九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

ヒナに対する合成女性ホルモン投与の影響(II)：Diethylstilbestrol筋注とヒナにおける酵素活性,血清PBI,血糖，アセトン体および体内ビタミンとの関係

和田，正太
九州大学農学部

https://doi.org/10.15017/21580

出版情報：九州大學農學部學藝雜誌. 19 (3), pp.299-307, 1962-03. 九州大學農學部
バージョン：
権利関係：

ヒナに対する合成女性ホルモン投与の影響 (II)

Diethylstilbestrol 筋注とヒナにおける酵素活性，血清 PBI，血糖，アセトン体および体内ビタミンとの関係

和　田　正　太

Effects of synthetic estrogens on chicks (II)

Effect of diethylstilbestrol injections on enzyme activities, serum PBI, blood sugar, acetone bodies and vitamin content in chicks

Masahuto Wada

Estrogen 投与により動物の生理状態に変化を来し，また標的臓器に種々の形態的変化を来すが，これらの作用機構は不明の点が少なくない．しかし結局は tissue もしくは cell level における酵素関与の諸反応に対する作用に帰し得る．

Estrogen と生体内酵素との関係については，多くはネズミについての in vitro の研究で呼吸酵素に対する estrogen の阻害作用があげられた.[6,30] 蛋白代謝関係では protease, d-amino acid oxidase, arginase, histaminase 等について，脂肪代謝関係では lipase, esterase 等，神経系代謝関係では choline acetylase, choline esterase 等について in vivo, in vitro で各組織について研究されたが多くは不定の結果が得られた.[47] これら estrogen と酵素作用との関係はヒナについてはあまり知られていない．

Estrogen と甲状腺機能との関係については実験条件で一致しないが,[17,33,38] Hartsook ら[20]は DES の投与によりネズミの甲状腺機能が促進され，基礎代謝率の上昇を伴うことを報じている．

一方家禽に対する estrogen の肥育効果は脳下垂体を介して甲状腺機能を抑制し，基礎代謝率を低下させることに由ると推測されていたが，まだ直接証明はない．

前報で DES 筋注のヒナで成長量の変化があり，体脂の蓄積，分布が DES レベルで変ることをみたが，この間における肝臓，血液における生化学的変化を知るため，二三の酵素，ビタミンA，B_2，甲状腺機能の指標としての血清 PBI，血糖，アセトン体などに対する DES 筋注の影響について研究した．

I. 実　験　法

1. 実験動物　前実験A，B，Cにおけるヒナを用いた．すなわち白色レグホン種雄ヒナを基本飼料で飼育し，ホルモン区は diethylstilbestrol(DES と略記) 0.1, 0.5, 1.0 mg をオリーブ油 0.25 ml にとかして隔日に胸肉内に注射し，対照にはオリーブ油 0.25 ml を同

様に隔日筋注を行なつた．ヒナの日令，注射期間は次のようであつた．

60日令ヒナに20日間（実験A群）および60日間（実験BII群），90日令ヒナに30日間（実験BI群），実験BIおよびBII群の一部はさらに80日間（実験CIおよびCII群）にわたりDESの隔日筋注を行なつた．

肝臓，血液の酵素活性ならびに血糖，アセトン体の測定は実験C群のヒナについて行ない，血清PBIは実験A，B，C群について測定し，肝臓，腎臓のビタミンA，B_2は実験A，B群のヒナについて測定した．

2. 分　析，測　定

(1) 酵素活性の測定

肝臓のoxidase：解体時速やかにとり出した肝臓は酵素実験まで−5〜−10°Cに保蔵した．氷冷した等張蔗糖溶液（0.25 M）を用いて（1：5）homogenateを作り，これについて酵素活性を測定した．

Succinoxidaseおよびsuccinic dehydrogenaseはSchneider法[41]およびSlater法[44]により測定した．Choline oxidaseはWilliam法[48]により測定したがDPNは用いなかつた．[45] Tyramine oxidaseはHawkins法[21]により測定した．

Phosphatase：肝臓および血液についてShinowara-Jones-Reinhart法[40]により測定した．血液はK-oxalateで凝固防止した1.0 mlで，肝臓は1：4（水）homogenate 1.0 mlについて実験し，基質のglycerophosphateから遊離する燐をFiske-Subbarow法で測定し，このmg％すなわちS-J-R unitで活性を示した．

Esterase：Itoh法[23]に従つて，肝臓の1：4（水）homogenateについてtributyrinを基質として分解率を測定した．

(2) 血清PBIの測定

実験AではConnorの蒸溜法[10]で，実験B，CではBarkerのアルカリ灰化法[1]により血清PBIの測定を行なつた．血清1〜2 mlに対し蛋白沈澱剤として5％三塩化酢酸10 mlを用いた．測定誤差は1γ％以内で，KIの回収率は90〜95％であつた．

(3) 血糖およびアセトン体の測定実験

実験Cの血清について測定した．血糖はHagedorn-Jensen法[15]で，アセトン体は比色法[14]で測定した．

(4) ビタミンAおよびB_2の測定

実験A，Bの肝臓，腎臓，脚肉についてビタミンAは藤田法，[16] B_2はルミフラビン螢光法[16]で測定した．

II. 実験結果ならびに考察

1. 肝臓のSuccinoxidaseおよびSuccinic Dehydrogenase

表1に示すように肝臓のsuccinoxidaseおよびsuccinic dehydrogenase活性に多少の変動があり，CI，CII群で活性の阻害，促進の傾向相反して，DES処理による一定の影響は認められなかつた．

ネズミではin vitroでこれら酵素がestrogenにより阻害されること[6,30]がしられてい

Table 1. Enzyme activities in tissues.

Group	CI				CII	
DES mg	0	0.1	0.5	1.0	0	0.5
Liver oxidases, Q_{O_2} μl/hr/mgN						
Succinoxidase	114	100	95	105	113	135
Succinic dehydrogenase	23	21	19	17	19	21
Tyramine oxidase	43	53	39	53	46	34
Choline oxidase	20	17	20	16	14	17
Liver phosphatases, S-J-R units						
Alkaline phosphatase	816	624	537	684	780	480
Acid phosphatase	420	318	441	468	430	441
Blood phosphatases, S-J-R units						
Alkaline phosphatase	8	13	10	—	7	6
Acid phosphatase	4	7	5	—	5	4
Liver esterase						
Decomp. activity	5.2	4.7	5.0	5.3	5.2	5.5
Decomp. %	11.3	10.0	10.6	11.4	11.2	11.8

るが，in vivo では明らかでない．DES 処理の大ヒナの肝臓ではこれら酵素の活性に明らかな阻害がみられずネズミの実験結果と異なることの一因として，筋注DESが肝臓では極めて低濃度まで稀釈されていることや肝臓における estrogen の不活化[11]が考えられる．

甲状腺除去のネズミで組織中 cytochrome 量が対照の 50 %となり，thyroxine 注射で正常値に戻ること，[12]また甲状腺除去のネズミの肝臓では TPNH - cytochrome c reductase 活性が低下し，thyroxine 投与で部分的に回復すること[36]がしられている．Succinoxidase 測定にあたり，甲状腺機能と関連させるために反応 medium に cytochrome c を補加せずに組織内 cytochrome c によつてのみ反応を進めたが，表示のように DES 区の活性は対照のそれと大差がみられなかつた．

2. 肝臓の Tyramine Oxidase

表1のように DES 処理は本酵素に対して一定の影響を示さなかつた．Tyramine oxidase は tyrosineの脱炭酸で生ずる tyramine の解毒に関係し，蛋白代謝の一指標となるものであるが，Kapeller-Adler[24] が精製 histaminase で示したような estrogen による活性増加は認められなかつた．

3. 肝臓の Choline Oxidase

Choline oxidase は choline を betaine aldehyde に酸化して choline のメチル基転位を容易ならしめてアミノ酸代謝に関係し，また choline の処理を通じて脂肪代謝に関係する．

Bernheim[2] はネズミの肝臓で choline oxidase がパルミチン酸，ステアリン酸，オレイン酸で阻害されることを in vitro で認め，[10] 脂肪肝での本酵素の活性低下はこれによると論じた．[18] Humoller[22] も高脂肪食による脂肝で同様に choline oxidase は脂肪酸に

より阻害された．しかし中性脂肪による阻害はみられず，酵素との接触不充分によると推測した．

実験Cのヒナの肝臓は DES 0.5, 1.0 mg 区では中性脂肪の増加が著しかつたが，表1のように choline oxidase 阻害は明らかでなかつた．

4. 肝臓の Phosphatase

Kochakian[27]は去勢マウスに DES 投与で肝臓の alkaline phosphatase が少しく増すことをみた．また去勢マウスで腎臓の alkaline phosphatase を減少し，acid phosphatase が増加することを認めた．[26]

表示のように DES 処理のヒナの肝臓では肝の alkaline phosphatase は活性低下の傾向がみられ，acid phosphatase は変りなかつた．

5. 血液 Phosphatase

Buchwald ら[4]は血清の acid phosphatase は estrogen で支配され，estrogen 欠（去勢，脳下垂体除去）で増し，その過剰で減少するとし，血清 alkaline phosphatase と estrogen との間には一定の関係が認められないとした．ヒナでは DES 投与によつて血中 phosphatase の増加があり，[28] Ca, P 代謝に関係ありとされた．しかし本回の条件下では表1のように DES 投与のヒナの血中 phosphatase に影響がみられなかつた．

6. 肝臓の Esterase

表示のように DES 処理のヒナで肝臓の esterase 活性は影響されなかつた．

7. 血清 PBI

血清PBI[35] (Protein-bound iodine) は大部分が thyroxine からなり，甲状腺機能との相関が認められ，[19,25,35] 循環ホルモンの有用な指標として用いられる．

表2のように実験A, B, Cを通じて血清 PBI 量は，異常値を含むが，DES 処理によつて甲状腺機能に変化を来したと認められる著変を示さなかつた．尤も最近 Bumgardner[5] によるとヒナでは血清 PBI は甲状腺機能の微小な変化を示すには感度が低いことを報じているからこの点も考慮する必要がある．

DES によるヒナの肥育効果は古くから間接的に甲状腺機能低下に基づくと推測され，甲状腺での I^{131} の turnover rate の減少結果もある[13]が，基礎代謝率低下について直接証明がない．[29,34]

ネズミでは DES 投与により脳下垂体，副腎，甲状腺を増大し，これに基礎代謝率の上昇を伴なつた．[20] 牛では DES 投与により，下垂体，副腎を増大したが，甲状腺の減重がしられている．[7]

DES 筋注のヒナでは表示のように甲状腺重はA群（1 mg区），B I 群でやや低下した．しかし長期投与の C群では増大の傾向があり，むしろ甲状腺機能を促すようにみえた．Selle ら，[43] Schultze ら[42]は thiouracil と DESもしくは dianisylhexene 投与のヒナで thiouracil 単用よりも甲状腺重を増大することをみたが，Schultze らは thyroxine 分泌の増加がなかつたことを報じている．

また血清 cholesterol 量は甲状腺ホルモンの脂質代謝への影響を示す指標の一つともなる．[19,25] 表示のように血清 cholesterol の甲状腺重に対応する変化は実験A，B群で明らかでなく，長期投与では相対応して増加するもの多く，むしろ甲状腺機能の低下を指示して

Table 2. Concentration of serum PBI and serum cholesterol, and weight of abdominal adipose leaf and endocrine organs.

Group		I				II	
DES mg		0	0.1	0.5	1.0	0	0.5
Concentration of serum PBI, γ/dl							
Expt.	A	1.6	2.1	1.8	1.2	—	—
	B	2.7	2.2	3.2	2.7	5.2	2.3
	C	2.1	1.0	—	2.1	1.2	1.0
Concentration of serum cholesterol, mg/dl							
Expt.	A	168	147	140	122	—	—
	B	135	177	127	143	104	87
	C	86	240	141	76	91	131
Weight of abdominal adipose leaf, g							
Expt.	A	1.7	1.9	3.0	4.1	—	—
	B	0.6	1.9	0.7	3.1	0.8	11.1
	C	1.2	1.6	48.3	19.6	1.2	30.0
Weight of endocrine organs, mg							
Expt. A	Thyroid	79	84	77	64	—	—
	Adrenal	101	89	86	83	—	—
	Anterior pituitary	7	8	6	6	—	—
Expt. B	Thyroid	147	137	128	127	111	113
	Adrenal	133	132	165	126	148	179
	Anterior pituitary	7	7	6	6	7	6
Expt. C	Thyroid	181	221	211	243	159	263
	Adrenal	158	160	150	201	187	147

いる．

一方体脂蓄積の指標としての腹腔脂肪組織の発達は表示のように各群でDESレベルに応じ，また投与期を増すにつれ著しく発達し，これに体脂の蓄積増加を伴なつていた．

これらから甲状腺重，血清PBI，血清コレステリンを指標とした場合，DES処理と甲状腺機能との間に一致した一定の関係は明らかにし得なかつた．従つてDESによる肥育効果は，甲状腺機能の抑制がこれに関与するとしても副次的なものと考えられる．

8. 血糖およびアセトン体

実験C群のヒナの血清について血糖，アセトン体を測定した結果は表3のとおりであつた．

Table 3. Concentration of blood sugar and acetone bodies.

Group		C I				C II	
DES mg		0	0.1	0.5	1.0	0	0.5
Blood sugar	mg/dl	128	129	140	111	129	133
Acetone	γ/ml	0.8	0.5	0.3	0.7	0.7	0.9
Acetoaeetic acid	γ/ml	4.5	2.4	3.8	5.6	4.1	4.7

DES 筋注は血糖量に著変を与えず，アセトン，アセト酢酸量は多少の変異が認められた．ケトン血，ケトン尿のレベルに影響する最大の生理的因子は性差であることがしられている．また各種ホルモンの支配をうける．

甲状腺機能を抑えると肝臓，腎臓のコレステリンを増し，この肝，腎スライスで基質の acetate の Qo_2 が減少しアセト酢酸の生成を増加することが認められ，[31]また下垂体除去のネズミの肝スライスによるケトン体生成は正常以下に低下するが，これは甲状腺機能の低下によるもので thyroxine で拮抗することが認められている．[3]

雄ヒナに DES 投与で血液，肝臓には多く産卵と関係深い生化学的変化がみられ一つの女性化が行なわれるが，本実験条件下では血糖，血中アセトン体に DES 投与による著変がみられなかつた．

9. 組織のビタミン A，B_2 量

表4に示すように実験AではDES処理により肝中A量に多少減少の傾向があつた．DES投与で成長量および肝重の変化を来すが，体重100 g 当肝A量については著変がなかつた．

腎中A量はやや，増加の傾向があり，脚肉中A濃度には大差がなかつた．

Table 4. Vitamin contents in tissues.

Group	I				II	
DES mg	0	0.1	0.5	1.0	0	0.5
Expt. A Vitamin A						
Liver I U/g	76.6	65.2	68.6	74.6	—	—
I U/Liver	1746	1492	1487	1862	—	—
I U/100g of bd. wt.	206	186	187	242	—	—
Kidney I U/g	1.08	1.55	1.21	1.55	—	—
I U/Kidney	6.40	11.28	7.42	10.93	—	—
I U/100g of bd. wt.	0.76	1.41	0.93	1.43	—	—
Leg muscle I U/g	0.330	0.352	0.290	0.384	—	—
Vitamin B_2						
Liver γ/g	19	14	17	15	—	—
γ/Liver	433	320	369	374	—	—
γ/100 g of bd. wt.	51	40	46	49	—	—
Kidney γ/g	21	19	24	26	—	—
γ/Kidney	125	138	147	183	—	—
γ/100 g of bd. wt.	14.7	17.3	18.5	23.9	—	—
Expt. B Vitamin A						
Liver I U/g	54.2	69.8	78.1	62.2	84.9	59.7
I U/Liver	1705	2041	1979	2042	2032	1626
I U/100g of bd. wt.	130	154	158	157	171	127
Kidney I U/g	1.53	2.02	1.53	2.36	2.04	2.21
I U/Kidney	12.15	16.44	13.40	21.15	15.22	17.30
I U/100g of bd. wt.	0.93	1.23	1.07	1.63	1.29	1.35
Vitamin B_2						
Liver γ/g	16	16	17	18	18	21
γ/Liver	403	408	431	591	431	572
γ/100g of bd. wt.	38	35	35	45	36	45
Leg muscle γ/g	1	2	1	2	1	1

肝中 B_2 量はやや低下し，腎中 B_2 量は増加の傾向があるが，その程度は大きくない．

実験Bでは DES 処理により肝中A量は BI 群で増加の傾向があるが，BII 群で減少した．腎中A量は対照と大差ないが実験Aと同様増加の傾向を示した．

肝および脚肉の B_2 量には変化がなかつた．

すなわち DES 注射により体内ビタミンA，B_2 量に多少の変異があり，肝Aは不定の変動を示すが，腎Aで増加の傾向があり，肉Aで変りなかつた．B_2 についても著変がみられなかつた．これら変化と DES レベルとの関係も明らかでなかつたが 1 mg 区で肝，腎のA，B_2 量は高くなる傾向を示した．DES 投与によつて血清A，B_2 の増加[8,9]がしられているが，組織ビタミンの変化は小であつた．

また Truscott[46]は雄マウスは去勢もしくは estrogen 投与により肝Aを増すとし，根本[32]は雌去勢マウスで estrogen 注射により肝，腎中Aを減少し，estrogen がA消費を高めると報じた．DES 筋注のヒナではこれらの関係は明らかでなかつた．

III. 要　　約

1. 60日，90日令の白色レグホン種雄ヒナについて diethylstilbestrol の 0.1, 0.5, 1.0 mg 隔日筋注を 20～140 日間行なつた．この間における肝臓，血液成分に対する DES の影響について研究した．

2. DES 処理により肝臓の succinoxidase, succinic dehydrogenase, tyramine oxidase, choline oxidase, esterase, ならびに血液 phosphatase 活性に著変が認められなかつた．肝臓の alkaline phosphatase では活性低下の傾向があつた．

3. 血清 PBI に著変がみられなかつた．甲状腺重，血清コレステリン，腹腔脂肪組織の発達からみると，DES の肥育効果に対して甲状腺機能は副次的な関係に立つと考えられた．

4. 血清中の血糖，アセトン体に著変がみられなかつた．

5. 肝臓，腎臓，脚肉でビタミンA，B_2 量の変化は僅小であつたが，DES 投与量の大なるものではこれらに増加の傾向がみられた．

終りに臨み終始御懇篤なる御指導を頂いた岩田久敬教授に深甚の謝意を表する．また実験に当り協力された菅野道広君に厚く御礼を申上げる．

参　考　文　献

1) Barker, S. B. et al. (1950), J. Clin. Endocr. & Med. **10**, 1136.
2) Bernheim, F. (1940), J. Biol. Chem. **133**, 291.
3) Bondy, P. K. et al. (1950), J. Biol. Chem. **186**, 245.
4) Buchwald, K. W. et al. (1945) Endocrinol. **37**, 301; (1947) **41**, 111.
5) Bumgardner, H. O. et al. (1957), Poultry Sci. **36**, 207.
6) Case, E. M. et al. (1948), Biochem. J. **43**, 481.
7) Clegg, M. T. et al. (1954), J. Animal Sci. **13**, 108.
8) Common, R. H. et al. (1946), Nature **158**, 95.
9) Common, R. H. et al. (1947) J. Endocr. **5**, 121; (1948) **5**, 263.
10) Connor, A. C. (1949), Surgery **25**, 510.
11) De Meio, R. H. et al. (1944), J. Biol. Chem. **156**, 577.

12) Drabkin, D. L. (1950), J. Biol. Chem. **182**, 335.
13) Epstein, D. I. et al (1949), Poultry Sci. **28**, 763.
14) 江上 等：標準生化学実験法 p. 38, 文光堂 (1953)
15) 藤井：生化学実験法（定量篇）p. 211, 南山堂（昭21）
16) 藤田：ビタミン定量法 p. 143, 298, 南江堂（昭30）
17) Gardner, S. H. (1949), Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **72**, 306.
18) Handler, P. et al. (1942), J. Biol. Chem. **144**, 401.
19) Handler, P. (1948), J. Biol. Chem. **173**, 295.
20) Hartsook, E. W. et al. (1957), Am. J. Physiol. **190**, 255.
21) Hawkins, J. (1952), Biochem. J. **50**, 577.
22) Humoller, F. L. et al. (1953), Am. J. Physiol. **174**, 199.
23) 児玉 等：化学実験学 **12**, 533, 河出書房（昭18）
24) Kapeller-Adler, R. (1951), Biochem. J. **48**, xxix.
25) Kennely, B. et al. (1952), J. Nutrition **49**, 599.
26) Kochakian, C. D. (1947), Recent Progress in Hormone Research **1**, 177.
27) Kochakian, C. D. et al. (1948), Am. J. Physiol. **155**, 262.
28) Laundauer, W. et al. (1941) Endocrinol. **28**, 458.
29) Mellen, W. J. et al. (1953), Poultry Sci. **32**, 994.
30) Meyer, R. K. et al. (1950), Recent Progress in Hormone Research, **5**, 465.
31) Mookerjea, S. et al. (1955), Endocrinol. **56**, 507.
32) 根木(1959), ビタミン**16**, 285.
33) Paschkis, K. C. et al. (1948), Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med. **68**, 485.
34) Perek, M. et al. (1945), Endocrinol. **36**, 240.
35) Perkin, M. et al. (1939), J. Clin. Invest. **18**, 733.
36) Phillips, A. H. et al. (1956), Biochem. et Biophys. Acta **19**, 380.
37) Rapport, L. R. et al. (1950), J. Clin. Endocr. & Metab. **10**, 735.
38) Reineke, E. P. et al. (1953), Fed. Proc. **12**, 114.
39) Rosenman, R. H. S. (1952), J. Clin. Endocr. & Metab. **12**, 1287.
40) 斉藤：光電比色計による臨床化学検査 p. 198, 南江堂（昭27）
41) Schneider, W. C. et al. (1943), J. Biol. Chem. **149**, 217.
42) Schultze, A. B. et al. (1945), Missouri Agr. Exp. St. Res. Bull. No. 392.
43) Selle, J. E. et al. (1948), Science **107**, 394.
44) Slater, E. C. (1949), Biochem. J. **45**, 1.
45) Strength, D. R. et al. (1953), J. Biol. Chem. **203**, 63.
46) Truscott, R. B. (1951), Endocrinol. **49**, 461.
47) 山本：ホルモン作用と酵素，南江堂 (1957)
48) Williams, J. N. Jr. (1952), J. Biol. Chem. **197**, 709.

Summary

White Leghorn male chicks of 60 and 90 days of age were intramuscularly injected each other day with diethylstilbestrol (DES) at levels of 0.1, 0.5 and 1.0 mg for 20 to 140 days, as already reported in detail in my previous report.

Some biochemical effects of DES on the liver and blood of those chicks were studied and the following results were obtained.

1. Activities of succinoxidase, succinic dehydrogenase, tyramine oxidase, choline oxidase and esterase of the liver and phosphatase of the blood showed no marked change with the DES injection. It showed some decreasing tendency of activity of alkaline phosphatase in the liver.

2. Concentration of serum PBI of the chicks was not altered noticeably

with the DES injection.

3. Concentration of blood glucose showed no change, and that of acetone bodies showed some variable results in serum of the chicks injected with DES.

4. Concentration of vitamins A and B_2 in the liver, kidney and muscle varied slightly. It appeared to increase them in some degree in the tissues of the chicks injected on high level of the hormone.