

シンポジウム プロラクチンとリプロダクション

胎児におけるプロラクチン分泌の動態とその生理的意義

東京大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 坂元正一教授)

水 口 弘 司

共同研究者

木川 源則, 桑原 慶紀, 森 宏之, 千国 宏文, 長阪 恒樹, 神保 恒雄, 多賀 理吉
 武谷 雄二, 水谷 勝美, 田中 和子, 劉 天恩, 合阪 幸三, 曾 栄輝, 田中 慶子
 杉浦 弘子, 井上 真理, 大島 清 (京都大学霊長類研究所)

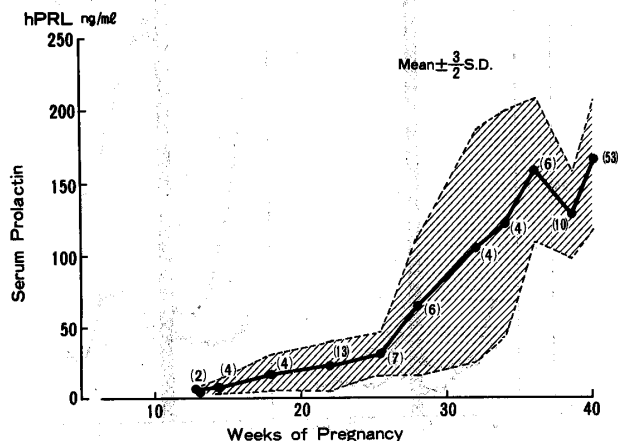
はじめに

プロラクチン (PRL) は各種の動物で極めて多彩な生理作用を有することが知られている。すなわち, 下等脊椎動物では体内の水, 電解質のバランス維持, あるいは reproduction に関連した生態学的行動の変化などに関与し, 外部環境への適応には不可欠なホルモンであるが, 進化するに従って哺乳類ではステロイドの代謝に作用し, ヒトでは乳腺刺激作用が主なものである。これは, 動物の進化に伴ってレセプターも進化し, ホルモン反応性が変化したことによるものであるが, 個体発生が系統発生を辿るとすれば, ヒトでも胎生期には異った生理作用を持つことも考えられる。

従来, 胎児血, 羊水中には妊娠初期から多量の PRL が存在することは知られている。本研究はこのような観点から, その由来, 分泌機序, 生理作用を検討した。

I. 胎児 PRL の分泌動態

図1 Concentration of Fetal Serum Prolactin during Pregnancy



胎児血中 PRL は妊娠13週から認めるが, 妊娠初期では低値である。妊娠25週ころから増加し, 満期産分娩時170ng/ml の高値となり, 新生児期には生後2週間まで徐々に下降する。PRL の血中半減期は約20分と短かく, 新生児期でもなお多量の PRL 分泌の持続することが分かる (図1)。

一方, 羊水中 PRL は妊娠6週から認め, 妊娠18週で平均2.2μg/ml と高値で peak を作り, その後妊娠末期にかけて徐々に下降する。また, 母体血 PRL は妊娠初期より増量し, 妊娠末期平均114ng/ml に達する。産褥初期ではなお高値を持続するが, その後下降して非妊時のレベルとなる (図2)。

図2 Concentration of Prolactin in Amniotic Fluid during Pregnancy

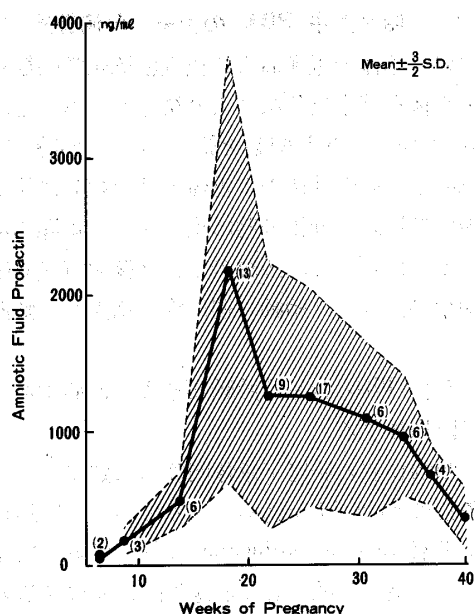
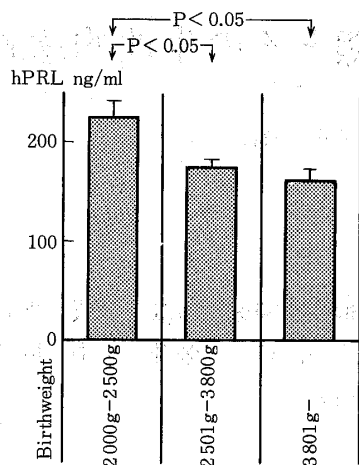


図3 Prolactin Concentration in Cord Serum in Relation to Birthweight



母体血、羊水および胎児血 PRL 濃度を妊娠中期と末期で比較してみると、妊娠中期では羊水 PRL 濃度が極めて高く、妊娠末期では羊水、胎児血ともに PRL 濃度の高いことが分かる。妊娠末期における母体血と羊水、および羊水と胎児血 PRL 濃度間には相関を認めず、これらは別個の分泌であることが示唆される。また、満期産分娩時の臍帶動、静脈血 PRL 濃度には差を認めず、羊水、胎児血 PRL 濃度に性差はない。

しかしながら、生下時体重2,500g 以下の light for dates (LFD) 児での胎児血中 PRL 濃度は高く、胎児の代謝系に参与する PRL の生理作用からは一つの適応現象とみることにもできる(図3)。また、過期産児での胎児血、羊水中 PRL 濃度は低値であり、羊水の水、電解質代謝との関連を求めることができるかも知れない。

II. 胎児血中 PRL の由来、分泌機構

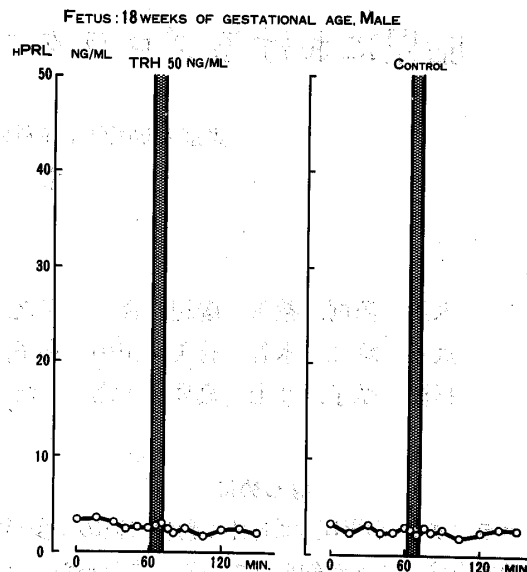
1) 胎児下垂体の電顕および免疫組織化学的観察：

胎児下垂体を酵素抗体法により染色してみると、胎齢8週以降で LH, FSH 細胞を認めるが、同時に PRL 細胞も認める。胎齢8週の下垂体ではその数は僅かであり、妊娠中期以降に分泌細胞は増加する。電顕的には変形した大型分泌顆粒と、辺縁の不正な核を有する細胞であり、顆粒の大きさは胎齢11週以降で増大する傾向がある。

胎児下垂体 PRL 含量は胎齢15週まで低値であり、妊娠中期以降増加する。

一方、胎齢15週の胎児下垂体門脈は未熟であり、下垂体内に多数の sinusoid を認めるのみである。胎齢18~22週で視床下部 median eminence に初めて第1次血管叢が出現し、下垂体門脈として形態学的に完成するのは胎

図4 hPRL Secretion of Human Fetal Pituitary in Superfusion



齢26週以降である。

2) 胎児下垂体の in vitro superfusion 実験：

胎児下垂体を容量400μl の chamber に入れ、37℃で incubation して培養液を流し、経時的に PRL を測定した。

胎齢15週の下垂体からの PRL 分泌は僅かであり、medium 中に TRH を添加しても PRL 分泌は増加しない。胎齢18週の下垂体からの PRL 分泌も僅かであるが(図4)、この時期の胎児下垂体からはすでに多量の LH, FSH 分泌があり、また LH-RH 刺激に反応して

図5 Superfusion of Human Fetal Pituitaries

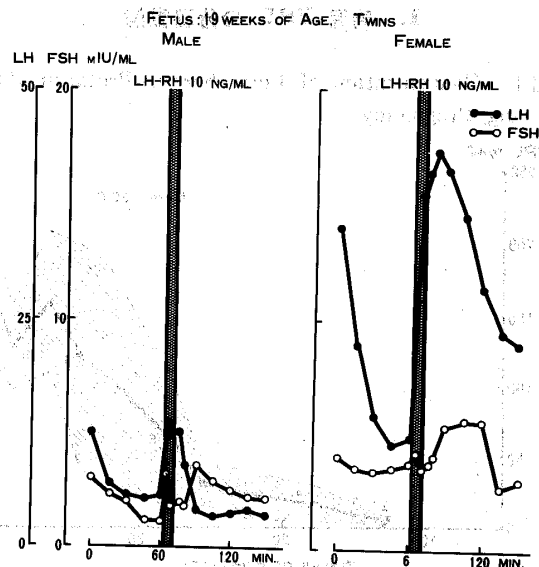
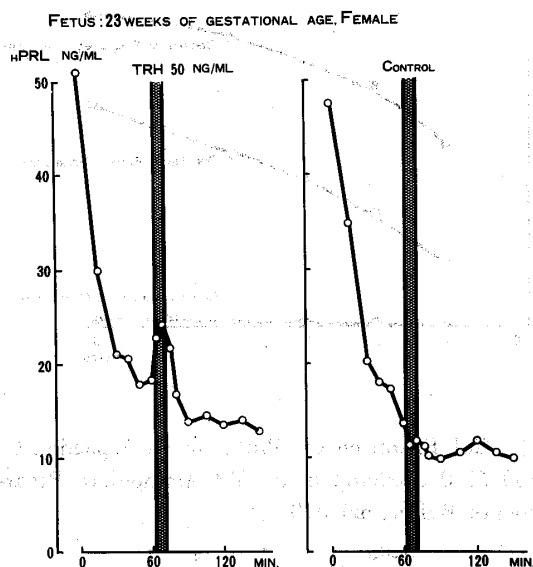


図6 hPRL Secretion of Human Fetal Pituitary in Superfusion



LH, FSH 分泌も亢進する (図5). In vitro に於て有意の PRL 分泌が認められ, 胎児下垂体の TRH 反応性も出現するのは胎齢22, 23週であり, この頃から胎児血 PRL が増量するという結果と一致する (図6).

3) 無脳児における PRL 分泌:

下垂体からの PRL 分泌は視床下部から抑制され, 下垂体の茎切断, 腎被膜下移植実験などで視床下部からの抑制が除去されると PRL 分泌が亢進することは周知のことであるが, この視床下部から放出されて PRL 分泌を抑制する因子は Prolactin Inhibiting Factor (PIF) と呼ばれる.

多くの無脳児では下垂体前葉は存在するが, 視床下部を欠損する. このような視床下部の欠損が確認された無脳児における新生児血中 GH, TSH 濃度は低い, PRL 濃度は正常であり, TRH に対する反応性も認められる. このように無脳児に於て視床下部よりの RIF 作用がなくても, 下垂体 PRL 分泌は正常である.

以上のごとく, 胎児下垂体には胎齢早期から PRL 分泌細胞を認め, 胎齢とともに細胞数, PRL 含量, in vitro に於ける PRL 分泌も増加し, 胎児血 PRL の推移と一致する. また, 胎児の視床下部には胎齢早期から RIF, PRF 両活性を認めた. 我々は, エストロゲンが PIF の産生を抑制することもすでに報告した⁹⁾. 下垂体門脈の完成する妊娠中期以降も PIF の作用は胎児血中に増量するエストロゲンにより抑制され, 妊娠末期まで PRL 分泌は亢進する. 胎児下垂体からの gonadotropin

図7 Ontogeny of Hypothalamic PIF, PRF and Pituitary Prolactin in the Human Fetus

Gestational Age (weeks)	10w	20w	30w	40w
Hypothalamic PIF, PRF		■	■	■
Responsiveness of anterior pituitary to TRH			■	■
Prolactin in the anterior pituitary		■	■	■
Development of Hypophyseal portal vessels		Few capillaries in pituitary	Capillaries Primary plexus appears	Portal system established (1 & 2 plexus)
Serum prolactin concentration				■
Serum unconjugated estrogen				■

分泌に関しては, 妊娠中期に LH, FSH 分泌は亢進して peak を作り, その後は feedback 機構が完成してステロイドによる抑制を受け, 新生児期に移行する. このような胎児下垂体 gonadotropin 分泌と比較し, PRL 分泌機構は対照的である (図7).

III. 羊水中 PRL の由来, 分泌機序

胎児血中 PRL は胎児下垂体より分泌されたものであることが推定されたが, 一方, 妊娠早期から羊水中に高濃度に存在する PRL の由来は明らかでなく, これを検討した.

1) 脱落膜よりの PRL 分泌:

近年, 胎盤組織, とくに脱落膜よりの PRL 分泌を示唆する報告がある⁴⁾⁷⁾. そこで胎盤組織を脱落膜, 絨毛膜, および羊膜に分け, in vitro incubation により PRL 分泌を分析した.

各組織の PRL 含量, および培養液中への PRL 分泌を比較してみると, いずれも脱落膜で最も多量である.

また, 図8のような器具を作製し, 卵膜を中隔として incubation を行ない, 母体側と胎児側への PRL 分泌を比較すると, 母体側に常に多量の PRL が分泌されるが, 脱落膜から分泌された PRL は胎児側にも相当量移行することが明らかとなった (図9).

さらに, 子宮外妊娠時の脱落膜, 量的には僅かではあるが, エストロゲンとゲスターゲン投与による非妊子宮の脱落膜からも PRL 分泌が認められた (図10).

脱落膜組織約40g より Neill & Reichert (1971)¹⁰⁾ の方法により PRL を精製し, Sephadex G-100でゲルろ過を行うと Fraction 3 に最も純度の高い PRL が溶出され, pigeon crop sac 法により強い生物活性のあることも確認された (図11).

2) 脱落膜における PRL 合成:

脱落膜に存在し, in vitro に於て分泌される PRL は,

図8 Schema of Incubation Apparatus

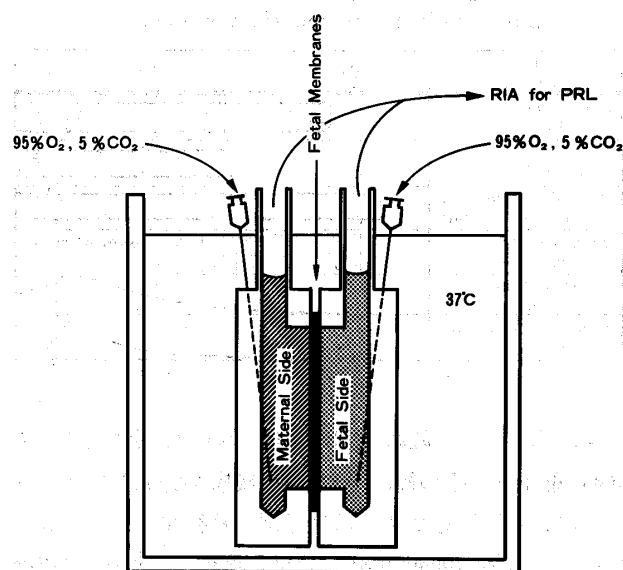
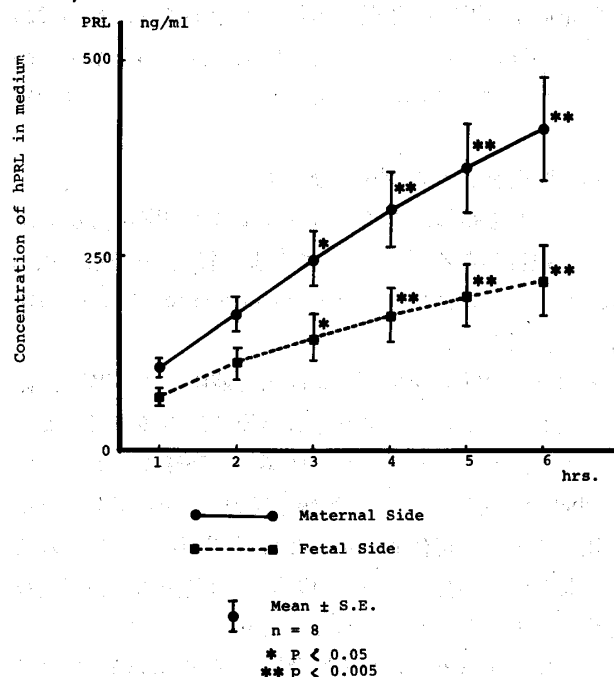


図9 Maternal Side and Fetal Side PRL Secretion by Fetal Membrane



単に血液あるいは羊水から移行し、濃縮されたものであるか、脱落膜において合成されたものであるかは明らかでなく、この点を検討した。

Incubation 開始前後の脱落膜組織内、および medium に放出された PRL 量を比較すると、脱落膜に於て PRL 合成の行われたことが明らかとなり、妊娠中期の脱落膜で PRL 合成能が最も高い。そこでこの脱落膜に各種蛋白合成阻害剤を加えて incubate すると、cycloheximide

図10 Prolactin Secretion into Medium in Various State of Endometrium

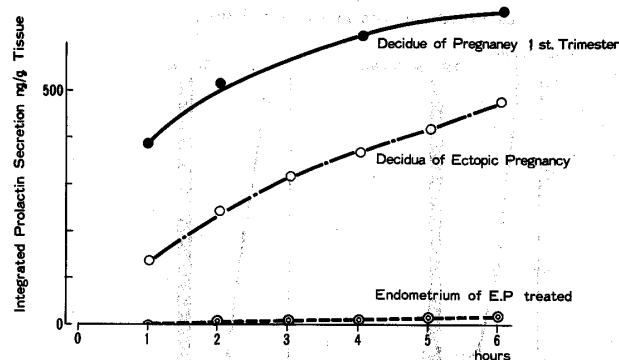


図11 Gel Filtration of Prolactin on Sephadex G-100 (1.0×100cm) in 0.05M Ammonium Bicarbonate Buffer, pH 8.0

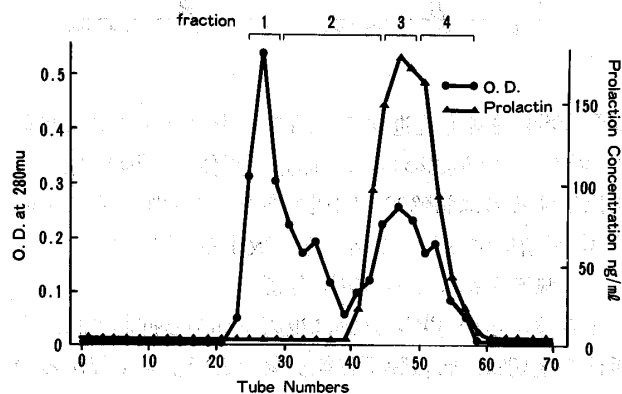


図12 Effects of Cycloheximide on PRL Secretion into Medium during Incubation of Decidua (38w of preg.)

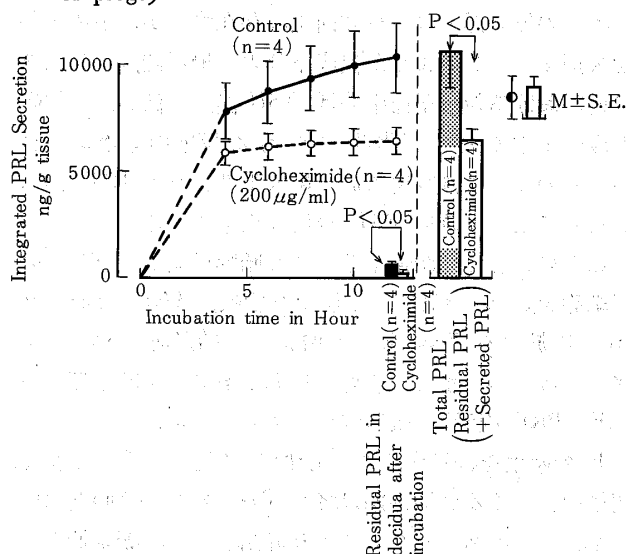
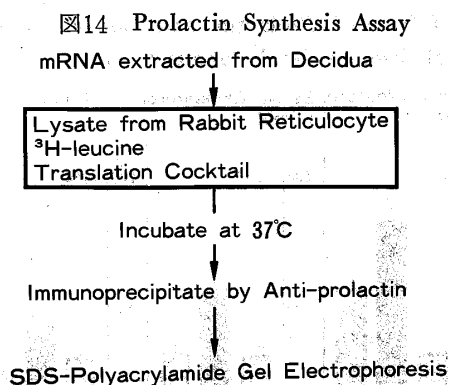
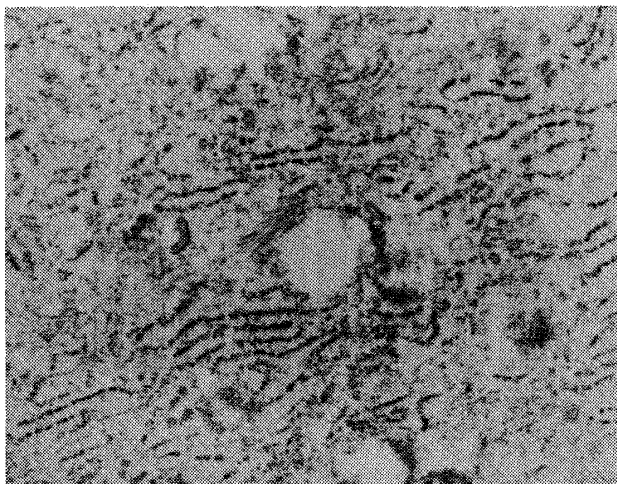


図13 抗 PRL 血清により酵素抗体法で PRL を染色し、電顕（20,000倍）で観察した脱落膜細胞



添加により PRL 合成は対照と比較して有意に抑制された（図12）。

酵素抗体法により PRL を染色し、電顕的に脱落膜細胞を観察すると、粗面小胞体に PRL が染色される（図13）。

一般に DNA に存在する遺伝情報は RNA に転写され、mRNA として細胞質に移行し、粗面小胞体のリボゾームで蛋白合成を行う。そこで、脱落膜細胞より RNA を抽出し、oligo d(T)-cellulose chromatography で mRNA を精製した。さらに家兎赤血球を溶血により破壊して抽出液を作成し、これに脱落膜より精製した mRNA を加え、必須アミノ酸を含む translation cocktail 液、 ^3H -leucine とともに incubate すると、cell-free の反応系で蛋白合成がおこる（図14）。蛋白合成は 37°C 、60分で飽和に達し、これに anti-prolactin 血清を加えて落した immunoprecipitate を10% SDS-polyacrylamide gel 電気泳動にかけた。 ^3H (dpm) の peak は脱落膜より精製した PRL の peak と一致し、 ^3H -leucine が PRL

図15 Protein Synthesis Directed by Decidual mRNA in Rabbit Reticulocyte Cell-free System

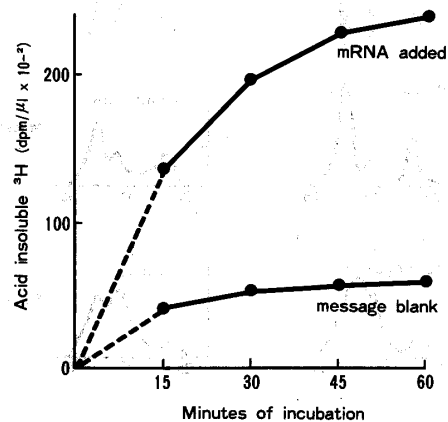
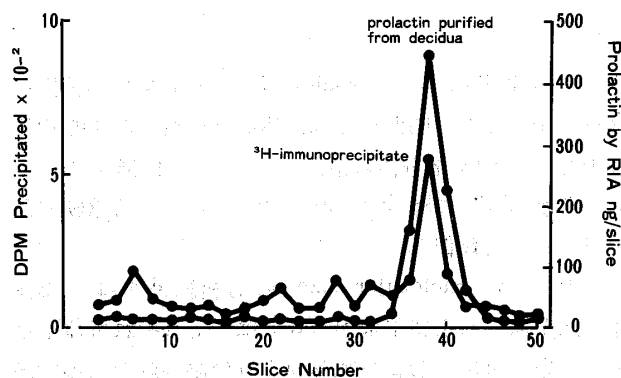


図16 SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Immunoprecipitated Cell-free Reaction Product and Purified Prolactin from Decidua



分子に取り込まれたことを示す（図15、16）。

以上のごとく、脱落膜より抽出した mRNA は in vitro に於て cell-free の反応系で PRL を合成することが、はじめて明らかとなった。

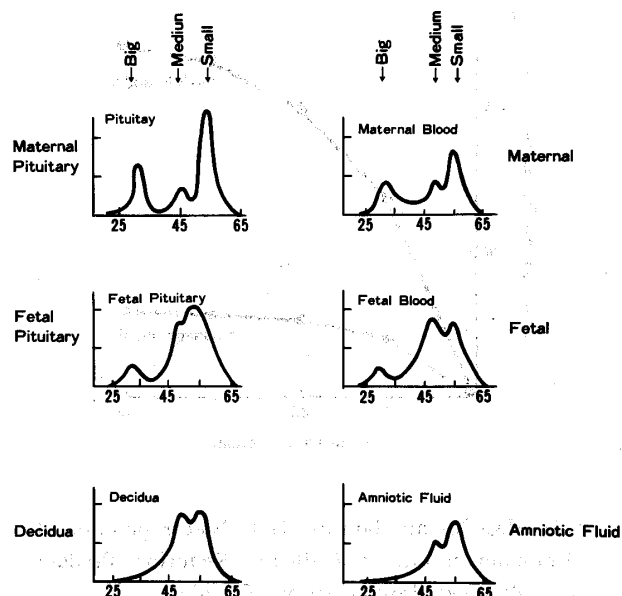
3) Bromocriptine (CB-154) 投与の影響：

妊娠中期中絶例に bromocriptine を内服させると、母体血 PRL は急速に下降するが、羊水中 PRL は変化しない。また分娩時、bromocriptine 投与例では非投与対照と比較し、母体血 PRL は低い、羊水、胎児血中 PRL は変化しない。胎児血 PRL の変化しないのは、胎児下垂体は未だ十分 PRL 分泌を開始していないためと考えられた。

4) PRL の molecular size 分析：

血中 PRL を gel filtration にかけると、big, medium, small の3分画に分かれ、PRL は molecular size に於て heterogeneous な分泌をすることが知られている⁸⁾。

図17 Heterogeneity of Maternal, Fetal and Amniotic Fluid Prolactin



そこで各種 PRL の Sephadex G-100 column の溶出パターンを見ると、胎児血では母体血と比較して big PRL は少なく、胎児下垂体の溶出パターンと類似する。一方、羊水 PRL には big molecule がなく、脱落膜の溶出パターンと類似した。

このように molecular size の分析結果では、母体血、胎児血、および羊水中 PRL は、それぞれ母体下垂体、胎児下垂体、および脱落膜より分泌されたものであることを示唆し、他の実験結果とも一致する (図17)。

このように、母体、胎児、羊水はそれぞれ別個の compartment を形成し、各 compartment に於ける PRL 分泌、分泌調節機構は異なるものであることを明らかにした。

IV. 胎児における PRL の生理作用

1) 胎児各種臓器の PRL レセプター:

妊娠初期から胎児の肝、腎、副腎、肺、性腺などには PRL に high affinity を有する特異的結合部位が存在し、解離係数 (K_d) は $1.54 \times 10^{-9} M$ である。PRL はこれらの胎児臓器で生理作用を有することが示唆された。

2) 胎児の脂肪代謝に対する PRL の作用:

妊娠26日目の家兎胎仔に NIH-ovine prolactin 1mg を筋注し、2日後に開腹して胎仔血を採取すると、同腹の対照生食投与群と比較して血清は著明な乳び状となり、胎仔の血清をみれば PRL 投与を受けたことが分かる。そこで、中性脂肪 (TG)、遊離脂肪酸 (FFA)、コレステ

図18 Effects of Prolactin and Cortisol on Lipid Metabolism in Fetal Rabbits (I)

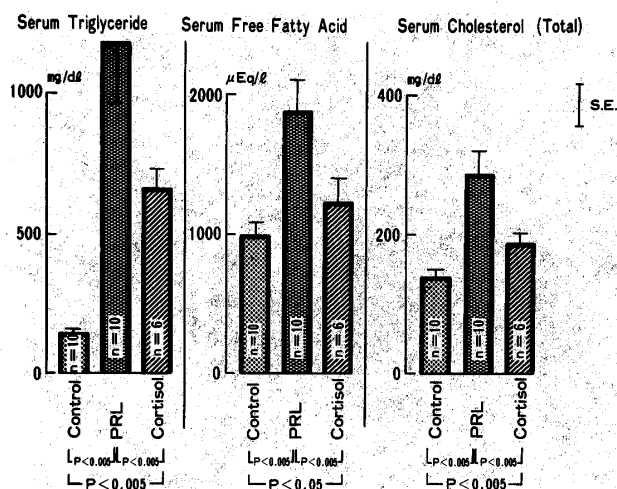
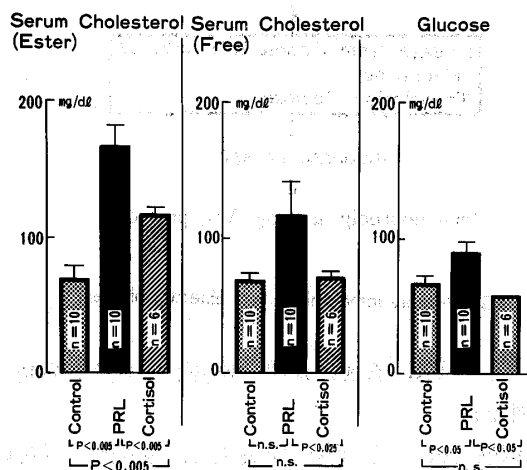


図19 Effects of Prolactin and Cortisol on Lipid Metabolism in Fetal Rabbits (II)



ロール、glucose を測定してみると、いずれも有意に増加しており、PRL は脂質の代謝に関与することが示唆された (図18, 19)。

PRL を成熟家兎に筋注すると、投与後6~24時間まで TG は有意に増加する (図20)。

さらに、ヒトに於ても高 PRL 血症婦人の血中 TG 値と PRL 濃度間には相関を認め、PRL 1,000ng/ml 以上の婦人での血中 TG は有意に高値を示した。

PRL の作用部位を検討するため、各種臓器の in vitro に於ける ^{14}C -acetic acid uptake をみると、肝に於て2時間では有意な増加を認め、PRL は主として胎児の肝に作用し、中性脂肪合成を促進することが示唆された。

3) 胎児副腎に対する PRL の作用:

近年 PRL が副腎のステロイド、特に androgen 産生

図20 Effects of Prolactin on Serum Triglyceride in Rabbits

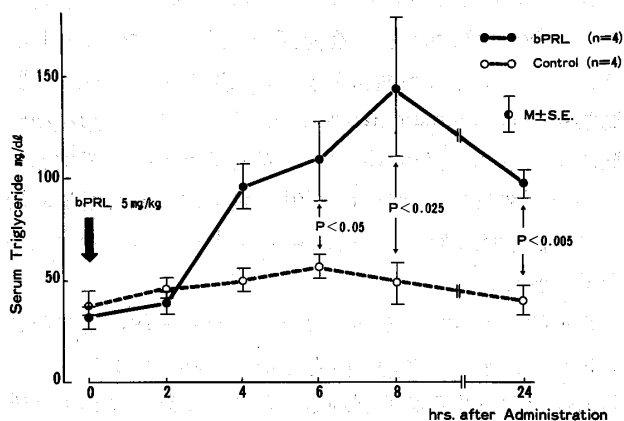
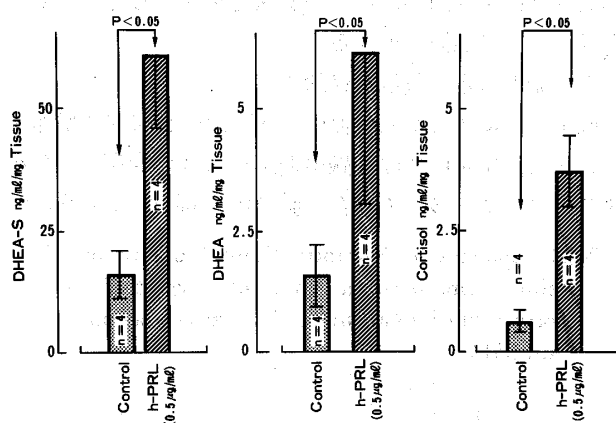


図21 Effects of h-PRL on In Vitro DHEA-S, DHEA and Cortisol Secretions after 1 Hour Incubation of Human Fetal Adrenals



に影響することが報告されている¹⁾。

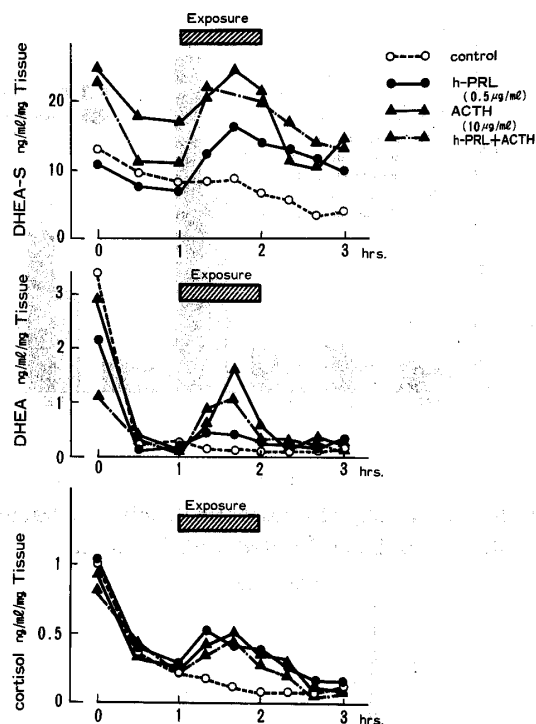
胎児副腎に於てもこれを in vitro で検討すると, PRL を添加して incubate した妊娠中期の胎児副腎からは有意に多量の DHEA-S, DHEA および cortisol が medium 中に分泌された (図21)。

その時間的経過は, preincubation 1 時間でこれらのホルモン分泌は basal level に達する。PRL (0.5 µg/ml), ACTH (10 µg/ml), または ACTH と PRL 添加によりいずれも有意に増加した (図22)。

PRL と ACTH の作用を比較すると, DHEA-S に関しては ACTH より弱く, DHEA, cortisol に関しては ACTH と同程度の副腎刺激作用があり, PRL と ACTH を共に加えても相乗作用は認められない。さらに, PRL の DHEA-S, cortisol 分泌促進作用に関しては dose response 関係がみられた。

以上のごとく, PRL は ACTH と協同して胎児副腎機

図22 Time Course of In Vitro DHEA-S, DHEA, and Cortisol Secretions in Human Fetal Adrenals



能を調節することが明らかとなった。

4) 胎児肺に対する PRL の作用：

PRL が胎児の肺成熟に関与することを示唆する報告はあるが²⁾³⁾, 否定的見解もある。周知のごとく, 肺に於てはⅡ型細胞で lipid 合成が行われ, ラメラ封入体 (オスミウム好性小体) に貯蔵され, 表面活性物質として肺胞に分泌される。

ラット胎仔における phospholipids は出生直前の胎齢 20 日より急増する。この増加する前の胎齢 17 日に NIH-

図23 Stimulation of Phospholipid Synthesis by Prolactin in Rat Fetal Lung

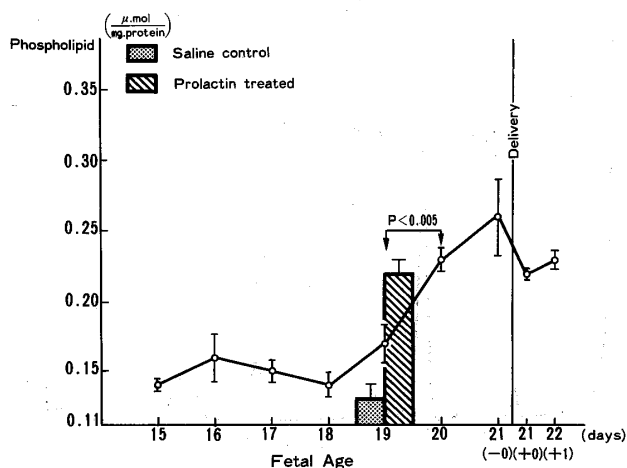


図24 Stimulation of Phospholipid Synthesis by Prolactin in Rat Fetal Lung

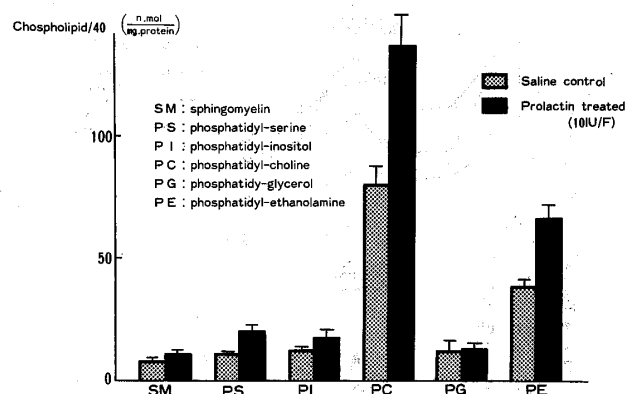
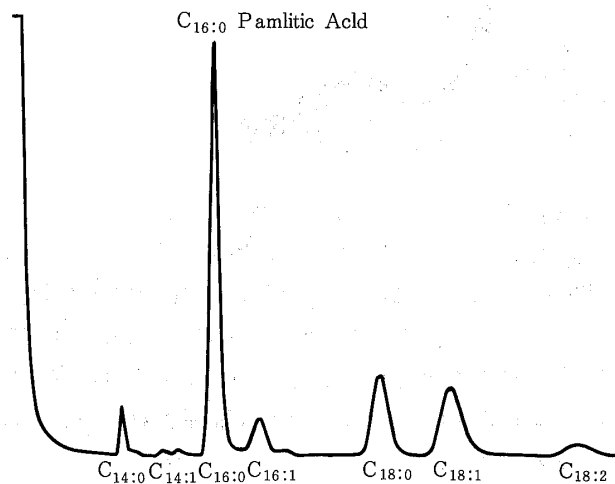
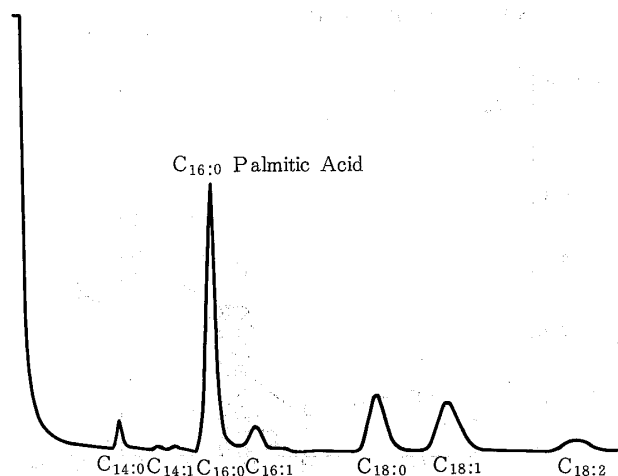


図 25

Gas Chromatography of Phosphatidylcholine Extracted from Rat Fetal Lung Treated with Prolactin



Gas Chromatography of Phosphatidylcholine Extracted from Rat Fetal Lung Treated with Saline Solution



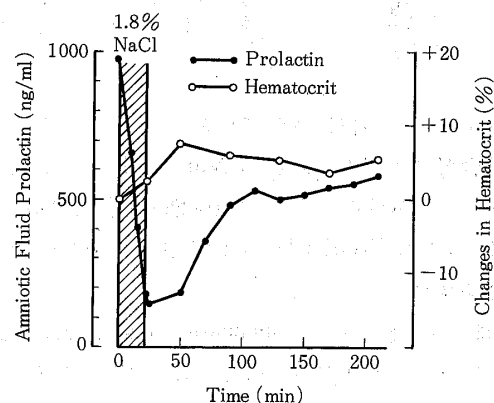
ovine prolactin 1mg を筋注すると、2日後の胎齢19日には肺 total phospholipids は有意に増加した(図23)。この phospholipids を2次元薄層クロマトで展開すると、レシチン分画が増加を示した(図24)。さらに、脂肪酸を gas chromatography にかけてみると、飽和型脂肪酸である C_{16} -palmitic acid が対照と比較して増加していた(図25)。すなわち、PRL 投与により胎児肺に於ては表面活性物質である dipalmitoyl lecithin の合成が促進された。

電顕的には PRL 投与によりラメラ封入体の増加が認められた。また、形態学的な肺成熟の指標であるラメラ封入体を含有する肺Ⅱ型細胞、および成熟した肺Ⅰ型細胞の数も増加し、また細胞内および肺胞に分泌されたラメラ封入体の数も増加を示し、形態学的にも PRL 投与による肺の成熟促進が確認された。これは、PRL の肺に対する直接作用か、あるいは副腎を介するものであるかは、さらに検討を要する。

5) 胎児の水、電解質代謝：

妊娠サルに於ても胎仔血中 PRL は妊娠末期に増加する。また、羊水中には妊娠早期から多量の PRL が存在する。さらに、多くの場合に胎盤は double discoid で

図26 Changes in Amniotic Fluid Prolactin and in Fetal Hematocrit in Face of Hypertonic Amniotic Fluid Replacement (145 days of pregnancy) (No. 551)



あり、胎盤間静脈の canulation により経子宮壁的に胎仔血を容易に採取することができる。そこで妊娠末期の rhesus monkey で、1.8%高張食塩水により羊水の70~80%を経子宮壁的に置換すると、置換により低下した羊水中 PRL は約1時間で急速に回復し、多量の PRL 分泌のあることが分かる。一方、胎盤間静脈より採取した胎仔血 hematocrit は高張食塩水注入により僅かに上昇するのみであった(図26)。

図27 Changes in Amniotic Fluid Prolactin and in Fetal Hematocrit in Face of Hydertonic Amniotic Fluid Replacement (130 days of pregnancy) (No. 566)

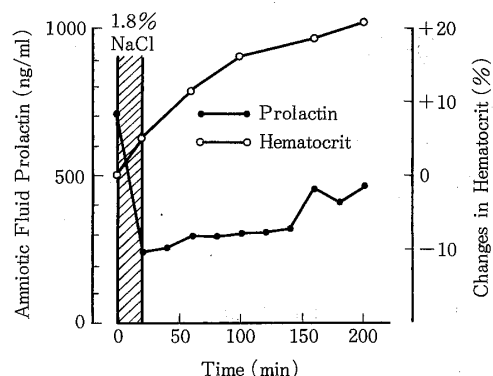
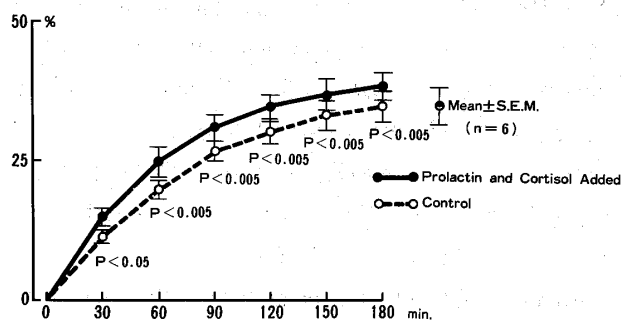


図28 $^{22}\text{NaCl}$ Transfer Rate across the Amnion (from Fetal Side to Maternal Side)



しかしながら、羊水置換後の羊水中 PRL 濃度の回復が遅れる場合には胎児血 hematocrit の上昇が著明であり、PRL は胎児、羊水間の水移行を抑制することが示唆された(図27)。

次いで、羊膜を中隔として胎児側に PRL を加え、in vitro で incubate し、羊膜を介した水、 Na^+ の移行を検討した。水の移行は、添加30分で抑制される傾向にあるが、有意な変化ではない。しかしながら、ヒト羊膜に於ても、胎児側から母体側への Na^+ 移行は PRL と cortisol 添加により有意に促進されることが確認された(図28)。

以上のごとく、PRL は一般に胎児皮膚あるいは羊膜などの膜に作用し、羊膜腔からの水消失を抑制するが、 Na^+ に対しては逆に移行を促進する。

V. まとめ

胎児血、羊水中には妊娠初期から多量の PRL が存在することは知られているが、その由来、分泌機序、生理作用は明らかでなく、これを検討した。

1) 母体、胎児および羊水中 PRL の由来、分泌機

序、作用はそれぞれ異なり、独立した3つの compartment を形成する。

2) 羊水中の PRL は脱落膜において合成、分泌され、local hormone として胎児の水、電解質代謝を調節する。

3) 胎児下垂体より妊娠中期以降に多量に分泌される胎児血中 PRL は、胎児における脂質代謝、肺成熟、副腎機能に生理作用を有する。

謝 辞

本研究発表の機会を与えられました松本会長、坂元前会長ならびに会員各位、また座長の労をとられた倉智敬一教授に謝意を表します。御指導、御鞭撻を賜った恩師坂元正一教授、小林隆名誉教授に深く感謝致します。本研究遂行に御指導と御協力を頂いた東京大学薬学部野島庄七教授ならびに井上圭三助教授、帝国臓器神戸川明博士、東京大学産科婦人科学教室同窓会諸先輩ならびに教室員各位に慎んで御礼申しあげます。

文 献

1. Carter, J.N., Tyson, J.E., Warne, G.L., McNeilly, A.S., Fairman, C. and Friesen, H.G.: Adrenocortical function in hyperprolactinemic women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 973, 1977.
2. Hamosh, M. and Hamosh, P.: The effect of prolactin on the lecithin content of fetal rabbit lung. *J. Clin. Invest.*, 59: 1002, 1977.
3. Hauth, J.C., Parker, F.C.R., MacDonald, P.C., Porter, F.J.C. and Johnston, J.M.: A role of fetal prolactin in lung maturation. *Obstet. Gynecol.*, 51: 81, 1978.
4. Healy, D.L., Kimpton, W.G., Muller, H.K. and Burger, H.K.: The synthesis of immunoreactive prolactin by decidua-chorion. *Brit. J. Obstet. Gynecol.*, 86: 307, 1979.
5. Minaguchi, H. and Meites, J.: Effects of a norethynodrel-mestranol combination(Enovid) on hypothalamic and pituitary hormones in rats. *Endocrinology*, 81: 826, 1967.
6. Neill, J.D. and Reichert, L.E.: Development of a radioimmunoassay for rat prolactin and evaluation of the NIAMD rat prolactin radioimmunoassay. *Endocrinology*, 88: 548, 1971.
7. Riddick, D.H. and Kusmick, W.F.: Decidua: A possible source of amniotic fluid prolactin. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127: 187, 1977.
8. Suh, H.K. and Frantz, A.G.: Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 928, 1974.