新しいドパミン作動薬を用いた
プロラクチン分泌調節機構の解析

太田昭彦

(1)

新しいドパミン作動薬を用いた
プロラクチン分泌調節機構の解析

東京大学大学院農学系研究科
畜産獣医学専門課程博士課程
太田昭彦

指導教官
東京大学教授
高橋迪雄

目次

第１章　下垂体ＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の直接作用　1

Ⅰ　はじめに　2

Ⅱ　材料と方法　6

１．動物　6

２．下垂体前葉細胞の浮遊化と培養　6

１）下垂体前葉細胞の浮遊化　6

２）細胞数および生存率の測定　7

３）下垂体前葉細胞の培養　7

３．静置培養　8

１）インキュベーションメディウムの調整　8

２）インキュベーション　9

４．ＰＲＬの測定　9

５．統計　9

Ⅲ　結果　１０

１．下垂体培養細胞のＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の影響　１０

２．ハロペリドールの下垂体培養細胞のＰＲＬ分泌に対する影響　１０

３．ＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制に対する
ハロペリドールの効果　１１

４．ＤＡ、アポモルフィンのＰＲＬ分泌抑制に対する
ＯＰＣ－４３９２の効果　１１

IV　考察　12

図表　18

第２章　Superfusionを用いたＯＰＣ－４３９２の
　　ＰＲＬ分泌動態に対する検討　27

Ｉ　はじめに　27

II　材料と方法　31
　1．マイクロキャリアの調整　31
　2．細胞の浮遊化とマイクロキャリアへの付着　31
　3．灌流液の調製　32
　4．Superfusion　32
　5．ＰＲＬの測定　34

III　結果　35
　1．Superfusion法による下垂体培養細胞のＰＲＬ分泌に及ぼす
　　ＯＰＣ－４３９２、ＤＡ、ＣＢ－１５４の効果　35
　　1）予備的検討　35
　　2）ＯＰＣ－４３９２　10^{-5}ＭのＰＲＬ分泌に対する影響　35
　　3）ＤＡ10^{-5}ＭのＰＲＬ分泌に対する影響　36
　　4）ＣＢ－１５４　10^{-5}ＭのＰＲＬ分泌刺激に対する影響　36

2．ＯＰＣ－４３９２、ＤＡ、ＣＢ－１５４のＴＲＨによる
ＰＲＬ分泌刺激に対する影響　３６

Ⅳ　考察　３８

図表　４２

第３章　生体におけるＯＰＣ－４３９２による
ＰＲＬ分泌調節系の解析

Ⅰ　はじめに　５１

Ⅱ　材料と方法　５６
1．動物　５６
2．他家下垂体移植ラット（isograftラット）の作出　５６
3．自家下垂体移植ラット（autograftラット）の作出　５７
4．偽妊娠ラットの作出　５７
5．レゼルピン投与ラット　５７
6．正常雄ラット、レゼルピン投与ラット、isograftラット、
autograftラットへのＯＰＣ－４３９２あるいは３－ｐｐｐ
の投与　５７
7．偽妊娠ラットへのＯＰＣ－４３９２、ＣＢ－１５４の投与　５９
8．採血　６０
9．ホルモン測定　６０
１０．統計　６０

III　結果　61
1．正常雄ラットの血中ＰＲＬ濃度に対する
ＯＰＣ－４３９２の効果　61
1）ＯＰＣ－４３９２の経口投与、断頭採血による
ＰＲＬ濃度への効果　61
2）ＯＰＣ－４３９２の静脈内投与、尾静脈採血による
血中ＰＲＬ濃度への効果　61
2．レゼルピン投与正常雄ラットにおけるＯＰＣ－４３９２の
血中ＰＲＬ濃度に対する効果　62
3．下垂体移植ラットにおけるＯＰＣ－４３９２、３－ｐｐｐの
血中ＰＲＬ濃度に対する効果　62
1）Autograftラットにおけるｏｐｃ－４３９２の
血中ＰＲＬ濃度に対する効果　63
2）Autograftラットにおける３－ｐｐｐの
血中ＰＲＬ濃度に対する効果　63
3）Isograftラットにおけるｏｐｃ－４３９２の
血中ＰＲＬ濃度に対する効果　64
4）レゼルピン投与isograftラットにおける
ＯＰＣ－４３９２の血中ＰＲＬ濃度に対する効果　64
4．ＯＰＣ－４３９２あるいはＣＢ－１５４の
偽妊娠維持に対する影響　65
5．偽妊娠ラットにおけるＰＲＬダイアーナルサージ、
ノクターナルサージに対するＯＰＣ－４３９２の効果　65
1）ダイアーナルサージに対するＯＰＣ－４３９２の効果　66
2）ノクターナルサージに対するＯＰＣ－４３９２の効果　66

IV　考察　68

図表　79

第4章　総括　93

謝辞　99

文献　100

第１章下垂体ＰＲＬに対する
ＯＰＣ－４３９２の直接作用

Ⅰ．はじめに

下垂体前葉からは、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）甲状腺刺激ホルモン（ＴＳＨ）、副腎皮質刺激ホルモン（ＡＣＴＨ）、成長ホルモン（ＧＨ）、プロラクチン（ＰＲＬ）の少なくとも６種のホルモンが分泌されている。in vitroで下垂体前葉を培養すると他の下垂体前葉ホルモンとは異なりＰＲＬ分泌は昂進すること（Pasteels, 1961）、ラット下垂体前葉を腎被膜下に移植すると移植下垂体からのＰＲＬ分泌の増大によって偽妊娠が成立すること（Everett et al., 1954）、視床下部と下垂体を連絡する下垂体柄の切断（Kanematsu and Sawyer, 1973）、視床下部腹内側核の破壊（Butler et al., 1975）によって血中ＰＲＬ濃度の上昇がみられること、視床下部抽出物中にＰＲＬ分泌抑制活性があること（Talwalker et al., 1963）等より、ＰＲＬ分泌は、他の下垂体ホルモンとは異なり、中枢（視床下部）からの分泌抑制支配を受けていることが示される。隆起漏斗系ドパミン（ＴＩＤＡ）ニューロンは、弓状核の神経細胞体より正中隆起外層に線維を延ばし、下垂体門脈周囲に神経終末をつくる（Fuxe, 1963）。下垂体門脈には他の末梢血に比べて高濃度のドパミン（ＤＡ）が存在すること（Ben-Jonathan et al., 1977）、α－メチルｐ－チロシンを投与して、ＤＡ合成を阻止すると脳内ＤＡは減少し、血中ＰＲＬ濃度が上昇するが、この上昇は生理的濃度のＤＡである程度抑制できること（Gibbs and Neill, 1978）、in vitroでも門脈で認められるものに相当する濃度のＤＡで下垂体からのＰＲＬ分泌を減少させられること（Shaar and Leheyer, 1974）、ＤＡレセプターが下垂体前葉に存在すること（Caron et al., 1977; Cronin et al., 1978）、ラット乳房神経の電気刺激によってＰＲＬ分泌を上昇させた際に、門脈中のＤＡ濃度が低下すること等（Neill, 1980）から、視床下部ＰＲＬ放出抑

制因子（ＰＩＦ）の主体は、ＤＡであり、ＰＲＬ分泌調節においてＤＡが第１義的役割をもっているものと考えられている(Ben-Jonathan,1985)。

一方、ＤＡニューロンは、ＴＩＤＡニューロン以外にも広く脳内に分布し(Hokfelt et al., 1984)、運動機能や、情動等の精神活動に重要な役割を果たしているとされる（田中と白川,1985）。また、ＤＡレセプターは、脳内や、下垂体以外にも副甲状腺(Brown et al.,1980)、血管系(Brodde,1982)、消化管(Kusunoki et al.,1985)等に分布し、それらの器官の生理作用に対してＤＡが関与していることが示唆されている。

ＤＡレセプターにはサブタイプが存在し、現在広く受け入れられているKebabianとCalne(1979)による分類では、アデニレートサイクラーゼ活性に促進的に共役しているものをＤ１レセプター、アデニレートサイクラーゼ活性に無関係または、抑制的に共役しているものをＤ２レセプターとしている。また、神経細胞における局在と機能によって、ＤＡニューロン自身に存在し、ＤＡニューロンの活動をショートフィードバック的に抑制するオートレセプターとＤＡニューロンがシナプスするニューロンに存在するシナプス後レセプターとに分類される（Roth,1979）。

抗精神病薬の多くがＤＡアンタゴニストであり、とくにＤ２レセプターとの親和性と薬効との間に高い相関が認められ（Seeman,1981）、精神分裂病のＤＡ仮説（Van Rossum,1966; Losonczy et al.,1987; Seeman P,1987）が支持されている。すなわち、中脳辺縁系および中脳皮質系ＤＡニューロンの異常な活動により分裂病が誘起され、抗精神病薬が、これらの部位のシナプス後Ｄ２レセプターにおいて ＤＡに拮抗することで症状が改善するものとされている。一般の抗精神病薬は、他の部位のＤＡレセプターにも作用を及ぼし、黒質線条体への作用によっては、錐体外路系副作用、いわゆるパーキンソン病様症状や、下垂体へのＤＡアンタゴニスト作用によっては、高ＰＲＬ血症による乳漏症、不

妊症などの副作用を起こすことが知られている（Richelson, 1980; Kannan, 1987）。

7-{3-[4-(2,3-dimethylphenyl)piperadinyl]propoxy}-2(1H)-quinolinone（ＯＰＣ－４３９２）は、Ｄ２レセプターに選択性を持ち、オートレセプターには、アゴスニトとして、しかしシナプス後Ｄ２レセプターにはアゴニストとして作用せず、むしろアンタゴニストとして作用すること（Kiuchi et al., 1987; Yasuda et al., 1988）、すなわち、主にＤＡニューロンそのものの活動を抑制させるという新しい考えをもとに抗精神病薬として開発中の薬剤である。血中ＰＲＬ濃度上昇と抗精神病としての薬効にも強い相関が認められるとの報告（Meltzer and Fang, 1976; Langer et al., 1977）もあり、ＯＰＣ－４３９２が、ＰＲＬ分泌にどの程度影響を及ぼすかは、臨床上極めて重要な問題であり、開発者はこの問題に強い関心を寄せた。

一般に、ＤＡアゴニストは、in vivo、in vitroで下垂体のＰＲＬ分泌を低下させ、一方、ＤＡアンタゴニストは、in vivoで血中ＰＲＬ濃度を上昇させ、in vitroでは、ＤＡによる下垂体細胞のＰＲＬ分泌抑制に拮抗する。これらのことは、ＤＡがＰＲＬ分泌をＤＡレセプターを介して制御していることの間接的な証拠でもあり、またこれらの薬剤がＰＲＬ分泌機序の解析や、ＰＲＬそのものの生理作用の解明に大きく貢献してきた由縁である(Dohler and Wittke, 1974; MacLoad, 1976; Gudelsky and Porter, 1980)。

著者は、従来のＤＡアゴニストや、ＤＡアンタゴニストにはみられない性質をもったＯＰＣ－４３９２を利用することによってＤＡ支配ＰＲＬ分泌制御機構に対する新しい知見が得られるのではないかと考えた。さらに、仮に、報告されているように、ＯＰＣ－４３９２が脳内のＤＡオートレセプターとシナプス後Ｄ２レセプターに対して全く逆の効果を示すという特異性を保有するならば、このことにより下垂体ＤＡレセプターの性質をより詳しく検討することが

できると考えた。

以上の背景により、以下第１章では下垂体前葉細胞の単層培養において、ＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の影響をＤＡアゴニスト、アンタゴニストと比較しつつ検討を加え、さらに、ＤＡアゴニスト、ＤＡアンタゴニストとＯＰＣ－４３９２を共存させて下垂体細胞に作用させそれらの相互作用をも含めた結果より、ＯＰＣ－４３９２の下垂体細胞のＰＲＬ分泌に対する直接効果と、下垂体ＤＡレセプターの特性について検討した。

II 材料と方法

1．動物

当教室で継代繁殖したウィスター・イマミチ系雄ラット（３～５カ月令）を用いた。動物は室温２３±１℃、１４時間明、１０時間暗、（５時～１９時点灯）の光条件下で飼育し、飼料（オリエンタル実験動物固形飼料ＭＦ）と水は自由に摂取させた。

2．下垂体前葉細胞の浮遊化と培養

1）下垂体前葉細胞の浮遊化

コラゲナーゼを主体とする方法（Shiota et al.,1984）で細胞の浮遊化を行なった。細胞の浮遊化に用いたガラス器具は、細胞のガラス表面への付着を防ぐため全てSigmacoat（Sigma)によってシリコンコート処理したものを用いた。動物を断頭後、クリーンベンチ内で頭部より下垂体前葉を取り出し、バファーＡ［１３７mM　ＮａＣｌ，５mM　ＫＣｌ，0.7mM　Na_2HPO_4，２５mM　ＨＥＰＥＳ（Sigma），５０μｇ／ｍｌ　硫酸ゲンタマイシン（Sigma）ｐＨ７.３］の入った小ペトリ皿に保存した。必要数の下垂体（下垂体１個で約２×１０^{6}個の細胞を得ることができる）を採取した後、下垂体を、約１ｍｍ^{3}に細切し、バファーＡで洗浄し、以下の２段階の酵素処理を行なった。バファーＡにコラゲナーゼ（Sigma,Type Ⅰ）４０ｍｇ、ＢＳＡ(Sigma. Essentially Fatty Asid Free A6003)４０ｍｇ、ＤＮａｓｅ（Sigma）１００μｇ、グルコース　２０ｍｇを加えた酵素液Ⅰ（１０ｍｌ）に下垂体片

を入れ、おだやかに撹拌しながら３７℃、１時間インキュベーションした。インキュベーション終了時に、ピペットで気泡を生じさせないように注意しながら、下垂体片の入った酵素液の吸入排出を繰り返し組織片を分散させたのち、室温で４８０×ｇで６分間遠沈した。上清を除去した後、下垂体細胞ペレットにバファーＡに１０％Viokase（Gibco）を加えた酵素液Ⅱ（１０ｍｌ）を加え、ピペットで再懸濁させた後、おだやかに撹拌しながら３７℃、８分間インキュベーションした。インキュベーション終了後、牛胎仔血清（Gibco）２ｍｌを加えて酵素反応を止め、４８０×ｇ、６分間遠沈した。上清を捨て下垂体細胞ペレットにメディウムⅠ［Dulbecco's Modified Eagle Medium(ＤＭＥＭ,Gibco)、１０％牛胎仔血清(Gibco)、３.７ｇ／ｌ$NaHCO_3$、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、５０Ｕ／ｍｌペニシリン（萬有製薬）、５０μｇ／ｍｌストレプトマイシン（明治製菓）ｐＨ７.３］を加えて懸濁し、５ｍｌディスポーザブルシリンジの先を切断し、切断面にナイロンメッシュ（１５０Ｘ－Ｔ２）を取り付けた濾過器で濾過後、遠沈、上清除去、メディウムⅠを加え懸濁する操作を２回繰り返し、最後に１０ｍｌのメディウムⅠに細胞を懸濁させ０.１ｍｌを細胞数ならびに生存率の測定に用い、残りを培養に供した。

２）細胞数および生存率の測定

Dye exclusion testによる細胞数ならびに生存率に測定を行なった。細胞浮遊液０.１ｍｌに同量の０.２％トリパンブルー生理食塩水溶液を加え混合し、１５分後に顕微鏡下で血球計算盤を用い、細胞質が染色されていないことをもって生存細胞と判定し、生存細胞数を算定した。生存率は９０％以上であった。

３）下垂体前葉細胞の培養

浮遊化した細胞は、5×10^5生細胞／ｍｌとなるようにメディウムⅠで希

釈し、直径３５ｍｍのプラスチック製培養皿（Falcon）に１ｍｌずつ分注し、CO_2インキュベーターで、湿度１００％、３７℃、５％CO_2－９５％ａｉｒで培養した。培養開始後３日目で１ｍｌのメディウムＩで培養液の交換を行なった。

以上の下垂体前葉細胞の浮遊化と培養方法をフローチャートとしてＦｉｇ．１－１に示した。

３．静置培養

１）インキュベーションメディウムの調製

Dopamine-hydrochloride（ドパミン　ＤＡ）（Sigma）は、１％アスコルビン酸を加えた生理食塩水に、ブロモクリプチン（ＣＢ－１５４）（Sandoz）は、３％酒石酸に、7-{3-[4-(2,3-dimethylphenyl)piperadinyl]propoxy}-2(1H)-quinolinone,（ＯＰＣ－４３９２、大塚製薬より供与）、　ハロペリドール（Sigma）は、０．１Ｍ乳酸に、また3-(3-hydrophenyl)-N-n-propilpidine（３－ｐｐｐ）（大塚製薬より供与）、アポモルフィン(Sigma)、は生理食塩水に10^{-3}～10^{-4}Ｍの濃度で各々実験直前に溶解しstock-solution とした。ＯＰＣ－４３９２についてはＦｉｇ．１－２に構造式を示した。これらのstock-solutionを、２０ｍＭ HEPES、$NaHCO_3$ ３．７ｇ／ｌを加えたＤＭＥＭ ｐＨ7.3（メディウムII）で必要濃度に希釈し、インキュベーションメディウムとした。試薬の溶解に用いた有機酸のインキュベーションメディウム中の最終濃度は、アスコルビン酸０．０１％、乳酸０．００２％、酒石酸０．００３％とした。

2）インキュベーション

細胞を４日間培養した。培養皿より培養液を取り除きメディウムII２ｍｌを培養皿にいれ、培養皿を緩やかに水平に２～３回回転した後メディウムIIを取り除く作業を３回繰り返し培養皿に付着した細胞を洗浄した。インキュベーションメディウム１ｍｌを培養皿に入れ、３７℃、５％CO_2－９５％ａｉｒで３時間インキュベーションした。インキュベーション後のメディウムはＢＳＡでコートした試験管に回収し、インキュベーション中にわずかに剝離してくる細胞を除去するため４８０×ｇで遠沈し、上清をホルモン測定時まで－２０℃で凍結保存した。

4．ＰＲＬの測定

ＰＲＬのラジオイムノアッセイの概要をＦｉｇ．１－３に示した。標識ホルモンには、ラクトパーオキシダーゼ法によりヨード化させたＮＩＡＤＤＫ－ｒＰＲＬ－Ｉ－５を、標準ホルモンとしてＮＩＡＤＤＫ－ｒＰＲＬ－ＲＰ－３を用い、測定ごとに毎回スタンダードカーブを作製した。

5．統計

平均値の差の検定は、Student's t testによって行い危険率５％以内をもって有意水準とした。

III. 結果

1. 下垂体培養細胞のＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の影響

下垂体のＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の直接効果をＤＡ、およびＤＡアゴニストであるＣＢ－１５４、３－ｐｐｐと比較しつつ検討した（Ｆｉｇ．１－４）。

その結果、ＣＢ－１５４は、10^{-10}Ｍの濃度でＰＲＬ分泌を基礎分泌（薬剤無添加）の８４．７±３．０％、10^{-9}Ｍで３３．３±１．５％、10^{-8}Ｍで１９．５±１．９％まで減少させた。３－ｐｐｐ、ＤＡも10^{-9}Ｍより用量依存的にＰＲＬ分泌を抑制し、10^{-6}Ｍの３－ｐｐｐおよびＤＡでそれぞれ１３．１±４．４％、９．８±１．４％までＰＲＬ分泌は減少した。ＯＰＣ－４３９２は、ＰＲＬ分泌を10^{-8}Ｍの濃度で基礎分泌の５０．９±３．９％に減少させ、10^{-7}Ｍで２３．８±１．０％まで減少させた。したがって、ＯＰＣ－４３９２は、他のＤＡアゴニストと同様に下垂体に対して用量依存的にＰＲＬ分泌を抑制する作用のあることが示された。またこれらの薬剤のＰＲＬ分泌抑制に対する半最大有効濃度（ＥＣ５０）は、おおよそＣＢ－１５４で2×10^{-10}Ｍ、３－ｐｐｐで3×10^{-9}Ｍ、ＤＡで8×10^{-9}Ｍ、ＯＰＣ－４３９２で6×10^{-9}Ｍであった。

2. ハロペリドールの下垂体培養細胞のＰＲＬ分泌に対する影響

ハロペリドールを下垂体培養細胞に作用させた結果（Ｆｉｇ．１－５）、10^{-9}Ｍから10^{-6}Ｍの濃度ではＰＲＬ分泌に対しては影響を与えなかったが、

10^{-5}Mにおいて基礎分泌（ハロペリドール無添加）に比べて有意にＰＲＬ分泌を抑制した（２２０７．１±８７．４ｎｇ／ｍｌ　ｖｓ　７６９．２±４９．２ｎｇ／ｍｌ）。ＤＡレセプターブロッカーとされるハロペリドールにおいても下垂体ＰＲＬ分泌に対して高濃度では抑制作用が認められることが示された。

３．ＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制に対するハロペリドールの効果

ＯＰＣ－４３９２と前節に示されたＰＲＬ分泌に影響を与えない濃度（10^{-9}～10^{-6}Ｍ）のハロペリドールを共存させて、下垂体培養細胞に作用させＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制がＤＡアンタゴニストのハロペリドールによって阻害されるか否かを検討した（Ｆｉｇ．１－６）。

その結果、10^{-9}～10^{-6}Ｍのハロペリドールとの共存によって、ＰＲＬ分泌抑制曲線はハロペリドールの用量が増加するにつれてに右上方にシフトし、ＯＰＣ－４３９２によるＰＲＬ分泌抑制効果をハロペリドールが阻害することが示された。

４．ＤＡ、アポモルフィンのＰＲＬ分泌抑制に対するＯＰＣ－４３９２の効果

ＤＡ自体あるいは、ＤＡアゴニストのアポモルフィンとＯＰＣ－４３９２を共存させて下垂体培養細胞に作用させ、ＰＲＬ分泌抑制効果に対する影響を調べ、ＯＰＣ－４３９２がＤＡアンタゴニスト作用を発現するか否かを検討した（Ｆｉｇ．１－７）。

その結果、ＤＡ10^{-7}ＭによるＰＲＬ分泌の抑制は、ＯＰＣ－４３９２$10^{-10}$Ｍ～10^{-9}Ｍの共存によっては、影響を受けなかった。しかしながら、

ＯＰＣ－４３９２それ自身がＰＲＬ分泌を抑制する濃度である３×１０$^{-9}$Ｍ、１０$^{-8}$ＭとＤＡ１０$^{-7}$Ｍと共存させると、ＰＲＬ分泌は各々、３５９．２±２６．９ｎｇ／ｍｌ、３５７．２±２０．４ｎｇ／ｍｌとＤＡ１０$^{-7}$Ｍ単独でのＰＲＬ分泌量（２３７．２±２０．６ｎｇ／ｍｌ）に比べ有意に高い値を示した（Ｆｉｇ．１－７）。一方、アポモルフィン１０$^{-8}$Ｍで抑制されたＰＲＬ分泌は１０$^{-10}$～１０$^{-9}$ＭのＯＰＣ－４３９２の共存によっては変化をひき起こさなかった（Ｆｉｇ．１－８）。

IV. 考察

ＤＡレセプターは、行動、神経化学的に、あるいは単一神経細胞からの電気的反応によって分析されてきたが、現在はその局在、機能等によりＤＡニューロンに存在し、ＤＡニューロンの活動に対して、抑制的に作用する自己レセプター（オートレセプター）と、ＤＡニューロンのシナプス後ニューロンに存在し、ＤＡを受容するシナプス後レセプターに分類される（Roth,1979）。また、細胞内２次メッセンジャー系の共役の仕方と薬理学的な性質という観点に立って、アデニレートサイクラーゼ活性に対して、促進的に共役するレセプターをＤ１レセプター、共役しないかむしろ抑制的に共役するレセプターを、Ｄ２レセプターとして分類することもある（Kebabian and Calne,1979）。オートレセプターはＤ２レセプターに属するとされ、シナプス後レセプターは、Ｄ１とＤ２レセプター両者が存在する（Stoof and Kebabian,1984）。下垂体細胞（ＰＲＬ分泌細胞、あるいは少なくともＰＲＬ分泌細胞が含まれる集団と考えられる）の、基礎レベル（Enjalbert and Bokaert, 1982）、及びVasoactive intestinal polypeptide（ＶＩＰ）（Onalli et al.,1981）で刺激したアデニレートサイクラーゼ活性はＤＡによって抑制されることが知られており、これらのことから、下垂体ＤＡレセプターはＤ２レセプター分類され、ＰＲＬ分泌は、アデニレートサイクラーゼ活性を抑制することによって抑制されるのではないかと考えられている(Barnes et al.,1978: Swennen and Denef,1982)。
一方、ＯＰＣ－４３９２は、オートレセプターにはアゴニストとして、シナプス後Ｄ２レセプターにはアンタゴニストとして働くとされており、下垂体ＤＡレセプターは、ＴＩＤＡニューロンのいわば「後」に存在するので、シナプス後Ｄ２レセプターの性質を持つことも予想される。従って、もしそうであれば

ＯＰＣ－４３９２は下垂体にはアンタゴニストに作用し、それ自身では、in vitro下垂体細胞のＰＲＬ分泌に影響を与えないことが予想された。

しかしながら、ＯＰＣ－４３９２は、下垂体細胞のＰＲＬ分泌に対して、ＤＡアゴニストであるＣＢ－１５４よりは弱いもののＤＡと同じオーダーの抑制曲線を示し、ＰＲＬ分泌を用量依存的に強く抑制した（Ｆｉｇ．１－４）。また、ＰＲＬ分泌に影響を与えない濃度のＤＡアンタゴニストであるハロペリドールを共存させると、ＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制効果は明らかに阻害を受け（Ｆｉｇ．１－６）、ＯＰＣ－４３９２は下垂体ＤＡレセプターに対してアゴニスティックに作用しているものと考えられた。但し、典型的なＤＡアンタゴニストであるハロペリドール（Andén et al.,1966）も高濃度においてはＰＲＬ分泌を抑制することが認められ（Ｆｉｇ．１－５）、これは、下垂体ＤＡレセプターを介した作用であると考えられた。このことは後で議論する。

また、ＤＡアゴニストのアポモルフィン10^{-8}Ｍの下垂体ＰＲＬ分泌抑制に対しては、ＯＰＣ－４３９２は、たとえ高濃度を負荷したとしても全く影響を与えなかった（Ｆｉｇ．１－８）。つまり、アポモルフィンのアゴニスト作用が発現しているような条件では、ＯＰＣ－４３９２は、何等の効果を発現し得ないことから、ＯＰＣ－４３９２は単独ではアゴニスティックに作用していることが示唆された。以上のことより、予期に反し、ＯＰＣ－４３９２は下垂体ＤＡレセプターに対してはアンタゴニスト作用を示さないことが明かとなった。

ハロペリドールは、ＤＡアンタゴニストであり、Ｄ１レセプターよりも Ｄ２レセプターに親和性が高い（寺井ら,1984）薬剤である。ハロペリドールにより、in vitroでＤＡあるいは、ＤＡアゴニストによるＰＲＬ分泌抑制が阻止されることが知られており(MacLoad,1976)、またin vivoにおいてもハロペリドールの投与によって血中ＰＲＬ濃度が上昇することが知られている（Dickerman et al.,1972)、さらに、放射性リガンドを用いた研究によってハロペリドールが下

垂体に対して特異的な結合部位を持つことが示され、結合したハロペリドールは他のＤＡリガンドにより競合的に排除されることも示されている(Calabro and MacLoad, 1978)。これらのことより、ハロペリドールによるＤＡおよびＤＡアゴニストのＰＲＬ分泌抑制の阻止作用は、ハロペリドールの下垂体ＤＡレセプターへの結合によってＤＡ、ＤＡアゴニストのレセプターへの結合が阻害されることによって起こると考えられる。ハロペリドールは、濃度依存的にＯＰＣ－４３９２の下垂体細胞のＰＲＬ分泌抑制曲線を右にシフトさせる傾向を示した（Ｆｉｇ．１－６）。このことは、ＯＰＣ－４３９２がＤＡレセプターに結合するのをハロペリドールが競合的に阻害した結果であることを強く示唆する。

オートレセプターアゴニストといわれている３－ｐｐｐ（Hjorth et al., 1981）を用いて培養下垂体細胞のＰＲＬ分泌を調べたところ、用量依存的にこれを抑制した（Ｆｉｇ．１－４）。

このことと、ＯＰＣ－４３９２がオートレセプターアゴニスト－シナプス後Ｄ２レセプターアンタゴニストとしての薬理学的特性が示唆されていること（Yasuda et al., 1988）と考え併せると、下垂体ＰＲＬ分泌細胞膜上に存在するＤＡレセプターは、ＤＡニューロンの「後」部位にあるのにもかかわらず脳内に存在するシナプス後Ｄ２レセプターよりは、むしろ、オートレセプターと共通した特性を持つことが強く示唆された。オートレセプターは、シナプス前膜以外にも、神経細胞体、樹状突起などのＤＡ放出部位から離れたところにも存在するとされ（Roth, 1979）、比較的低濃度のＤＡに反応することが要求される。下垂体ＤＡレセプターも正中隆起外層のＤＡ分泌神経終末よりはるかに離れた位置に存在する。従って下垂体ＤＡレセプターは、シナプス構造内に存在するシナプス後ＤＡレセプターに比べれば、相対的に低い濃度のＤＡで反応しなければならない。ＤＡアゴニストであるアポモルフィンは、電気生理学的

(Skirboll et al.,1979)、行動学的(Strömbom,1975)および神経化学的に低濃度においてオートレセプターに対しアゴニストの作用を示し高濃度でシナプス後ＤＡレセプターアゴニストの作用を示すといわれている（Goodale et al.,1980)。少なくとも、下垂体門脈血に存在する程度の濃度によってドパミン性の調節を行なうためには、その親和性からいって、下垂体のＤＡレセプターがオートレセプター類似のものであることは合目的的であろう。

ハロペリドールの濃度を上げたときにＰＲＬ分泌が抑制されること（Ｆｉｇ．１－４）、ＤＡのＰＲＬ抑制効果が高濃度のＯＰＣ－４３９２でわずかではあるが、阻害されること（Ｆｉｇ．１－７）、しかし、アポモルフィンのそれは阻害されないこと（Ｆｉｇ１－８）は、下垂体ＤＡレセプターの性質を間接的に表現している結果と考えられる。ＤＡレセプターが、複数存在するとするのも一つの考えではあるが、むしろ将来このレセプターの性質、あるいは物質としての解析が進展すればかりにレセプター分子が一種類であっても、合理的に理解され得る現象なのかも知れない。

以上により、ＯＰＣ－４３９２は、下垂体ＰＲＬ分泌にたいして殆どＤＡアンタゴニスト作用を示さず、下垂体ＰＲＬ分泌を強く抑制すること、さらにＤＡアンタゴニストハロペリドールによってその抑制が拮抗されることより、下垂体ＤＡレセプターに対してアゴニストとして作用することが示され、下垂体ＤＡレセプターはオートレセプターの特性を持つものと推定された。

また、ＯＰＣ－４３９２は、脳内ＤＡ活性に対しては抑制的に、下垂体ＤＡ活性に対しては促進的に働くことになり、従来のＤＡアゴニストやアンタゴニストとは異なる新しいタイプの化合物であることが明かとなり、ＰＲＬ分泌機序における、ＤＡ系支配を解析する手段として非常に有用であることが示唆された。そこで、第２章において、superfusion（細胞表面灌流）系をもちいてＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対する動的な解析を加え、その特性についてさ

らに検討を加える。

第 1 章　　図表

Procedure for dissociation of pituitaries

anterior pituitaries

↓ wash with buffer A

cut into $1mm^3$ pieces

↓ wash twice with buffer A

↓ add 10ml of enzyme solution I

incubation with shaking at 37℃ for 60min

↓

centrifuge at 480×g for 6min

↓ discard supernatant

↓ add 10ml of enzyme solution II

incubation with shaking at 37℃ for 8min

↓ add 2ml of fetal calf serum

centrifuge at 480×g for 6min

↓ discard supernatant

suspend sedimented cells with 10ml of medium I

↓ wash cells twice with medium I

↓ cell count

dilute to 5×10^5 cell/ml in medium I

and distribute into culture dishes

Fig. 1－1

下垂体前葉細胞の浮遊化のフローチャート

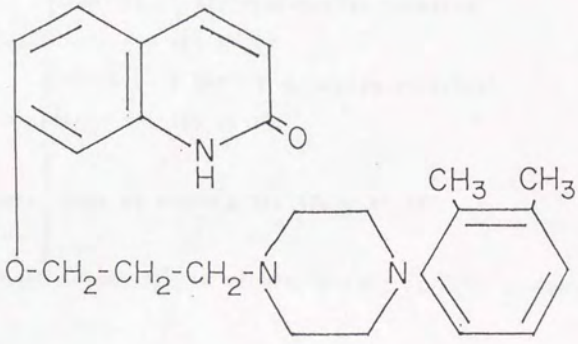


Fig. 1－2

ＯＰＣ－４３９２の化学構造式

Radioimmunoassay for rat PRL

100μl sample or standard hormone

↓ Add 500μl assay buffer[1]

200μl anti-ratPRL solution[2]

Incubation for 24h at 4℃

↓ Add 100μl 125I-labeledPRL solution[3]

Incubation for 48h at 4℃

↓ Add 200μl anti-γ-globulin solution[4]

Incubation for 48h at 4℃

↓

Centrifuge at 1300×g for 20min at 4℃

↓

Count radioactivity of precipitate by Auto γ Spectrometer

1) 0.01M phosphate buffered saline (PBS) containing 0.1%NaN_3 and 1%BSA

2) anti-ratPRL solution containing 50mM EDTA and 1%nomal rabbit serum

3) 125I-ratPRL 10000 cpm/0.1ml of assay buffer

4) anti-[rabbit γ-globulin] goat serum diluted 1:30 with PBS

Fig. 1－3

PRLラジオイムノアッセイのフローチャート

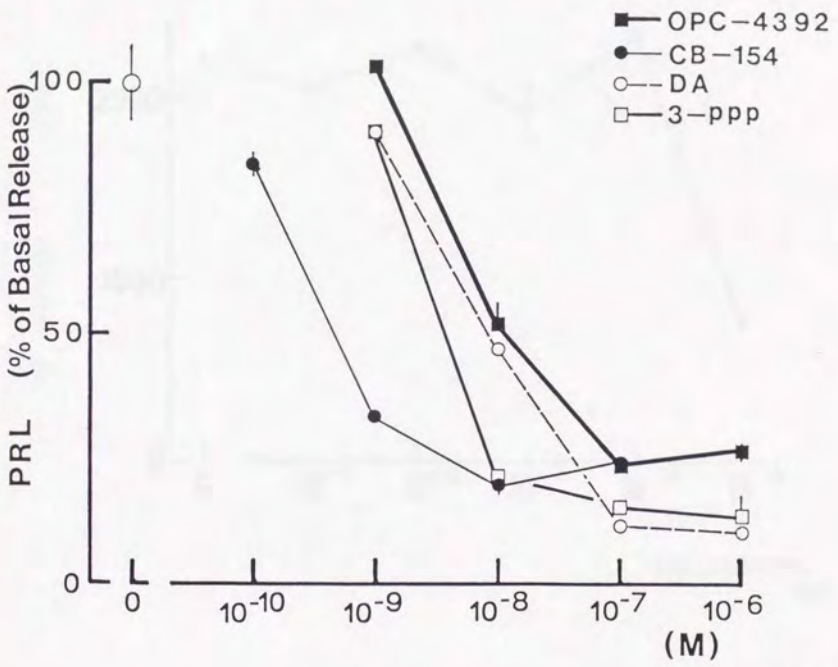


Fig. 1−4

OPC−4392、3−ppp、CB−154、DAの下垂体単層培養細胞のPRL分泌に対する効果

■ OPC−4392 □ 3−ppp ● CB−154 ○ DA

値は、コントロール(Basal Release)のPRL分泌に対する%で表わした。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。縦線を欠くものは点内に標準誤差が含まれる。

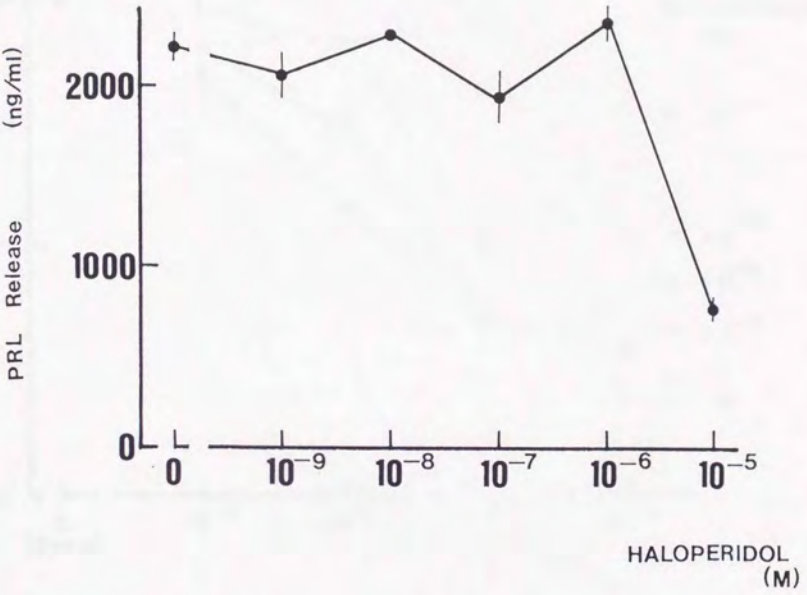


Fig. 1－5

ハロペリドールの下垂体単層培養細胞のＰＲＬ分泌に対する効果

各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。縦線を欠くものは点内に標準誤差が含まれる。

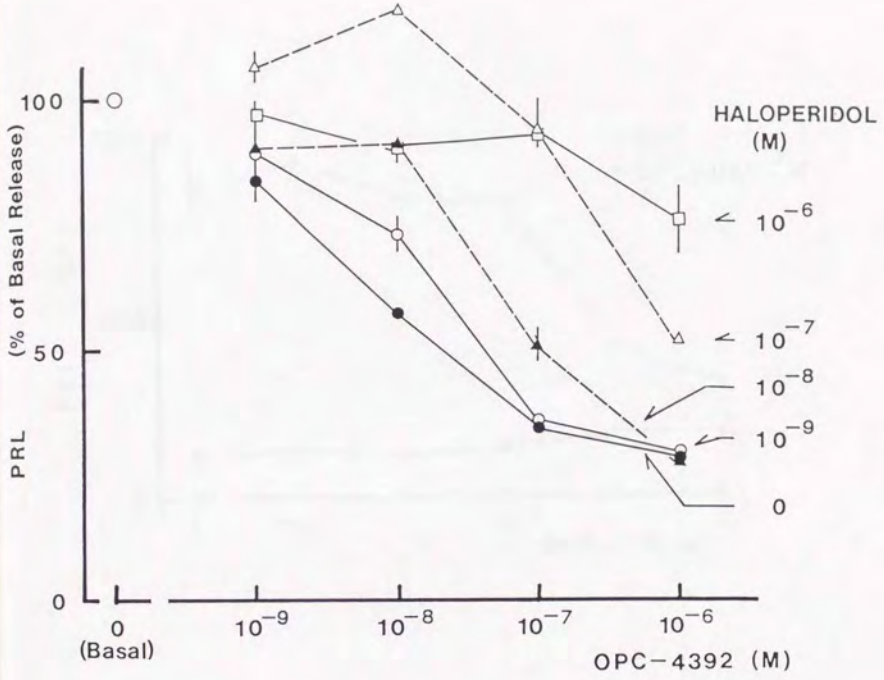


Fig. 1−6

OPC−4392によって抑制された下垂体単層培養細胞のPRL分泌に対するハロペリドールの効果

値は、コントロール(Basal Release)のPRL分泌に対する%で表わした。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。縦線を欠くものは点内に標準誤差が含まれる。

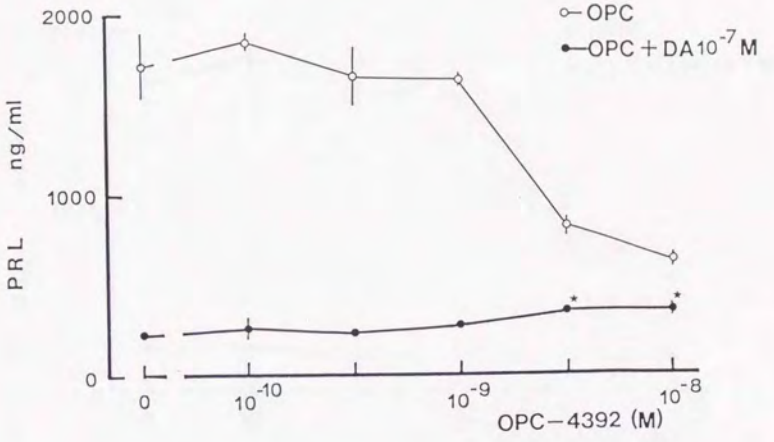


Fig. 1－7

ＤＡ１０$^{-7}$Ｍによって抑制された下垂体単層培養細胞のＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の効果

○　ＯＰＣ－４３９２単独、●　ＯＰＣ－４３９２＋ＤＡ１０$^{-7}$Ｍ

各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。縦線を欠くものは点内に標準誤差が含まれる。＊はｐ＜0.05でＤＡ１０$^{-7}$Ｍのみとの間で有意差のあることを示す。

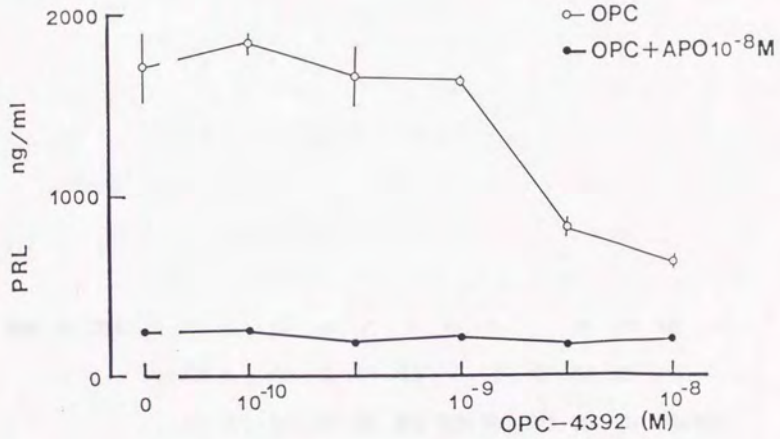


Fig. 1−8

アポモルフィン10^{-5}Mによって抑制された下垂体単層培養細胞のPRL分泌に対するOPC−4392の効果

○ OPC−4392単独、● OPC−4392＋アポモルフィン10^{-8}M

各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。縦線を欠くものは点内に標準誤差が含まれる。

第２章　Ｓｕｐｅｒｆｕｓｉｏｎを用いたＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌動態に対する検討

I. はじめに

ラットではストレス負荷（Ajika et al 1972）、吸乳刺激（Grosvenor and witworth,1974）によってＰＲＬが分泌されるのに加えて、発情前期ゴナドトロフィンサージに随伴するＰＲＬサージ（Butcher et al.,1974）、妊娠前半または偽妊娠での１日２回のＰＲＬサージ（Butcher et al.,1972; Freeman et al.,1974）等の生理的ＰＲＬ分泌相の存在が知られている。ＰＲＬ分泌は、常態では、ＴＩＤＡニューロン神経終末より門脈へ分泌されるＤＡによる抑制支配下にある（Ben-Jonathan,1985）。卵巣除去偽妊娠ラットのＰＲＬサージに同期して、門脈血中ＤＡ濃度が減少することが報告されており（DeGreef and Neill,1979)、ＰＲＬ分泌は、このＤＡの抑制がはずれて起こることが強く示唆されている。

一方、視床下部抽出物が、in vivoでＰＲＬ分泌を上昇させることが報告された（Boyd et al.,1976）。現在までに、Thyrotropin-releasing hormone（ＴＲＨ）、Vasoactive intestinal polypeptide（ＶＩＰ）、ニューロテンシン、アンギオテンシンII(McCann,1982)、Peptide histidine isoleucine（ＰＨＩ）(Shimatsu et al.,1983)などの神経ペプチドが、in vivo、in vitroでＰＲＬ分泌を上昇させることが報告されている。吸乳刺激時にＴＲＨ抗血清を投与したり（DeGreef et al.,1987）、吸乳刺激、エーテルストレス時にＶＩＰ抗血清を投与すると（Abe et al 1985）、これらの刺激にともなう血中ＰＲＬ濃度の上昇が部分的に抑制されること、また、門脈中のＤＡ濃度の変化のみではＰＲＬ分泌動態を完全には説明できないこと（Gibbs and Neill,1978）などからＰＲＬ放出促進因子（prolactin rereasing factor ＰＲＦ)の存在が想定されている。

生体内におけるＰＲＬ分泌に対する制御は、ＰＩＦ（ＤＡ）あるいはＰＲＦ

一方のみの減衰、増加といった単純なものではなく、両者の動的相反支配によって制御されているものと考えられる。

このような動的な現象をin vitroで検討しようとするとき、静置培養で行なうことは必ずしも適当ではない。Superfusion法は、内分泌組織片または、細胞をカラム内に収容し、メディウムで連続的に灌流することによりそれらの分泌動態を観察する方法であって、組織、細胞より分泌された物質が蓄積することが少なくいわゆるプロダクトインヒビションによる影響を排除できること、経時的、連続的、可逆的、多元的（２種類以上の物質を作用させその反応を解析することが可能である）に、in vitroの長所である生体内の複雑な因果応答連鎖を排した条件で検討できる等、ホルモン分泌動態を探る上できわめて優れた方法である。副腎（Lowry and McMartin, 1974）、下垂体（Lowry, 1974; Smith and Vale, 1980; Shiota et al., 1984）、黄体細胞（Murakami et al., 1982）、顆粒層細胞（kadota et al., 1988）等多くの内分泌組織あるいは、細胞において分泌刺激ホルモン、分泌抑制ホルモン、細胞内２次メッセンジャー等の負荷によるsuperfusionによる解析がなされそれらのホルモン分泌機序の解明に大きく貢献してきた。そこで著者は、superfusion法を用いることによって、視床下部から放出されるＰＩＦ（ＤＡ）とＰＲＦの二重支配の再現を試みつつ、生理的に近い条件でＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に与える影響をさらに詳しく検討することにした。

下垂体superfusion法には、下垂体片を用いる方法と培養細胞を用いる方法がある。下垂体片を用いる方法は比較的簡便ではあるが、採取した時点での個体間の反応性の差を反映してしまう可能性があること、短時間の間欠的な作用において作用物質が組織内部まで速やかに拡散するかどうかなどの点に問題をはらむ等の難点を持つ。これに対し、Smith と Vale（1980）によって始められた、遊離化させた細胞を、マイクロキャリアに付着させたものを用いる方法では、

細胞表面を灌流液がくまなく流れることが可能となること、細胞をあらかじめ数日間培養してから用いることができるために条件を一定にそろえやすいこと等の長所を持つので、著者は本法を用いて実験を行なった。

本章では、生理的ＰＩＦとされるＤＡ、代表的ＤＡアゴニストであるＣＢ－１５４、そしてＯＰＣ－４３９２をsuperfusion系に作用させ、それぞれのＰＲＬ分泌に与える影響を検討し、さらに、生理的ＰＲＦの一つとされるＴＲＨとこれらのＤＡ、ＤＡアゴニストを同時に灌流し、下垂体ＰＲＬ分泌動態の解析、ならびにＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対する作用の特異性について検討した。

II. 材料と方法

1. マイクロキャリアの調整

マイクロキャリアには、Cytodex-I（Pharmacia）を用いた。Cytodex-Iにバファー A［137mM NaCl、5mM KCl、0.7mM Na_2HPO_4、25mM HEPES、50μ／ml硫酸ゲンタマイシン pH7.3］を加え25mlにメスアップし、115℃、15分のオートクレーブ処理によって、膨潤および滅菌を行なった。

2. 細胞の浮遊化とマイクロキャリアへの付着

動物は、3～4ヶ月令のウィスター系ラットを用い、第1章と同一の方法で下垂体を採取、酵素的に細胞を浮遊化、細胞数を算定した。細胞浮遊液は、メディウムI［DMEM、10%牛胎仔血清、3.7g／l $NaHCO_3$、20mM HEPES、50μg／mlストレプトマイシン、50U／mlペニシリン pH7.3］で3×10^5生存細胞に希釈した。細胞浮遊液100mlに対し、2.5mlの割合で、膨潤させたCytodex-I懸濁液を加え、Cytodex-Iが均等に浮遊するように撹拌しながら、直径9cmのガラス製ペトリ皿に15mlずつ駒込ピペットで分注した。細胞は、CO_2インキュベーターで37℃、5%CO_2－95%air、湿度100%で培養し、Cytodex-Iに付着させ、4日間培養後、実験に供した。

3．灌流液の調製

灌流液は、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．９３ｇ／ｌ　ＮａＨＣＯ$_3$を加えたＤＭＥＭ（メディウムⅢ）をベースとした。ＯＰＣ－４３９２は、０．１Ｍ乳酸に、ＣＢ－１５４は、３％酒石酸に、ＤＡは、アスコルビン酸を加えた生理食塩水に、ＴＲＨ（武田薬品）は０．１％ＢＳＡを加えた生理食塩水に、各々10^{-2}～10^{-3}Ｍの濃度で実験直前に溶解した。溶解した試薬は、メディウムⅢで必要濃度（ＤＡ　10^{-5}、10^{-7}、10^{-8}Ｍ、ＯＰＣ－４３９２　10^{-5}Ｍ、ＣＢ－１５４　10^{-5}Ｍ、ＴＲＨ　10^{-7}Ｍ）に希釈した。試薬の溶解に用いた有機酸がホルモン分泌に影響する可能性を考慮し、試薬を作用させないときに用いる灌流液にも、試薬のはいった灌流液と同じ濃度の有機酸を加えた。

4．Superfusion

Superfusionは、Shiotaら（1984）の方法に準じて行い、その模式図を（Ｆｉｇ．２－１）に示した。

灌流液の流路は、ペリスタリティックポンプ部分には、内径１．３ｍｍのシリコンチューブを、他は内径１．１４ｍｍおよび０．７６ｍｍののポリエチレンチューブを用い、灌流前に０．１％ＢＳＡ溶液でコートした。灌流液は、灌流前に５％CO_2－９５％O_2を飽和させた。

上部ロート部分を取り外した、エコノカラム（０．７×４ｃｍ　Biorad）にCytodex-Ⅰに付着した細胞をカラム内に気泡が入らないように注意しながら、カラムの下端から１ｃｍの高さまで詰め細胞カラムとした。細胞カラムは２本用意し、同時に２本のsuperfusionが行えるようにした。カラムの下端は、フラクションコレクターへの流路（ポリエチレンチューブ）に注射針によって接続

した。細胞カラムの上部にはゴム製の蓋をし、灌流液瓶、ペリスタリティックポンプ、小室（メディウムより発生する気泡除去用）の順に接続したチューブに取り付けた注射針を貫通させた。最後に細胞カラムを３７℃のウオーターバス内に据え付けた金属製の網に垂直に固定し流路を完成させた。

流速０．２５ｍｌ／分でsuperfusionを開始した。細胞の灌流系への適応とホルモン分泌の安定化を図るため、６０分間前灌流を行なった後、以下の実験を行なった。

１）ＤＡ10^{-8}Ｍ，10^{-7}Ｍを３０分間づつ連続して灌流した。

２）ＯＰＣ－４３９２　10^{-5}Ｍを６０分間灌流した。

３）ＤＡ10^{-5}Ｍを６０分間灌流した。

４）ＣＢ－１５４　10^{-5}Ｍを６０分間灌流した。

５）ＴＲＨ10^{-7}Ｍを１０分間灌流した後、１５０分の間隔をあけて再び、ＴＲＨ10^{-7}Ｍを１０分間灌流した。

６）ＤＡ10^{-5}Ｍを１００分間灌流しＤＡ灌流中に［５）の１回目のＴＲＨ作用時間と同時刻］にＴＲＨ10^{-7}Ｍを１０分間灌流した。ＤＡ灌流終了後６０分の間隔をあけてＯＰＣ－４３９２　10^{-5}Ｍを１００分間灌流し、ＯＰＣ－４３９２灌流中に［５）の２回目のＴＲＨの作用時間と同時刻］にＴＲＨ10^{-7}Ｍを１０分間灌流した。

７）ＯＰＣ－４３９２　10^{-5}Ｍを１００分間灌流しＯＰＣ－４３９２灌流中に［５）の１回目のＴＲＨ作用時間と同時刻］にＴＲＨ10^{-7}Ｍを１０分間灌流し、ＯＰＣ－４３９２灌流終了後６０分の間隔をあけてＣＢ－１５４　10^{-5}Ｍを１００分間灌流し、ＣＢ－１５４灌流中に［５）の２回目のＴＲＨの作用時間と同時刻］にＴＲＨ10^{-7}Ｍを１０分間灌流した。

灌流培養液は、フラクションコレクターで、１）の実験では、１０分毎、他

の実験では、５分毎にＢＳＡでコートした試験管内に回収した。採取した灌流培養液はホルモン測定時まで－２０℃で凍結保存した。

５．ＰＲＬの測定

灌流液中のＰＲＬは、第１章と同一の方法でラジオイムノアッセイによって測定した。

III. 結果

1. Superfusion法による下垂体培養細胞のＰＲＬ分泌に及ぼすＯＰＣ－４３９２、ＤＡ、ＣＢ－１５４の効果

1）予備的検討

Superfusion系に10^{-8}M、10^{-7}MのＤＡを作用させ、１０分ごとに灌流液を採取した（Ｆｉｇ．２－２）。

ＤＡ10^{-8}Mの３０分の灌流によってＰＲＬ分泌はＤＡ作用前の約７０％に減少し、引き続く３０分の10^{-7}MのＤＡの灌流によってＰＲＬ分泌は基礎分泌の約５０％まで減少した。ＤＡの灌流が終了した時点で、ＰＲＬ分泌は速やかにほぼ基礎分泌（ＤＡ灌流前のＰＲＬ分泌）のレベルに戻った。したがって、superfusion 系においてもＤＡによってＰＲＬ分泌が、用量依存的に抑制され、ＰＲＬ分泌の解析に有用なことが示された。

しかしながら、静置培養（１章）ではＰＲＬ分泌がＤＡ10^{-7}Mで基礎分泌の約１０％（Ｆｉｇ．１－３）まで減少したのに対しsuperfusion法では前述の如く、約５０％の減少にとどまり、ＰＲＬ分泌抑制に対する反応は静置培養に比べやや劣る傾向がみられた。したがって、以降のsuperfusion法の実験においてはＤＡ、ＣＢ－１５４、ＯＰＣ－４３９２は、10^{-5}Mの濃度で作用させた。また分泌動態をより詳しく検討するため、灌流液は５分ごとに採取した。

2）ＯＰＣ－４３９２ 10^{-5}MのＰＲＬ分泌に対する影響

ＯＰＣ－４３９２灌流開始直後は、ＰＲＬ分泌に変化は見られなかったが２５～３５分にかけて一時的にＰＲＬ分泌は低下した。その後ＰＲＬ分泌は基礎分泌のレベルまで戻り、ＯＰＣ－４３９２灌流終了後も大きな変化は認めら

れなかった（Ｆｉｇ．２－３）。

３）ＤＡ10^{-5}ＭのＰＲＬ分泌に対する影響

ＤＡの灌流開始後やや変動がみられるもののＰＲＬ分泌は著しく低下した。このＰＲＬ分泌の低下は、ＤＡ灌流終了後３５分まで続き、その後基礎分泌のレベルまでＰＲＬ分泌が回復した（Ｆｉｇ．２－４）。

４）ＣＢ－１５４ 10^{-5}ＭのＰＲＬ分泌に対する影響

ＣＢ－１５４の灌流によってＰＲＬ分泌は急激に減少し、ＣＢ－１５４の灌流中は、基礎分泌の約１０％まで低下した。さらにＣＢ－１５４灌流終了後においてもＰＲＬ分泌は、少なくとも、２時間３０分にわたって、抑制されたままであった（Ｆｉｇ．２－５）。

２．ＯＰＣ－４３９２、ＤＡ、ＣＢ－１５４のＴＲＨによるＰＲＬ分泌刺激に対する影響

ＴＲＨ（10^{-7}Ｍ）を１０分間２回にわたって灌流するとＰＲＬ分泌は、一過的に上昇しそのピークは、ＴＲＨ作用前（４０～６０ｎｇ／ｍｌ）の４～５倍の値（１回目、２２８ｎｇ／ｍｌ、２回目、２５４ｎｇ／ｍｌ）を示し、ＴＲＨ灌流終了後２０分には、ほぼ基礎分泌の値に戻った（Ｆｉｇ．２－６）。

ＴＲＨ（10^{-7}Ｍ）を１０分間、１回目にはＤＡ（10^{-5}Ｍ）灌流中に、２回目にはＯＰＣ－４３９２（10^{-5}Ｍ）の灌流中にそれぞれ灌流した結果をＦｉｇ２－７に示した。ＤＡによってＰＲＬ分泌は基礎分泌（４５～６５ｎｇ／ｍｌ）に比べ１０ｎｇ／ｍｌ前後と著しく減少し、ＴＲＨを灌流すると、そ

れに対応したＰＲＬ分泌の上昇が観察されたが、ＴＲＨのみの灌流（Ｆｉｇ．２－６）に比べそのピークは極めて小さく（４３ｎｇ／ｍｌ）、ＴＲＨによるＰＲＬ分泌刺激はＤＡによって強く抑制された。しかしながら、ＤＡの灌流を終了させたあとに、ＤＡ単独投与終了後には認められなかったＰＲＬ分泌の大きな上昇（１５０～２３０ｎｇ／ｍｌ）が観察された。ＯＰＣ－４３９２（10^{-5}Ｍ）の灌流に伴って、ＰＲＬ分泌は６０～７０ｎｇ／ｍｌまで減少した。この状態でＴＲＨを負荷することによってＰＲＬ分泌は大きく上昇しそのピークは３４０ｎｇ／ｍｌに達し、ＴＲＨによるＰＲＬ分泌刺激に対するＯＰＣ－４３９２の抑制効果は認められなかった。ＯＰＣ－４３９２灌流終了時には、ＤＡ灌流終了時に見られたＰＲＬ分泌の上昇も認められなかった。

次に、ＴＲＨ（10^{-7}Ｍ）を１０分間づつ、１回目にはＯＰＣ－４３９２（10^{-5}Ｍ）灌流中に、２回目にはＣＢ－１５４（10^{-7}Ｍ）灌流中にそれぞれ流した結果をＦｉｇ．２－７に示した。ＯＰＣ－４３９２の灌流によっては、基礎分泌に比べＰＲＬ分泌の減少は認められず、この状態でＴＲＨを負荷するとＰＲＬ分泌上昇のピークは、ＴＲＨのみの灌流（Ｆｉｇ．２－６）に比べ絶対値ではやや小さいものの（１７５ｎｇ／ｍｌ）、基礎分泌（３５～４０ｎｇ／ｍｌ）に対する比率では４倍以上に達し、ＴＲＨのＰＲＬ分泌刺激作用に対してのＯＰＣ－４３９２による抑制効果はほとんど認められなかった。ＯＰＣ－４３９２灌流終了後のＰＲＬ分泌は基礎分泌、およびＴＲＨ作用前のＯＰＣ－４３９２灌流時とほぼ同じレベルであった。ＣＢ－１５４の灌流によってＰＲＬ分泌は低下し、この状態でＴＲＨを灌流すると、ＰＲＬの上昇が認められたが、そのピークは、７４ｎｇ／ｍｌとＴＲＨ単独の灌流（Ｆｉｇ．２－６）に比べ著しく小さく、ＣＢ－１５４によってＴＲＨ分泌刺激は強く抑制された。その後のＣＢ－１５４灌流終了時には、ＰＲＬ分泌は変化せずＤＡ＋ＴＲＨの場合と異なりＰＲＬ分泌の著しい増加は観察されなかった。

IV. 考察

生体内においては正常な状態ではＰＲＬ分泌は視床下部の強い影響を受けており、ＯＰＣ－４３９２を生体内に投与しＰＲＬ分泌に対する影響は、下垂体に対するものと内生的なＰＩＦ（ＤＡ）やＰＲＦに対する影響を考慮せねばならない。そこで本章ではsuperfusion系によって、視床下部の他の因子の影響や、２次的な影響を排除しつつ、ＰＲＦとしてＴＲＨを用い、生理的ＰＩＦとしてＤＡを、ＤＡアゴニストＣＢ－１５４とともにＯＰＣ－４３９２の下垂体ＰＲＬ分泌に対する影響を検討した。

ＤＡのＰＲＬ分泌抑制効果は静置培養に比べやや弱く表現される傾向がみられた（Ｆｉｇ．２－２）。この原因は、不明であるが、ＤＡのＰＲＬ分泌抑制作用の一つとして、ＤＡがＰＲＬに対するプロダクトインヒビション作用を増強させる効果を持つと仮定すれば、静置培養と異なり灌流液によって分泌されたＰＲＬが速やかに細胞周囲より取り除かれるため、この効果の分が差し引かれているためと説明することができるかも知れない。

ＤＡはＰＲＬ分泌を速やかに抑制し、ＤＡの作用から開放されてから比較的速やかにＰＲＬ分泌に対する抑制が解除された（Ｆｉｇ．２－４）。また、ＴＲＨを負荷するとＰＲＬ分泌は促進された（Ｆｉｇ．２－６）。ＤＡの持続的負荷条件下でＴＲＨを作用させても、そのＰＲＬ分泌刺激効果は、強く抑制されるが、ＤＡ負荷を終了させた時点で、ＴＲＨの影響によると思われるＤＡ単独作用の終了時では観察されなかった著しいＰＲＬ分泌の昂進がおこった（Ｆｉｇ．２－７）。このＰＲＬ分泌の増加は、ＴＲＨのみの刺激（Ｆｉｇ．２－６）に比べてもはるかに大きなものであった。このことよりＤＡがＰＲＬ分泌を抑制している間に、合成から分泌にいたる過程の何れかに、ＰＲＬが蓄

積することが考えられた。したがってＤＡの減少によってＰＲＬ分泌がそれ以前の状態に復帰するだけでなく、その時点でＰＲＦが存在すれば、ＰＲＦのＰＲＬ分泌刺激効果は誇張されて表現される可能性が示唆され、例えば生理的なＰＲＬの大量分泌相においてもこのようなメカニズムが存在するのではないかと考えられた。

ＣＢ－１５４はＰＲＬ分泌を抑制したがＤＡ（Ｆｉｇ．２－４）と異なりＣＢ－１５４の灌流終了後もＰＲＬ分泌は長時間にわたって抑制されたままであった（Ｆｉｇ．２－５）。また、ＴＲＨのＰＲＬ分泌刺激効果に対して強い抑制効果を示し、さらに、ＣＢ－１５４作用終了後においてもＤＡで観察されたＰＲＬ分泌の昂進がみられなかった（Ｆｉｇ．２－８）。これは、ＣＢ－１５４の下垂体レベルにおいてのＰＲＬ分泌抑制作用が、長期間持続することも原因の一つと考えられる。すなわち、ＣＢ－１５４は、生体においてＰＲＬ分泌を長時間にわたって抑制することが知られている（Flükiger and DelPozo, 1978)が、これは、ＣＢ－１５４の血中の半減期が長いことに加えて（Bhuta, 1976）、ＤＡレセプターに対してＣＢ－１５４は親和性がＤＡに比べ高く（Caron et al 1977）、レセプターから離れにくいことが原因になっていると思われる。さらに、ＣＢ－１５４がＤＡ（Rosenzweig and Kanwer, 1982）と同様に細胞内にインターナリゼーションし細胞内で、ＰＲＬ分泌過程を抑制することが考えられるが、このような場合にもＤＡのような生理物質と異なり分解や排出が遅れることによって、効果が長く持続するかも知れない。前述の如くＴＲＨのＰＲＬ分泌刺激をＣＢ－１５４は強く抑制しＣＢ－１５４灌流終了後にもＤＡ（Ｆｉｇ．２－７）と異なり、ＴＲＨによるＰＲＬ分泌の増大が全く見られない（Ｆｉｇ．２－８）が、このことから生体内におけるＣＢ－１５４によるＰＲＬ分泌の阻害効果は、単に下垂体門脈中のＤＡの増加を再現した結果のみと解釈するよりも、ＰＲＦによる分泌刺激効果をも阻害した結果と解釈

する方が妥当であろう。

ＯＰＣ－４３９２は、ＰＲＬの基礎分泌に対しての抑制は、他の２つ（ＤＡとＣＢ－１５４）に比べて明らかに弱かった（Ｆｉｇ．２－３）。しかし第１章での静置培養においては、ＯＰＣ－４３９２は、強くＰＲＬ分泌を抑制し、抑制曲線もＤＡとほぼ重なっていたこと（Ｆｉｇ．１－４）や、super-fusion系でもＴＲＨ投与下でＤＡ負荷を中止したときに見られるＰＲＬ分泌昂進を明らかに抑制する（Ｆｉｇ．２－７）とみられることからsuperfusion系においてもＯＰＣ－４３９２は、ＰＲＬ分泌抑制効果があるものと判断される。ところが、ＯＰＣ－４３９２は、ＤＡ、ＣＢ－１５４と異なりＴＲＨのＰＲＬ分泌刺激を殆ど抑制しなかった（Ｆｉｇ．２－７、Ｆｉｇ．２－８）。第１章の静置培養においてＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対する最大抑制はＤＡに比べると小さく（Ｆｉｇ．１－４）また、わずかではあるが、ＤＡのＰＲＬ分泌抑制がＯＰＣ－４３９２によって阻害されることも観察されたこと（Ｆｉｇ．１－７）も考え併せると、ＯＰＣ－４３９２は、下垂体ＤＡレセプターに対して、パーシャルアゴニストとして作用することも考えられる。また、ＴＲＨが存在しているときにＯＰＣ－４３９２がＤＡアゴニストとして作用し難いとすれば、それは、ＴＲＨの効果の１部にＤＡレセプター作用に対するものが含まれているためと考えられるが、この点についてこれ以上考察を進めるような材料は見あたらない。何れにせよＯＰＣ－４３９２のＴＲＨに対しての反応性がＤＡ、ＣＢ－１５４と異なることはＴＲＨのＰＲＬ分泌作用の発現メカニズムの解析という点でも、今後の興味ある課題の１つである。

ＤＡ、ＣＢ－１５４、ＯＰＣ－４３９２の３者のsuperfusion系におけるＰＲＬ分泌にたいする影響は、量的のみならず質的にも非常に異なると解釈される結果を示した。すなわちＣＢ－１５４は、ＰＲＬの基礎分泌のみならずＴＲＨ刺激分泌をＤＡと異なり長時間抑制するのに対し、ＯＰＣ－４３９２は、

ＤＡアゴニストでありながらＴＲＨの様な生理的ＰＲＬセクレタゴーグ（すなわちＰＲＦ）によるＰＲＬ分泌に対してはほとんど抑制効果を示さないという新しい特性を見いだすことができた。これらの性質を利用することによって、生理的なＰＲＬ分泌がＤＡの減少によるものかまたはＰＲＦの増加によるものなのか、その両者であるのかという問題を解決する手段となり得ることが示唆され、第１章で得られた、脳内ＤＡ作用と下垂体ＤＡ作用に対する特異性と併せて、ＯＰＣ－４３９２が生体におけるＰＲＬ分泌機序を探る手段として有用な薬剤であることが示唆された。

第３章では、数種の実験的ＰＲＬ分泌モデル動物を作出し生体内におけるＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対するＤＡアゴニスト作用を確認し、生体内におけるＰＲＬ分泌機序に対しての検討を加えた。

第２章　　図表

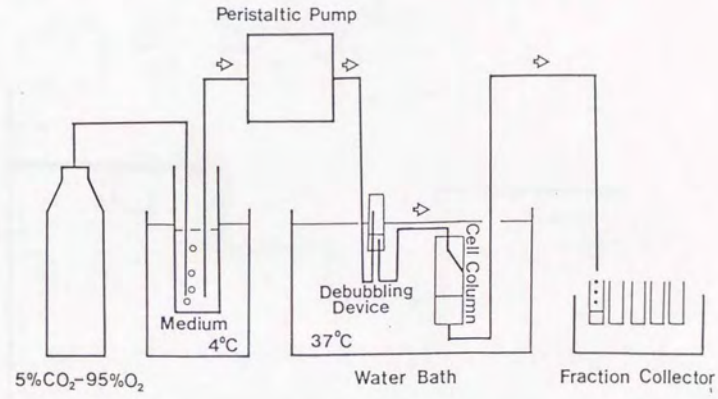


Fig. 2-1

Superfusion 系の模式図

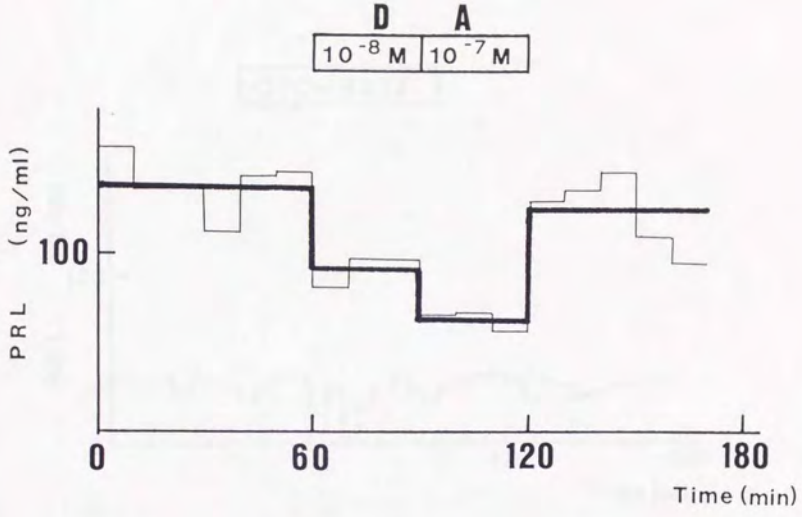
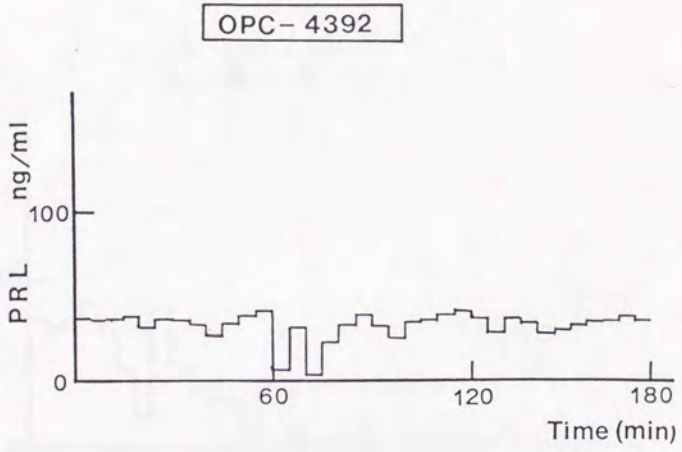


Fig. 2－2

Superfusion系におけるDA10^{-8}、10^{-7}Mの下垂体培養細胞PRL分泌に対する効果

灌流液は10分毎に採取した。□はDAを作用させた時間を表わす。細線は各フラクションの値を、太線は灌流液のみ、またはDA負荷時の平均値を表わす



Ｆｉｇ．２－３

Superfusion系におけるＯＰＣ－４３９２　10^{-5}Ｍの下垂体培養細胞ＰＲＬ分泌に対する効果

灌流液は５分毎に採取した。□はＯＰＣ－４３９２を作用させた時間を表わす。

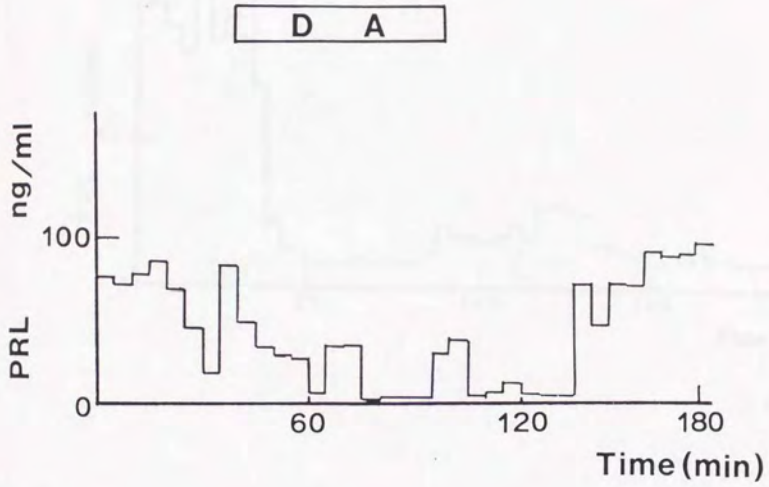
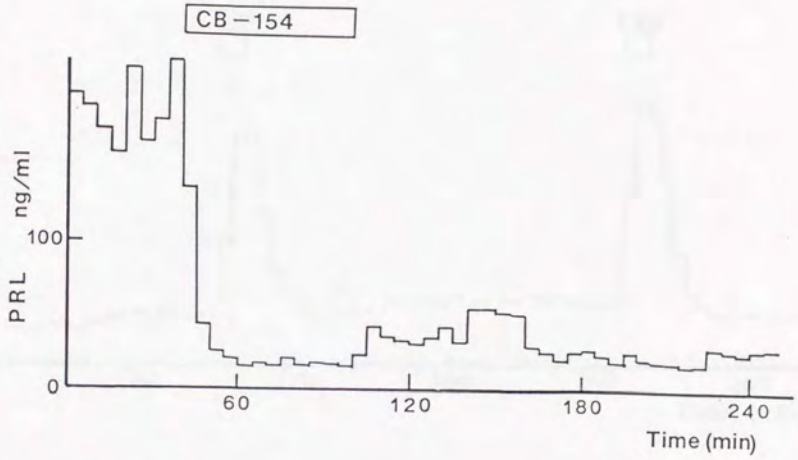


Fig. 2－4

Superfusion系におけるDA^{-5}Mの下垂体培養細胞PRL分泌に対する効果

灌流液は5分毎に採取した。□はDAを作用させた時間を表わす。



Ｆｉｇ．２－５

Superfusion系におけるＣＢ－１５４　10^{-5}Ｍの下垂体培養細胞ＰＲＬ分泌に対する効果

灌流液は５分毎に採取した。□はＣＢ－１５４を作用させた時間を表わす。

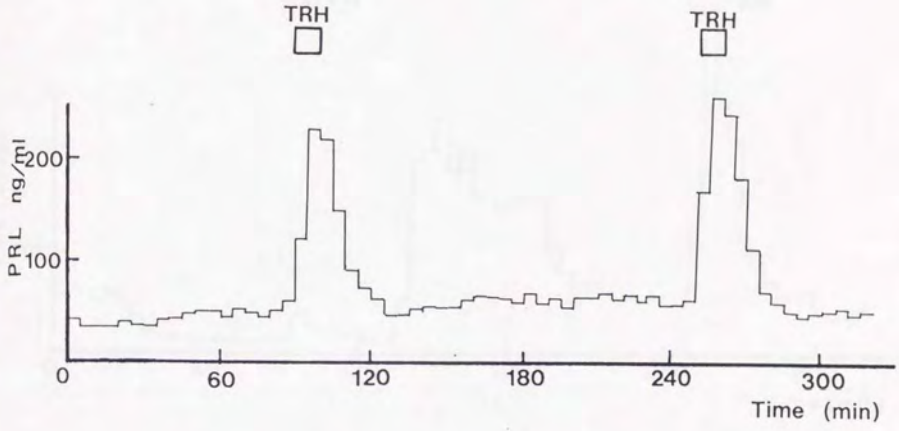
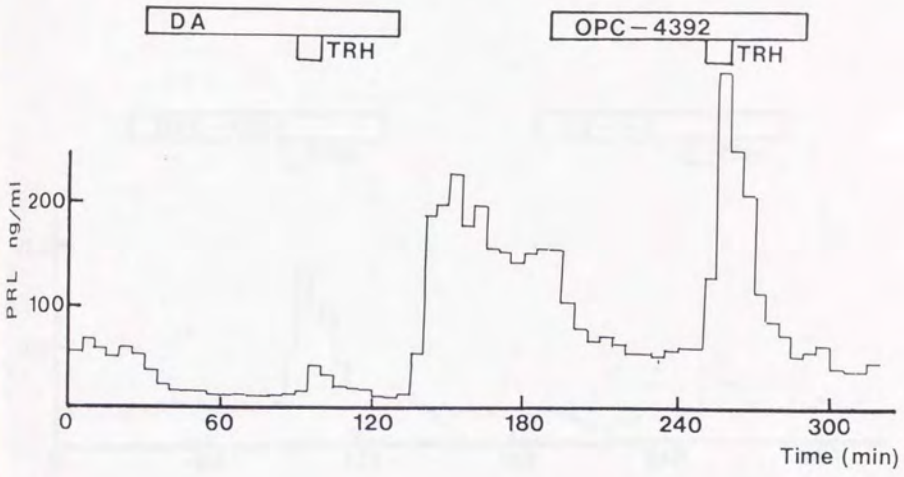


Fig. 2－6

Superfusion系におけるＴＲＨ10^{-7}Ｍの下垂体培養細胞ＰＲＬ分泌に対する効果

灌流液は５分毎に採取した。□はＴＲＨを作用させた時間を表わす。



Ｆｉｇ．２－７

Superfusion系におけるＤＡ１０$^{-5}$Ｍ、ＯＰＣ－４３９２　１０$^{-5}$Ｍ存在下におけるＴＲＨ１０$^{-7}$Ｍの下垂体培養細胞ＰＲＬ分泌に対する効果

灌流液は５分毎に採取した。□はＤＡ、ＯＰＣ－４３９２、またはＴＲＨを作用させた時間を表わす。

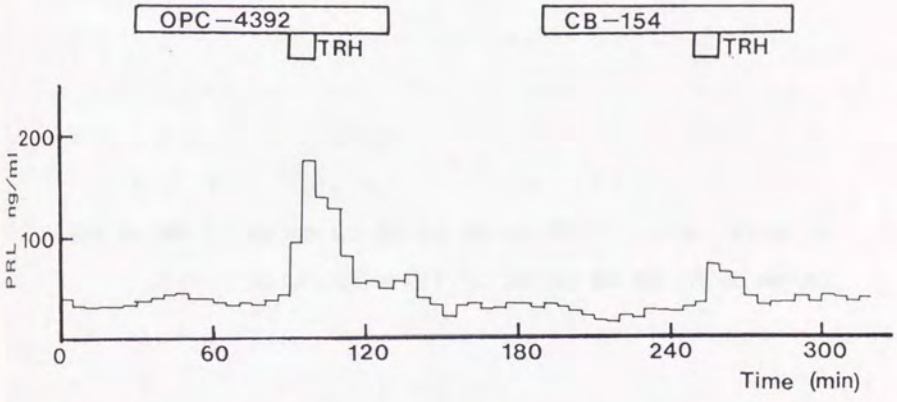


Fig. 2−8

Superfusion系におけるOPC−4392 10^{-5}M、CB−154 10^{-5}M存在下におけるTRH 10^{-7}Mの下垂体培養細胞PRL分泌に対する効果

灌流液は5分毎に採取した。□はOPC−4392、CB−154またはTRHを作用させた時間を表わす。

第３章　生体におけるＯＰＣ－４３９２によるＰＲＬ分泌調節系の解析

I. はじめに

ＰＲＬの生理作用はきわめて多種多彩にわたっているが、哺乳類においては、種の保存に関わる生殖においても非常に大きな役割をはたしている。ＰＲＬ(Prolactin)はその名のとおり泌乳の維持に必須なホルモンである。ラットにおいては、妊娠前期、あるいは偽妊娠における機能黄体の維持に必須でありＰＲＬなしに妊娠は成立しない(鈴木と高橋、1979)。また雄においてもライディヒ細胞へのＬＨレセプターを増加させる作用を介してのテストステロン産生を増強する作用（Hafiez et al.,1972）、また精子形成や副性腺にたいしても、テストステロンに対する作用を増強すること（Bartke et al.,1970）が知られている。しかしながら、なんらかの原因で病的な過剰分泌がおこると無排卵症、精子減少症等、逆に生殖系に対して、重大な支障をきたすことがヒトにおいてよく知られている(Kannan,1987)。これらのことより、ＰＲＬ分泌調節系が哺乳類の種の保存にとってきわめて重要な役割を果たしていることが理解される。

下垂体のＰＲＬ分泌は、視床下部の抑制因子と促進因子との相反支配によって制御されている。ＰＲＬ分泌制御は常態では抑制支配優位であり、その抑制因子の主体は、ＴＩＤＡより分泌されるＤＡであるとされる。かつては、ＤＡによるin vivoのＰＲＬ分泌抑制効果は、視床下部ＰＩＦの増加を介したものとの見解も示された(kamberi et al.,1971)が、ＤＡは、第１章、第２章での実験においても示される通りin vitroにおいて下垂体レベルでのＰＲＬ分泌を強く抑制し、ＤＡアゴニストでも同様の効果を持つことから、最近では、ＤＡのＰＲＬ分泌抑制作用は専ら下垂体に対する直接作用と考えられている(Ben-Jonathan,1985)。

生体内においてＤＡはチロシンよりチロシン水酸化酵素によってドーパに変

換され、さらに芳香族Ｌ－アミノ酸脱炭酸酵素によって合成される（Nagatsu et al.,1964）。ＤＡは、他のカテコルアミン、すなわちアドレナリン、ノルアドレナリンの前駆体としてのみ考えられてきたが、その後、ＤＡニューロンに独立して存在することが明らかにされ（Moore and Bloom,1978）、ＤＡが神経伝達物質そのものとして認識されるに至った。ＤＡ系ニューロンは前記ＴＩＤＡ（隆起漏斗系）の他に黒質－線状体系、中脳－皮質系、中脳－辺縁系、脳室周囲系等が存在し（田中と白川,1985）、運動機能、内分泌、情動機能など多様な機能を有しているといわれている。ＰＲＬ分泌はストレス(Ajika et al.,1972)、吸入刺激(Grosvenor and Whitworth,1974)、子宮頸管刺激(Freeman et al.,1974)などによって誘起されるが、このような刺激は、脳内中枢を介したものと考えられ、この際、これらのＤＡ系ニューロンがＴＩＤＡニューロンを含めて、間接的にＰＲＬ分泌にかかわっている可能性も否定できないと思われる。しかしながら、脳内ＤＡ作用と下垂体ＤＡ作用を生体内でうまく分離する手段がなかったためもあって、この問題に関しては殆ど関心が持たれていなかった。従来のＤＡアゴニスト、ＤＡアンタゴニストでは、脳内ＤＡ作用部位、下垂体ＤＡ作用部位両者同時にアゴニスト、またはアンタゴニストの作用を現わしてしまい、ＰＲＬ分泌の変化が脳内ＤＡ作用部位で起こったのか下垂体ＤＡ作用部位で起こったのかは理論的には解明できず、仮に脳内でのＰＲＬ分泌に対する影響に変化が現れたとしても下垂体への直接作用に隠されてしまう可能性がある。また血液脳関門を通過できないとされるＤＡ、またはＤＡアンタゴニストのドンペリドン（Kannan,1987）等では、脳内ＤＡ系に影響が及ばないことから下垂体へのＤＡ作用部位への直接効果しか観察し得ないことになる。

ＯＰＣ－４３９２は、これらのＤＡアゴニストやＤＡアンタゴニストと異なり脳内では、シナプス後Ｄ２レセプターにはアンタゴニストとして、オートレセプターにはアゴニストとして作用すると考えられており（すなわち、脳内

ＤＡ系に対してはＤＡを強力に抑制する方向に作用する）、また下垂体ＤＡレセプターには第１章の結果よりアゴニストとして作用することが明らかとなった。従ってＯＰＣ－４３９２を生体に投与し、ＰＲＬ分泌の挙動を解析することによってＰＲＬ分泌に対する脳内ＤＡの関与に対する知見の得られることが期待される。

視床下部での存在が証明されておりin vitroにおいてＰＲＬ分泌を促進する生理活性物質が多数見いだされている（McCann, 1982）にもかかわらずＰＲＬ分泌促進系の全体像については必ずしも十分明かにされていない。生理的なＰＲＬ分泌相にＤＡまたはＣＢ－１５４を投与しても、第２章で示されたようにこれらがＰＲＦ作用をも抑制してしまう可能性があること、あるいは、ＤＡ系の抑制支配を解除しただけでＰＲＬ分泌が大幅に増加する可能性があること等から、生体内におけるＰＲＬ分泌促進系の解析には困難が伴う。ところが、第２章の結果よりＯＰＣ－４３９２は、ＤＡ、ＣＢ－１５４とは異なりＴＲＨによるＰＲＬ分泌刺激作用に対する抑制効果を殆ど持たないことが示された。従って、ＯＰＣ－４３９２を投与することによってＤＡレセプターを介したＰＲＬ分泌抑制効果を保有しながらも、ＰＲＦに対する反応性を残した状態が生体内で実現されること考えられ、生理的ＰＲＬ分泌相に投与することによって、ＰＲＬ分泌がＤＡの抑制解除であるのかＰＲＦが関与したものであるのかをも明らかにすることができると考えられる。

交尾刺激あるいは、人工的な子宮頸管刺激がない場合、ラットは排卵後に黄体相を実質的に持たず普通４日の短いサイクルで性周期が回帰するが、子宮頸管刺激により誘起される１日２回のＰＲＬサージによってプロジェステロンを分泌する機能黄体が導入され偽妊娠が起こり約１４日間継続する（DeGreef et al 1977）。ＰＲＬは機能黄体の維持すなわち偽妊娠の維持に必須であり、なんらかの方法によってＰＲＬサージを阻止すると機能黄体は退行し偽妊娠は早

期に終了することが知られている。したがって、偽妊娠の阻止を指標としてＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対する抑制効果を検討することができる。

以上の背景により、本章では、ＯＰＣ－４３９２を中心としたＤＡアゴニストの生体内におけるＰＲＬ分泌に対する作用を以下のＰＲＬ分泌モデル動物を対象にした。

1．視床下部支配下（抑制優位）の下垂体を持つラット：
　正常雄ラット
2．視床下部抑制支配のみを解除した下垂体を持つラット：
　レゼルピン投与雄ラット
3．視床下部支配から完全に解除された下垂体を持つラット：
　Autograftラット
4．視床下部支配下にある下垂体と視床下部支配から完全に解除した下垂体を合わせ持つラット：
　Isograftラット
5．生理的ＰＲＬ分泌相を持つラット：
　偽妊娠ラット

II. 材料と方法

1. 動物

当教室で継代繁殖した成熟ウィスター系ラット（３～４カ月令）を使用した。雌ラットは毎日膣スメアを観察し、４日の規則正しい性周期を示す動物を用いた。

飼育条件は第１章と同一である。

2. 他家下垂体移植ラット（isograftラット）の作出

Donorおよびrecipientとも雄ラットを使用した。エーテル麻酔下で背部切開よりrecipientラットの左腎を露出させた。次に、donorラットを断頭、下垂体を取り出し、油性ペニシリン液に浸漬した。先に露出したrecipientラットの左腎被膜下にメスで１～２ｍｍの切口をつくり、ガラス製ブランジャーを挿入、被膜の１部を臓器実質よりはがしポケットを作った。移植する下垂体を移植用ピペットに移し、ポケットにピペットの先を入れ、ブランジャーで下垂体をピペットより腎被膜ポケットに挿入した。ピペットとブランジャーをポケットより抜き取り、ブランジャーで、下垂体を被膜の外側より原型に近い形に広げ、ポケットの最深部に押し込み、ポケット内に溜った血液、ペニシリンを除き、腎を腹腔内に戻し縫合した。移植後、少なくとも１週間を経たのち動物を実験に供した。

3．自家下垂体異所移植ラット(autograftラット）の作出

雄ラットの下垂体を周咽頭法（本間、1953）により摘出した。摘出した下垂体をisograftラットの作出と同様の方法で自己の左腎包膜下に移植した。移植後少なくとも１週間を経た後、動物を実験に供した。

4．偽妊娠ラットの作出

１８～１９時に、発情前期の雌ラットにガラス棒で子宮頸管を約１００回圧迫した。子宮頸管刺激を加えた日の翌日を偽妊娠第０日と定義し、第１日より３日間連続して膣スメアが非発情期像を示した動物を、偽妊娠が成立したと判定し、実験に使用した。

5．レゼルピン投与ラット

５％グルコース液に酢酸を最少限滴下して溶解させたレゼルピン(Sigma)を１０ｍｇ／ｋｇの用量で、雄ラットに実験開始５時間前に腹腔内に投与した。

6．正常雄ラット、レゼルピン投与ラット，iso-graftラット，autograft
ラットへのＯＰＣ－４３９２あるいは３－ｐｐｐの投与

ＯＰＣ－４３９２は、０．１Ｍ乳酸に加温溶解し、経口投与、または軽いエーテル麻酔下で、大腿静脈より投与した。３－ｐｐｐは、生理食塩水に溶解し、軽いエーテル麻酔下で、大腿静脈より投与した。対照動物には、溶媒（０．１Ｍ

乳酸）のみを投与した。

実験群を下表に示した。

実験群	処置	
正常雄ラット	ＯＰＣ－４３９２	0.5mg/head p.o.
	〃	1.5mg/head p.o.
	〃	5 mg/head p.o.
	〃	5mg/kg i.v.
	０．１Ｍ乳酸（対照）	i.v.
ﾚｾﾞﾙﾋﾟﾝ投与正常雄ﾗｯﾄ	ＯＰＣ－４３９２	5mg/kg i.v.
autograftラット	ＯＰＣ－４３９２	1mg/kg i.v.
	〃	5mg/kg i.v.
	３－ｐｐｐ	5mg/kg i.v.
	０．１Ｍ乳酸（対照）	i.v.
isograftラット	ＯＰＣ－４３９２	1mg/kg i.v.
	〃	5mg/kg i.v.
	０．１Ｍ乳酸（対照）	i.v.
ﾚｾﾞﾙﾋﾟﾝ投与isograftﾗｯﾄ	ＯＰＣ－４３９２	5mg/kg i.v.

p.o.経口投与　i.v.静脈投与

7．偽妊娠ラットへのＯＰＣ－４３９２、ＣＢ－１５４の投与

０．１Ｍ乳酸に溶解したＯＰＣ－４３９２を軽いエーテル麻酔下で大腿静脈または腹腔内に投与した。実験の１部では、０．１Ｍ乳酸のみを投与した実験群を対照とした。３％酒石酸に溶解したＣＢ－１５４は、皮下に投与した。投与量、投与回数、投与日時を実験群ごとに下表に示した。

ＯＰＣ－４３９２投与群		
偽妊娠第４日０時	5mg/kg	i.v.×１
偽妊娠第４日１５時	5mg/kg	i.v.×１
偽妊娠第４日０時、３時	5mg/kg	i.v.×２
偽妊娠第４日０時、６時、１２時、１８時、５日０時、６時、１２時、１８時、	5mg/kg	i.v.×８
偽妊娠第４日０時	30mg/kg	i.p.×１
偽妊娠第４日０時１２時、５日０時、１２時、	30mg/kg	i.p.×４
偽妊娠第７日０時１２時、８日０時、１２時、	30mg/kg	i.p.×４
０．１Ｍ乳酸投与群（対照群）		
偽妊娠第４日０時		i.v.×１
偽妊娠第４日１５時		i.v.×１
偽妊娠第４日０時、３時		i.v.×２
ＣＢ－１５４投与群		
偽妊娠第４日０時	1.5mg/kg	s.c.×１
偽妊娠第７日０時	1.5mg/kg	s.c.×１

i.v.静脈投与、i.p.腹腔内投与、s.c.皮下投与

8．採血

経口投与群では、ＯＰＣ－４３９２投与前、投与１、２、４、６、８、２４時間後に、断頭によって採血を行なった。血液は４℃で凝固させ、遠沈、血清を分離した。ＯＰＣ－４３９２または３－ｐｐｐ静脈投与群の採血は、原則として、ＯＰＣ－４３９２、３ｐｐｐ投与直前、投与０．５、１、２、４、６、２４時間後の各時間に行なった。正常雄ラット、レゼルピン投与ラットは、無麻酔で尾端静脈を切開し、ヘパリンでコートしたキャピラリーで採血し、遠沈、血漿を分離した。Isograftラット、autograftラットは、軽いエーテル麻酔下で心臓せん刺により、血液を採取し４℃で凝固させ、遠沈、血清を分離した。

偽妊娠動物の１部については、偽妊娠第４日にＯＰＣ－４３９２または０．１Ｍ乳酸投与後３時間毎の、無麻酔での尾端静脈切開による採血を行なった。血漿および血清はホルモン測定まで－２０℃で凍結保存した。

9．ＰＲＬの測定

血漿および血清中のＰＲＬは第１章と同一の方法でラジオイムノアッセイにより測定した。

１０．統計

平均値の差の検定はStudent's t testによって行ない危険率５％以内をもって有意水準とした。

III. 結果

1. 正常雄ラットの血中ＰＲＬ濃度に対するＯＰＣ－４３９２の効果

1）ＯＰＣ－４３９２の経口投与、断頭採血によるＰＲＬ濃度への効果

ＯＰＣ－４３９２　0.5～5mg／headを正常雄ラットに経口投与した結果（Fig. 3－1）、0.5mg／headの投与では、血中ＰＲＬ濃度は平均値で投与前（0時間）の8.1ng／mlに比べ投与後6時間で11.2ng／ml　および8時間で10.2ng／mlと上昇傾向がみられるものの、有意差は認められなかった。1.5mg／headの投与では投与後の血中ＰＲＬ濃度の平均は6.5～9.8ng／mlの値を示し、投与前の血中ＰＲＬ濃度（9.4±2.5ng／ml　平均値±標準誤差）に差を認めなかった。5mg／headの投与によっては、血中ＰＲＬ濃度は、投与前9.0ng／mlに比べ、投与後4時間（3.2ng／ml）、6時間（3.1ng／ml）、8時間（4.0ng／ml）、24時間（4.6ng／ml）といずれも有意差は認められないものの投与前と比べて低値を示した。

2）ＯＰＣ－４３９２の静脈内投与、尾静脈採血による血中ＰＲＬ濃度への効果

ＯＰＣ－４３９２　5mg／kg、または対照として0.1M乳酸のみを正常雄ラットに投与した結果（Fig. 3－2）、両者ともに投与後血中ＰＲＬ濃度は、低下した。しかしながら、ＯＰＣ－４３９２の5mg／kg投与後の血中ＰＲＬ濃度は対照に比べ0.5時間（12.4±0.7　vs　34.1±4.2ng／ml）、4時間（8.8±1.9　vs　39.1±5.5ng／ml）で有意に低く、投与後2時間を除く他の時点においてもＯＰＣ－４３９２投与群

の血中ＰＲＬ濃度の平均値は、対照群に比べ低い値を示した。

2．レゼルピン投与正常雄ラットにおけるＯＰＣ－４３９２の血中ＰＲＬ濃度に対する効果

レゼルピン１０ｍｇ／ｋｇを正常雄ラットに投与５時間後にＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇを投与したときの血中ＰＲＬ濃度の推移をＦｉｇ．３－３に示した。レゼルピンの投与によって、血中ＰＲＬ濃度は、無処置正常雄ラット（図中　－５ｈ，９．０±２．１ｎｇ／ｍｌ）に比べ投与後４時間（図中　－１ｈ，３４．０±２．９ｎｇ／ｍｌ）と有意に上昇した。

レゼルピン投与後５時間目にＯＰＣ－４３９２（５ｍｇ／ｋｇ）を投与した。この投与によって、血中ＰＲＬ濃度は投与後０．５時間（８．８ｎｇ／ｍｌ）には、投与直前（図中０ｈ，３０．４ｎｇ／ｍｌ）に比べて有意に低下し、血中ＰＲＬ濃度の有意な低下はＯＰＣ－４３９２投与後４時間まで続き、６時間後には２９．２±４．３ｎｇ／ｍｌとＯＰＣ－４３９２投与前のレベルまで上昇した。ＯＰＣ－４３９２投与後２４時間すなわちレゼルピン投与後２９時間後の血中ＰＲＬ濃度は平均４０．９ｎｇ／ｍｌでなおレゼルピンによるとみられる上昇した血中ＰＲＬ濃度が観察された。

3．下垂体移植ラットにおけるＯＰＣ－４３９２、３－ｐｐｐの血中ＰＲＬ濃度に対する効果

下垂体移植ラットのＯＰＣ－４３９２、３－ｐｐｐ投与後の血中ＰＲＬ濃度は投与前のＰＲＬ濃度に対するパーセンテージで表わした。下垂体移植ラットの血中ＰＲＬ濃度の平均は、正常雄ラット（８．８±２．４ｎｇ／ｍｌ）に比べ

高値を示し、autograftラットでは、２３．１±５．０ｎｇ／ｍｌと正常雄ラットの２．５倍程度、isograftラットでは、１８０．８±４０．４±ｎｇ／ｍｌと正常雄に比べ約２０倍の値であった（Ｆｉｇ．３－４）。

１）Autograftラットにおける０ＰＣ－４３９２の血中ＰＲＬ濃度に対する効果

Autograftラットに、０ＰＣ－４３９２投与した結果をＦｉｇ．３－５に示した。対照群の０．１Ｍ乳酸投与によっては血中ＰＲＬ濃度に影響を与えなかった。これに対し、０ＰＣ－４３９２　１ｍｇ／ｋｇ投与群では、投与後０．５時間で投与前の６９．１％（平均値）、１時間で６０．９％、２時間で３８．６％と血中ＰＲＬ濃度は低下し、投与後６時間まで、投与前の約３５％の低値を推移した。投与後２４時間では、血中ＰＲＬ濃度は、７９．５％まで上昇したものの、対照群の血中ＰＲＬ濃度に比べ有意に低かった。０ＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇ投与群においても血中ＰＲＬ濃度の推移は、投与後６時間まで１ｍｇ／ｋｇ投与群とほぼ同様の経過をたどり、さらに投与後２４時間の血中ＰＲＬは、投与前の５９．６％までしか回復しなかった。

２）Autograftラットにおける３－ｐｐｐの血中ＰＲＬ濃度に対する効果

３－ｐｐｐ　５ｍｇ／ｋｇの投与によって血中ＰＲＬ濃度は、投与後０．５時間から４時間にわたって低値（投与前のレベルの３０～５０％）を示した後、投与後６時間、２４時間でそれぞれ投与前のレベルの８５．２％、７１．０％まで上昇した（Ｆｉｇ．３－６）。

3）IsograftラットにおけるＯＰＣ－４３９２の血中ＰＲＬ濃度に対する効果

IsograftラットにＯＰＣ－４３９２を投与した結果をＦｉｇ．３－７に示した。対照とした０．１Ｍ乳酸投与群では、投与による血中ＰＲＬ濃度への影響は認められなかった

ＯＰＣ－４３９２　１ｍｇ／ｋｇの投与によって血中ＰＲＬ濃度は、０．５時間から４時間にわたって著しく低下したが、autograftラットの場合（Ｆｉｇ．３－５）と異なり、投与後６時間で血中ＰＲＬ濃度は投与前のレベルまで回復した。ＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇ投与群においては、１ｍｇ／ｋｇ投与群に比べ血中ＰＲＬ濃度の抑制時間の延長が観察され、血中ＰＲＬ濃度の著しい低下は投与後少なくとも６時間まで継続したが、投与後２４時間ではほぼ投与前のレベルまで上昇し、autograftラットで観察された、ＯＰＣ－４３９２投与後２４時間での血中ＰＲＬ濃度の低下は認められなかった。

4）レゼルピン投与isograftラットにおけるＯＰＣ－４３９２の血中ＰＲＬ濃度に対する効果

レゼルピンによってはisograftラットの血中ＰＲＬ濃度は有意に上昇しなかった（投与前１１２．９±１６．０ｎｇ／ｍｌ、投与後１２８．１±４１．３ｎｇ／ｍｌ）。

ＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇの投与によって血中ＰＲＬ濃度は投与後４時間にわたってＯＰＣ－４３９２投与前のレベルの２０％前後まで低下した。投与後６時間では約５１．５％まで上昇し、２４時間後にはばらつきは大きいものの投与前を上回るレベル（１６６．３±５２．７％）まで上昇した（Ｆｉｇ．３－８）。

4．ＯＰＣ－４３９２あるいはＣＢ－１５４の偽妊娠維持に対する影響

ＯＰＣ－４３９２を偽妊娠ラットに投与し、ＣＢ－１５４と同様に偽妊娠を阻止できるか否かを検討した（Ｔａｂｌｅ　３－１）。

偽妊娠第４日０時にＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇまたは、３０ｍｇ／ｋｇを投与したが、膣スメア像は偽妊娠第１３～１６日まで発情休止期像（白血球像）を示し、偽妊娠は阻止されなかった。そこでＯＰＣ－４３９２の投与回数を増やし偽妊娠第４日または第７日０時よりの１２時間ごとの３０ｍｇ／ｋｇの４回の投与、あるいは偽妊娠第４日０時よりの６時間毎の８回の投与を行なった。しかしながら、どの処置においても偽妊娠を阻止することはできなかった。

これに対し偽妊娠第４日０時のＣＢ－１５４（１.５ｍｇ／ｋｇ）の単一投与によって、第６日に全例の膣スメアは発情前期像に変化した。第７日０時に同量のＣＢ－１５４を単一投与しても、第９日または第１０日で膣スメアは発情前期または発情期像を示し、偽妊娠はＣＢ－１５４によって完全に阻止された。

5．偽妊娠ラットにおけるＰＲＬダイアーナルサージ、ノクターナルサージに対するＯＰＣ－４３９２の効果

ＯＰＣ－４３９２によっては偽妊娠が阻止されないという前節の実験結果の原因を探るため、偽妊娠時における１日２回のＰＲＬサージ（ダイアーナルサージ、ノクターナルサージ）の直前にＯＰＣ－４３９２を投与し、２つのサージ出現に対する影響を検討した。

1）ダイアーナルサージに対するＯＰＣ－４３９２の効果

偽妊娠第４日の１５時にＯＰＣ－４３９２（５ｍｇ／ｋｇ）または対照としてとして０．１Ｍ乳酸を投与した（Ｆｉｇ．３－９）。

０．１Ｍ乳酸のみの投与では、３例中２例において２１時に血中ＰＲＬ濃度は大幅に増加し、その値は７３８．２および８４５．５ｎｇ／ｍｌであり、ダイアーナルサージの出現が確認された。ＯＰＣ－４３９２投与群では、３例中１例に２１時に血中ＰＲＬ濃度の上昇傾向（２１８．２ｎｇ／ｍｌ）を認めたものの他の２例においては血中ＰＲＬ濃度の上昇は認められなかった。従って、ＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇの投与によってダイアーナルサージが抑制されることが示された。

2）ノクターナルサージに対するＯＰＣ－４３９２の効果

偽妊娠第４日０時にＯＰＣ－４３９２（５ｍｇ／ｋｇ）または対照として０．１Ｍ乳酸を投与した（Ｆｉｇ．３－１０）。

乳酸投与群では、３例中１例が３時に残る２例が６時に血中ＰＲＬ濃度の急増が観察されノクターナルサージが確認された。

ＯＰＣ－４３９２投与群においても４例中全例に６時にノクターナルサージが認められ、０時に５ｍｇ／ｋｇを単一投与しても、ノクターナルサージは抑制されないことが示された。

ＯＰＣ－４３９２の投与回数を増やし偽妊娠第４日の０時と３時に５ｍｇ／ｋｇ宛２回投与を行なった結果（Ｆｉｇ．３－１１）、０．１Ｍ乳酸２回投与群（対照群）の５時の血中ＰＲＬ濃度（５９９．０±９８．０ｎｇ／ｍｌ）に比べ有意に低いものの（２７８．８±５９．２ｎｇ／ｍｌ）、ＯＰＣ－４３９２　２回投与群においても、明らかにノクターナルサージの出現が観察された。その

後８時より１７時にかけて、ＯＰＣ－４３９２　２回投与群、対照群とも血中ＰＲＬ濃度は低値（４０～１５０ｎｇ／ｍｌ）を示した後、２０時で、両者ともに血中ＰＲＬ濃度は、大幅に上昇し、ダイアーナルサージが認められた。

IV. 考察

ＤＡやＤＡアゴニストの生体への投与が血中ＰＲＬ濃度を減少させること、また、ＤＡアンタゴニストの投与が、血中ＰＲＬ濃度を上昇させることがよく知られている(Kannan, 1987)。

第１章、第２章の結果により、ＯＰＣ－４３９２は、下垂体に対しほぼＤＡアゴニストの性質を表わすことが明らかにされた。また脳内ＤＡレセプターの、オートレセプターに対してはアゴニストとして、シナプス後Ｄ２レセプターに対してはアンタゴニストとして働くので、脳内ＤＡ活性は抑制された状態になると考えられる。

ＤＡアゴニストのＣＢ－１５４やpiribedil（ピリベジル）の処置によって、脳内ＤＡニューロン自体の活動は減少し、ハロペリドールのようなＤＡアンタゴニスト処置によって脳内ＤＡニューロン自体の活動は増加する（Moore and Wuerthele, 1979）。このような、代償的な活動の増減は、オートレセプター及び神経的なフィードバックループにアゴニスト、アンタゴニストが作用した結果と考えられている。ところが、ＴＩＤＡニューロンはこれらのＤＡアゴニスト、アンタゴニストに対して他のＤＡニューロンと異なり、短時間では直接応答しないことが知られている（Gudelsky and Moore, 1976）。例えば、ハロペリドールによって、ＴＩＤＡニューロンの活性上昇が起こるが線条体ＤＡニューロンのそれに比べて非常に遅れ、血中ＰＲＬ濃度の上昇に同期しておこること、そして、このＴＩＤＡニューロンの活性上昇は、下垂体除去ラットでは全く起こらないことから、この活性上昇はＰＲＬがショートフィードバック様式によってＴＩＤＡニューロンの活性を調節した結果と理解され、ＴＩＤＡニューロンのオートレセプターの働きによるとは考えられていない。言いかえれば

ＴＩＤＡニューロンにはＤＡオートレセプターは存在しないと考えられている（Demarest and Moore, 1979; Moore, 1987）。したがって、ＯＰＣ－４３９２を生体に作用させた場合、ＴＩＤＡニューロンそれ自体の活性に影響を与えない、すなわち門脈中のＤＡには変化を与えないことが予想される。

実験的にＰＲＬ分泌を昂進させたラットにおいてのＯＰＣ－４３９２の投与によって著しく血中ＰＲＬ濃度が減少することが示され（Ｆｉｇ．３－３、３－５、３－７、３－８）、とくに、正位下垂体をもたず、視床下部の抑制的支配から完全に開放された下垂体をもつautograftラットでもＯＰＣ－４３９２によって、血中ＰＲＬ濃度が減少したこと（Ｆｉｇ．３－５）より、この効果は、下垂体に対する直接作用であり、第１章、第２章でin vitroで示されたＤＡレセプターに対するアゴニスト作用が、in vivoにおいても発現されることが明らかとなった。また３－ｐｐｐがautograftラットにおいてＰＲＬ分泌を抑制すること（Ｆｉｇ．３－６）（Meltzer HY and Simonovic, 1981）から、in vivoにおいてもいわゆるオートレセプターアゴニストは、下垂体ＤＡレセプターに対してアゴニスト作用を持つことが確認された。

正常雄ラットのＯＰＣ－４３９２の投与実験では、経口投与断頭採血によるもの（Ｆｉｇ．３－１）と、静注投与で尾静脈採血（Ｆｉｇ．３－２）の２種類の方法によって血中ＰＲＬ濃度の推移を検討したが、基礎レベルの血中ＰＲＬ濃度が断頭採血では、１０ｎｇ／ｍｌなのに対し尾静脈採血では、４０ｎｇ／ｍｌと非常に高い値を示し、尾静脈採血によるストレスによって血中ＰＲＬ濃度が上昇していることが考えられた。従って、経口投与断頭採血の方法による結果の方が、正常雄ラットに対するＯＰＣ－４３９２の効果を正確に反映していると考えられる。経口投与断頭採血では、低用量のＯＰＣ－４３９２では、血中ＰＲＬ濃度に変化を与えず、高濃度の投与では、血中ＰＲＬ濃度を低下させる傾向を示した（Ｆｉｇ．３－１）。前述のように、ＯＰＣ－４

３９２は、ＴＩＤＡニューロンに影響を与えないものと考えられるので、この結果はＯＰＣ－４３９２が、正常雄ラットの下垂体門脈血中に高濃度に存在すると推定される内生的ＤＡに対してアンタゴニスティックな効果を持たないことを示すものと考えられ、ＯＰＣ－４３９２はin vivoにおいても下垂体ＤＡレセプターには、専らアゴニストとして作用するものと考えられた。また、静注投与、尾静脈採血動物にみられたＯＰＣ－４３９２による血中ＰＲＬ濃度の減少は、ストレスによって、上昇したＰＲＬ分泌がＯＰＣ－４３９２によって抑制されたものと判断される。

ＯＰＣ－４３９２をautograftラットとisograftラットに投与した場合の血中ＰＲＬ濃度の変化に差異が認められた。すなわちＯＰＣ－４３９２の投与によって、autograftラットの血中ＰＲＬ濃度は初期値の３０％までしか低下しなかったのに対し（Ｆｉｇ．３－５）、isograftラットでは、初期値の３％まで低下した（Ｆｉｇ．３－７）。ところで、autograftラットの血中ＰＲＬ濃度の絶対値は、isograftラットそれに比べて１／８しかなかった（Ｆｉｇ．３－４）。下垂体を異所に移植して視床下部の支配から切り放すと、ＰＲＬ、ＧＨを除く他のホルモンは殆ど分泌されなくなる。雌ラットでは、エストロジェンは下垂体に直接作用して、ＰＲＬの合成（Gorski et al.,1981）、分泌（Andrews and Ojita 1977）、ＰＲＬ分泌細胞（ラクトトロフ）の増加（Stevens and Hefenstein,1966）を促進することがよく知られているが、雄では、この役をテストステロンが果たしている（Shin et al.,1974; Herbert et al.,1977）。Autograft雄ラットの血中ＰＲＬ濃度がisograftラットに比べて低いことの大きな原因の一つは、正位下垂体の欠如によるゴナドトロフィンの著しい減少によって精巣退行が起こりテストステロンの減少が継発するためと推定される。ＯＰＣ－４３９２のautograftラットとisograftラットの血中ＰＲＬ濃度に対する相対的効果の差は、両者の下垂体のＰＲＬ分泌活性の差によるものと考えられ、

ＰＲＬ分泌活性が高いほどＤＡレセプターを介した抑制に強く反応するものと判断された。この現象は１種の代償性反応であると理解される。

またＯＰＣ－４３９２による血中ＰＲＬ濃度の低下すなわちＯＰＣ－４３９２の抑制効果持続時間の長さにおいてもautograftラットとisograftラットの間に差異が認められた。すなわち、autograftラットでは、１ｍｇ／ｋｇ、５ｍｇ／ｋｇのＯＰＣ－４３９２の投与によって、少なくとも２４時間にわたって、抑制効果がみられたのに対し（Ｆｉｇ．３－５）、isograftラットでは、１ｍｇ／ｋｇでは、６時間後に、５ｍｇ／ｋｇでの遅くとも２４時間後には、血中ＰＲＬ濃度は初期値のレベルまで完全に回復し、抑制時間の短縮が認められた（Ｆｉｇ．３－７）。Autograftラットには存在しない正位の下垂体がなんらかの原因によって、ＰＲＬ分泌の昂進を起こし、その結果抑制時間の短縮が起こったものと思われる。以下この点を考察する。

Isograftラットでは、腎被膜下の下垂体による継続的高ＰＲＬ状態が存在するから、ＴＩＤＡニューロンは当然この状態に反応し、内生的にＰＲＬ分泌抑制機構が発現しＤＡ活性が上昇しているはずであって、従って正位下垂体のＰＲＬ分泌は、抑制された状態にあると考えられる。ＯＰＣ－４３９２の投与によって血中ＰＲＬ濃度が下がり、それに連れてＴＩＤＡニューロンより分泌されるＤＡが減少し、正位下垂体のＰＲＬ分泌が上昇する可能性が考えられる。しかしながら、門脈中のＤＡが減少しても正位下垂体は依然としてＯＰＣ－４３９２投与によるこの薬物のＰＲＬ分泌抑制を、autograftラットと同様に受けているはずであり、このことは両者の差異を説明し得ない。レゼルピンは、脳内のシナプスのＤＡを含めたカテコールアミンを長時間にわたって枯渇させる作用を持ち(Anden, 1967)、これを投与すれば、ＴＩＤＡニューロンにおけるＤＡの枯渇が主因となり、血中ＰＲＬ濃度の上昇が起こるとされる（Eriksson et al 1983）。ところがレゼルピンをisograftラットに投与したところ、血中

ＰＲＬ濃度には変化がなく（投与前１１２．９±１６．０ｎｇ／ｍｌ　ｖｓ　投与後１２８．１±４１．３ｎｇ／ｍｌ）、isograftラットにおいてはＴＩＤＡニューロンの活性を減少させて正位下垂体からのＰＲＬ分泌の上昇をはかっても、総体として血中ＰＲＬ濃度の上昇に寄与しないことが判った。先に、移植した下垂体由来の高ＰＲＬ血症によりＴＩＤＡニューロンの活性が上昇していると推論したが、このような上昇は実際には起こっていない可能性も考えられる。さらにisograftラット（Ｆｉｇ．３－８）あるいは正常雄（Ｆｉｇ．３－３）にあらかじめレゼルピンを投与し、血中ＰＲＬ濃度を上昇させた状態のラットにおいてのＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇ投与による血中ＰＲＬ濃度の変化を調べたところ、isograftラットの場合には、レゼルピンを投与しないとき（Ｆｉｇ．３－７）と同様に２４時間後に、また、正常雄ラットでは、６時間後には、血中ＰＲＬ濃度はほぼ初期の値まで上昇した。

以上のことより、正位下垂体を持つ正常、あるいは、isograftラットが、autograftラットに比べてＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制効果が短期間しか発現しない原因は、正位下垂体に対する内生的ＤＡ供給の減少によるものではないことは明らかである。つまり、ＯＰＣ－４３９２の投与は、正位下垂体からのＰＲＬ分泌を促進する効果があるためと考えられる。

In vitroでＤＡが視床下部ＴＲＨ分泌を抑制するとの報告がある（Joseph-Bravo et al 1979）。また、ラット正中隆起外層の下垂体門脈系の毛細血管の周囲で、[^{3}H]－ＤＡで標識される終末が、ＴＲＨ様免疫陽性細胞に密接している像が電子顕微鏡によって観察されており、このＤＡ含有終末が、ＴＲＨ終末にaxo-axonicに接触してしてＴＲＨの分泌に影響を与えている可能性が考えられている（Nakai et al 1983）。また第２章の結果より、ＯＰＣ－４３９２はＴＲＨのＰＲＬ分泌刺激作用に対して抑制作用を殆ど示さなかった。

これらのことと、本章で観察されたように、in vivoでＯＰＣ－４３９２を投

与した場合はin vitroで期待されるようなＰＲＬ血中レベルの低下が起こらないことから、ＯＰＣ－４３９２は下垂体レベルで作用するとともに、ＴＲＨまたは他のＰＲＦ分泌ニューロンにＤＡ系支配がおよんでその系に対しても作用している可能性がある。つまり、ＰＲＦ分泌ニューロンがドパミン作動性ニューロンの後シナプスニューロンとなっている可能性である。もしそうであれば、ＯＰＣ－４３９２はシナプス後Ｄ２レセプターにはアンタゴニスト効果を持つからＰＲＦニューロンにはＤＡ作動性の抑制から解除され、その結果、ＰＲＦが分泌され結果的に正位下垂体をもつラットでのＰＲＬ分泌抑制期間の短縮として観察されると考えることができる。このような機序が存在するとすれば、正常ラットにＯＰＣ－４３９２を投与した際に脳内のＰＲＦ分泌細胞に存在するシナプス後Ｄ２レセプターにＯＰＣ－４３９２がアンタゴニストとして働きＰＲＬ分泌の上昇が観察されるかも知れない。しかし実際にはこのような現象は起こらなかった。これは、ＴＩＤＡニューロンにオートレセプターが欠損しているためかも知れない。すなわちＯＰＣ－４３９２によっては、ＴＩＤＡニューロンの活性は影響を受けず、従って門脈内ＤＡは変化しない。このような状態でＰＲＦ分泌細胞に存在するシナプス後Ｄ２レセプターにＯＰＣ－４３９２がアンタゴニストに働いて、たとえＰＲＦが分泌されたとしても、第２章において見られたように内生的なＤＡによってＰＲＦのＰＲＬ分泌刺激は、強く抑制されてしまうと考えることができる。

正常ラットにレゼルピンを投与したときには、内生的ＤＡ活性は減少してしまうので、ＰＲＦによるＰＲＬ分泌刺激効果が、より明瞭に現れるはずである。とはいえ、ＯＰＣ－４３９２のin vivo投与では、下垂体に対するＰＲＬ分泌抑制の直接作用を除くことはできない。したがって、ＰＲＦの関与の有無は、ＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制のautograftラットにくらべての抑制時間の短縮として現れるものと推定される。なおＣＢ－１５４のようなアゴニストはシ

ナプス後Ｄ２レセプターにもアゴニストとして働くから、投与すればＰＲＦの低下と下垂体ＤＡレセプターを介したＰＩＦ活性の上昇を招くからＰＲＬ分泌は一方的に抑制されることになろう。

ラットでは黄体の機能化およびその維持にＰＲＬが必須である（Smith et al.,1975）。子宮頸管刺激に継発する神経－内分泌反射によってＰＲＬの大量放出が誘起され黄体が機能化され、以後１日２回のＰＲＬサージ（３時～６時に認められるノクターナルサージ、１７時～２１時に認められるダイアーナルサージ）によって黄体の機能が維持される（Bucther et al.,1972; Freeman 1974)。妊娠が成立しない場合黄体は約１４日で退行し偽妊娠は終了するが、これより早い時期にＣＢ－１５４などのＤＡアゴニスト作用を有する麦角アルカロイド（Frückiger and DelPozo,1979）や、脳内にＰＲＬ（Voogt and meites ,1971)を投与すると偽妊娠を中断させ得ることが報告されている。上の二つの例は、これは、それぞれ外生的、内生的にＤＡ活性を高めることによってＰＲＬ分泌を阻害し黄体を退行させた結果である。ラットの偽妊娠の維持すなわち黄体機能の維持は、プロジェステロンを生理活性の無い２０α－ダイハイドロプロジェステロンに変換する２０α－水酸基脱水素酵素（２０α－ＨＳＤ）の活性をＰＲＬが抑制することによって行なわれており、in vivoにおいて４０時間以上ＰＲＬの感作を受けないような状態にすると、２０α－ＨＳＤ活性が上昇し黄体が退行するが、この過程は不可逆であり（Matsuda et al., 1990）、偽妊娠は終了または中断する。したがって、４０時間以上、内生的なＰＲＬ分泌を抑制すれば、偽妊娠は中断されるはずである。　ＯＰＣ－４３９２は下垂体のＰＲＬ分泌をin vitro（第１章）、in vivo（本章）において強く抑制することから偽妊娠を中断させ得ることが予想された。

ところが、ＣＢ－１５４では、１．５ｍｇ／ｋｇの単一投与で偽妊娠が中断されるのに対し、ＯＰＣ－４３９２の５ｍｇ／ｋｇ、３０ｍｇ／ｋｇの単一投与

では、偽妊娠を中断することはできなかった（Ｔａｂｌｅ　１）。ＯＰＣ－４３９２はＣＢ－１５４に比べてＰＲＬ抑制効果が弱いことが、本研究において示唆されてきたので投与量、投与回数を増加させ、偽妊娠の中断を試みた。本章のisograftラット、autograftラットでの実験によって５ｍｇ／ｋｇのＯＰＣ－４３９２の投与によって、少なくとも６時間にわたってＰＲＬ分泌を抑制するはずである。従って、６時間毎の２日間にわたってＯＰＣ－４３９２（５ｍｇ／ｋｇ）を投与にすることによって、偽妊娠が中断することが予想された。しかしながら、このような処置を行なってもなおかつＯＰＣ－４３９２によっては偽妊娠を中断させることができなかった（Ｔａｂｌｅ　１）。したがって、偽妊娠のＰＲＬサージの発現機序の中に、ＣＢ－１５４では抑制でき、ＯＰＣ－４３９２には抑制できないメカニズムが、存在することが強く示唆された。

偽妊娠における２つのＰＲＬサージ、ノクターナルサージとダイアーナルサージは、ストレス（Freeman et al., 1974）、ステロイド（Freeman and Sterman, 1978）、光周期（Bethea and Neill, 1979）等に対する反応性が異なることが知られておりこの２つのサージの発現は独立した機序によって発現しているのではないかと考えられている。ＯＰＣ－４３９２を２つのサージに作用させることによって、その反応に差がでることも予測され、それによって、新たなる情報が得られることも期待できる。そこで、２つのサージの直前にＯＰＣ－４３９２を投与した結果、興味深いことに、ダイアーナルサージは阻止されるが（Ｆｉｇ．３－９）、ノクターナルサージは、阻止されず（Ｆｉｇ．３－１０）、投与回数を増加させると、量的には抑制されるもののＰＲＬサージそのものを抑制することはできなかった（Ｆｉｇ．３－１１）。したがって、ＯＰＣ－４３９２の６時間毎の２日間にわたる投与によって、偽妊娠が中断できなかったのは、このノクターナルサージが阻止されず、２４時間毎にＰＲＬ

が供給されるため、黄体が退行しなかったためと考えられた。以上の結果から、ダイアーナルサージは主に下垂体門脈血中のＤＡの減少によっておこり、ＯＰＣ－４３９２よって阻止し得るものと考えられる。一方、ノクターナルサージは、ＰＲＦの関与が強く示唆され、ＤＡの減少に加えて、ＣＢ－１５４によっては阻止されるがＯＰＣ－４３９２によっては阻止し得ないものと考えられた。

ＶＩＰが門脈中に高濃度に存在する事が知られている（Said and Porter, 1979; Shimatsu et al., 1981)。抗ＶＩＰ血清で吸乳刺激やストレスによる血中ＰＲＬ濃度の上昇を抑制すること（Abe et al., 1985）等から、生理的ＰＲＦの一つである可能性が想定されている。またin vitroでＰＲＬ分泌刺激効果を持つＰＨＩ（Werner et al., 1983）が正中隆起(Höckfelt et al., 1982)や門脈血(Shimatsu et al 1983)に存在することも知られている。これらのほかにもＰＲＦ活性のある、いくつかの神経ペプチドが存在しており（McCann, 1982)、これらのペプチドの全てあるいは一部がノクターナルサージに関与しているのであろう。また、内側視索前野（ＭＰＯＡ）の破壊によって偽妊娠が誘起される(Clemens et al., 1976)が、そのときノクダーナルサージのみが観察されること、また、偽妊娠中にＭＰＯＡを破壊するとダイアーナルサージが消失し、ノクターナルサージのみが発現することが報告されている（Freeman and Banks, 1980)。ＭＰＯＡの破壊によってＴＳＨ分泌が一過的に上昇することから（Aizawa and Creer, 1981）ＭＰＯＡはＴＲＨ分泌を抑制している部位とも考えられる。従って、ＭＰＯＡのノクターナルサージ抑制作用は、ＴＲＨ分泌抑制作用と重複していることも考えられ、ノクターナルサージの発現にはＴＲＨが強く関与していることも想像される。子宮頸管刺激をしたラットでは刺激しないラットにくらべて血中ＴＳＨが高いことも報告されているが（Castro-Vasques et al., 1981)、この原因は、ＭＰＯＡからの脱抑制によるＴＲＨ分泌の昂進のためかも知れない。

ＣＢ－１５４は長期活性を示すＤＡアゴニストであることが知られている（Besser et al.,1977）。ＣＢ－１５４の単一投与によって偽妊娠が阻止されることから、適当量のＣＢ－１５４は少なくとも４０時間にわたって、ＰＲＬ分泌を抑制し続けていることが示唆される。ＣＢ－１５４は、in vitroで、第１章で示したように静置培養において強いＰＲＬ分泌抑制作用を示し、第２章で示した如くsuperfusion系において負荷終了後にもＰＲＬ分泌を抑制し続ける。さらにＴＲＨによるＰＲＬ分泌刺激も強く抑制した。これらのことより、ＣＢ－１５４の偽妊娠阻止効果は、下垂体レベルでのＤＡアゴニスト作用のみでも説明し得るものであり、実際そう考えられてきた。しかしながら、その存在が推定されたＤＡ系によるＰＲＦの抑制支配に対してもＣＢ－１５４は効果を及ぼしている可能性が強い。もしそうであればＣＢ－１５４を投与した条件ではＰＲＦの不足も原因となってノクターナルサージは決して発現し得ない。すなわち、ＣＢ－１５４は、ＰＲＦ分泌細胞に存在すると仮定した、シナプス後Ｄ２レセプターにアゴニストとして働き、ＰＲＦ分泌を抑制することも考えられる。ＣＢ－１５４はおそらく下垂体レベル、脳内レベル両者のＰＲＦに対する抑制効果によって、ノクターナルサージすなわち偽妊娠を中断させることができるものと思われる。

以上の結果から、生理的なＰＲＬ分泌相において、ＰＲＦが関与していること、さらにはこのＰＲＦの分泌支配に脳内ＤＡ系が関与すること、すなわちＯＰＣ－４３９２を用いた解析によって、ＤＡは下垂体の直接なＰＲＬ分泌の抑制支配に加えて、脳内においてもＰＲＦ分泌を抑制することによって２重にＰＲＬ分泌を抑制的に支配していることが示唆された（Ｆｉｇ．３－１２模式図）。

また、ＯＰＣ－４３９２は、他の抗精神病薬（Meltzer and Fang ,1976; Langer et al., 1977）のようにin vivoで血中ＰＲＬ濃度を上昇させず、in vitroではＰＲＬ分泌を強く抑制する作用のあること、また血中ＰＲＬ濃度

が上昇した状態では、血中ＰＲＬ濃度を強く低下させる作用があることが示された。したがって、抗精神作用が確認されれば、副作用として高ＰＲＬ血症を起こさない新しいタイプの抗精神病薬となることが示唆され、さらに高ＰＲＬ血症に対する治療薬としての有用性も示唆された。

第３章　図表

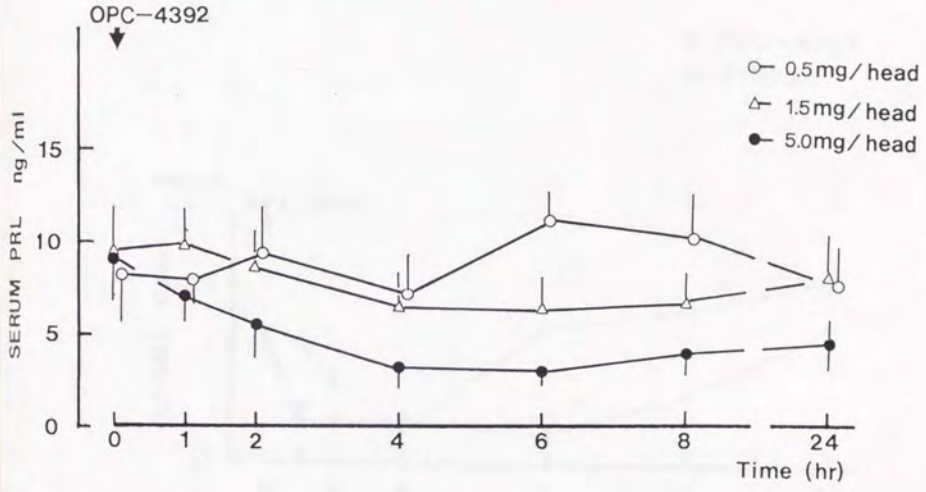


Fig. 3−1

正常雄ラットのＯＰＣ−４３９２経口投与後の血中ＰＲＬ濃度の推移

○ 0.5mg／head、△ 1.5mg／head、● 5mg／head

採血は断頭により行なった。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。

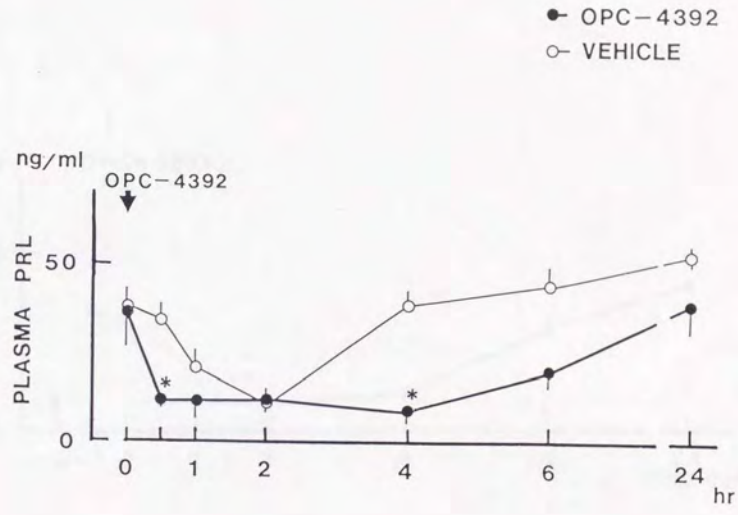


Fig. 3−2

正常雄ラットのOPC−4392静脈投与後の血中PRL濃度の推移

● OPC−4392 5mg/kg、○ 0.1M乳酸（対照）。

各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。＊はp＜0.05で対照群との間に有意差のあることを示す。

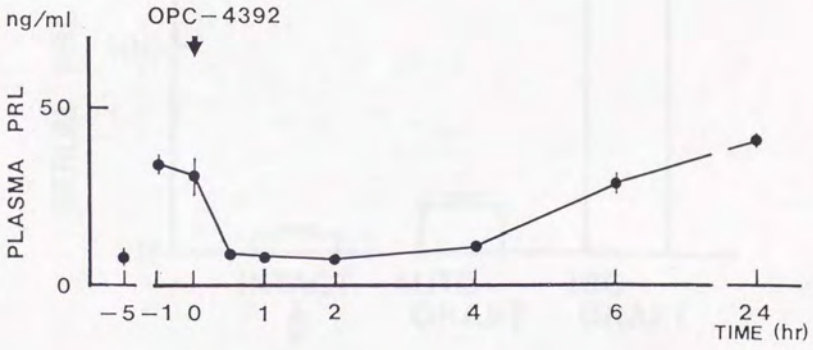


Fig. 3−3

レゼルピン投与ラットのＯＰＣ−４３９２投与後の血中ＰＲＬ濃度の推移

レゼルピン１０ｍｇ／ｋｇ 投与５時間後に、ＯＰＣ−４３９２　５ｍｇ／ｋｇを投与した。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。縦線を欠くものは点内に標準誤差が含まれる。

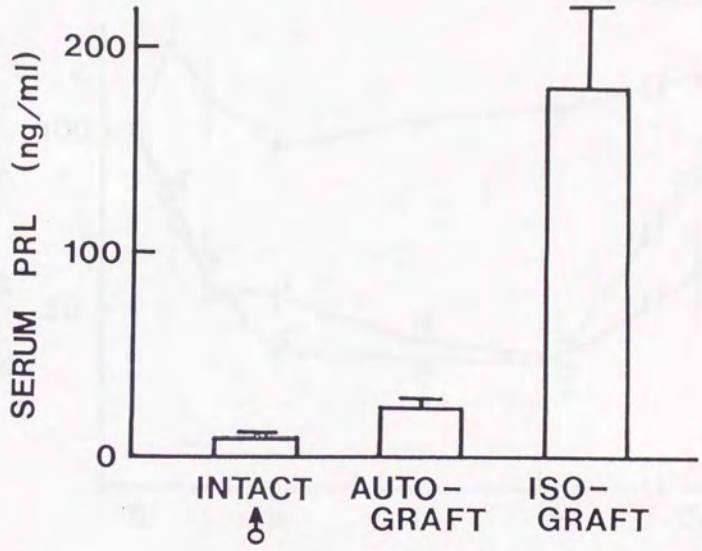


Fig. 3－4

正常雄ラット、autograftラット、isograftラットの血中ＰＲＬ濃度

各棒の高さと縦線は平均値±標準誤差を示す。

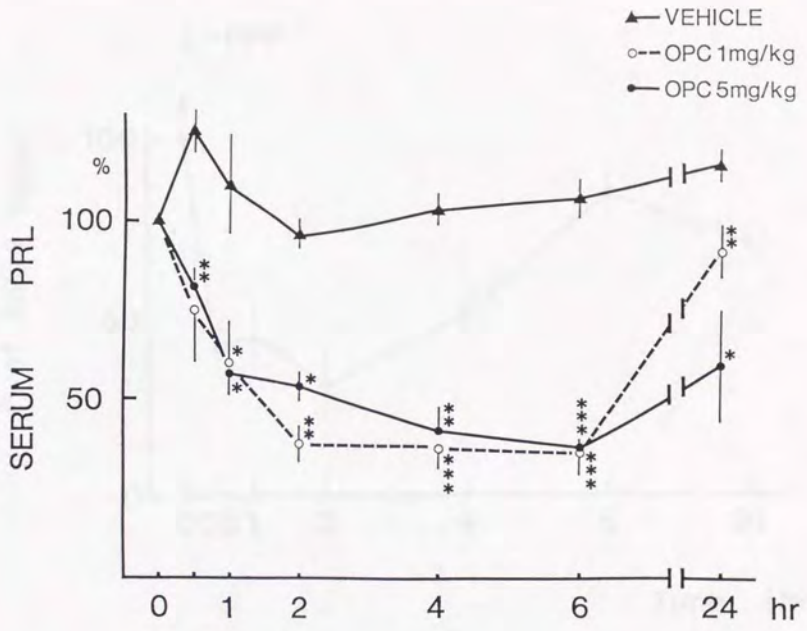
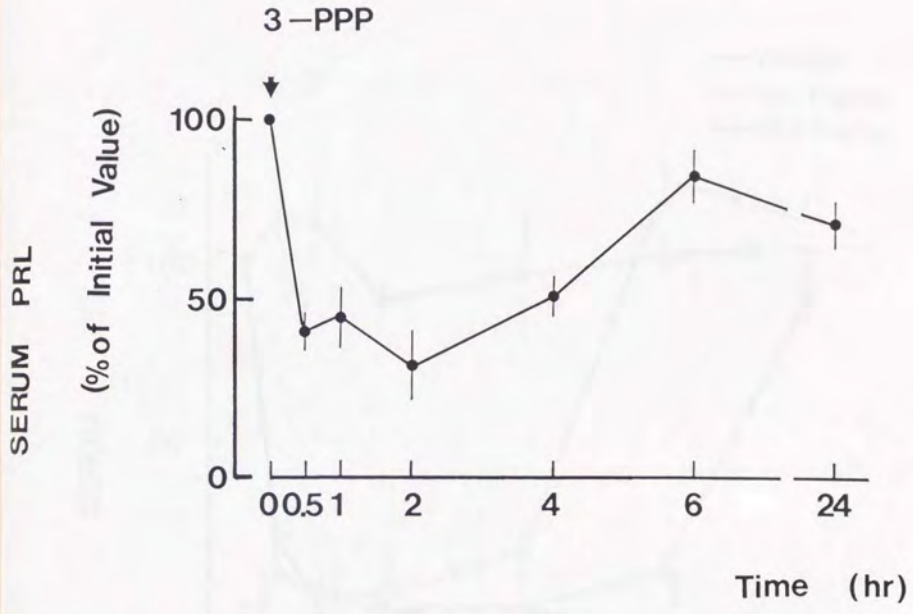


Fig. 3－5

Autograftラットの０ＰＣ－４３９２ 投与後の血中ＰＲＬ濃度の推移

○ ０ＰＣ－４３９２ １ｍｇ／ｋｇ、● ０ＰＣ－４３９２ ５ｍｇ／ｋｇ、▲ ０.１Ｍ乳酸（対照）。値は、各群の０ＰＣ－４３９２投与直前の血中ＰＲＬ濃度（図中０ｈ）に対する％で表わした。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。＊、＊＊、＊＊＊は、それぞれ、$p < 0.05$、$p < 0.01$、$p < 0.001$で対照群との間で有意差のあることを示す。



Ｆｉｇ．３－６

Autograftラットに対する３－ｐｐｐ５ｍｇ／ｋｇ投与後の血中ＰＲＬ濃度の推移

値は、各群のＯＰＣ－４３９２投与直前の血中ＰＲＬ濃度（図中０ｈ）に対する％で表わした。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。

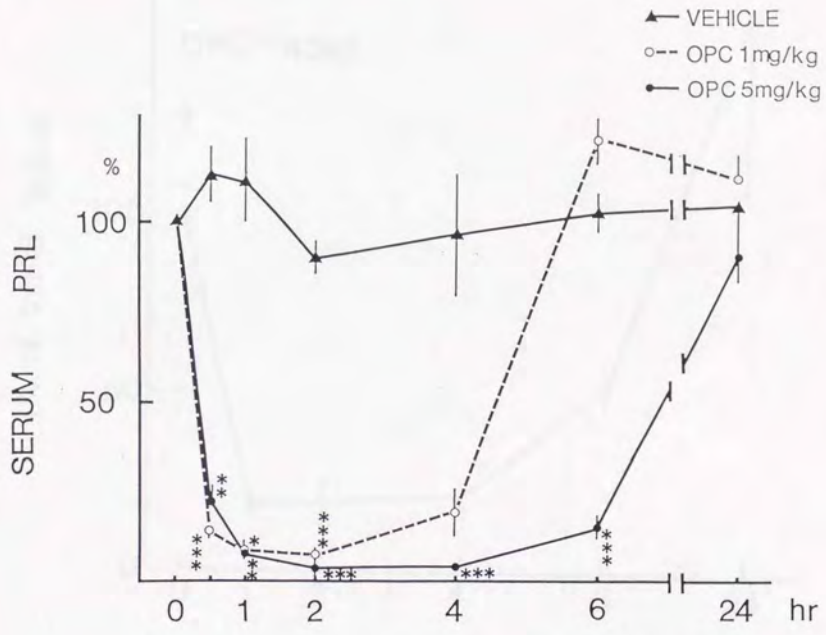
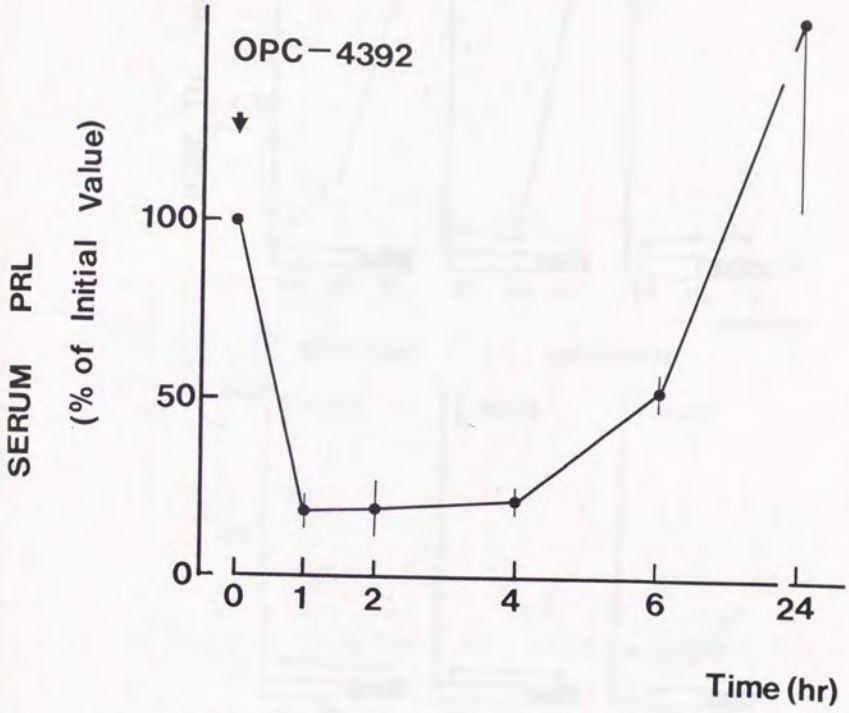


Fig. 3－7

Isograftラットの０ＰＣ－４３９２投与後の血中ＰＲＬ濃度の推移

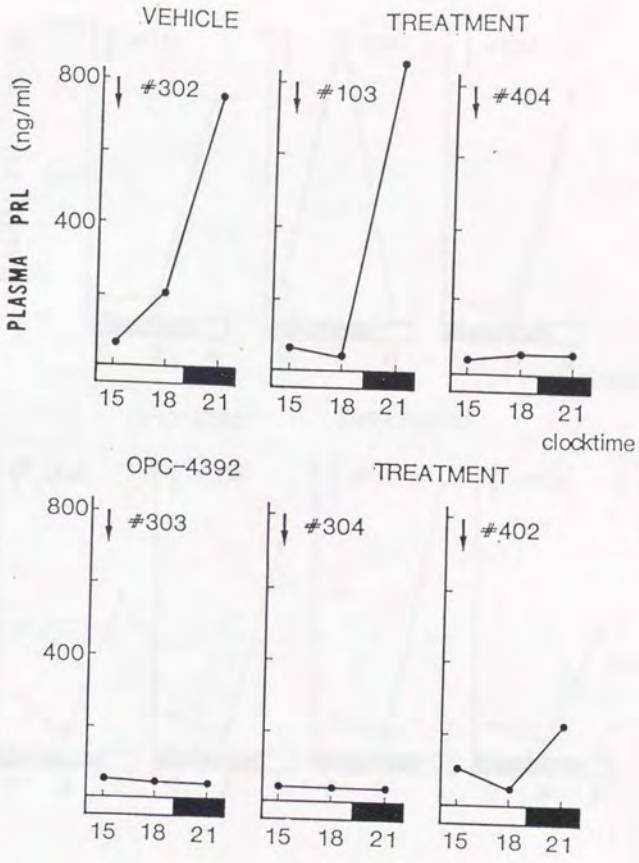
○　０ＰＣ－４３９２　１ｍｇ／ｋｇ、●　０ＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇ、▲　０.１Ｍ乳酸（対照）。値は、各群の０ＰＣ－４３９２投与直前の血中ＰＲＬ濃度（図中０ｈ）に対する％で表わした。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。＊、＊＊、＊＊＊は、それぞれ、$p < 0.05$、$p < 0.01$、$p < 0.001$で対照群との間で有意差のあることを示す。



Ｆｉｇ．３－８

レゼルピン投与isograftラットのＯＰＣ－４３９２投与後の血中ＰＲＬ濃度の推移

レゼルピン１０ｍｇ／ｋｇ 投与５時間後に、ＯＰＣ－４３９２ ５ｍｇ／ｋｇを投与した。値は、各群のＯＰＣ－４３９２投与直前の血中ＰＲＬ濃度（図中０ｈ）に対する％で表わした。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。

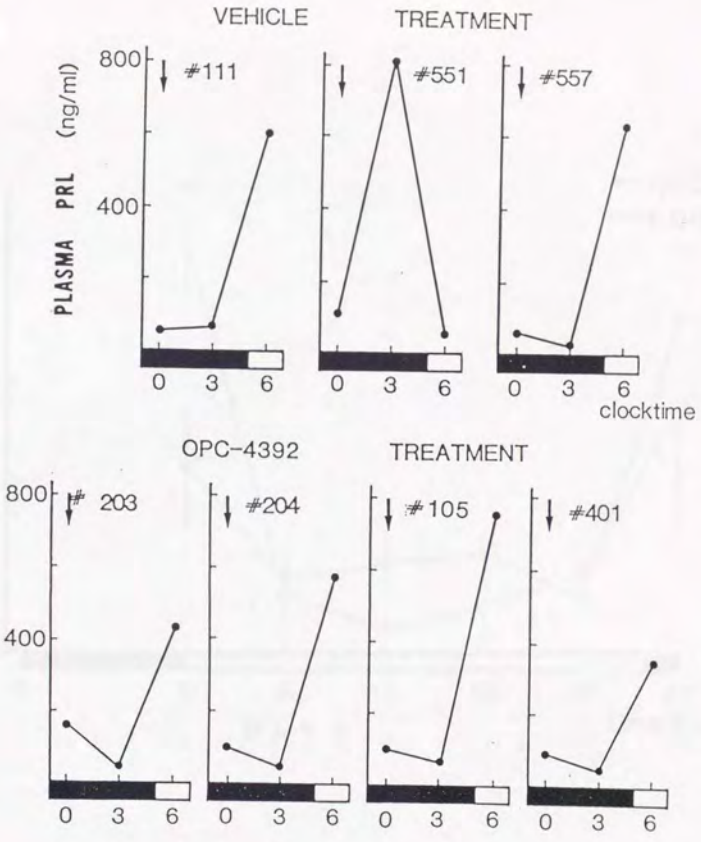


Ｆｉｇ．３－９

偽妊娠ラットのダイアーナルＰＲＬサージに対するＯＰＣ－４３９２単一投与の影響

偽妊娠第４日の１５時（矢印）に、ＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇ（上段）または、０．１Ｍ乳酸（対照）（下段）を投与し、１８時、２１時に採血をした。

＃は個体番号を示す。□は明期、■は暗期を表わす。



Ｆｉｇ．３－１０

偽妊娠ラットのノクターナルＰＲＬサージに対するＯＰＣ－４３９２単一投与ののの影響

偽妊娠第４日の０時に、ＯＰＣ－４３９２　５ｍｇ／ｋｇ（上段）または０．１Ｍ乳酸（対照）（下段）を投与し、３時、６時に採血をした。＃は個体番号を示す。□は明期、■は暗期を表わす。

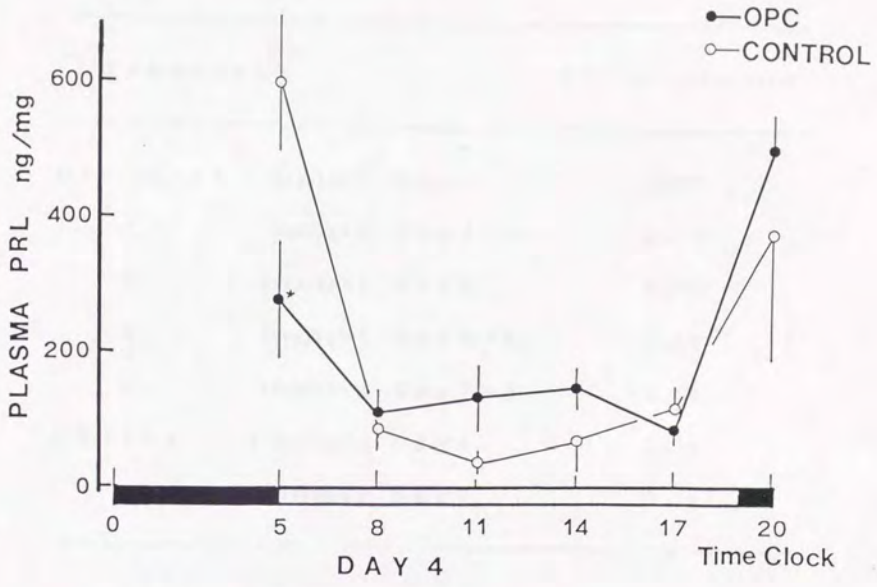


Fig. 3－11

偽妊娠ラットのノクターナルＰＲＬサージに対するＯＰＣ－４３９２２回投与の影響

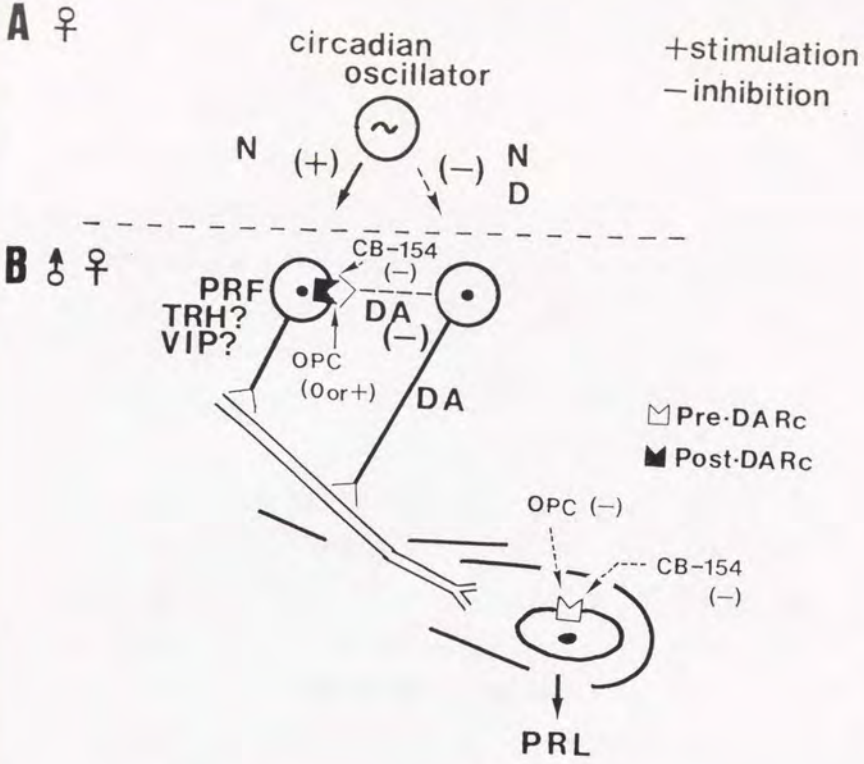
偽妊娠第４日の０時と３時に、● ＯＰＣ－４３９２ ５ｍｇ／ｋｇまたは ○ ０.１Ｍ乳酸（対照）を２回投与し、５時より２０時まで３時間毎に採血した。各点および縦線は平均値±標準誤差を示す。＊、ｐ＜0.05、で対照群との間で有意差のあることを示す。

Treatment		PSP not interrupted
OPC－4392	5mg/kg×1 Day4	7／7
〃	5mg/kg×8 Day4－5	4／4
〃	30mg/kg×1 Day4	6／6
〃	30mg/kg×4 Day4－5	6／6
〃	30mg/kg×4 Day7－8	6／6
CB－154	1.5mg/kg×1 Day4	0／6
〃	1.5mg/kg×1 Day7	0／6

Table. 3－1

ＯＰＣ－４３９２、ＣＢ－１５４の偽妊娠に対する影響

ＯＰＣ－４３９２、ＣＢ－１５４の投与方法、時間の詳細については材料と方法に記した。偽妊娠の中断は、膣スメアによって決定した。左には、ＯＰＣ－４３９２、またはＣＢ－１５４の投与量、回数、投与日を示した。右端に示した数値は、分母が各群の例数、分子が薬剤投与により偽妊娠が中断した動物数を示す。



Ｆｉｇ．　３－１２
ＰＲＬ分泌調節におけるＤＡ支配系の模式図
　♀　Ｎ（ノクターナル）サージ：サーカディアンオシレーターは、ＰＲＦニューロンを刺激、ＴＩＤＡニューロンを抑制する（パネルＡ）。ＴＩＤＡニューロンの抑制によって門脈血中のＤＡは減少するとともにＤＡによるＰＲＦニューロンのシナプス後ＤＡレセプターによる抑制が解除される。このＰＲＦニューロンに対する抑制解除と、サーカディアンオシレーターによる刺激が同時に起こることによりＰＲＦが分泌される。Ｎサージは、ラクトトロフへのＰＲＦ刺激とシナプス前様ＤＡレセプターを介したＤＡ抑制の減少により発現する（パネルＢ）。
　Ｄ（ダイアーナル）サージ：サーカディアンオシレーターは、ＴＩＤＡニューロンの抑制にのみ作動する（パネルＡ）。したがって、門脈中のＤＡは減少する。ＰＲＦニューロンのＤＡ抑制も解除されるが、サーカディアンオシレーターによる直接刺激が無いために、ＰＲＦは分泌されない。Ｄサージは、ラクトトロフのＤＡ抑制減少のみで発現する（パネルＢ）。
　♂　ＴＩＤＡニューロンにより、ラクトトロフシナプス前様ＤＡレセプターとＰＲＦに存在するシナプス後レセプターを介して二重にＰＲＬ分泌を抑制している（パネルＢ）。

第４章　総括

下垂体ＰＲＬ分泌は視床下部より分泌されるＰＲＬ放出促進因子（ＰＲＦ）とＰＲＬ放出抑制因子（ＰＩＦ）によって相反的に調節を受けているとされる。またステロイドなどの末梢ホルモンにも影響を受ける。哺乳類のＰＲＬ分泌調節は、著しく抑制支配優位にあり、現在では、その抑制支配の主体は、隆起漏斗部より下垂体門脈に分泌されるドパミン（ＤＡ）であり、ラクトトロフに存在するＤＡレセプターを介してＰＲＬ分泌を調節しているとの説が主流である。ＤＡを含めた多くのＤＡアゴニストやＤＡアンタゴニストがＰＲＬ分泌機序や生理的なＰＲＬ分泌動態の解析の有力な手段として用いられＰＲＬ分泌に対するＤＡの役割の追究に大きく貢献してきた。7-{3-[4-(2,3-dimethylphenyl) piperadinyl]propoxy}-2(1H)-quinolinone（ＯＰＣ－４３９２）は、抗精神病薬として開発中の新規の化合物であるが、Ｄ２レセプターに選択性があり、さらにシナプス前ＤＡレセプター（オートレセプター）にはアゴニストとして、シナプス後ＤＡレセプターには、アンタゴニストとして作用するとされる、従来のＤＡアゴニストやアンタゴニストにはみられない特性を有する薬剤である。本研究は、ラットを用いてin vitroにおいて下垂体ＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の作用の特異性を明らかにし、それをもとにin vivoにおいてＰＲＦとの下垂体レベルや中枢レベルでの相互作用も含めた、ＤＡ支配系ＰＲＬ分泌調節機構の解析を行なった。

第１章　下垂体ＰＲＬ分泌に対するＯＰＣ－４３９２の直接作用

下垂体静置培養系を用いて、代表的なＤＡアゴニスト、ＤＡアンタゴニストと比較しつつ、ＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対する影響を検討した。その結果、ＯＰＣ－４３９２は、ＤＡ、ＤＡアゴニストであるbromocriptine（ＣＢ

－１５４）、3-(3-hydroxyphenyl)-N-n-propylpiperidine（３－ｐｐｐ）と同様に濃度依存的にＰＲＬ分泌を抑制し、その抑制の半最大有効濃度（ＥＣ５０）は10^{-9}Ｍオーダーで、10^{-10}Ｍオーダーを示すＣＢ－１５４よりは弱いもののＤＡ、３－ｐｐｐと同じオーダーで強いＰＲＬ分泌抑制作用を示した。また、ＤＡアンタゴニストであるハロペリドールにおいても10^{-5}Ｍの高濃度ではＰＲＬ分泌を強く抑制した。次にハロペリドールと、ＯＰＣ－４３９２を下垂体培養細胞に作用させた結果、ハロペリドールは、それ自身ＰＲＬ分泌を抑制しない濃度においてＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制を濃度依存的に阻害した。また、ＤＡ、ＤＡアゴニストであるアポモルフィンとＯＰＣ－４３９２を共存させて下垂体培養細胞に作用させた結果、ＯＰＣ－４３９２は、高濃度においてわずかに、ＤＡのＰＲＬ分泌抑制を阻害したものの、アポモルフィンのＰＲＬ分泌抑制を全く阻害しなかった。以上のことより、ＯＰＣ－４３９２は、下垂体ＤＡレセプターに対してほとんどアンタゴニスト作用を示さず、ハロペリドールによってＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌抑制効果が拮抗されることから、ＯＰＣ－４３９２は下垂体ＤＡレセプターにはアゴニストとして作用することが示された。したがって、下垂体ＤＡレセプターは、ＤＡニューロン終末のいわば、「後」にあるにもかかわらず、薬理学的にはむしろオートレセプターの性質を持つことが示唆された。ＯＰＣ－４３９２は、脳内においてはオートレセプターアゴニスト作用、およびシナプス後ＤＡレセプターアンタゴニスト作用によりＤＡ活性は抑制されるが、下垂体ＤＡレセプターに対しては、本章の結果より、ＤＡ活性に対して促進的に働くことになり、脳内、下垂体両者に対して促進的、あるいは抑制的に働く従来のＤＡアゴニスト、または、アンタゴニストとは異なり、ＰＲＬ分泌調節におけるＤＡ系支配をより詳しく解析する上で非常に有用であることが示唆された。

第２章　Superfusionを用いたＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌動態に対する検討

本章では、マイクロキャリアに付着させた下垂体培養細胞をカラムに詰め、メディウムで連続的に灌流するsuperfusion法を用い、ＯＰＣ－４３９２に加えて生理的ＰＩＦとしてＤＡ、ＤＡアゴニストとしてＣＢ－１５４、さらには、生理的ＰＲＦとして、ＴＲＨをこれらと同時に作用させ、さらにＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌に対する特異性をより生理的条件に近い条件で検討した。本実験に用いたsuperfusion においては、ＤＡに対する濃度依存的なＰＲＬ分泌抑制と、ＴＲＨにたいする大量のＰＲＬ分泌高進が観察された。Superfusion法におけるＤＡ、ＣＢ－１５４、ＯＰＣ－４３９２のＰＲＬ分泌にたいする影響は、静置培養とは異なり、量的のみならず質的にも異なると解釈される結果を示した。ＯＰＣ－４３９２負荷によるＰＲＬ分泌抑制効果は弱く表現され、ＰＲＬ分泌高進状態においては抑制効果がみられたもののＴＲＨのＰＲＬ分泌高進作用に対しては、殆ど抑制効果を示さなかった。ＤＡの負荷によっては急激にＰＲＬ分泌は減少したが、負荷終了後、比較的速やかにＰＲＬ分泌は、負荷前の値に回復した。またＤＡ負荷中にＴＲＨを作用させるとその時点でのＴＲＨよるＰＲＬ分泌の上昇は起こらないが、ＤＡ負荷終了後、ＴＲＨ単独負荷よりもはるかに大きいＰＲＬ分泌の高進が観察され、生体内におけるＰＲＬの大量分泌にはこのようなメカニズムが存在している可能性が示唆された。ＣＢ－１５４は、負荷後速やかにＰＲＬ分泌を減少させ、さらには負荷終了後においてもＰＲＬ分泌は、長時間に渡って抑制されたままであった。さらにＴＲＨ作用時のＰＲＬ分泌高進も強く抑制しＣＢ－１５４負荷終了後においてもＤＡにおいて観察されたＰＲＬの大量分泌は全くみられず、生体内におけるＣＢ－１５４の強力なＰＲＬ抑制作用には、単に門脈血中のＤＡの増加を再現したのみならず、ＰＲＦによる分泌刺激効果をも阻害している可能性も示唆された。

以上の結果より、１章の結果とも考え併せれば、ＯＰＣ－４３９２はＤＡアゴニストでありながらＣＢ－１５４とは異なり、ＴＲＨのようなＰＲＦに対しては、ＰＲＬ分泌抑制効果を示さないことが示唆され、この性質を利用することによって生理的なＰＲＬ分泌が、ＤＡの減少によるものか、ＰＲＦの増加によるものかという問題を解決する手段となる可能性が示唆され、第１章で明かとなった脳内ＤＡ系と下垂体ＤＡ系に対する解離と併せ、ＯＰＣ－４３９２がＰＲＬ分泌調節機構の解析に有用であることがさらに示唆された。

第３章　生体におけるＯＰＣ－４３９２によるＰＲＬ分泌調節系の解析

実験的にＰＲＬ分泌を高進させたラット（レゼルピン投与ラット、auto-graftラット、isograftラット）の血中ＰＲＬ濃度は、ＯＰＣ－４３９２によって著しく抑制され生体内においても下垂体ラクトトロフＤＡレセプターに対してＯＰＣ－４３９２はアゴニストとして作用することが確認された。しかしながら、正位即ち視床下部支配下にある下垂体を持つラット（レゼルピン投与ラット、isograftラット）は正位下垂体を持たないラット（autograftラット）に比べＰＲＬ分泌抑制時間の短縮が観察された。隆起漏斗系ＤＡニューロンにはオートレセプターは存在しないとされていることから、この現象は、第２章で示唆された下垂体レベルでのＯＰＣ－４３９２では阻止できないＰＲＦの分泌によるものと推定され、このＰＲＦ分泌はＤＡ系による抑制されるＰＲＦ分泌機序がＯＰＣ－４３９２のシナプス後Ｄ２レセプターアンタゴニスト作用により解除された結果であると解釈された。正常ラットでは、血中ＰＲＬ濃度はＯＰＣ－４３９２の投与によって変化しなかったが、ＯＰＣ－４３９２によってＰＲＦが分泌されても内生的ＤＡによって、ＰＲＬは抑制されると考えられた。

生理的ＰＲＬ分泌相をもつ偽妊娠ラットにＯＰＣ－４３９２を大量、頻回に

投与してもＣＢ－１５４とは異なり偽妊娠を中断させることができなかった。この原因を探るため、ＰＲＬダイアーナルサージまたは、ノクターナルサージの直前にＯＰＣ－４３９２を投与したところ、ＯＰＣ－４３９２によってダイアーナルサージは阻止されるのに対し、ノクターナルサージは投与量を増やしても消失させることはできず、この結果偽妊娠が阻止できなかったものと判断された。したがって、ノクターナルサージ発現機序にはＯＰＣ－４３９２によっては、阻止できず、ＣＢ－１５４によっては阻止できる、すなわちＰＲＦを解した機序が関与することが強く示唆され、ＣＢ－１５４は、下垂体レベルにおけるＰＲＦのＰＲＬ分泌刺激作用の抑制に加えて、前述した、正位下垂体ラットを持つラットにおいての実験で推定されたＤＡ系に抑制されるＰＲＦ分泌系をも抑制している可能性も考えられた。

以上によりＯＰＣ－４３９２を用いた解析によってＤＡは、下垂体に対する直接の抑制支配に加えて、脳内においてもＰＲＦ分泌を抑制することによって二重にＰＲＬ分泌を抑制的に支配していることが示唆された。

謝 辞

本論文の完成までに、終始御指導、御鞭撻賜りました高橋迪雄教授に、深甚なる謝意を表します。

御指導、御鞭撻賜りました本間運隆前教授に深謝致します。

貴重な御教示、御鞭撻を賜りました塩田邦雄助教授に深謝致します。

本研究の遂行並びに論文の作製に多大な御協力を戴きました獣医生理学教室の皆様に心より御礼申し上げます。

本論文の作製に御便宜を賜りました清水直容教授（帝京大学医学部）に感謝致します。

本論文の作製に御協力戴いた帝京大学医学部付属市原病院動物室の皆様に感謝致します。

ＯＰＣ－４３９２を供与して戴きました菊池哲朗氏（大塚製薬）に感謝致します。

文 献

Abe H, Engler D, Molitch ME, Bollinger-Gruber J, Peichilin S 1985 Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. Endocrinology 116:1383

Aizawa T, Creer MA 1981 Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. Endocrinology 109:1731

Ajika K, Kalra SP, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM 1972 The effect of stress and nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats. Endocrinology 90:710

Andén NE, Dahlström A, Fuxe K, Hökfelt T 1966 The effect of haloperidol and chlorpromazine on the amine levels of central monoamine neurons. Acta Physiol Scand 68:419

Andén NE 1967 Effects of reserpine and a tyrosine hydroxxylase inhibitor on the monoamine levels in different regions of the rat central nervous syatem. European J Pharmacol 1:1

Andrews WW, Ojida SR 1977 On the feedback action of estrogen on gonadotropin and prolactin release in infantile female rats, Endocrinology 101:1517

Barnes GD, Brown BL, Gard TG, Atkinson D, Ekins RP 1978 Effect of TRH and dopamine on cyclic AMP levels in enriched mammotroph and thyrotroph cells. Mol Cell Endocrinol 12:273

Bartke A, Lloyd CW 1970 Influence of prolactin and pituitary isografts on spermatogenesis in dwarf mice and hypophysectomize rats. J Endocrinol 49:311

Ben-Jonathan N 1985 Dopamine:A prolactin-inhibiting hormone. Endocr Rev 6:564

Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ 1977 Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during estrous cycle and throughout pregnancy. Endocrinology 100:452

Besser GM, Thorner MO, Wass JAH, Mortimer CH, Yeo T 1977 Therapeutic use of bromocriptine and growth hormone release inhibiting hormone. Prog Reprod Biol 2:261

Bethea CL, Neill JD 1979 Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. Endocrinology 104:870

Bhuta SI 1976 CB-154-[14C] absorption,blood level,and excretion in man. Sandoz

Boyd III AE, Spencer E, Jackson IMD, Reichilin S 1976 Prolactin-releasing factor (PRF) in porcine hypothalamic extract distinct from TRH. Endocrinology 99:861

Brodde OE 1982 Vascular dopamine receptors: Demonstration and characterization by in vitro studies. Life Sci 31:289

Brown EM, Attie MF, Reen S, Gardner DG, Kebabian J, Aurbach GD 1980 Characterization of dopaminergic receptors in dispersed bovine parathyroid cells. Mol Pharmacol 18:335

Butcher RL, Fugo NW, Collons WE 1972 Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat. Endocrinology 90:1125

Butcher RL, Collins WE, Fugo NW 1974 Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, Progesterone and estradiol-17beta throughout the 4day estrous cycle of the rat. Endocrinology 94:1704

Butler WR, Krey LC, Lu KH, Peckham WD, Knobil E 1975 Surgical disconnection of the medial basal hypothalamus and pituitary function in the rhesus monkey 4. prolactin secretion. Endocrinology 96:1099

Calabro MA, MacLoad RM 1978 Binding of dopamine to bovine anterior pituitary gland membranes. Neuroendocrinology 25:32

Caron MG, Beaulieu M, Paymond V, Gagné B, Drouin J, Lefkowitz RJ, Labrie F 1977 Dopaminergic receptors in the anterior pituitary grand. J Biol Chem 253:2244

Castro-Vasques A, Ojida SR, Krulich L, McCann SM 1981 Thyroid stimulating hormone release during the estrous cycle of the rat: variations in responsiveness to cervicovaginal stimulation. Neuroendocrinology 33:193

Clemens JA, Smalstig EB, Sawyer BD 1976 Studies on the role of the preoptic area in the control of reproductive function in the rat. Endocrinology 99:728

Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI 1978 Dopamine and dihydroergocriptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. Endocrinology 103:302

De Greef WJ, Dullaart J, Zeilmaker GH 1977 Serum concentrations of progesterone, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin in pseudopregnant rats: Effect of decidualization. Endocrinology 101:1054

De Greef WJ, Neill JD 1979 Dopamine levels in hypophysial stalk plasma of rat during surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. Endocrinology 105:1093

De Greef WJ, Voogt JL, Visser TJ, Lamberts SWJ, van der Schoot P 1987 Control of prolactin release induced by suckling. Endocrinology 121:316

Demarest KT, Moore KE 1979 Comparison of dopamine synthesis regulation in the terminals of nigrostriatal, mesolimbic, tuberoinfundibular and tuberohypophyseal neurons. J Neural Transm 46:263

Dikerman S, Clark J, Dickerman E, Meites J 1972 Effect of haloperidol on serum and pituitary prolactin and hypothalamic PIF in rats. Neuroendocrinology 9:332

Dohler KD, Wuttke W 1974 Total blockade of phasic pituitary prolactin release in rats: Effect on serum LH and progesterone during the estrous cycle and pregnancy. Endocrinology 94:1595

Enjalbert A, Ruberg M, Kordon C 1978 Neuroendocrine control of prolactin secretion. In: Pobyn C, Harter M (eds) Progress in prolactin physiology and pathology. Elsevier North Holland, Amsterdum p83

Enjalbert A, Bockaert J 1982 Pharmacological characterization of the D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. Mol Pharmacol 23:576

Eriksson E, Modigh K, Carlsson A, Wikstrom H 1983 Dopamine receptors involved in prolactin secretion pharmacologically characterized by means of 3-ppp enantiomers. European J Pharrmacol 96:29

Everett JW 1954 Luteotrophic function of autografts of the rat hypophysis. Endocrinology 54:685

Freeman ME, Banks JA 1980 Hypothalamic sites which control the surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. Endocrinology 106:668

Freeman ME, Smith MS, Nazian SJ, Neil JD 1974 Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 94:875

Freeman ME, Sterman JR 1978 Ovarian steroid modulation of prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats. Endocrinology 102:1915

Frükiger E, del Pozo E 1978 Influence on the endocrine system. In: Berde B, Shild HO (eds) Ergot alkaroids and related compounds. Springer Verlag, Heidelberg p615

Fuxe K 1963 Cellular localization of monoamines in the median eminence and the infundibular stem of some mammals. Acta Physiol Scand 58:383

Gibbs DM, Neill JD 1978 Dopamine Levels in hypophysial stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. Endocrinology 102:1895

Goodale DB, Pustephorz DB, Long JP, Flynn JR, Walsh B, Cannon JG, Lee T 1980 Neurochemical and behavial evidence for a selective presynaptic dopamine receptor agonist. Science 210:1141

Gorski J 1981 Prolactin biosynthesis and its regulation by estrogens. In: Jaffe RB (ed) Prolactin. Elsevier, New york p57

Grosvenor CE, Whitworth N 1974 Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. J Dairy Sci 57:900

Gudelsky GA, Moore KE 1976 Differential drug effects on dopamine concentration and rates of turnover in the median eminence, olfactory tubercle and corpus striatum. J neural Transm 38:95

Gudelsky GA, Porter JC 1980 Release of dopamine from tubroinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration Endocrinology 106:526

Hafiez AA, Lloyd CW, Bartke A 1972 The role of prolatin in the regulation of testis function: the effects of prolatin and luteinizing hormone on the plasma level of testosterone and androstenedione in hypophysectomized rats. J Endocrinol 52:327

Herbert DC, Cisneros PL, Rennels EG 1977 Morphological changes in prolactin cells of the rat after testosterone administration. Endocrinology 100:487

Hjorth S, Carlsson A, Wikström H, Lindberg P, Sanchez P, Hacksell U, Arvidsson LE, Svenson U, Nilsson JLG 1981 3-ppp, a new centrally acting DA-receptor agonist with selectivity for autoreceptors. Life Sci 28:1225

Hökfelt T, Farrenkrug J, Tatemoto K, Mutt V, Werner S 1982 PHI a VIP like peptide is present in the rat median eminence. Acta Phsiol Scand 116:469

Hökfelt T, Johanssen O, Goldstein M 1984 Chemical anatomy of the brain. Science 225:1326

本間運隆　1953　ダイコクネズミの下垂体摘出手術　医学と生物学 28:94

Joseph-Bravo P, Charri JL, Palacios JM, Kordon C 1979 Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat medio basal hypothalamus. Endocrinology 104:801

Kadota C, Ohta M, Takahashi M 1988 Dynamic response to follicle-stimulating hormone of secretion of progesterone by superfused rat ovarian granulosa cells. Mol Cell Endocrinol 59:213

Kamberi IA, Mical RS, Porter JC 1971 Effect of anterior pituitary purfusion and intraventricular injection of catecholamine on prolactin release. Endocrinology 88:1012

Kanematsu S, Sawyer CH 1973 Elevation of plasma prolactin after hypophysial stalk section in the rat. 93:238

Kannan CR 1987 The pituitary gland: Clinical surveys in endocrinology Vol 1. Plenum Publishing Corporation, New York

Kebabian JW, Calne DB 1979 Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93

Kiuti K, Hirata Y, Minami M, Nagatu T 1987 Effect of 7-(3-[4-(2-3-dimetylphenl)piperazinyl]propoxy)-2(1H)-quinolinone (OPC-4392), a newly synthesized agonist for presynaptic dopamine D2 receptor on thyrosine hydroxylation in rat striatal slices. Life Sci 42:343

Kusunoki M, Taniyama K, Tanaka C 1985 Dopamine regulation of [3H]acetylcholine release from guinea pig stomach. J Pharmacol Exp Ther 234:713

Langwr G, Sachar EJ, Gruen PH, Halperm FS 1977 Human prolactin responses to neuroleptic drugs correlate with antischzophrenic potency. Nature 266:639

Losonczy MF, Davidoson M, Davis KL 1987 The dopamine hypothesis of schizophrenia In:Meltzer HY (ed) Psychopharmacology:The third generation of progress. Ravan Press, New York p715

Lowry PJ 1974 A sensitive method for the detection of corticotrophin releasing factor using a perfused pituitary cell column. J Endocrinol 62:163

Lowry PJ, McMartin C 1974 Measurement of the dynamics of stimulation and inhibition of steroidogenesis in isolated rat adrenal cells by using column perfusion Biochem J 142:287

MacLoad RM 1976 Regulation of Prolactin secretion. In:Martini L, Ganong WF (eds) Frontiers in neuroendocrinology Vol 4. Ravan Press, New York p169

MacLoad RM, Lehmeyyer JE 1974 Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. Endocrinology 94:1077

Matsuda J, Noda K, Shiota K, Takahashi M 1990 Participation of ovarian 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase in luteotrophic and luteolytic process during rat pseudopregnancy. J Reprod Fert 88:467

McCann SM 1982 The role of brain peptides in control of anterior pituitary hormone secretion. In: Muller EE, MacLoad RM (eds) Neuroendocrine perspective. Elsevier Biomedical Press p1

Meites J 1973 Control of prolactin secretion in animals. In: Pasteels JG, Pobyn C (eds) Human prolactin. Excerta Medica Amusterdam p105

Meltzer HY, Fang VS 1976 The effect of neuroleptics on serum prolactin in schizophrenic patients. Arch Gne Psych 33:279

Melter HY, Simonovic M 1981 Effect of 3-ppp, a putative dopamine autoreceptor agonist, on serum prolactin levels. Life Sci 99:105

Moore KE 1987 Interactions between prolactin and dopaminergic neurons. Biol Reprod 36:47

Moore KE, Wuerthele SM 1979 Regulation of nigrostriatal and tuberoinfundibular hypophyseal dopaminergic neurons. Prog Neurobiol 13:325

Moore RY, Bloom FE 1978 Central catecholamine neuron systems. Ann Rev Neurosci 1:129

Murakami N, Takahashi M, Suzuki Y, Homma K 1982 Responsiveness of dispersed rat luteal cells to luteinizing hormone and prolactin during the estrous cycle and early pseudopregnancy. Endocrinology 111:500

Nagatu T, Levitt M, Udenfriend S 1964 Tyrosine hydroxylase:The initial step in norepinephrine biosynthesis. J Biol Chem 239:2910

Nakai Y, Shioda S, Ochiai H, Kondo J, Hashimoto A 1983 Ultrastructual relationship between monoamine- and TRH-containing axons in the rat median eminence as revealed by combined autoradiography and immunocytochemistry in the same tissue section. Cell tissue Res 230:1

Neill JD 1980 Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. In:Martini L, Ganong WF(eds) Frontiers in neuroendocrinology Vol 6. Ravan Press, New York p129

Onalli P, Schwartz JP, Costa E 1981 Dopaminergic modulation of adenylate cyclase stimulation by vasoactive intestinal peptide in anterior pituitary. Proc Natl Acad Sci 78:6531

Pasteels JL 1961 Sécrétion de prolactine per l'hypophyse en culture de tissus. C R Acad Sci Ser D 253:2140

Richelson E 1980 Neuroleptics and neurotransmitter receptors. Psychiat Ann 10:459

Rosenzweig LJ, Kanwer YS 1982 Dopamine internalization by and intracellular distribution within prolactin cells and somatotrophs of the rat anterior pituitary as determined by quantitative electron microscopic autoradiography. Endocrinology 111:1817

Roth RH 1979 Dopamine autoreceptors: Pharmacology, function and comparison with postsynaptic dopamine receptors. Cmmun Psycopharmacol 3:429

Said SI, Porter JC 1979 Vasoactive intestinal polypeptide: release into hypophyseal portal blood. Life Sci 24:227

Seeman P 1981 Brain dopamine receptors.Pharmacol Rev 32:229

Seeman P 1987 Dopamine receptors and dopamine hypothesis of schizophrenia. Synapse 1:133

Shaar CJ, Clemens JA 1974 The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. Endocrinology 95:1202

Shimatsu A, Kato Y, Inoue T, Christofides ND, Bloom S, Imura H 1983 Peptide histidine isoleucine and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity coexist in rat hypophysial portal blood. Neurosci Letter

Shimatsu A, Kato Y, Matsushita N, Kitakami H, Yanaihara N, Imura H 1981 Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide in rat hypophysial portal blood. Endocrinology 108:395

Shin SH, Aiken RB, Roberts R, Howitt C 1974 Effect of testosterone on serum prolactin in the castrated rat. J Endocrinol 63:257

Shiota K, Yoshida K, Noguchi C, Nagayama R 1984 In vitro Thyrotrophin release with thyrotropin releasing hormone and an analogue, DN-1417. Acta Endocrinol 106:71

Skirboll LR, Grace AA, Bunney BS 1979 Dopamine auto- and postsynaptic receptors: electorophysiological evidence for differential sensitity to dopamine agonists. Science 206:80

Smith MA, Vale WW 1980 Superfusion of rat anterior pituitary cells attached to cytodex beads: validation of a technique. Endocrinology 107:1425

Smith MS, Freeman NE, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of Pseudopregnancy. Endocrinology 96:219

Stevens E, Helfenstein JE 1966 Some effects of certain naturally occurring oestrogens on the anterior pituitary grands of the rats. Nature 211:879

Stoof JC, Kebabian JW 1984 Two dopamine receptors: biochemistry, physiology and pharmacology. Life Sci 35:2281

Strömbom U 1975 On the functional role of pre- and postsynaptic catecholamine receptors in brain. Acta Physiol Scand Suppl 431:1

鈴木善祐　高橋迪雄　1979　妊娠のホルモン制御　－哺乳動物－　代謝　臨時増刊「性」　Vol16：473

Swennen L, Denef C 1982 Physiological concentrations of dopamine decrease adenosine 3',5'-monophosphate levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs: evidence for a causal relationship to inhibition of prolactin release. Endocrinology 111:398

Talwalker PK, Patner A, Meites J 1963 In vitro inhibition of pituitary prolactin synthesis and release by hypothalamic extract. Am J Physiol 205:213

田中千賀子　白川治　1985　ドーパミンレセプター　代謝　22:113

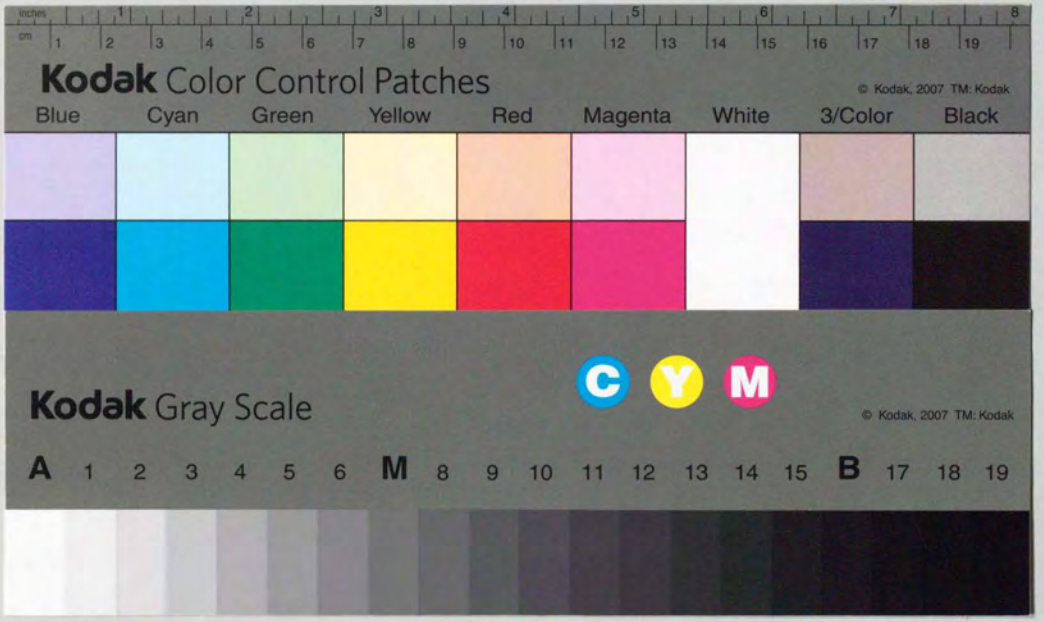
寺井道夫　臼田眞治　前野弘夫　1984　ドーパミン受容体　蛋白質核酸酵素29:1328

Van Rossum JM 1966 The significance of dopamine-receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. Arch Int Pharmacodyn Ther 160:492

Voogt JJ, Meites J 1971 Effect of an implant of prolactin in median eminence of pseudopregnant rats on serum and pituitary LH, FSH and prolactin. Endocrinology 88:286

Yasuda Y, Kikuchi T, Suzuki S, Tsutsui M, Yamada K, Hiyama T 1988 7-[3-(4-[2,3-dimethylphenyl]piperazinyl)propoxy]-2(1H)-quinolinone(OPC-4392), A presynaptic dopamine autoreceptor agonist and postosynaptic D2 Receptor antagonist. Life Sci 42:1941

Werner S, Hulting AL, Hökfelt T, Eneroth P, Tatemoto K, Mutt V, Moroder L, Wunsch E 1983 Effect of the peptide PHI-27 on prolactin release in vitro. Neuroendocrinology 37:476


inches
cm
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue
Cyan
Green
Yellow
Red
Magenta
White
3/Color
Black
Kodak Gray Scale
C
Y
M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19