

# ラットの性現象と下垂体中の Prolactin に関する研究

## I. 哺乳中のラットの下垂体 Prolactin レベル に及ぼす吸乳刺激の影響

湯 原 正 高・和 田 宏

### Studies on Pituitary Prolactin Level in different Reproductive States of Rat

#### I. Effect of Suckling Stimulus on Pituitary Prolactin Level of Lactating Rat

Masataka YUHARA and Hiroshi WADA

Disc electrophoresis can be used to separate prolactin as a distinct and individual band in the disc electrophoretic patterns of purified preparations and pituitary extracts. The first part of this study was designed to find the method of measuring prolactin in purified preparation and in the anterior pituitary extracts of rat by disc electrophoresis. The second part was carried out to know the effect of suckling stimulus on pituitary prolactin level of mother rat after parturition using the above method.

The results are summarized as follows:

1. There was a significant correlation ranging from 10  $\mu$ g to 100  $\mu$ g between optical density of prolactin band and a given weight of standard NIH bovine prolactin preparation.
2. Disc electrophoretic patterns of the anterior pituitary gland of adult female rat had the three very predominant protein bands. Each band was assayed for prolactin activity by using the pigeon crop sac method. Prolactin was identified as the fastest migrating band near ion front on gel column. Optical density of the prolactin band increased in proportion to the increase of quantity of the pituitary extracts of rat applied to gel column.
3. The pituitary prolactin level of the lactating rats which were isolated from her litters for 12 hours on 4th or 7th day after parturition resulted in a significant increase. When litters suckled their mother for a half hour or 3 hours after 12 hours isolation, pituitary prolactin level of the mother rat declined significantly. At the end of the 3rd week after parturition, three hours of suckling following 12 hours nonsuckling caused no change in pituitary prolactin level of the mother rat. When litter size was reduced from 6 to 2, pituitary prolactin level of mother rat rose markedly for 3 hours suckling after 12 hours nonsuckling.

## 緒 言

prolactin は、哺乳類の泌乳開始とその維持について主役を演ずる重要なホルモンである。また、prolactin はこの乳汁分泌刺激作用のほかに、マウス、ラットなどある種の動物では黄

体刺激作用をもつことが報告され、2次的には性周期、受精卵の着床および妊娠維持などに重要な役割を果しているものと考えられる。

下垂体の prolactin の放出は、種々の刺激や薬物によって影響されるがラットの性周期、妊娠、分娩および哺乳など一連の性現象において、下垂体の prolactin レベルを最も大きく変動させる要因は、estrogen と吸乳刺激 および交尾刺激と考えられる。吸乳刺激やストレスなどの神経刺激は、prolactin のほか、GH、TSH、ACTH および MSH などの放出にも関与することが知られている<sup>1)</sup>。

乳子を母ラットから一定時間隔離した後に吸乳させると、母ラットの下垂体 prolactin レベルの著しい低下を起こすが<sup>2)3)</sup>、このような下垂体 prolactin レベルの急速な低下は、このホルモンの放出を意味することが明らかにされている。吸乳刺激による下垂体 prolactin の低下は極めて短時間に起こり、また吸乳刺激の強さによっても、そのレベルは影響を受けることが報告されている<sup>1)</sup>。GROSVENOR ら<sup>2)</sup>は、哺乳中のラットの乳子の数を減らすと下垂体の prolactin レベルが増加することを示した。

prolactin の生物学的検定法としては鳩の嗦のう反応が一般に用いられているが、この方法は1試料の検定に少なくとも数羽の鳩を必要とすることおよび鳩の年齢、品種や季節などによってもその感度が異なり、測定値に変動を与える要因が多いなどの難点がある。

ORNSTEIN および DAVIS ら<sup>5)6)</sup>によって開発されたディスク電気泳動法は下垂体の蛋白質とくに prolactin や growth hormone の分離に適している。本報告はディスク電気泳動法を用いて精製 prolactin およびラットの下垂体 prolactin の比較測定法を検討し、ついでこの方法を用いて吸乳刺激による下垂体中の prolactin レベルの変動を知るために行なったものである。

## 材 料 および 方 法

### ディスク電気泳動

ORNSTEIN および DAVIS ら<sup>5)6)</sup>の方法に基づいて行ない、その方法の細部については若干の変更を加えて泳動を行なった。下層ゲルには7.5%の polyacrylamide を用い、上層ゲルには原則として3.75%の polyacrylamide を用いた。泳動カラムとして内径5 mmのガラスチューブを用い、ディスク電気泳動は pH 9.5で行なった。泳動分離した蛋白バンドの染色は amino black 10Bで行なった。

prolactin バンドの測定は東洋科学産業 KK 製のデンストロール DM-6 D 型を用いた。prolactin の量はデンストメーターによる測定値すなわち分離されたバンドの積分値 (Optical Density ; O.D.) で示した。

### Prolactin Preparation

精製 prolactin として牛下垂体より抽出した NIH-P-B 2 を用い、これを pH 7.5 の 0.05 M 磷酸緩衝液に溶かして試料液とした。試料層に加える prolactin の量は 10  $\mu$ g から 150  $\mu$ g とし、試料層には上層ゲルを用いた。

### ラット下垂体

ラットをエーテルあるいはネブタールで麻酔後頸静脈切断法によって放血した後、断頭して下垂体を摘出した。その際スポイド又は注射器で、生理食塩水を下垂体に滴下し次いで濾紙で水分を吸い取って、表面に付着する血液を除いた。摘出した下垂体前葉はトーションバラ

スで重量を測定した。次いで下垂体前葉を生理食塩水に数秒間浸して、付着している血液を洗い、ガラス製ホモジナイザーに入れて下垂体 1 mg 当り 0.01 ml の上層ゲルを加えて磨砕し試料ゲルとした。下垂体 prolactin の検量線を得るためにはカラム 1 本当り（試料ゲル 0.2 ml 当り）0.75～2 mg の下垂体相当量を加えた。

#### Prolactin バンドの生物検定

発情前期のラットの下垂体をカラム 1 本当り 2 mg ずつ泳動し、12本のカラムのうち2本だけを染色し、他の10本のカラムはチューブからはずした後、染色せずに直ちに凍結した。

泳動後の未染色のカラムについて、染色したカラムに現われる3本のバンドに相当する部分を切って3つに区分した。各区分のゲルはメスで薄く削り、4℃の蒸留水に12時間入れて静かに攪拌しながら溶出した。この溶出液を蒸留水に対して12時間透析した後、内液を凍結乾燥した。

prolactin の検定は REECE—TURNER ら<sup>7)</sup>の方法を用い、それぞれの抽出区分について下垂体 1 mg 相当量を 0.1 ml の磷酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、毎日その 0.1 ml ずつを鳩の喉のう直上の皮内に注射し、5日目に喉のうを切取って反応の程度を REECE—TURNER のスケールによって判定した。

#### 供試ラットおよび吸乳刺激

体重 200～300 g の哺乳中の Wister 系ラットを用い、分娩後2日目に哺乳子数を6匹に制限した。供試ラットの大部分は 20 ± 2℃ の恒温室で飼育し、14時間の点灯を行なった。

吸乳刺激による下垂体中の prolactin レベルの変動を知るために、分娩後4日目、7日目および21日目の3回につき、下垂体中の prolactin レベルの測定を行なった。

分娩後4日目では、普通に哺乳中のラットを対照とし、12時間子ラットを隔離、および12時間子ラットを母ラットから隔離後3時間吸乳させた場合の3区を設けた。

分娩後7日目には、哺乳中、12時間隔離、12時間隔離後30時間吸乳、3時間吸乳および乳子数を6匹から2匹に減らした場合の5区を設けた。

分娩後21日目では、分娩4日目と同様の3区を設け、これらの試験区分を第1～3表に示した。

哺乳中の母ラットの下垂体を採取する際には母ラットを刺激しないように取扱い、子ラットが吸乳中の場合には、子ラットに吸乳させている状態のまま断頭を行なうか、あるいは子ラットを離してから1分以内に断頭を行なった。下垂体の摘出、試料層の調製は前項によったが、カラムに加える試料ゲルの比率 (B : D : E : F) を 1 : 2 : 1 : 3 とし、F液には 0.05M, pH 7.5 の磷酸緩衝液または蒸留水を用いた。カラム 1 本当りの下垂体量は 2 mg とした。

## 結 果

### I. 牛の標準 Prolactin およびラット下垂体 Prolactin の測定

牛下垂体抽出 prolactin NIH—P—B 2 の泳動バンドは2本となり、易動度の小さいバンドが太く濃かった。

牛 prolactin NIH—P—B 2 の量とデンストメーターによる測定値の関係を第1図に示した。この prolactin の最低検出量は 10 μg であり、10 μg から 100 μg の範囲では prolactin の量と測定値の間にはほぼ直線性の比例関係が得られた。

この関係は  $y = 1.07x - 4.02$  の回帰式で示される。測定値と泳動像からみると内径 5 mm の

カラムを用いた場合に  $10 \mu g$  では正確な量的比較がやや困難であり、同様に  $150 \mu g$  ではその量がやや多すぎるものと考えられる。

雌ラットの下垂体のディスク電気泳動像を第2図に示した。ラットの下垂体には3本の太いバンドが認められ、LEWIS ら<sup>8)9)</sup>の報告などから考えて、これらの3本のバンドは先端の色素バンドに近い易動度の大きい順に prolactin, albumin および growth hormone (GH) であると推定される。

prolactin バンドを確認するために、第2図の P, A, G のそれぞれのバンドを鳩の嗦のう反応によって検定した。その結果Pバンドの溶出液のみが陽性反応を示し、AおよびGバンドの溶出液には prolactin による独特の皮厚反応が認められなかった。以上から、第2図に示したPバンドすなわち先端バンドに最も近いバンドが prolactin であることを確認した。

発情前期のラットの下垂体を試料層にそれぞれ  $0.75mg$ ,  $1mg$ ,  $1.25mg$ ,  $1.5mg$ ,  $1.75mg$ ,

Fig. 1 Relationship between optical density of stained band of prolactin and amount of the hormone applied to column measured by disc electrophoresis.

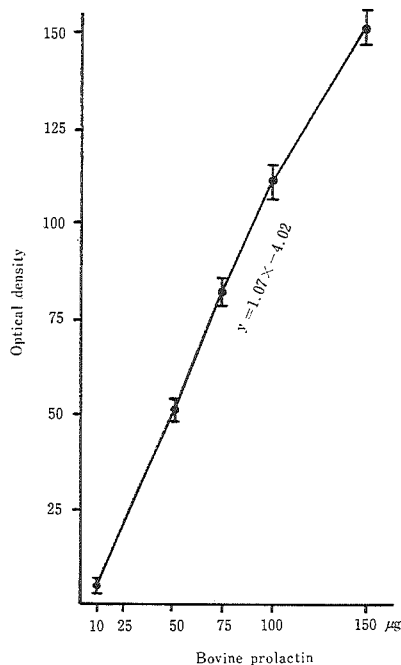
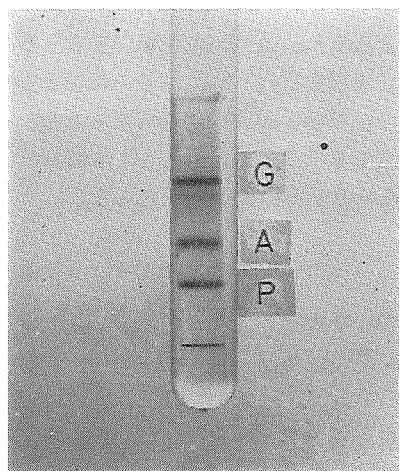
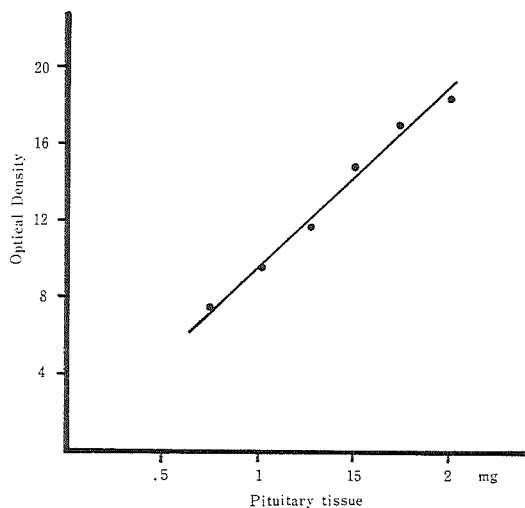


Fig. 2. Disc electrophoretic pattern of pituitary extract of female rat.



P : prolactin  
A : albumin  
G : growth hormone

Fig. 3 Relationship of optical density of a stained prolactin band to various weight of pituitary homogenates of female rat.



2 mg ずつ加えてディスク電気泳動を行ない, prolactin バンドをデンシトメーターで測定した結果を第3図に示した. デンシトメーターによる prolactin バンドの積分値とカラムに添加した下垂体量との間には 0.75 mg から 2 mg の範囲で直線的な検量線が得られた. すなわち上述の精製 prolactin と同様な結果が得られ, ラットの下垂体磨砕抽出液についても, ディスク電気泳動法による prolactin の比較測定が可能であることが判った.

## II. 吸乳刺激による下垂体 Prolactin レベルの変動

### 1. 分娩後4日目のラットの吸乳刺激による下垂体 prolactin レベルの低下

分娩後4日目における普通に哺乳中のラット, 12時間乳子を隔離したラットおよび12時間隔離後3時間吸乳させたラットの下垂体 prolactin レベルをディスク法によって測定した結果を第1表に示した.

母ラットから子ラットを12時間離すと, 母ラットの下垂体 prolactin レベルは著しく上昇した. すなわち分娩後4日目の母ラットから子ラットを12時間分離すると下垂体 1 mg 当りの prolactin の O. D. のカウント数は, 第1表に示したように 10.6 となり乳子をつけて絶えず吸乳させた状態の 2.3 倍の測定値を示した. 体重 100 g 当りの下垂体 prolactin レベルについても, 多量の prolactin の蓄積を示唆する高い値を示した. このレベルは発情期のラットの下垂体 prolactin レベルの約 1.5 倍に相当する.

Table 1. Effect of suckling stimulus on pituitary prolactin level of the 4th day postpartum mother rat.

| Group | No. of rat | Anterior pituitary weight<br>mg | Body weight<br>g | Optical density of pituitary prolactin |                |                |                     |  |  |
|-------|------------|---------------------------------|------------------|----------------------------------------|----------------|----------------|---------------------|--|--|
|       |            |                                 |                  | M                                      | per mg<br>± SE | per 100 g<br>M | body weight<br>± SE |  |  |
| 1*    | 4          | 9.4                             | 285              | 4.5                                    | ± 0.15         | 15.0           | ± 0.51              |  |  |
| 2**   | 4          | 11.6                            | 330              | 10.6                                   | ± 0.57         | 37.5           | ± 2.0               |  |  |
| 3***  | 4          | 11.6                            | 280              | 2.0                                    | ± 0.14         | 8.2            | ± 0.45              |  |  |

\* Constant suckling

\*\* 12 hrs. non-suckling

\*\*\* 3 hrs. suckling following 12 hrs. non-suckling

以上のように12時間の隔離による prolactin の上昇は, 吸乳刺激の廃絶と乳腺胞内に貯溜した乳汁が全く排出されないことによるものと思われる.

子ラットを12時間隔離後3時間吸乳させた母ラットの下垂体 1 mg 当りの prolactin の O. D. 測定値は 2.0 となり, 子を12時間隔離したラットのその 20% まで低下した. このレベルは雄および卵巣除去ラットのそれにほぼ匹敵する. 体重 100 g 当りの下垂体 prolactin の比較でも前者は後者の約 25% であった. すなわち吸乳刺激によって有意な下垂体 prolactin の低下が認められた.

### 2. 分娩後7日目のラットの吸乳刺激

分娩後7日目の吸乳刺激の結果を, 第2表に示した. 哺乳中の母ラットの下垂体 prolactin の O. D. 測定値は下垂体 1 mg 当り 5.2 であり, 12時間子ラットを離すと 9.6 となり, 著しく増加する.

子ラットを12時間隔離後, 30分および3時間吸乳させると前者の prolactin バンドの測定値は 3.3, 後者では 3.1 となった. 30分および3時間吸乳刺激を与えた母ラットの下垂体 1 mg

当りの prolactin レベルは、子ラットを12時間隔離した母ラットのそれに比較して、それぞれ42%および36%であり、前者と後者の間には高い有意差が認められた。

体重100g当りの下垂体 prolactin レベルについても、ほぼ同様な関係が認められた。

筆者らの用いたディスク法では厳密な意味での定量は困難であるが、吸乳中止による下垂体 prolactin レベルの上昇、吸乳刺激による低下などの測定には、これまでの報告の傾向とはほぼ一致した。

Table 2. Effects of suckling stimulus and number of young on pituitary prolactin levels of mother rat at the 7th day after parturition.

| Group | Treatment                                      | No. of youngs nursed per rat | No. of mother rats used | Anterior pituitary weight<br>mg | Body weight<br>g | Optical density of pituitary prolactin |                                 |  |  |
|-------|------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|------------------|----------------------------------------|---------------------------------|--|--|
|       |                                                |                              |                         |                                 |                  | per mg pituitary<br>M ± SE             | per 100 g body weight<br>M ± SE |  |  |
| 1     | Constant suckling                              | 6                            | 5                       | 10.4                            | 278              | 5.2 ± 0.25                             | 19.8 ± 0.79                     |  |  |
| 2     | 12 hours non-suckling                          | 6                            | 5                       | 10.6                            | 283              | 9.6 ± 0.43                             | 35.9 ± 1.55                     |  |  |
| 3     | 30 minutes suckling after 12 hrs. non-suckling | 6                            | 5                       | 11.0                            | 270              | 3.3 ± 0.30                             | 12.2 ± 1.57                     |  |  |
| 4     | 3 hours suckling after 12 hrs. non-suckling    | 6                            | 5                       | 10.6                            | 276              | 3.1 ± 0.29                             | 12.0 ± 1.26                     |  |  |
| 5     | "                                              | 2                            | 5                       | 10.7                            | 268              | 5.3 ± 0.22                             | 21.5 ± 1.12                     |  |  |

なお、母ラットから12時間隔離し、30分間吸乳させた場合と、3時間吸乳させた場合の下垂体 prolactin レベルの差は認められなかった。

分娩後7日目の母ラットから、乳子を12時間隔離し、乳子の数を2匹に減らして3時間吸乳させると、乳子を6匹として3時間吸乳させた場合に比較して、母ラットの下垂体 prolactin レベルは有意に高かった。すなわち12時間吸乳刺激を与えなかった母ラットの下垂体 prolactin レベルに対して、乳子を2匹とした前者の低下率は約40%であるが、後者の低下率は約60%であった。このことは分娩後の下垂体からの prolactin の放出は、乳子の数すなわち吸乳刺激の強さによって左右されることを示唆している。

REECE ら<sup>10)</sup>は、哺乳子数を減らすと下垂体 prolactin 含量の上昇が起こることを生物学的検定法を用いて報告しているが、筆者らのディスク法による結果はほぼこれと一致している。

### 3. 分娩後3週間目の吸乳刺激

分娩後3週間目の下垂体 prolactin レベルおよびそれに及ぼす吸乳刺激の影響を第3表に示した。

分娩後3週間目では、母ラットの下垂体 prolactin レベルは、12時間子ラットを離しても、乳子をつけた状態に較べて有意な上昇は認められず、また3時間の吸乳によっても、顕著な低下はみられなかった。

このことは、子ラットがすでに餌を摂取していて、吸乳刺激が弱くなっていることを示すものと思われる。

Table 3. Pituitary prolactin levels of the 21st day of postpartum mother rats with or without suckling stimulus.

| Group | Treatment                                    | No. of youngs nursed per rat | No. of mother rats used | Anterior pituitary weight<br>mg | Body weight<br>g | Optical density of pituitary prolactin |   |      |                       |   |      |
|-------|----------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------------------|------------------|----------------------------------------|---|------|-----------------------|---|------|
|       |                                              |                              |                         |                                 |                  | per mg pituitary                       |   |      | per 100 g body weight |   |      |
|       |                                              |                              |                         |                                 |                  | M                                      | ± | SE   | M                     | ± | SE   |
| 1     | Constant suckling                            | 6                            | 4                       | 10.5                            | 281              | 4.5                                    | ± | 0.41 | 16.9                  | ± | 1.84 |
| 2     | 12 hours non-suckling                        | 6                            | 5                       | 10.8                            | 298              | 5.2                                    | ± | 0.30 | 19.0                  | ± | 1.17 |
| 3     | 3 hours suckling after 12 hours non-suckling | 6                            | 5                       | 10.5                            | 287              | 4.4                                    | ± | 0.32 | 16.1                  | ± | 1.32 |

## 考 察

分娩後のラットの下垂体 prolactin レベルの測定については、これまで多くの報告があるが、乳子を絶えずつけた状態での測定結果は、その分泌の状態を示すものではない。本研究においてもこの状態では、分娩後4日目から3週間の間に大きな変動はないが、一定時間隔離後の吸乳刺激による下垂体 prolactin レベルの低下率には大きな差がみられる。この意味から、分娩後における下垂体 prolactin の生産と放出を推定するには、乳子の隔離とその後の吸乳刺激による下垂体 prolactin レベルの低下率によって示すのが妥当であろう。

GROSVENOR ら<sup>2)</sup> は、30分の吸乳刺激によって分娩後6日と14日目の母ラットの下垂体1mg当りの prolactin レベルは、それぞれ最高95%および90%の低下を示すことを報告している。この研究では、分娩後4日および7日目のラットから子ラットを12時間隔離し、30分間の吸乳刺激を与えると、それぞれ80%および58%の下垂体 prolactin レベルの低下が認められた。

prolactin の分泌、放出は視床下部の PIF によって支配されており、吸乳刺激によって起こる下垂体中の prolactin レベルの低下は、PIF の不活性化などによる prolactin の大量の放出によることが実験的に証明されている。また、吸乳刺激は、下垂体後葉から oxytocin の放出を誘起するが、現在では oxytocin による prolactin の放出説は否定され、oxytocin と PIF は無関係であると考えられている。

RATNER ら<sup>4)</sup> は吸乳刺激を与えたラットの視床下部の酸抽出液中には全く PIF の存在が認められないことを *in vitro* の研究において示した。このことは、吸乳刺激によって視床下部の PIF が破壊されるかあるいは、他の不活性な物質に変化したことを示唆するものと思われる。

吸乳刺激による PIF の作用の低下、あるいは失活と下垂体 prolactin の放出は、この研究およびこれまでの報告から30分以内に起こっており、その反応は極めて短時間である。吸乳刺激のほか estrogen によっても下垂体 prolactin は影響を受けるが、estrogen の作用は視床下部 PIF に働く以外に、下垂体への直接作用もあり、この点 estrogen の場合には吸乳刺激にみられるような短時間の急速な変動は認められていない。AMENOMORI ら<sup>4)</sup> は放射免疫法を用いて、分娩後4日目のラットを母ラットから離すと、30分後から血中の prolactin 濃度の低下が認められ、3時間後には著しく低下し、12時間隔離後吸乳させると、血中 prolactin 濃度が著しく上昇することを報告した。このことは、この研究において下垂体 prolactin レベルの

測定によって得られた結果と理論的によく一致している。下垂体 prolactin の測定は、それだけでは放出との関連を直接示すものではないが、測定時の動物の状態や条件を考慮するならば、下垂体における生産と放出を推定することも可能であろう。

## 摘 要

ディスク電気泳動法は、精製 prolactin および下垂体抽出物について prolactin を独立したバンドとして分離することができる。この研究は第1にディスク電気泳動法による精製 prolactin およびラットの下垂体前葉中の prolactin の測定を行ない、次にこの方法を用いて、哺乳中のラットの下垂体 prolactin レベルに及ぼす吸乳刺激の影響を知るために行なった。その結果は次の通りである。

1. NIH の標準牛 prolactin の量と prolactin バンドの測定値との間には  $10\mu g$  から  $100\mu g$  の範囲内で比例関係がみられた。

2. 雌ラットの下垂体前葉の泳動像には3本の太い蛋白バンドが認められた。それぞれのバンドは鳩の嗦のう反応によって、その prolactin 活性を検定した。prolactin は先端バンドに近い易動度の最も大きいバンドであることが認められた。prolactin バンドの測定値は、カラムに加えるラット下垂体の量に比例して増加し、この方法によって量的な比較の可能性が示された。

3. 分娩後4日目および7日目のラットでは、12時間乳子を隔離した状態の母ラットの下垂体 prolactin レベルは著しく増加した。乳子を12時間隔離後、その子を母ラットに戻して30分間または3時間の吸乳を行なうと母ラットの下垂体 prolactin レベルは有意に減少した。分娩後3週目のラットでは、12時間隔離後3時間の吸乳を行なっても母ラットの下垂体 prolactin レベルの変動は認められなかった。

吸乳する乳子の数も6匹から2匹に減らすと母ラットの下垂体 prolactin レベルには著しい増加が認められた。

## 文 献

- 1) NEILL, J. D. : Endocrinol., 87, 1192—1197 (1970)
- 2) GROSVENOR, C. E. and C. W. TURNER : Endocrinol., 63, 530—534 (1958)
- 3) RATNER, A. and J. MEITES : Endocrinol., 75, 377—382 (1964)
- 4) AMENOMORI, Y., C. L. CHEN and J. MEITES : Endocrinol., 86, 506—510 (1970)
- 5) ORNSTEIN, L. : Ann. NY Acad. Sci., 121, 321—349 (1964)
- 6) DAVIS, B. J. : Ann. NY Acad. Sci., 121, 404—427 (1964)
- 7) REECE, R. P. and C. W. TURNER : Mo. Agr. Exp. Sta. Res. Bull. No. 266 (1937)
- 8) LEWIS, U. J., E. V. CHEEVER and W. P. VANDERLAAN : Endocrinol., 76, 362—368 (1965)
- 9) JONES, A. E., J. N. FISHER, U. J. LEWIS and W. P. VANDERLAAN : Endocrinol., 76, 578—583 (1965)
- 10) REECE, R. P. and C. W. TURNER : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 35, 621—622 (1937)