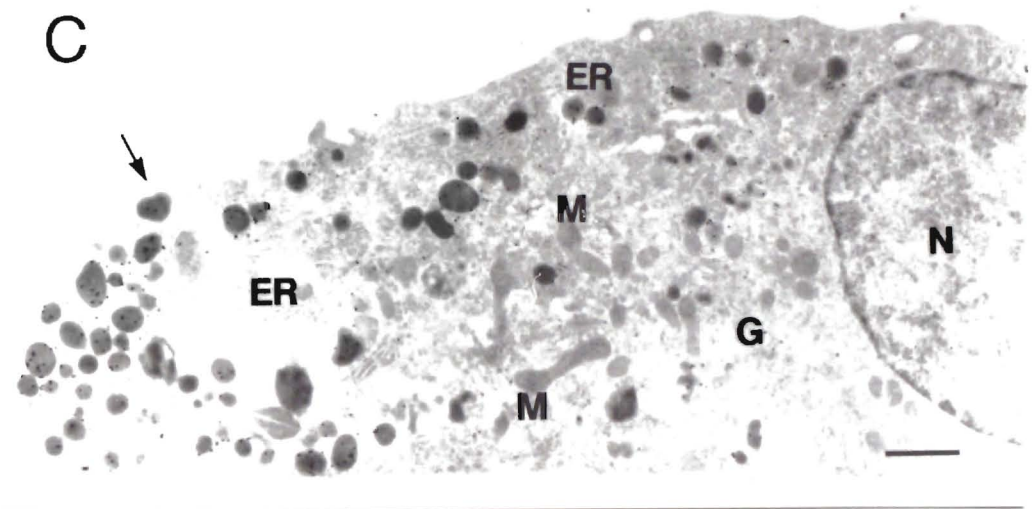
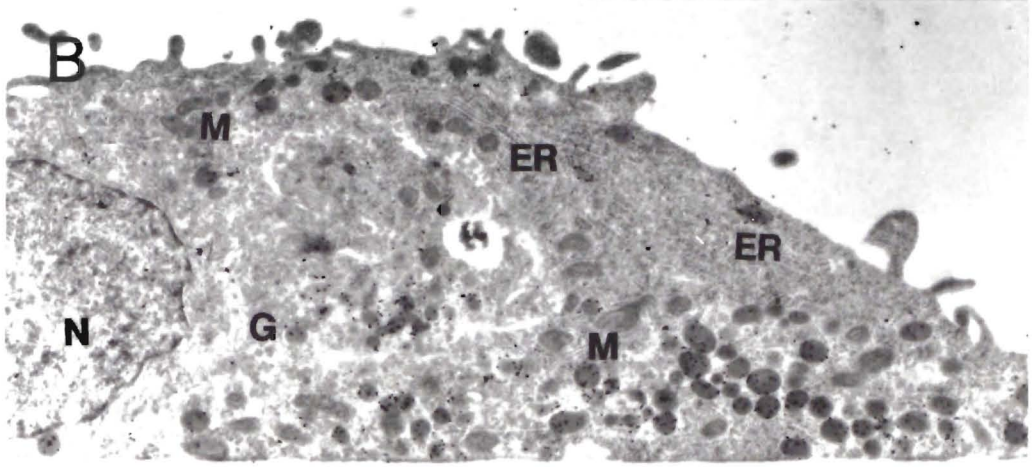
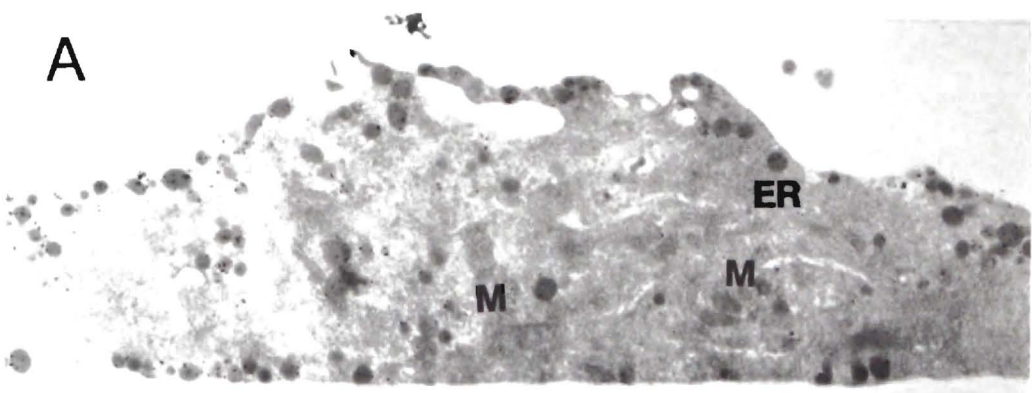
C : PIII、矢印は開口分泌像を示す。

PRL産生細胞の分泌顆粒上に金コロイドが付着する

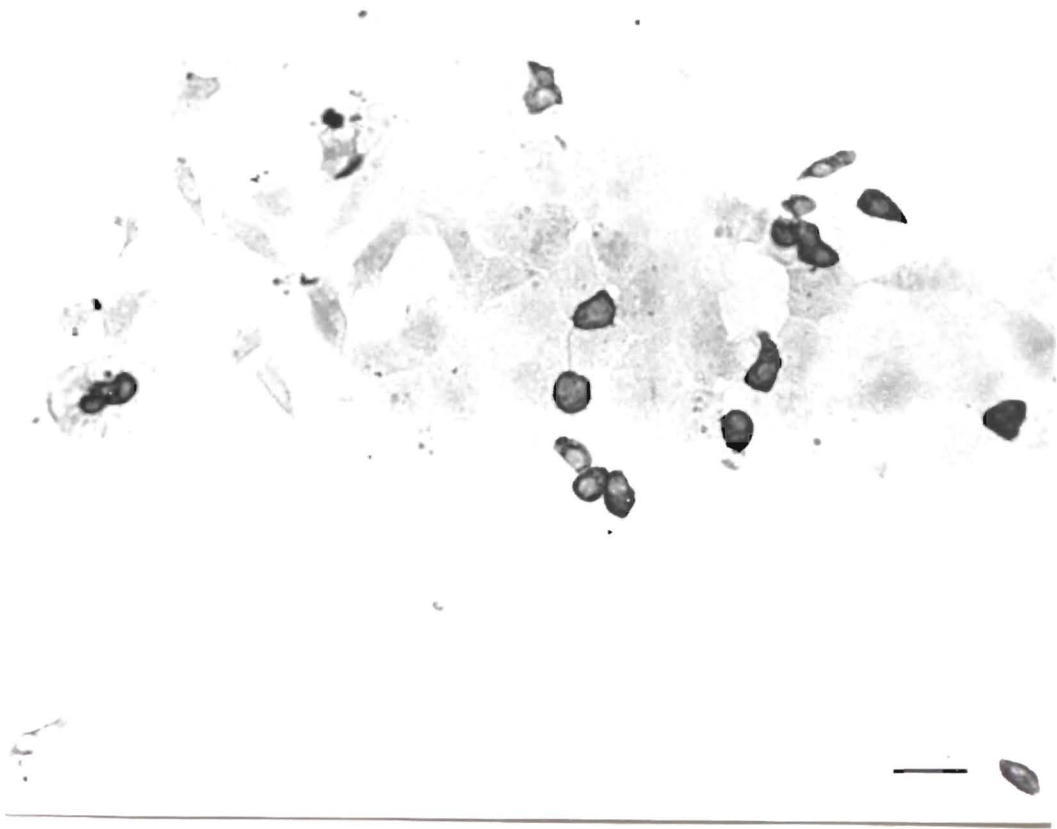
in vivoと同様に3タイプに区別できる。

N:核、M:ミトコンドリア、ER:粗面小胞体、G:ゴルジ装置

x10000、スケールは1 μ m



☒ 2 4



☒ 2 5

培養開始後9日目のGH産生細胞

GH産生細胞は培養皿底面に密着した形をとらない。

PAP染色、x100、スケールは100 μ m

図 26 2 タイプの培養GH産生細胞

A : GI

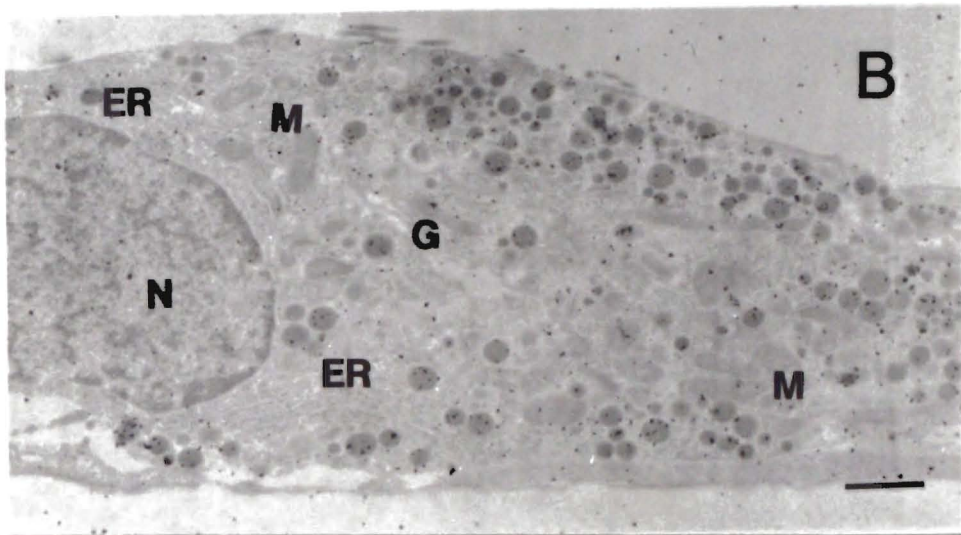
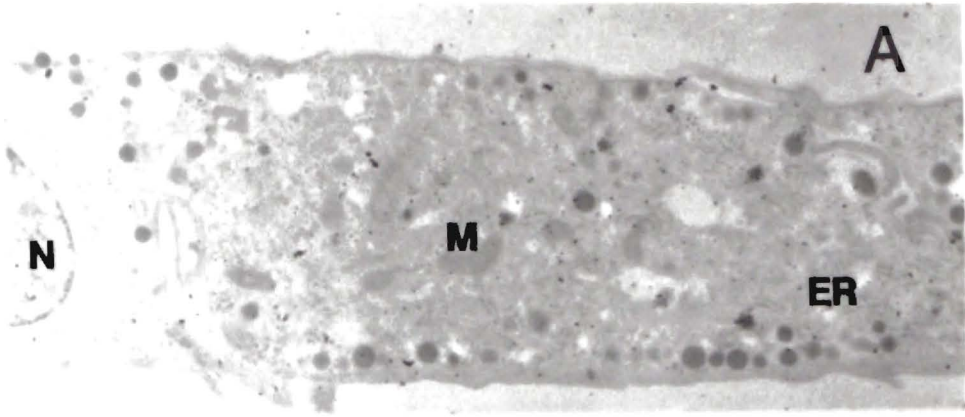
B : GII

GH産生細胞の分泌顆粒上に金コロイドが付着する。

*in vivo*と同様に2タイプに区別できる。

N:核、M:ミトコンドリア、ER:粗面小胞体、G:ゴルジ装置

x 10000、スケールは1 μ m



⊠ 2 6

II.3 各種生理活性物質の添加効果

緒言

生理活性物質の一つであるエストロジェンは、発情ホルモンとして生殖器官の細胞増殖に深く関与していることが知られているが、脳下垂体前葉のPRL産生細胞に対しても増殖促進効果のあることがin vivo (20, 21, 22, 23) およびin vitro (52) 研究により明らかとなってきた。また、視床下部のGRFが、GH産生細胞の増殖を促進したり (24)、脳下垂体後葉のバソプレッシンが脳下垂体前葉細胞の増殖を促進する (26) との報告がある。

そこで、生理活性物質の細胞増殖効果を確かめるために、先ずエストロジェンによるPRL産生細胞の増殖についての解析を行った。さらに、視床下部や脳下垂体に存在し、PRL産生細胞およびGH産生細胞の機能調節に関係があると考えられている生理活性物質 - GRF [GHの放出を促進する物質]、LHRH [LHとFSHの放出を促進し、またPRLの放出も促進する物質 (41)]、ソマトスタチン [GHの放出を抑制する物質]、TRH [TSHおよびPRLの放出を促進する物質]、S-100タンパク [脳下垂体の未分化な細胞や、ある種のGH産生細胞に存在する物質 (53, 54)] - を培養液中に添加し、in vitroにおけるPRL産生細胞およびGH産生細胞の増殖効果について研究を行った。

材料および方法

本研究 (II. 2) により確立した培養方法を用いて実験を行った。添加生理活性物質として、エストロジェン (β -estradiol [E₂]: Sigma)、GRF (rat growth hormone-releasing factor fragment 1-29 amid、成長

ホルモン放出因子: Sigma)、LHRH (luteinizing hormone releasing hormone、黄体形成ホルモン放出ホルモン: Sigma)、ソマトスタチン (Somatostatin: Sigma)、TRH (甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン: Sigma)、S-100タンパク (S-100A protein: Sigma) を用いた。また、抗エストロジェン物質としてタモキシフェン (tamoxifen: Sigma)、細胞分裂抑制物質としてピリミジン代謝拮抗物質のサイトシンアラビノサイド (cytosine arabinoside [CA]: Sigma) を使用した。

結果

MEM・FBS培地で脳下垂体前葉細胞の培養を行い、PRL産生細胞とGH産生細胞の数の増減について調べた。その結果、9日間の細胞培養により、PRL産生細胞数が増加することがわかった。しかし、GH産生細胞数には変化は認められなかった。そこで培地に分裂抑制物質であるCAを 4×10^{-7} M加えて同様に培養すると、PRL産生細胞数の増加は有意に抑えられた ($p < 0.01$) (図27)。さらに、少数ながら、PRL産生細胞の分裂像が電子顕微鏡により観察された (図28)。一方、分裂抑制物質を添加しても、GH産生細胞数に変動はみられなかった。

つぎに、培養開始後3日目に種々の生理活性物質 (E_2 、GRF、LHRH、ソマトスタチン、TRH、S-100タンパク) をMEM・FBS培地に添加し、PRL産生細胞およびGH産生細胞の増殖について調べてみた。

MEM・FBS培地に E_2 (10^{-5} M、 10^{-7} M) を加えて細胞培養した場合、いずれの濃度でも、MEM・FBS培地の場合とPRL産生細胞の増加の程度は変わらなかった。MEM・FBS培地に抗エストロジェン物質であるタモキシフェンを 10^{-5} M、 10^{-8} Mおよび 10^{-11} M添加して培養すると、 10^{-5} Mおよび 10^{-8} Mの濃度ではPRL産生細胞の数の増加は有意に抑制されたが、 10^{-11} Mの濃度で

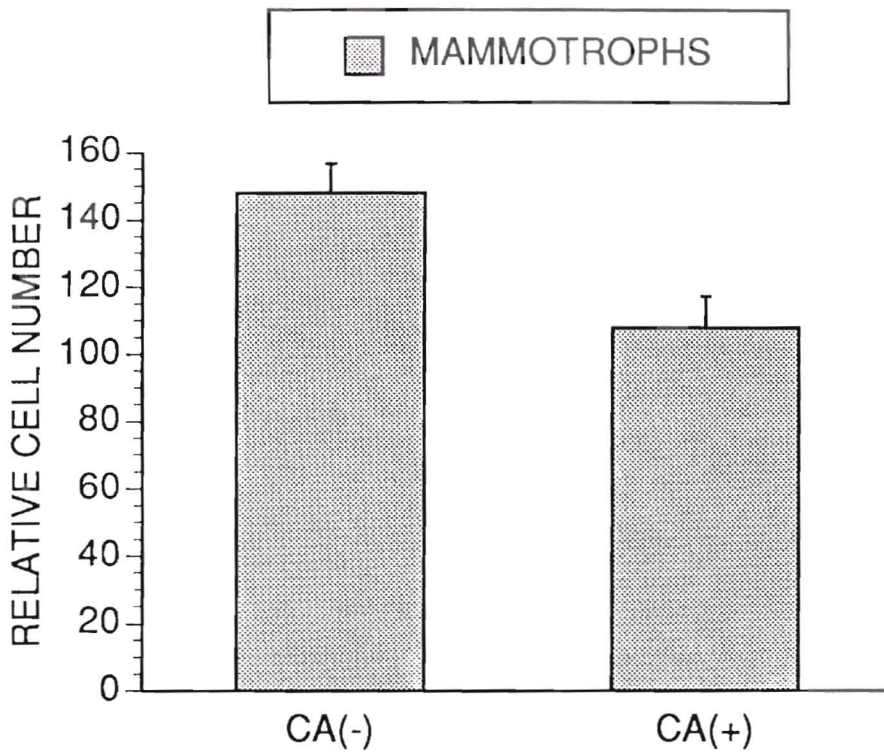


図 2 7 培養PRL産生細胞数の変化

MAMMOTROPHS:PRL産生細胞、CA:サイトシンアラビノサイド

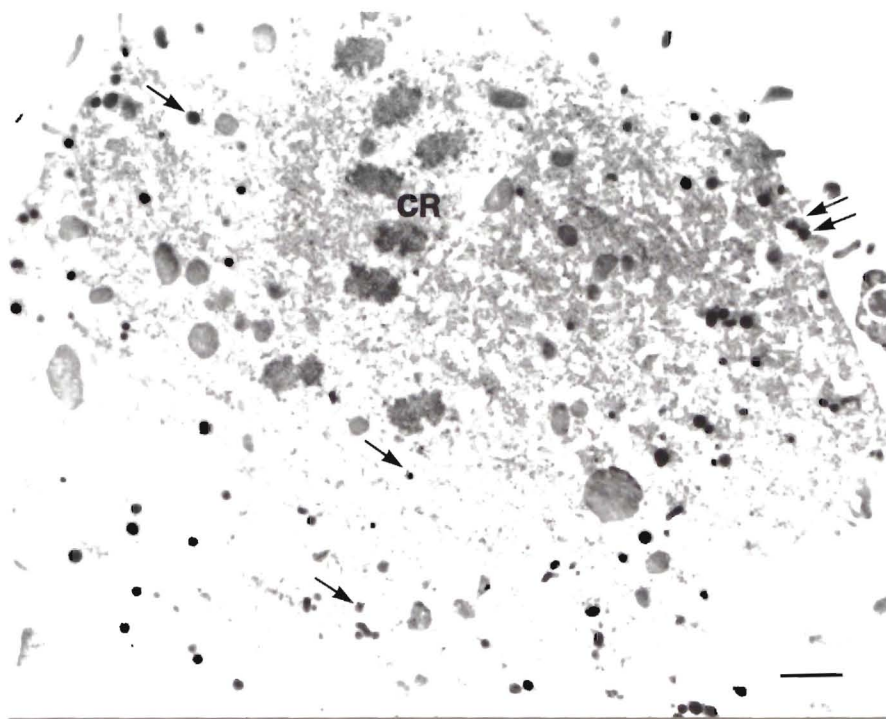


図 2 8 培養PRL産生細胞の分裂像

矢印は金コロイド（抗PRL）の付着した分泌顆粒を示す。

CR:染色体、M:ミトコンドリア

x 8000、スケールは1 μ m

は抑制されなかった。MEM・FBS培地にE₂ (10⁻⁵M、10⁻⁷M) とタモキシフェン (10⁻⁵M、10⁻⁸M) を添加して培養した場合、高濃度 (10⁻⁵M) タモキシフェン添加ではPRL産生細胞数の増加が僅かに認められたにすぎなかったが、低濃度 (10⁻⁷M) のタモキシフェン添加では、PRL産生細胞数は無添加の場合と同程度に増加した。なお、E₂およびタモキシフェン添加のために用いたエタノールはPRL産生細胞の培養には影響はおよぼさなかった (図29)。また、いずれの培養条件でも、GH産生細胞の数の増減には変化はみられなかった。

GRF (10⁻⁶M) をMEM・FBS培地に添加することにより、MEM・FBS培地のみにもみられたPRL産生細胞数の増加は抑えられた。一方、GH産生細胞はMEM・FBS培地の場合のみは、細胞数に増減が認められなかったが、GRF添加によりGH産生細胞の数は増加した。

LHRH (10⁻⁶M) を添加した場合のPRL産生細胞の数の増加は、MEM・FBS培地のみでみられる増加よりもさらに著しい増加を示した。しかし、GH産生細胞数には変化は認められなかった。GRFとLHRHについては、さらに詳細に検討を加えた (II. 4 および5)。

さらに、この他の生理活性物質 — ソマトスタチン、TRH、S-100タンパク — を添加した場合には、MEM・FBS培地の場合の結果と同程度に、PRL産生細胞数は増加し、GH産生細胞数には増減はみられず、いずれの物質についても、添加による効果は認められなかった。

考察

MEM・FBS培地でPRL産生細胞を培養すると、細胞数が増加するが、MEM・FBS培地にCAを添加して培養すると、細胞数の増加はおこらない。この結果は、CAは細胞分裂抑制物質であることからみて、CA添加によりPRL産生

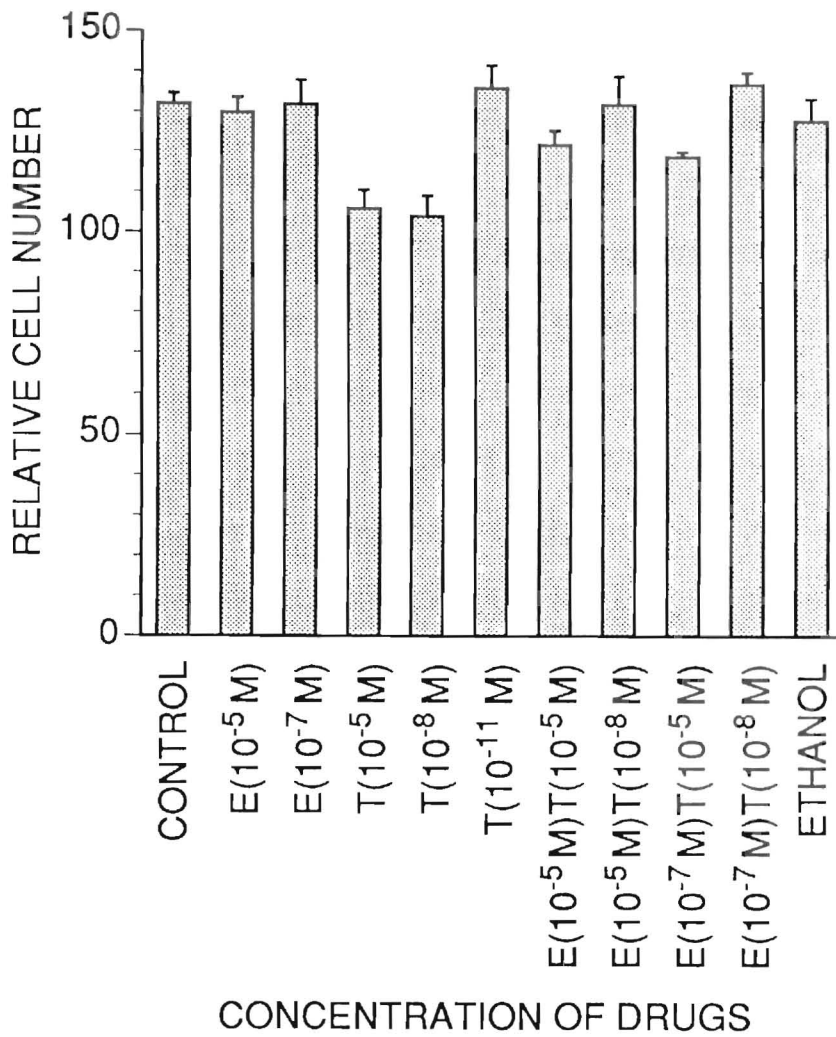


図 2 9 培養PRL産生細胞数の増加に対するE₂の効果

E: E₂、T: タモキシフェン

細胞の分裂が抑制されたと考えられる。また、MEM・FBS培地のみで培養されたPRL産生細胞には、超微形態学的に分裂像が観察される。これらのことを総合すると、MEM・FBS培地でのPRL産生細胞数の増加は細胞分裂による増殖であるといえよう。

MEM・FBS培地にE₂を加えて細胞培養すると、MEM・FBS培地の場合と同程度に、PRL産生細胞の増加がみられたが、培地にタモキシフェンを添加して培養すると、PRL産生細胞数の増加は抑制された。培地にE₂とタモキシフェンを添加して培養すると、高濃度のタモキシフェン添加ではPRL産生細胞数の増加はわずかであったが、低濃度のタモキシフェン添加では、無添加の場合と同程度にPRL産生細胞数は増加した。このことは、タモキシフェン自身に直接的な抑制作用がある可能性は残るが、タモキシフェン無添加培地によるPRL産生細胞の増殖は、培地中の牛胎仔血清（FBS）にエストロゲン様物質が含まれている可能性を示唆するとも考えられ、今後の検討課題である。一般にE₂は多くの培養細胞の増殖を促進することが知られているが、PRL産生細胞についてもまた同様の働きがあることがわかった。さらにE₂によるPRL産生細胞の増殖促進作用は、MEM・FBS培地中に含まれる濃度で充分であり、それ以上、E₂濃度のみを上げて培養しても、より有効な増殖効果は期待できないことも示された。他方、血清を含む培地で培養しても細胞増殖は認められないという報告もあるが（49）、これらは馬血清を使用している。馬血清中のE₂含有量はFBSに比べかなり少ないため、E₂による細胞増殖効果が十分に発揮されなかったと考えられる。

この研究で、GRFおよびLHRH添加により、*in vitro*におけるPRL産生細胞およびGH産生細胞数の増減が明確に観察された。このことは、*in vivo*で、生理活性物質が脳下垂体前葉のPRL産生細胞およびGH産生細胞数

の調節因子として働いている可能性を示唆している。

II. 4 PRL産生細胞およびGH産生細胞におよぼすGRFの効果

緒言

視床下部に存在するGRFは、GH産生細胞からのGH放出を促進することが知られている(55)。また、老齢ラットでは、免疫組織化学的技法により、視床下部のGRFが減少することや(56,57)、GRFによるGH放出能力が低下することが(40,58)報告されている。さらに、*in vitro*の研究により、GRFがGH産生細胞の増殖に関与していることも明らかとなっている(24)。このように、GRFのGH産生細胞数の調節が、加齢とも関係していることは、本研究の*in vivo*での結果を考察する上で大変興味深い。さらに本研究の*in vitro*での結果から、GRFが脳下垂体前葉のGH産生細胞だけではなく、PRL産生細胞数も調節する因子であるらしいことがわかってきた。このことは、*in vivo*でみられたラットの加齢に伴うPRL産生細胞の大幅な増加と、GH産生細胞数はほとんど変わらないか、若干の減少することが、GRFの影響によるものかどうかを知るうえで重要な手がかりになると考えられる。そこで、本研究(II. 2)により確立した脳下垂体前葉細胞培養法を用い、MEM・FBS培地にGRFを添加することによるPRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化についての検討を行った。

方法

本研究(II. 2)により確立した培養方法を用いて、GRF(rat-growth hormone-releasing factor 1-29; Sigma)の作用を検討する実験を行った。また、細胞分裂抑制物質としてサイトシンアラビノサイド(cytosine arabinoside; Sigma)を使用した。

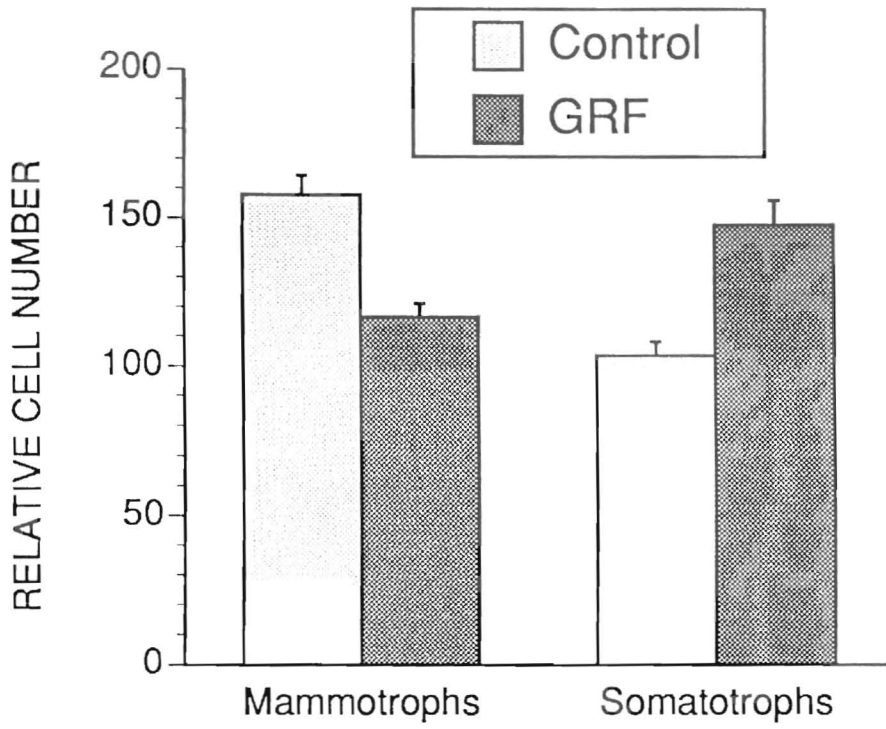
結果

初代培養開始後3日目と6日目に、GRF (10^{-6} M) をMEM・FBS培地に添加して9日間の培養を行い、培養3日目の細胞数を基準として、PRL産生細胞数とGH産生細胞数の変化について調べた。MEM・FBS培地のみでの培養では、PRL産生細胞は有意に細胞数が増加した。培地にGRFを添加すると、PRL産生細胞数の増加は完全に抑えられた ($p < 0.01$)。一方、GH産生細胞では、培地のみの場合、細胞数の増減はみられなかったが、GRFを添加することにより、細胞数は有意に増加した ($p < 0.01$) (図30)。また、MEM・FBS培地のみの場合、3、6、9日目のPRL産生細胞数は、ほとんど直線的に増加していくことがわかった (図31)。

PRL産生細胞に対するGRFの細胞増殖増加抑制効果は、 10^{-12} Mの濃度まで有効であり、 10^{-14} Mではじめて抑制効果が失われた。また、GH産生細胞に対するGRFの細胞数の増加促進効果は 10^{-10} Mまで有効であり 10^{-12} Mでその効力を失った (図32)。

培養開始後、3日目と6日目に細胞分裂抑制物質であるCA (4×10^{-7} M) とGRFを添加し、PRL産生細胞数の増加について調べた。CAの添加により、MEM・FBS培地でのPRL産生細胞数の増加は完全に抑えられた ($p < 0.01$)。また、GRFの単独添加の場合でも、GRFとCAを合わせて添加した場合でも、CA単独添加の場合と同様に、PRL産生細胞数の増加を完全に抑制した (図33)。

GRFの細胞数増加抑制効果がPRL産生細胞に特異的であるかどうかを調べるために、脳下垂体前葉のホルモン産生細胞以外の細胞 - 繊維芽細胞 - を用いて、MEM・FBS培地のみの場合の繊維芽細胞数の変化と、添加したGRFの繊維芽細胞数増加抑制効果について実験した。繊維芽細胞はPRL産生細胞と同様に6日目、9日目で細胞数は増加し、その増加率はPRL産生



☒ 3 O 培養PRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化に対するGRFの効果

Mammothrophs : PRL産生細胞、Somatotrophs : GH産生細胞

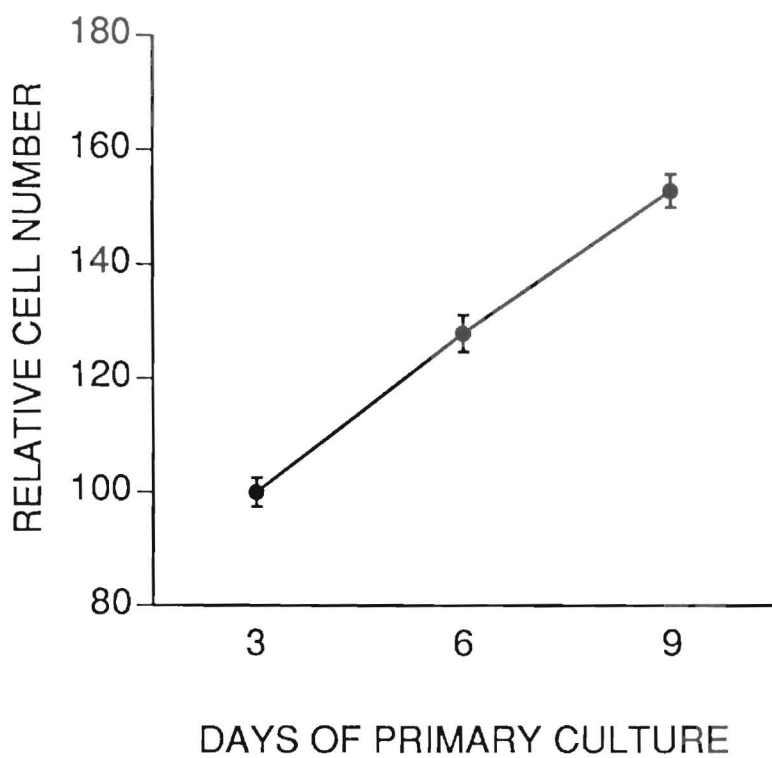


図 3 1 培養開始後3、6、9日目のPRL産生細胞数の変化

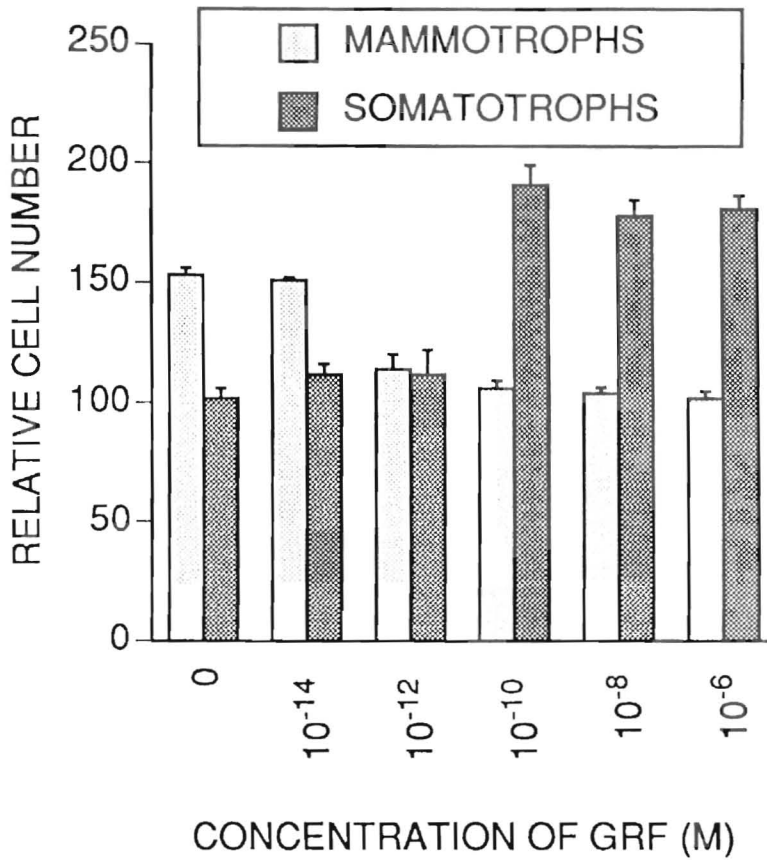


図 3 2 種々のGRF濃度に対する培養PRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化

MAMMOTROPHS : PRL産生細胞、SOMATOTROPHS : GH産生細胞

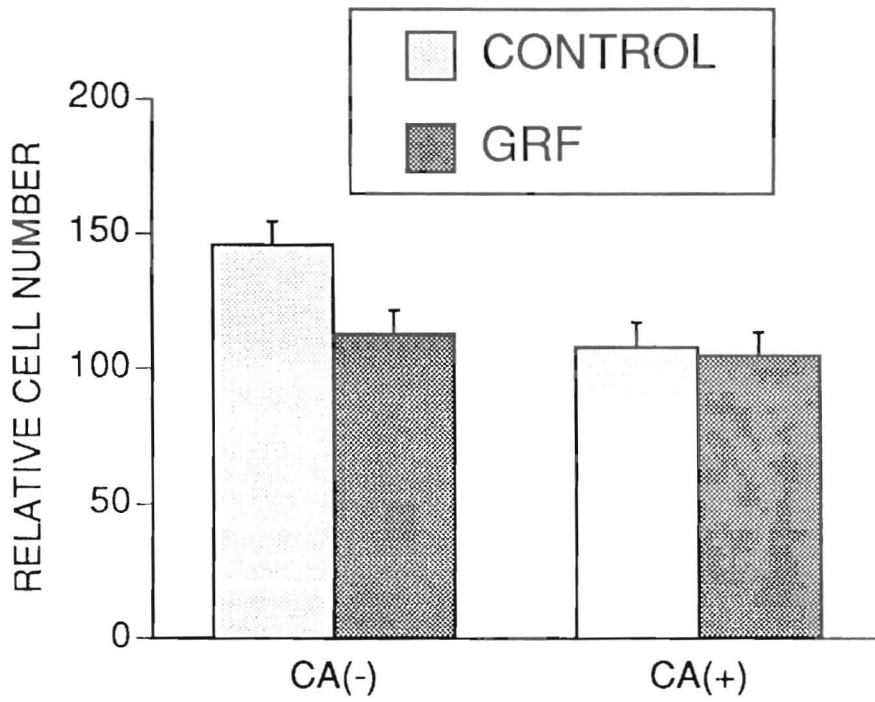


図 3 3 GRFとCA添加による培養PRL産生細胞数の変化

CA: サイトシンアラビノサイド

細胞に比べ高かった。MEM・FBS培地にGRFを添加すると、高濃度 (10^{-6} M) の場合でも、低濃度 (10^{-10} M) の場合でも、繊維芽細胞数の増加を添加により抑制する効果は認められなかった (図34)。

考察

PRL産生細胞は、本研究 (II. 2) で確立した培養条件下で細胞数が増加することがわかった。そして、その増加は細胞分裂抑制物質 -CA- により抑制されたことから、増殖により細胞数が増加したと考えられる。また、GRFによるPRL産生細胞数の増加抑制効果は、CAによる効果と類似することから、GRFもまたPRL産生細胞の増殖を抑制する働きを持つと考えられる。

GRFのPRL産生細胞増殖抑制効果は、非常に低濃度 (10^{-12} M) でも有効であったことから、この作用は細胞に対し薬理的に直接作用するのではなく、なんらかの生理学的な機序を介して作用しているとおもわれる。さらに、GRFは繊維芽細胞数の増加には関与しなかったことから、GRFはPRL産生細胞の増殖に関してのみ特異的に抑制していると考えられる。

本研究で、GRFはPRL産生細胞の増殖を抑制する効果があることがわかったが、他の研究者により、GRFはPRL産生細胞からのPRLの放出を促進する効果のあることが報告されている (59,60,61)。GRFと同様なPRL産生細胞の増殖抑制効果を持つ脳内物質としてドーパミンが知られているが、ドーパミンはまた、PRL産生細胞からのPRLの放出を抑制することも知られている (21,62,63)。このように、GRFとドーパミンとは共にPRL産生細胞の増殖抑制に関しては類似の働きをするが、ホルモンの放出に関しては正反対の作用をする点で異なる。

一方、GRFはGH産生細胞の増加を促進することが示されたが、他の研究

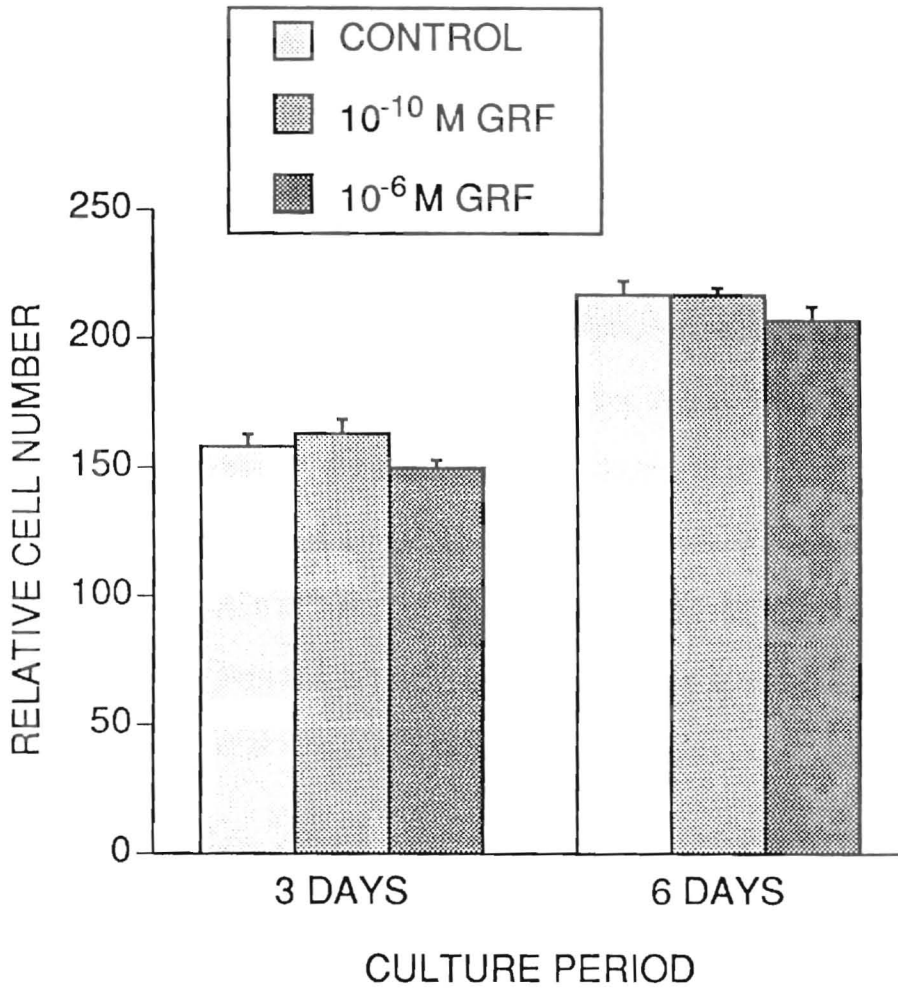


図 3 4 GRF添加による培養繊維芽細胞数の変化

者により同様の報告がされている(24)。このように、GRFは同じ脳下垂体前葉の二種類の好酸性細胞の増殖に対して、まったく逆の効果を持つ点で興味深い。ラットでは形成期の脳下垂体前葉の好酸性細胞は、ほとんどがGH産生細胞であり、発生が進行するにつれてPRL産生細胞も増えてくることが知られている(4,26,27)。また、PRL産生細胞は加齢と共に数が増加し、一方、GH産生細胞は数が減少するという報告もある(13)。さらに、老齢ラットでは正中隆起部内のGRF含量が減少していることが免疫組織化学的に確認されている(56,57)。これらのことから、加齢に伴いラットの視床下部のGRFが減少することにより、脳下垂体前葉のPRL産生細胞の増殖抑制およびGH産生細胞の増殖促進が解除され、PRL産生細胞数の増加につながっている可能性が示唆される。

II. 5 PRL産生細胞およびGH産生細胞におよぼすLHRHの効果

緒言

視床下部に存在しているLHRHは脳下垂体前葉のLH産生細胞やFSH産生細胞に作用してホルモンの放出を促し、雌の動物の場合は、放出されたLHとFSHは卵巣に作用してエストロゲン分泌を促進することや、そのエストロゲンが視床下部や脳下垂体前葉に働いて、PRL分泌に促進的作用をすることが知られている(64)。最近、LHRHはPRL産生細胞からのホルモン放出をin vivo (41) やin vitro (11) で促進することや、逆に視床下部内のPRL様物質がLHRHの放出を促進すること(65)がわかってきた。このようにLHRHとPRLとの間には、生体機能を維持する上で密接な関係があるものと考えられる。またin vitroの研究により、LHRHがPRL産生細胞やGH産生細胞の細胞数の比率を変化させる働きがあることも報告されている(4, 26, 27)。本研究のin vitro実験(II. 3)からも、LHRHがPRL産生細胞数の増加を調節する因子であるらしいことがわかってきた。これを確かめることは、in vivoの研究で得られたラットの加齢に伴うPRL産生細胞数の増加の知見が、LHRHの影響によるものかどうかを知るための手がかりになると考えられる。そこで、脳下垂体前葉細胞培養法を用い、培養液にLHRHを添加することによるPRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化についての研究を行った。

方法

前述の培養方法に基づいて、LHRH (luteinizing hormone releasing hormone: Sigma) とエストロゲン (β -estradiol [E_2]: Sigma) の添加実験を行った。また、抗エストロゲン物質としてタモキシフェン

(tamoxifen: Sigma)、細胞分裂抑制物質としてサイトシンアラビノサイド (cytosine arabinoside: Sigma) を使用した。

結果

MEM・FBS培地に培養3日目と6日目にLHRHを添加 (10^{-6} M) してPRL産生細胞を培養し、細胞数の増加を調べた。培養6日目、9日目とも、MEM・FBS培地の場合以上の細胞数の増加が観察され、9日目には無添加では132%の増加であるのに対し、LHRH添加では166%もの増加が認められ、有意に増加していることがわかった ($p < 0.01$) (図35)。

LHRH添加による9日間培養でPRL産生細胞数の増加は、MEM・FBS培地の場合に比べ、LHRHの濃度が 10^{-6} M ($p < 0.01$) と 10^{-8} M ($p < 0.05$) とで認められた。しかし、LHRHが 10^{-10} M以下の濃度ではPRL産生細胞は有意に増加したとはいえなかった (図36)。

MEM・FBS培地の場合の培養でも、培養9日間でPRL産生細胞数は有意に増加するが、これにLHRHを添加すると細胞数はさらに増加した。つぎに、MEM・FBS培養液にCAを加えて培養すると、これにLHRHを添加した場合でも、しなかった場合でも共に、PRL産生細胞は、培養3日目と比べて数の増減はおこらなかった (図37)。

MEM・FBS培地に E_2 を添加 (10^{-5} 、 10^{-7} M) して9日間培養した場合、MEM・FBS培地の場合と同程度のPRL産生細胞数の増加しかみられなかった。MEM・FBS培地にLHRH (10^{-6} M、 10^{-8} M) と E_2 (10^{-5} 、 10^{-7} M) を共に添加して培養すると、PRL産生細胞の数は、 E_2 濃度には関係なく、LHRH濃度に依存して増加していることがわかった (図38)。培地に抗エストロゲン物質であるタモキシフェン (10^{-5} M、 10^{-8} M) を添加すると、いずれの濃度でもPRL産生細胞数に有意な増加はみられなかった。また、タモキシフ

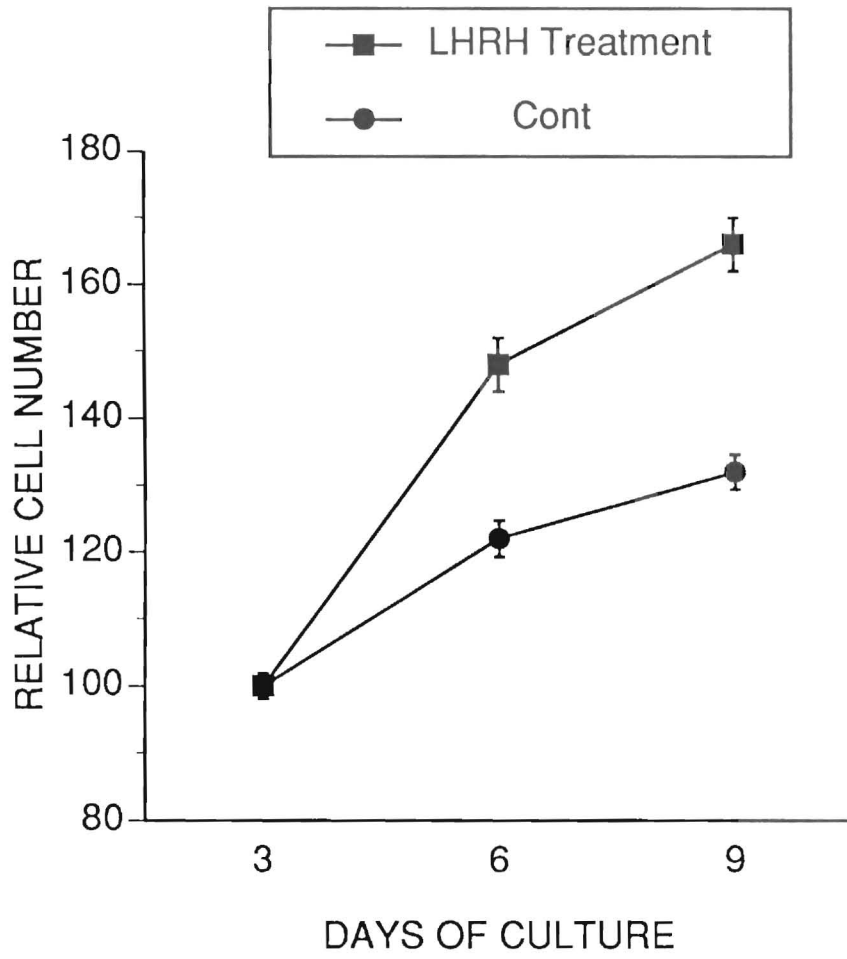


図 3 5 LHRH添加による培養開始後、3、6、9日目のPRL産生細胞数

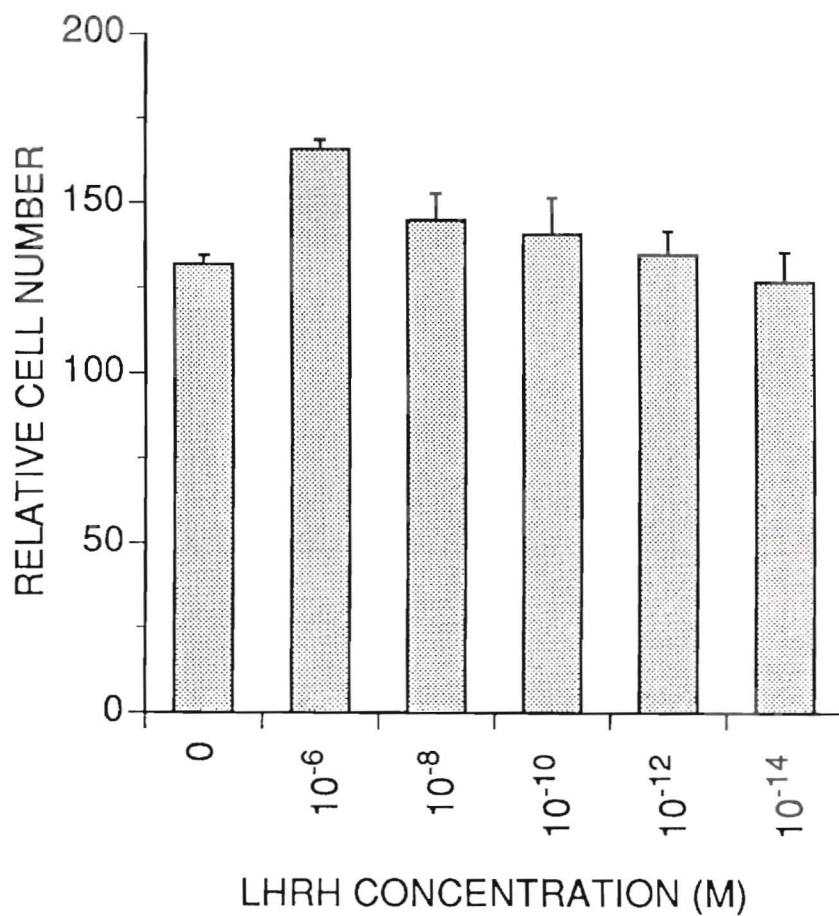


図 3 6 種々のLHRH濃度に対する培養PRL産生細胞数の変化

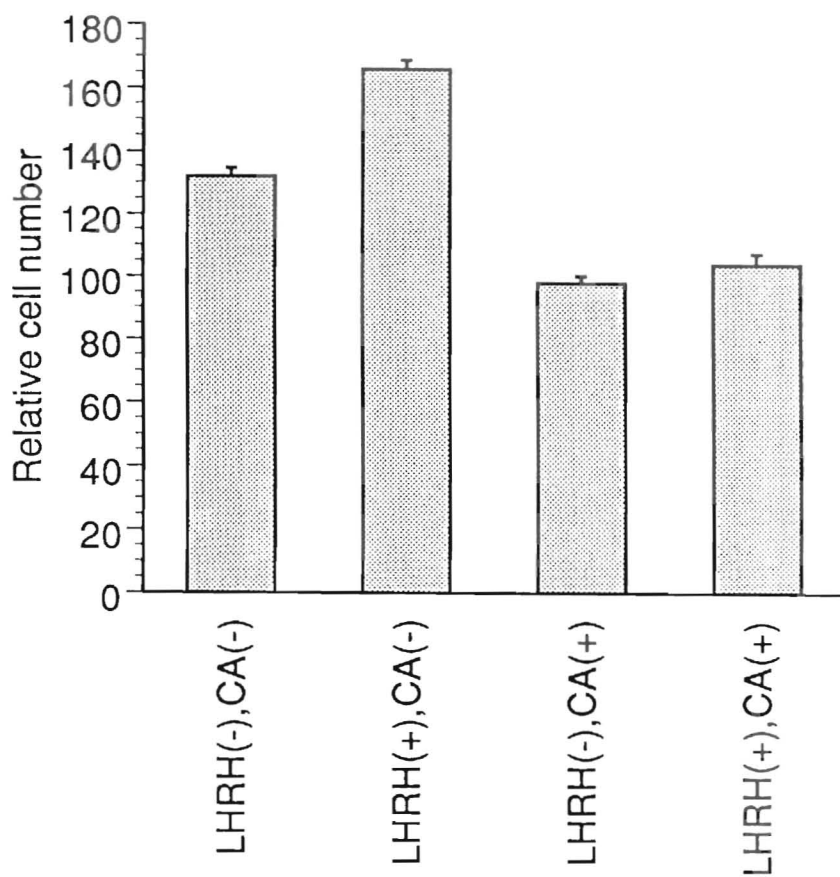


図 3 7 LHRHとCA添加による培養PRL産生細胞数の変化

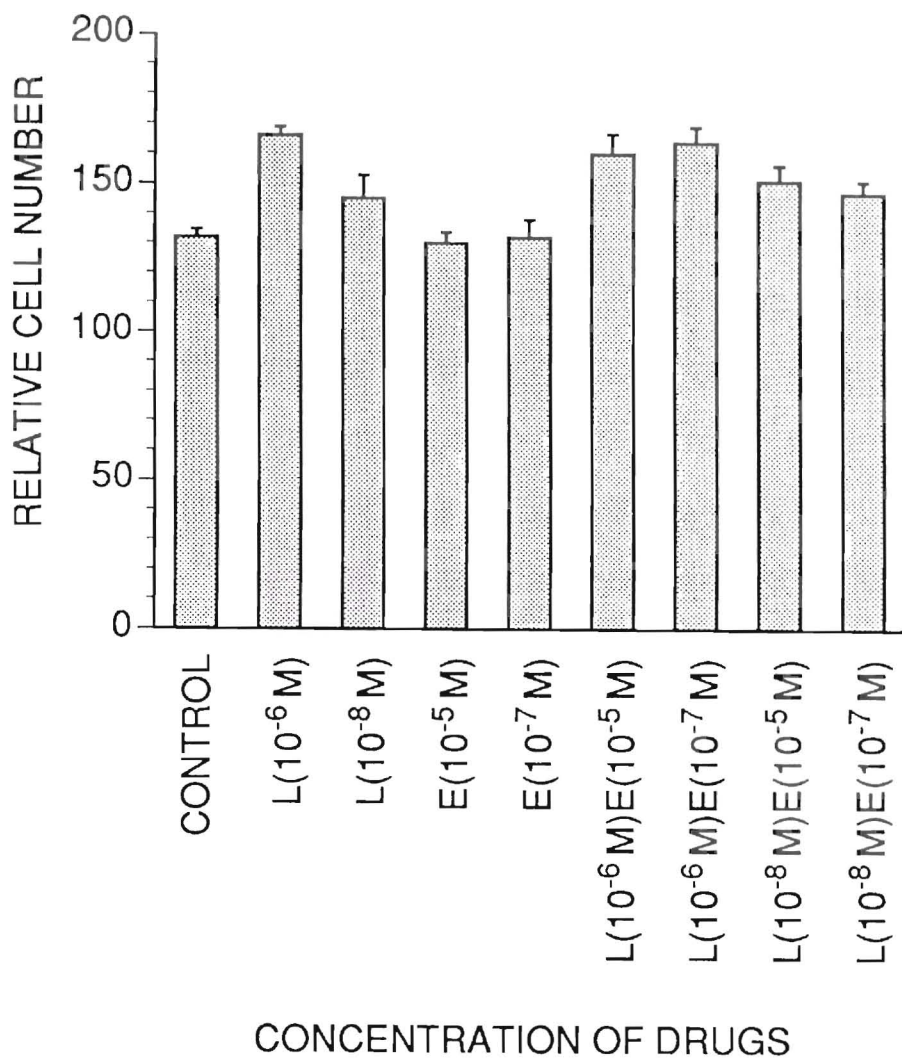


図 3 8 LHRHと E_2 添加による培養PRL産生細胞数の変化

L : LHRH、E : E_2

エン (10^{-5} M、 10^{-8} M) とLHRH (10^{-6} M) を添加して培養した場合は、タモキシフェンを単独で添加した場合と同様に、PRL産生細胞の増減は認められなかった (図39)。

MEM・FBS培地にGRF (10^{-7} M、 10^{-9} M) とLHRH (10^{-6} M、 10^{-8} M) を共に添加して9日間培養すると、いずれの場合でも、PRL産生細胞数の増加は、GRF単独添加の場合まで抑制された。また、GH産生細胞はいずれの場合でも、GRF単独添加程度の数の増加が認められた (図40)。さらに、培地にGRF (10^{-7} M、 10^{-9} M) と E_2 (10^{-5} M、 10^{-7} M) を共に添加して培養した場合、いずれの組合せでも、PRL産生細胞数の増加はGRFのみの単独添加の場合と同様に、細胞数の増加は全く抑えられ、一方、GH産生細胞数はGRF単独添加と同程度にまで増加した (図41)。

考察

本研究により確立した培養条件下では、LHRHはPRL産生細胞の数を E_2 のみによる増加以上に増やすことがわかった。そして、その細胞増加効果はLHRH濃度に依存しており、 10^{-10} M以下の低濃度ではその効果は発揮されなかった。しかしながら、このようなPRL産生細胞数の増加効果も、抗エストロジェンであるタモキシフェン添加により失われた。また、細胞分裂抑制物質であるCA添加により、LHRHのPRL産生細胞数の増加効果は抑えられたことより、 E_2 の場合と同様に、LHRHもまたPRL産生細胞の細胞分裂を促進しているものと考えられる。以上の結果から、LHRHによるPRL産生細胞の増殖は、 E_2 の存在下ではじめて有効であり、LHRHの単独作用では、PRL産生細胞数の増加効果は起こらないと思われる。 E_2 はin vivo (20, 21, 22, 23) およびin vitro (52) の研究から、ホルモン産生細胞の増殖を促進するとの報告があり、また、本研究 (II, 3) から、PRL産

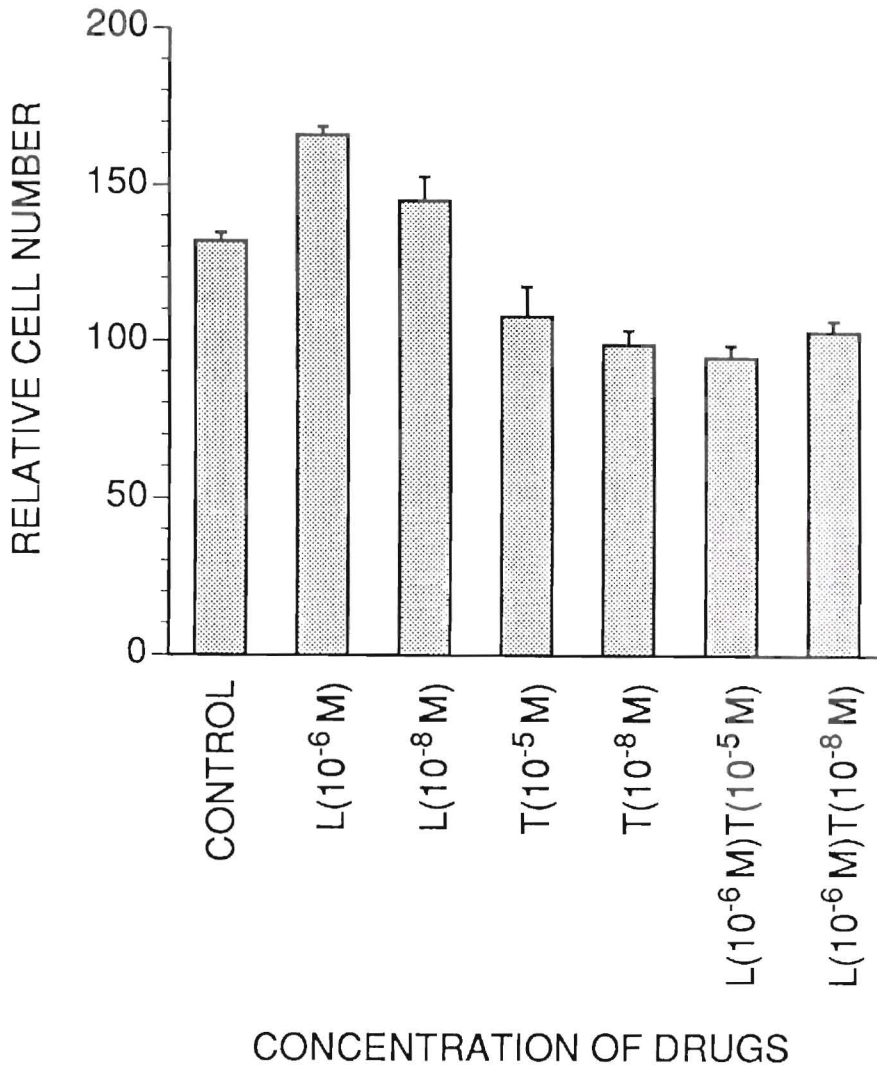


図 3 9 LHRHとタモキシフェン添加による培養PRL産生細胞数の変化

L: LHRH、T: タモキシフェン

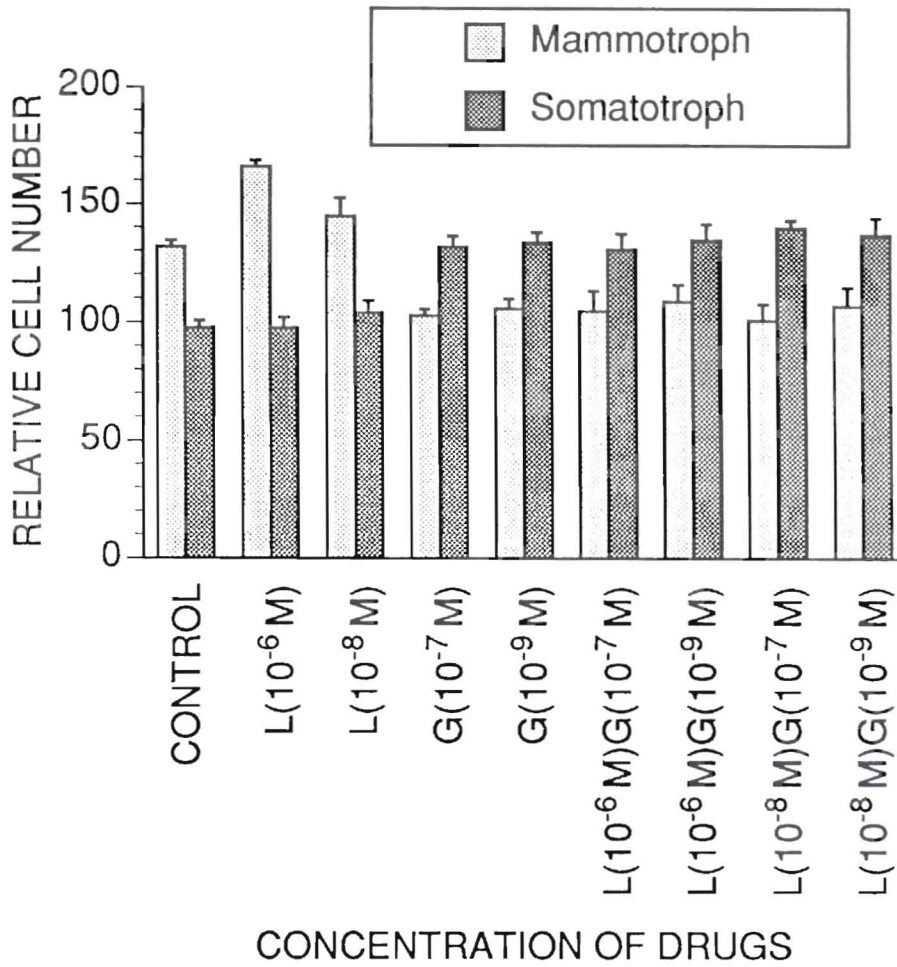


図 4 O LHRHとGRF添加による培養PRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化

L : LHRH、G : GRF

Mammothroph : PRL産生細胞、Somatotroph : GH産生細胞

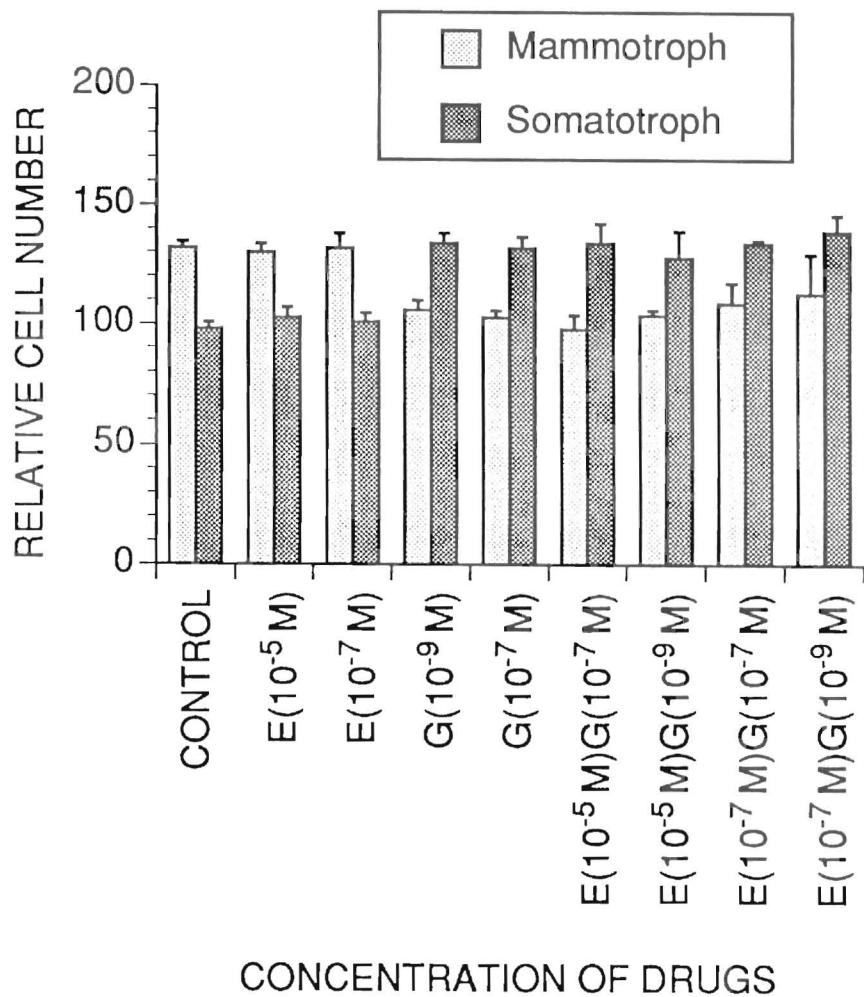


図 4 1 E₂とGRF添加による培養PRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化

E : E₂、G : GRF

Mammothroph : PRL産生細胞、Somatotroph : GH産生細胞

生細胞の増殖促進効果が認められている。さらに、胎仔期および新生仔期において、LHRHは脳下垂体前葉内に占めるPRL産生細胞の割合を増やすことが報告されているが(4,26,27,66)、いずれの研究も、LHRHとE₂との関連については言及していない。雌の去勢ラットではPRL産生細胞の分裂能力が低下するという報告は(67)、本研究のin vitro実験で得られた、LHRHのPRL産生細胞に対する増殖効果がE₂の存在下で高まるという結果と、間接的ながら一致する。

PRL産生細胞の増殖機構に関しては、E₂、LHRHどちらの場合についても不明であるが、E₂が存在するとLHRHの増殖効果が増すことから、E₂によりPRL産生細胞のLHRHに対する感受性が増す可能性が示唆される。

MEM・FBS培地にGRFとE₂を添加すると、PRL産生細胞の増殖が抑制されたが、このin vitroでのGRFの増殖抑制は、E₂による細胞増殖を抑制するために起こったものと考えられる。LHRHによるPRL産生細胞増殖に対するGRFの増殖抑制効果にも、E₂が介在している可能性が考えられる。

視床下部のLHRHが老齢期になると増加するという報告は、いまのところ知られていない。しかしながら、LHレベルが加齢に伴い上昇するという報告はある(68)。もし、このLHレベルの上昇がLHRHの作用によるものだとすると、LHRHは老齢期には増加すると考えられる。以上の仮定から、老齢ラットでのPRL産生細胞数の増加は、GRFの減少と共に、LHRHの増加に起因している可能性が示唆される。

II. 6 結論

GRFはPRL産生細胞に対しては細胞増殖抑制効果を、GH産生細胞に対しては増殖促進効果をもつことがわかった。また、E₂はPRL産生細胞に対して増殖促進効果を持つことがわかった。さらに、E₂はLHRHのPRL産生細胞の増殖促進効果を増強することもわかった。このことは、少なくともラットでは生体内に存在しているGRF、E₂、LHRHがおたがいに関連しながら、脳下垂体前葉のPRL産生細胞数およびGH産生細胞数の調節に関与している可能性を示唆している。

総括

ラットでは、老齢になると脳下垂体前葉のPRL産生細胞が増加し、GH産生細胞が減少する現象は、脳下垂体前葉細胞の数が増加するということを考えあわせると、同一祖先細胞に由来する両細胞の間で、加齢に伴ってGH産生細胞が移行してPRL産生細胞に変化したと考えるよりも、視床下部に含まれる生理活性物質（特にGRF、LHRH、E₂）のレベルが加齢に伴い変動したために、各々の物質の相乗効果により、PRL産生細胞は増殖し、一方、GH産生細胞の増殖が抑えられることとなり、その結果、脳下垂体前葉のPRL産生細胞の数は増加し、一方、GH産生細胞の数は増減しないか、あるいは若干減少すると考えた方が良いように思われる。このことは、ラットの脳内や体液中に存在している生理活性物質は、単に標的細胞のホルモン産生やホルモン放出に寄与し、体内のホルモンの恒常性を維持しているだけではなく、標的細胞の数の調節にも関与して、この面での恒常性も維持していることを意味している。そこで、以上の観点から、ラットでは老齢期において、PRL産生細胞が増加し、GH産生細胞が増加しないしくみについて、次のような仮説を考えてみた。

(I) ラットの老齢期において脳下垂体前葉でPRL産生細胞が増加する仮説 (図42)

[雄]

- (1) 若齢、中年齢期には視床下部のGRFが多く存在するため、PRL産生細胞の増殖は起こりにくい。
- (2) 老齢期になるとGRFが減少するため、PRL産生細胞は増殖しやすくなる。

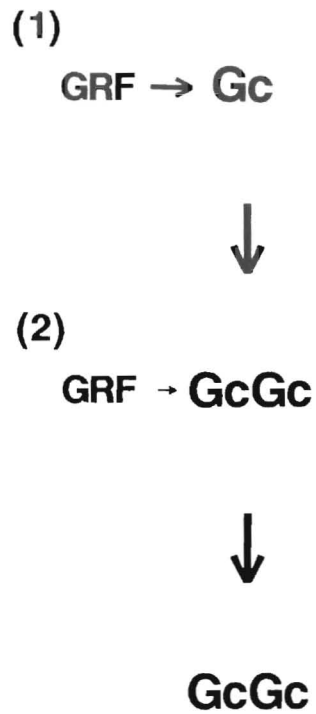
- (3) 老齡期の生殖腺機能低下にともない、負のフィードバック機構で増加したLHRHによりPRL産生細胞はさらに増殖する。

[雌]

- (1) 若齡、中年齡期には視床下部のGRFが多く存在するため、PRL産生細胞の増殖は起こりにくい。しかし、卵巣から E_2 は多量に放出されるため、PRL産生細胞数は雄に比べ多くなる。
- (2) 老齡期になるとGRFが減少し、また E_2 も多く存在するため、PRL産生細胞は雄の場合以上に増殖する。
- (3) 老齡期の生殖腺機能低下にともない、負のフィードバック機構で増加したLHRHとLHRH感受性を高める E_2 の相乗効果により、PRL産生細胞は、雄よりさらに増殖する。

(II) ラットの老齡期において脳下垂体前葉でGH産生細胞が不増加である仮説 (図43)

- (1) 若齡、中年齡期では視床下部のGRFが多く存在するため、GH産生細胞は増殖する。
- (2) 老齡期になるとGRFが減少するため、GH産生細胞の増殖は抑えられ、GH産生細胞の数は増加しなくなる。



☒ 4 3 ラットの老齡期におけるGH産生細胞の不増加に関する仮説

G c : GH産生細胞

→の大小は、GRF濃度の高低を示す。

要旨

哺乳類の脳下垂体前葉のプロラクチン（PRL）産生細胞と成長ホルモン（GH）産生細胞は、それぞれが産生するホルモンの化学構造の類似性、細胞の組織化学的性質の類似性および両方のホルモンを含んだ細胞の存在などから、両細胞の密接な関係が想定されている。また、成長をおえた老齢期の哺乳類では、血中PRL濃度が増加することが知られ、加齢に伴うPRL産生細胞とGH産生細胞との形態的、機能的変化についても関心が寄せられている。最近、脳や視床下部などの上位中枢や末梢の標的器官に存在する種々の生理活性物質が、脳下垂体ホルモンの合成・放出だけでなく、ホルモン産生細胞の増殖促進・抑制に関与することもわかってきた。本研究は、こうしたPRL産生細胞とGH産生細胞の関係を明らかにするため、ラットを用いて、先ず、個体レベルで動物の加齢に伴う血中PRL濃度、PRL産生細胞とGH産生細胞の数、および細胞の微細構造の検討を行った。次に、個体レベルの研究で得られた加齢に伴うホルモン産生細胞数の増減が、それぞれの産生細胞の増殖能力の変化の結果なのか、あるいはGH産生細胞からPRL産生細胞へと表現型の転換による結果なのかを知るために、脳下垂体前葉細胞の初代培養細胞を用いたin vitro系で、各種生理活性物質に対するPRL産生細胞とGH産生細胞の細胞増殖応答の差を利用して検討を行った。

I. 個体レベルの研究 3-32カ月齢のウィスター系の雌雄のラットを用い、各齢の血中PRL濃度をRIA法で測定し、また、脳下垂体前葉細胞の電子顕微鏡観察から、粗面小胞体やゴルジ装置の発達程度と分泌顆粒の形状や大きさにより、PRL産生細胞は3タイプに、GH産生細胞は2タイプの分類し、加齢に伴う各タイプの細胞の増減や雌雄差を調べて、形態学

的にPRL産生細胞とGH産生細胞の機能状態の知見を得た。

老齢（24カ月齢以上）になると、若齢（14カ月齢未満）や中年齢（14カ月齢以上24カ月齢未満）に比べ、非常に高い血中PRL濃度を示す個体が見られた。若齢や中年齢でPRL濃度の高い個体のPRL産生細胞には機能亢進像が観察された。一方、老齢で血中PRL濃度の高い個体の細胞の形態的機能像は、若齢や中年齢に比べ衰えていたが、PRL産生細胞数は増加していた。このことから、中年齢期と老齢期を境として、PRL産生細胞が機能面で変化を起こしていると考えられる。各個体の脳下垂体前葉内のGH産生細胞とPRL産生細胞の占有率の間には負の相関関係が認められ、また、加齢に伴い脳下垂体前葉のホルモン産生細胞数が全体的にいずれも増加する中で、PRL産生細胞の占有率は増加し、GH産生細胞の占有率は減少することから、老齢ラットでは、脳下垂体内のPRL産生細胞数は大幅に増加し、GH産生細胞数は増減がないか、僅かながら減少していると思われる。

II. 培養細胞を用いた研究 まず、脳下垂体前葉からPRL産生細胞およびGH産生細胞を単離する方法と単離した細胞を培養する方法を確立した。次に、培養液中に種々の生理活性物質—エストロゲン（ E_2 ）、成長ホルモン放出因子（GRF）、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）、ソマトスタチン、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン（TRH）、脳下垂体前葉のS-100タンパク—や細胞分裂抑制物質、抗エストロゲンなどを添加し、PRL産生細胞とGH産生細胞に対する増殖効果の有無を、細胞数の増減により調べた。PRL産生細胞は E_2 添加により無添加以上の細胞増殖はみられなかった。しかし、抗エストロゲンの添加により、増殖抑制効果がおこることと、LHRHによる増殖促進効果を増強することから、培地中の牛胎仔血清（FBS）に含まれる程度の濃度で十分に細胞増殖の賦活的役割を果

たしていると思われる。。LHRHはE₂の存在下で、PRL産生細胞に対し濃度依存的に増殖促進効果を示した。一方、GRFは細胞分裂抑制物質と同様に、PRL産生細胞のE₂とLHRHによる増殖を抑制した。GH産生細胞に対しては、GRFのみが増殖促進効果を示した。このように、E₂、LHRH、GRFの細胞増殖促進あるいは抑制作用は、それぞれの細胞に対して特異的に働くことがわかった。ソマトスタチン、TRHおよびS-100タンパクは、PRL産生細胞とGH産生細胞に対して増殖促進も抑制効果も示さなかった。

以上の結果から、老齢になると脳下垂体前葉のPRL産生細胞数は増加し、GH産生細胞数は増減しないか、あるいは若干減少する現象は、脳下垂体前葉の全ホルモン産生細胞数が増加することからみて、GH産生細胞がPRL産生細胞に転換したとは考えにくい。培養細胞を用いた*in vitro*の実験で得られた結果を*in vivo*の系にあてはめてみると、視床下部や脳下垂体に存在する各種ホルモンのレベルは加齢に伴い変化し、成長が止まり生殖機能の低下した老齢では、生殖腺ホルモンの減少によるLHRHの増加により、PRL産生細胞の増殖は促進され、一方、GRFやGHの減少によりGH産生細胞の増殖は抑制され、その結果がPRL産生細胞数およびGH産生細胞数の変化となったと思われる。また、*in vivo*の系でみられる血中PRL濃度およびPRL産生細胞数の雌雄差は、卵巣エストロジェンの有無による。このことから、ラットの視床下部や脳下垂体中に存在している生理活性物質は、単に標的細胞のホルモン産生や放出だけではなく、標的細胞数の調節の面でも恒常性の維持に関与していることが示唆される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導、御校閲を賜りました埼玉大学理学部教授、能村哲郎博士に甚大なる謝意を表すとともに、御好意ある御教示を下さいました埼玉大学教養学部教授、小川瑞穂博士ならびに理学部教授、石原勝敏博士に深く感謝致します。また、本研究全体に対し御指導を下さいました（財）東京都老人総合研究所研究部長、大岡宏博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- (1) 比較内分泌学会編, 内分泌機関のアトラスー脊椎動物・無脊椎動物ー, 36-53, 講談社
- (2) S.Hashimoto, G.Fumagalli, A.Zanini, and J.Meldolesi, Sorting of three secretory proteins to distinct secretory granules in acidophilic cells of cow anterior pituitary, *J. cell Biology*, 105, 1579-1586, 1987
- (3) M.Karin, J.-L.Castrillo and L.E.Theill, Growth hormone gene regulation: a paradigm for cell-type-specific gene activation. *T.I.G.*, 6(3), 92-96, 1990
- (4) J.P.Hoeffler, F.R.Boockfor and L.S.Frawley, Ontogeny of prolactin cells in neonatal rats: Initial prolactin secretors also release growth hormone, *Endocrinology*, 117, 187-195, 1985
- (5) D.A.Leong, S.K.Lau, Y.N.Shinha, D.L.Kaiser and M.O.Thorner, Enumeration of lactotropes and somatotropes among male and female pituitary cells in culture: Evidence in favor of a mammosomatotrope subpopulation in the rat, *Endocrinology*, 116, 1371-1378, 1985
- (6) F.R.Boockfor, J.P.Hoeffler and L.S.Frawley, Estradiol induces a shift in cultured cells that release prolactin or growth hormone, *Am. J. Physiol.*, 250, E103-E105, 1986
- (7) Y.Kashio, P.Chomczynski, T.R.Downs and L.A.Frohman, Growth hormone and prolactin secretion in cultured somatomammotroph cells, *Endocrinology*, 127, 1129-1135, 1990
- (8) L.S.Frawley, F.R.Boockfor and J.P.Hoeffler, Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin, *Endocrinology*, 116, 734-737, 1985
- (9) J.R.Thorpe and M.Willis, Immunocytochemical and morphometric studies of mammotrophs, somatotrophs and somatomammotrophs in sheep pituitary cell cultures, *J. Endocrinology*, 129, 417-422, 1991
- (10) T.E.Porter, J.B.Hill, C.D.Wiles and L.S.Frawley, Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional interconversion of growth hormone- and prolactin-secreting cells? Suggestive evidence from virgin, gestating and lactating rats, *Endocrinology*, 127, 2789-2794, 1990

- (11) M. Begeot, F. J. Hemming, N. Martinat, M. P. Dubois and P. M. Dubois, Gonadotropin releasing hormone (GnRH) immunoreactive lactotrope differentiation, *Endocrinology*, 112, 2224-2226, 1983
- (12) M. Begeot, F. J. Hemming, P. M. Dubois, Y. Combarous, M. P. Dubois and M. L. Aubert, Induction of pituitary lactotrope differentiation by luteinizing hormone α subunit, *Science*, 226, 566-568, 1984
- (13) L. J. A. van Putten, M. J. van Zwieten, J. A. M. Mattheij and J. A. M. Kemenade, Studies on prolactin-secreting cells in aging rats of different strains. I. alterations in pituitary histology and serum prolactin levels as related to aging, *Mech. Ageing Dev.*, 42, 75-90, 1988
- (14) K. T. Demarest, K. E. Moore and G. D. Riegler, Adenohypophysial dopamine content and prolactin secretion in the aged male and female rat, *Endocrinology*, 116, 1316-1323, 1985
- (15) J. W. Simpkins, G. P. Mueller, H. H. Huang and J. Meites, Evidence for decreased catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats: possible relation to gonadotropin, *Endocrinology*, 100, 1672-1679, 1977
- (16) R. W. Steger, Age related changes in the control of prolactin secretion in the female rat, *Neurobiol. Aging*, 2, 119-123 1981
- (17) C. V. Mobbs, D. Cheyney, Y. N. Sinha and C. E. Finch, Age-correlated and ovary-dependent changes in relationships between plasma estradiol and luteinizing hormone, prolactin, and growth hormone in female C57BL/6J mice, *Endocrinology*, 116, 813-820, 1985
- (18) D. A. Stewart, M. R. Blackman, M. A. Kowatch, D. B. Danner and G. S. Roth, Discordant effects of aging on prolactin and luteinizing hormone- β messenger ribonucleic acid levels in the female rat, *Endocrinology*, 126, 773-778, 1990
- (19) G. L. Rossi, G. E. Bestetti, E. Galbiati, E. E. Muller and D. Cocchi, Sexually dimorphic effects of aging on rat somatotropes and lactotropes, *J. Gerontology*, 46, B152-158, 1991
- (20) N. Yamamoto, H. Seo, N. Suganuma, N. Matsui, T. Nakane, A. Kuwayama, N. Kageyama, Effect of estrogen on prolactin mRNA in the rat pituitary: Analysis by in situ hybridization and immunohistochemistry, *Neuroendocrinology*, 42, 494-497, 1986
- (21) S. Takahashi and S. Kawashima, Proliferation of prolactin cells in

- the rat: Effects of estrogen and bromocryptine, *Zoological Science*, 4, 855-860 (1987)
- (22) R.L. Perez, G.A. Machiavelli, M.I. Romano and J.A. Burdman, Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin-secreting cells in the anterior pituitary gland of adult male rats, *J. Endocrinology*, 108, 399-403 (1986)
- (23) S. Takahashi, K. Okazaki and S. Kawashima, Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages, *Cell Tissue Res.*, 235, 497-502 (1984)
- (24) N. Billestrup, L.W. Swanson, and W. Vale, Growth hormone-releasing factor stimulates proliferation of somatotrophs in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 181, 6854-6857 1986
- (25) L.S. Frawley and J.P. Hoeffler, Hypothalamic peptides affect the ratio of GH and PRL cells: Role of cell division, *Peptides*, 9, 825-828, 1989
- (26) A.M. McNicol, J.E. Murray and W. McMeekin, Vasopressin stimulation of cell proliferation in the rat pituitary gland in vitro, *J. Endocrinology*, 126, 255-259, 1990
- (27) J.P. Hoeffler and L.S. Frawley, Hypothalamic factors differentially affect the proportions of cells that secrete growth hormone or prolactin, *Endocrinology*, 120, 791-795, 1987
- (28) 倉本和直, 朱宮正剛, 井上達, 蟹沢成好, 広川勝晃, 田中康一, 老化動物育成過程における自然死ラットの病理所見, *基礎老化研究*, 10, 71-71, 1985
- (29) M.C. Poole and W.D. Kornegay III, Cellular distribution within the rat adenohypophysis: A Morphometric study, *Anatomical record*, 204, 45-53, 1982
- (30) F.M. Perez and W.C. Hymer, A new tissue-slicing method for the study of function and position of somatotrophs contained within the male rat pituitary gland, *Endocrinology*, 127, 1877-1886, 1990
- (31) 吉村不二夫, 下垂体前葉と細胞学 - 生活環と分泌環との相関 -, 15-27, 理工学社, 1984
- (32) S. Takahashi and M. Niyatake, Immuno-electron microscopical studies of prolactin cell in the rat: Postnatal development and effects of estrogen and bromocryptine, *Zoological Science*, 8,

549-559, 1991

- (33) T. E. Porter, C. D. Wiles and L. S. Frawley, Evidence for bidirectional interconversion of mamatotropes and somatotropes - Rapid reversion of acidophilic cell types to pregestational proportions after weaning, *Endocrinology*, 129, 1215-1220, 1990
- (34) D. M. Henricks, W. J. Faught and L. S. Frawley, Fluctuation in the proportions of growth hormone-secreting and prolactin-secreting cells during the bovine estrus cycle, *Endocrinology*, 129, 1221-1225, 1991
- (35) I. E. Stratmann, C. Ezrin and E. A. Sellers, Estrogen-induced transformation of somatotrophs into mamatotrophs in the rat, *Cell Tissue Res.*, 152, 229-238 (1974)
- (36) J. Snyder, W. Wilfinger, and W. C. Hymer, Maintenance of separated rat pituitary mamatotrophs in cell culture, *Endocrinology*, 98, 25-32, 1976
- (37) S. U. Kim, D. H. Shin, and G. Moretto, Isolation, culture and cell-type identification of adult human pituitary cells, *Acta Neuropathol. (Berl)*, 68, 205-208, 1985
- (38) C. Tougard, R. Picart, and A. Tixier-Vidal, Electron-microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture, *American J. Anatomy*, 158, 471-490, 1980
- (39) W. S. Oetting and A. M. Walker, Differential isoform distribution between stored and secreted prolactin, *Endocrinology*, 119, 1377-1381, 1986
- (40) G. Nagy, J. Mulchahey and J. D. Neill, Autoctine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide, *Endocrinology*, 122, 364-366, 1988
- (41) C. R. Hopkins, Short term kinetics of luteinizing hormone secretion studied in dissociated pituitary cells attached to manipulable substrates, *J. Cell Biology*, 73, 685-695, 1977
- (42) T. T. Chen, R. D. Kineman, J. G. Betts, J. B. Hill and L. S. Frawley, Relative importance of newly synthesized and stored hormone to basal secretion by growth hormone and prolactin cells, *Endocrinology*, 125, 1904-1909, 1989
- (43) R. D. Kineman, T. T. Chen and L. S. Frawley, A cellular basis for

- growth hormone deficiency in the dwarf rat: Analysis of growth hormone and prolactin release by reverse hemolytic plaque assay, *Endocrinology*, 125, 2035-2040, 1989
- (44) F.R. Boocker, J.P. Hoeffler, L.S. Frawley, Analysis by plaque assays of GH and PRL release from individual cells in cultures of male pituitaries. Evidence for functional heterogeneity within rat mammatrope and somatotrope populations, *Neuroendocrinology*, 42, 64-70, 1986
- (45) G.P. Ceda, G. Valenti, U. Butturini and A.R. Hoffman, Diminished pituitary responsiveness to growth hormone-releasing factor in aging male rats, *Endocrinology*, 118, 2109-2114, 1986
- (46) T.H. Jones, B.L. Brown and P.R.M. Dobson, Evidence that angiotensin-II is a paracrine agent mediating gonadotropin-releasing hormone stimulated inositol phosphate production and prolactin secretion in the rat, *J. Endocrinology*, 116, 367-371, 1988
- (47) W.J. DeVito, J.M. Connors and G.H. Hedge, Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: in vitro release and subcellular localization, *Neuroendocrinology*, 46, 155-161, 1987
- (48) C.Y. Cheung, Prolactin suppresses luteinizing hormone secretion and pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone by a direct action at the anterior pituitary, *Endocrinology*, 113, 632-638, 1983
- (49) L.J. Hofland, P.M. van Koetsveld, T.M. Verleun and S.W.J. Lamberts, Long-term culture of rat mammatrope and somatotrope subpopulations separated on continuous Percoll density gradients: Effects of dopamine, TRH, GHRH, and somatostatin, *Acta Endocrinologica (Copenh)*, 122, 127-136, 1990
- (50) J.R. Thorpe and M. Willis, Immunocytochemical and morphometric studies of mammatrophs, somatotrophs and somatomammatrophs in sheep pituitary cell cultures, *J. Endocrinology*, 129, 417-422, 1991
- (51) B. Velkeniers, E.L. Hooghe-Peters, R. Hooghe, A. Belayew, G. Smets, A. Claeys, P. Robberecht and L. Vanhaelst, Prolactin cell subpopulations separated on discontinuous Percoll gradient: An immunocytochemical, biochemical, and physiological characterization, *Endocrinology*, 123, 1619-1630, 1988
- (52) K. Inoue, M. Hattori, T. Sakai, S. Inukai, N. Fujimoto and A. Ito, Establishment of a series of pituitary clonal cell lines

differing in morphology, hormone secretion, and response to estrogen, *Endocrinology*, 126, 2313-2320, 1990

- (53) N. Shirasawa and F. Yoshimura, Pituitary folliculo-stellate cells immunostained with S-100 protein antiserum in the postnatal, castrated and thyroidectomized rats, *Anat. Embryol.*, 165, 51-61, 1982
- (54) N. Shirasawa, S. Yamaguchi and F. Yoshimura, Granulated folliculo-stellate cells and growth hormone cells immunostained with Anti-S 100 protein serum in the goat pituitary gland, *Cell Tissue Res.*, 237, 7-14, 1984
- (55) W. Vale, C. River and M. Brown, Regulatory peptides of the hypothalamus, *Annu. Rev. Physiol.*, 39, 473-527, 1977
- (56) K. Shirasu, W. E. Stumpf and M. Sar, Evidence for direct action of estradiol on growth hormone-releasing factor (GRF) in rat hypothalamus: localization of [³H]estradiol on GRF neurons, *Endocrinology*, 127, 344-349, 1990
- (57) N. Morimoto, F. Kawakami, S. Makino, K. Chihara, M. Hasegawa and Y. Ibata, Age-related changes in growth hormone releasing factor and somatostatin in the rat hypothalamus, *Neuroendocrinology*, 47, 459-464, 1988
- (58) P. Robberecht, M. Gillard, M. Waelbroeck, J. -C. Camus, P. D. Neef and J. Christophe, Decreased stimulation of denylate cyclase by growth hormone-releasing factor in the pituitary of old rats, *Neuroendocrinology*, 44, 429-432, 1986
- (59) F. F. Casanueva, C. G. Brorras, B. Bruguera, L. Lima, C. Muruais, J. A. F. Tresguerres and J. Devesa, Growth hormone and prolactin secretion after growth hormone-releasing hormone administration, in anorexia nervosa patients, normal control and tamoxifen-pretreated volunteers, *Clin. Endocrinology*, 27, 517-523, 1987
- (60) P. K. Farmer, J. M. Tyler and M. E. Stachura, Monensin influences basal and human growth hormone-releasing hormone-44 induced release of stored and new rat growth hormone and prolactin, *Mol. Cell Endocrinology*, 62, 253-262, 1989
- (61) M. E. Stachura, J. M. Tyler and P. K. Farmer, Combined effects of human growth hormone(GH)-releasing factor-44(GRF) and somatostatin(SRIF) on post-SRIF rebound release of GH and prolactin: A model for GRF-SRIF modulation of secretion, *Endocrinology*, 123, 1476-1482, 1988

- (62) G. A. Jahn, G. A. Machiavelli, L. E. Kalbermann, I. Szijan, G. E. Alonso and J. A. Burdman, Relationships among release of prolactin, synthesis of DNA and growth of the anterior pituitary gland of the rat: effect of oestrogen and sulpiride, *J. Endocrinology*, 94, 1-10, 1982
- (63) R. L. Perez, G. A. Machianelli, M. I. Romano and J. A. Burdman, Prolactin release, oestrogens and proliferation of prolactin-secreting cell in the anterior pituitary gland of adult male rat, *J. Endocrinology*, 108, 399-403, 1986
- (64) A. Pecile and R. Bossa, Hypothalamus pituitary and aging: Age changes in hypothalamic-pituitary function, ed. by A. V. Everitt and J. A. Burgess, 86-96, Charles C. Thomas Publisher, 1976
- (65) N. Azad, L. Duffner, E. B. Paloyan, D. Reda, L. Kirsteins, N. V. Emanuele and A. M. Lawrence, Hypothalamic prolactin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from male rat hypothalamus, *Endocrinology*, 127, 1928-1933, 1990
- (66) M. J. Horacek, G. T. Campbell, and C. A. Blake, Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone: Effects on induction of LH, follicle-stimulating hormone, and prolactin cell differentiation, *Endocrinology*, 124, 1800-1806, 1989
- (67) T. Sakai, K. Inoue, Y. Hasegawa and K. Kurosumi, Effect of passive immunization to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) using GnRH antiserum on the mitotic activity of gonadotrophs in castrated male rats, *Endocrinology*, 122, 2803-2808, 1988
- (68) C. E. Finch and P. W. Landfield, Handbook of the biology of aging : Neuroendocrine and autonomic functions in aging animals, 567-592