

Gossypol 投与下雄性ラットに対する HCG 負荷の影響について

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

馬 場 良 和

EFFECT OF HCG ADMINISTRATION IN THE GOSSYPOL-TREATED MALE RATS

Yoshikazu BABA

*From the Department of Urology, Yamaguchi University, School of Medicine
(Director: Prof. J. Sakatoku)*

The effect of gossypol acetic acid (GAA) on the pituitary-Leydig cell axis was studied. Adult male Wistar rats were administered orally 5 mg/kg/day GAA for three weeks, 10 mg/kg/day GAA for three weeks or 20 mg/kg/day GAA for two weeks. Each group was treated for four days with saline or 500 IU human chorionic gonadotropin intraperitoneally injected. None of the rats died. The mean body weight in each group was increased, but the mean body weight gain in the 20 mg/kg group was significantly lower than that in the controls ($p < 0.01$). There was no significant change in the weight of testes or epididymis in any group. The serum level of lactate dehydrogenase, follicle stimulating hormone and testosterone was significantly lower in the animals treated with 20 mg/kg/day GAA for two weeks than in the controls ($p < 0.05$). No change was seen in other groups. The serum testosterone level after HCG stimulation (HCG 500 IU intraperitoneal injection for 4 days) was significantly lower in animals treated with 20 mg/kg/day GAA for two weeks ($p < 0.01$).

GAA is suggested to affect the pituitary-Leydig cell axis and directly inhibit Leydig cell function.

Key words: Gossypol acetic acid, Pituitary-Leydig cell axis, Leydig cell function, Testosterone, HCG

緒 言

男性に対する避妊法は、現在のところ性交中絶法、コンドーム法、精管切断術に限られており女性と比較し有効で安全な経口避妊薬の開発は遅れている¹⁾。Gossypol は綿の実より抽出精製されたフェノール誘導体で、その毒性については古くから知られていたが、避妊作用については発見されていなかった²⁾。しかし、中国の National Coordinating Group により初めて男性経口避妊薬として使用され、99.89% に有効であり副作用も少なく投与の中止によって妊娠性の回復をみたとの報告があり³⁾、以来有効で安全な男性経口避妊薬として注目を集めた。その後 gossypol 服用による低カリウム性麻痺の報告があり⁴⁾その臨床応用は疑問視されてきている⁵⁾。しかし、gossypol の作用機序は現在まで研究されてきた経口避妊薬とは異なることが予想され誘導体の開発を含めた基礎的研究が望まれている⁵⁾。

現在まで研究が行われてきた性ホルモンの男子経口避妊薬と比較し gossypol 服用では下垂体睾丸系への影響は少ないとされ、初期の中国での臨床報告例では 6% に性欲の低下を認めるのみであり血清 LH 濃度、血清 testosterone 濃度とも正常値を示している³⁾。動物実験においても初期の中国よりの報告では下垂体睾丸系に影響を及ぼさないとされているが^{3,6)}、現在では下垂体睾丸系に影響を及ぼすとする報告もあり⁷⁻⁹⁾統一した見解は得られていない。

Gossypol の Leydig 細胞機能に対する影響についても *in vitro* の実験系を使用し研究されているが統一した見解は得られていない^{7,10-13)}。すでに当教室の原田は、雄性 rat に gossypol を投与し血清 LH 濃度、血清 testosterone 濃度、睾丸内 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (以下 3β HSD と略す) 活性の低下を認めており、gossypol が LH を介して testosterone 生合成を抑制すると共に、 3β HSD に対して直接に作用することを推定している¹⁴⁾。このた

め今回の実験では gossypol の下垂体を介した Leydig 細胞への影響を除くために過剰の HCG 刺激による testosterone 分泌能を測定した。また rat では有効量と中毒量が接近しているため gossypol 投与により体重の減少を見ることが多い⁶⁾。そこで今回の実験ではまず基礎実験を行い、体重の減少をみない投与期間と投与量とを設定した。

材料と方法

Gossypol は gossypol acetic acid (Sigma, St. Luis, Missouri, USA. 純度98%以上) (以下 GAA と略す) を用いた。実験動物は生後9週齢の Wistar 系成熟雄性 rat 40匹 (体重 270~300 g) を用いた。Rat は実験7日前より水、飼料、光など同一条件で飼育した。Rat は無作為に次の8群に分けた。

第1A群: 生理食塩水 0.5 ml, 3週間連日経口投与。生理食塩水 0.5 ml 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第1B群: 生理食塩水 0.5 ml, 3週間連日経口投与。HCG 500単位, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第2A群: GAA 5 mg/kg/日, 3週間連日経口投与。生理食塩水 0.5 ml, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第2B群: GAA 5 mg/kg/日, 3週間連日経口投与。HCG 500単位, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第3A群: GAA 10 mg/kg/日, 3週間連日経口投与。生理食塩水 0.5 ml, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第3B群: GAA 10 mg/kg/日, 3週間連日経口投与。HCG 500単位, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第4A群: GAA 20 mg/kg/日, 2週間連日経口投与。生理食塩水 0.5 ml, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

第4B群: GAA 20 mg/kg/日, 2週間連日経口投与。HCG 500単位, 屠殺前4日間連日腹腔内投与。

GAA は使用直前にエタノールにて溶解均一化した後に生理食塩水にて 0.5 ml あたり所定の分量になるように希釈しスターラーで攪拌しながら 0.5 ml ずつ注射器に分注し金属製カテーテルで経口投与した。HCG は HCG® (帝国臓器社製) を使用し, 0.5 ml あたり 500 IU となるように蒸留水にて希釈した。HCG の量は Hsueh の報告¹⁵⁾を参考にして基礎実験を行い, Leydig 細胞よりの testosterone 分泌が最高になるように 500 IU 4日間とした。

Rat は実験中週2回体重を測定した。生理食塩水投与群, GAA 5 mg/kg 投与群および GAA 10 mg/kg 投与群では3週間後に, GAA 20 mg/kg 投与群では2週間後にエーテル麻酔下に採血屠殺した。血液

は採血後 400 G で10分間遠心分離し測定まで -20°C で凍結保存した。

血清 LH 濃度, 血清 FSH 濃度の測定は NIH 提供の NIAMD antiratserum を用い¹⁶⁾, 血清 testosterone 濃度の測定はミドリ十字社製の ^3H テストステロンキットを用いそれぞれ RIA 法にて二重測定した。

屠殺後睪丸重量, 副睪丸重量を測定した。

結果

実験経過中に死亡した rat は認めなかった。

1) 体重 (Fig. 1)

全群とも体重の平均値の低下を認めなかった。

生理食塩水投与群, GAA 5 mg/kg 投与群, GAA 10 mg/kg 投与群では体重増加率の平均値に有意差を認めなかった。しかし, GAA 20 mg/kg 投与群では2週目で体重増加率 $5.8 \pm 1.0\%$ (平均値 $\pm$ S.E. 以下略す) と生理食塩水投与群の体重増加率 $12.0 \pm 1.4\%$ と比べ有意に低下した ($p < 0.01$)。

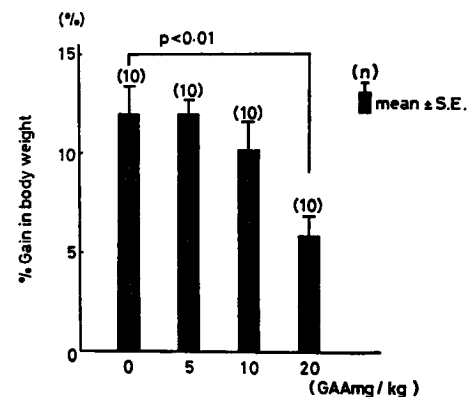


Fig. 1. Growth rate of male rats treated with saline or 5, 10 or 20 mg/kg/day GAA for two weeks.

2) 睪丸重量 (Fig. 2)

睪丸重量は生理食塩水投与群 1.58 ± 0.02 g, 5 mg/kg 投与群 1.60 ± 0.04 , 10 mg/kg 投与群 1.61 ± 0.02 g, 20 mg/kg 投与群 1.60 ± 0.02 g と各群間の平均値に有意差を認めなかった。

3) 副睪丸重量 (Fig. 3)

副睪丸重量は生理食塩水投与群 0.59 ± 0.03 g, 5 mg/kg 投与群 0.59 ± 0.03 g, 10 mg/kg 投与群 0.60 ± 0.03 g, 20 mg/kg 投与群 0.57 ± 0.03 g と各群間の平均値に有意差を認めなかった。

4) 血清 LH 濃度 (Fig. 4), 血清 FSH 濃度 (Fig. 5)

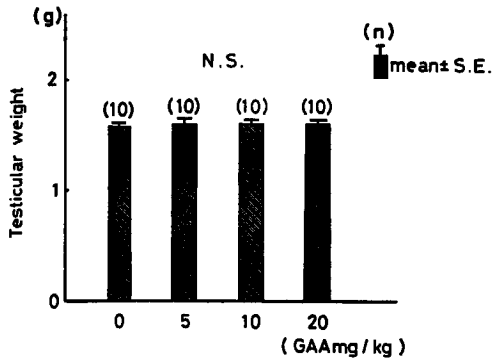


Fig. 2. Testicular weight of male rats treated with saline or 5, 10 or 20 mg/kg/day GAA.

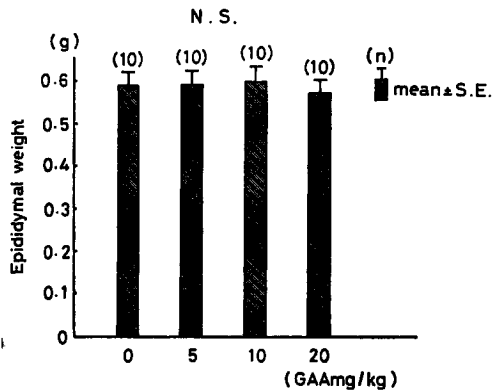


Fig. 3. Epididymal weight of male rats treated with saline or 5, 10 or 20 mg/kg/day GAA.

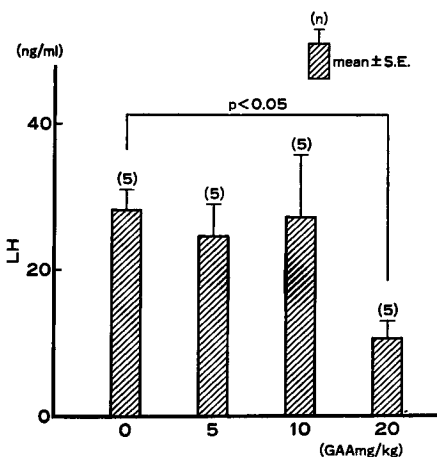


Fig. 4. Serum LH level of male rats treated with saline or GAA, 5, 10 or 20 mg/kg/day GAA.

血清 LH 濃度は、生理食塩水投与群 27.9 ± 2.9 ng/ml, 5 mg/kg 投与群 24.6 ± 4.3 ng/ml, 10 mg/kg 投

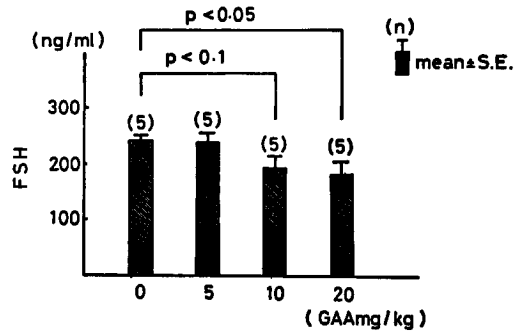


Fig. 5. Serum FSH level of male rats treated with saline or GAA, 5, 10 or 20 mg/kg/day GAA.

与群 28.1 ± 8.2 ng/ml と各群間の平均値に有意差を認めなかった。20 mg/kg 投与群では 10.6 ± 6.6 ng/ml と生理食塩水投与群に比べ有意に低下した ($p < 0.05$)

血清 FSH 濃度は生理食塩水投与群 239.0 ± 9.3 ng/ml, 5 mg/kg 投与群 236.8 ± 16.2 ng/ml と各群間の平均値に有意差を認めなかったが、10 mg/kg 投与群では、 191.4 ± 16.1 ng/ml と生理食塩水投与群に比べ平均値に低下傾向を認めた。20 mg/kg 投与群では 175.8 ± 31.8 ng/ml と生理食塩水投与群に比べ有意に低下した ($p < 0.05$)。

5) 血清 testosterone 濃度 (Fig. 6)

血清 testosterone 濃度は生理食塩水投与群 150.6 ± 40.7 ng/dl, 5 mg/kg 投与群 156.6 ± 58.1 ng/dl, 10 mg/kg 投与群 172.4 ± 31.8 ng/dl と各群間の平均値に有意差を認めなかった。20 mg/kg 投与群では 55.1 ± 19.6 ng/dl と生理食塩水投与群に比べ有意に低下した ($p < 0.05$)。また HCG 負荷後の血清 testosterone 濃度も生理食塩水投与群 $2,097.6 \pm 94.0$ ng/dl, 5 mg/kg 投与群 $2,156.9 \pm 73.8$ ng/dl, 10 mg/kg 投与

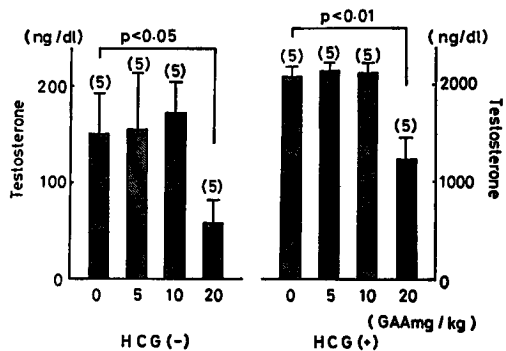


Fig. 6. Serum testosterone level of male rats treated with saline or GAA, 5, 10 or 20 mg/kg/day GAA, and serum testosterone level after HCG stimulation.

群 $2,131.4 \pm 91.7$ ng/dl と各群間の平均値に有意差を認めなかったが、20 mg/kg 投与群では $1,246.9 \pm 210.8$ ng/dl と生理食塩水投与群に比べ有意に低下した ($p < 0.01$)。

考 察

National Coordinating Group による初期の動物実験では rat に対し GAA 15~40 mg/kg/日を2~4週間投与し妊孕性の低下を認めている³⁾。また、下垂体辜丸系では、1) β HSD、脂質、cholesterol など testosterone 生合成に関与する物質と Leydig 細胞の形態 2) androgen 依存性の副性器の形態、重量、大きさ、3) 血清 testosterone 濃度、血清 dihydrotestosterone 濃度およびその誘導体の濃度、血清 LH 濃度、血清 FSH 濃度、LH-RH に対する反応性について調べられており、いずれも gossypol 投与によって影響を受けていない⁶⁾。また Kalla も GAA 7.5 mg/rat/日を10週間経口投与し妊孕性の低下を認めているが、副性器の重量、血清 LH 濃度、血清 FSH 濃度、辜丸での HCG 結合能には対照群と比較し有意の差を認めていない¹⁷⁾。また *in vitro* での辜丸組織への gossypol 添加実験においても testosterone 合成能の低下は認めていない¹²⁾。gossypol には光学異性体が存在するためにその純度が問題となってくるが¹⁸⁾、以上の報告では GAA の純度については記載されていない。

一方、Chang らは GAA 7.5 mg/kg/日12週間、GAA 15 mg/kg/日12週間、GAA 30 mg/kg/日6週間経口投与を行い、いずれも妊孕性の低下を認めているが、GAA 30 mg/kg/日投与群のみ血清 LH 濃度、血清 testosterone 濃度の低下を認めている。しかし同時に体重の減少を認めているため糖尿病モデル rat および飢餓状態の rat の下垂体辜丸系の変動との類似性を指摘している⁹⁾。Hadrey も GAA 30 mg/kg/日5週間経口投与を行い妊孕性の低下を認めているが、血清 LH 濃度ならびに血清 testosterone 濃度の低下も認めている。GAA 投与中体重の低下は認めていないが、対照群と比べると体重に有意差を認める⁷⁾。星合らも GAA 30 mg/kg/日5週間経口投与を行い妊孕性の低下と血清 LH 濃度ならびに血清 testosterone 濃度の低下を認めている⁹⁾。体重減少は認めていない。以上の報告では自ら精製した GAA ならびに Sigma 社製の GAA で純度98%以上の GAA を使用している。

今回の実験では Sigma 社製の GAA を使用し 20 mg/kg/日2週間経口投与を行い比較的体重の変動の

少ない投与期間および投与量を選択した。Weinbauer らは妊孕性の低下を認める GAA 投与量では、rat の死亡率が増加し著明な体重減少を来すと報告している¹⁸⁾。しかし、今回の実験では、GAA 20 mg/kg 投与群において対照群と比較し体重の増加率に有意差を認めたものの、rat の死亡は認めず、投与期間中に体重の減少は認めなかった。GAA 20 mg/kg 投与群では血清 LH 濃度、血清 FSH 濃度、血清 testosterone 濃度に有意の低下を認めた。以上から gossypol が下垂体辜丸系に作用していることが示された。

Gossypol の Leydig 細胞に対する直接作用については *in vitro* の実験系を使用し研究されている。Kalla らは *in vitro* での辜丸組織への gossypol 添加実験を行い testosterone 合成能の低下は認めていない¹²⁾。また Zhuang らは Leydig 細胞は Sertoli 細胞に比べ gossypol の影響を受けにくいと報告している¹³⁾。一方、Lin, Hadrey, 星合らは *in vitro* での辜丸組織⁷⁾あるいは Leydig 細胞^{10,11)}への gossypol 添加実験を行い testosterone 合成能の低下を認めている。当教室の原田は gossypol 投与による辜丸内 testosterone 生合成に関与する酵素活性の変動に着目し、 β HSD 活性の低下は gossypol の Leydig 細胞に対する直接作用による可能性のあることを報告した¹⁴⁾。また、Hoffer も同様の辜丸内酵素活性の変動を報告している¹⁹⁾。

今回の実験では、gossypol の下垂体を介した Leydig 細胞への作用を除くために4日間通刺の HCG を投与した。この結果 GAA 20 mg/kg 投与群では HCG 刺激後の血清 testosterone 濃度は低下した。gossypol は下垂体を介する以外にも直接 Leydig 細胞機能を抑制することが示された。

ま と め

Wistar 系成熟雄性 rat に GAA を 5 mg/kg/日ならびに 10 mg/kg/日、3週間経口投与、20 mg/kg/日2週間経口投与を行い次の知見を得た。

1) 全群とも体重の増加は維持されたが、GAA 20 mg/kg/日投与群では対照群に比べ体重の増加率が有意に低下した。また全群とも死亡した rat を認めなかった。

2) 辜丸重量、副辜丸重量は各群間に有意差を認めなかった。

3) GAA 20 mg/kg/日投与群では血清 LH 濃度、血清 FSH 濃度、血清 testosterone 濃度が対照群に比べ有意に低下した。その他の群では変動を認めなかった。

4) GAA 20 mg/kg/日投与群では HCG 500 IU 4 日間腹腔内投与後の血清 testosterone 濃度も有意に低下した。

以上から gossypol は下垂体睾丸系に対して抑制作用があり, Leydig 細胞に対して下垂体を介すると共に直接に作用することが認められた。

本論文の要旨は第74回日本泌尿器科学会において発表した。

稿を終えるにあたり, 御指導, 御校閲を賜りました恩師酒徳治三郎教授に深甚の謝意を表します。また細部にわたり直接御指導いただきました滝原博史講師に感謝いたします。さらに, ご協力いただきました教室員諸兄に感謝いたします。

文 献

- 1) Potts DM: Male contraception in family planning programs. In: Male contraception—advances and future prospects., edited by Zatuchni GI, Goldsmith A, Spieler JM and Sciarra JJ, pp.2-6, Harper and Row Publishers, Philadelphia, 1986.
- 2) Abou-Donia MB: Physiological effects and metabolism of gossypol. *Residue Rev*, **61**: 124-159, 1976
- 3) National coordinating group on male anti-fertility agents: Gossypol—a new antifertility agent for males. *Chinese Med J* **6**: 417-428, 1978
- 4) Liu Z, Liu G, Hei L, Zhang R and Yu C: Clinical trial of gossypol as a male anti-fertility agent. In: Recent advances in fertility regulation., edited by Chang CF, Griffin D and Woolmann A, pp. 160-163, Atar, Geneva, 1982
- 5) Waller DP, Niu X and Kim I: Toxicology and mechanism of action of gossypol. In: Male contraception—advances and future prospects., edited by Zatuchni GI, Goldsmith A, Spieler JM and Sciarra JJ, pp. 2-6, Harper and Row Publishers, Philadelphia, 1986
- 6) Xue SP: Studies on the antifertility effect of gossypol. In: Recent advances in fertility regulation. edited by Chang CF, Griffin D and Woolmann A, pp.160-163, Atar, Geneva, 1982
- 7) Hadrey MA, Lin YC and Dym M: Effects of gossypol on the reproductive system of male rats. *J Androl* **2**: 190-199, 1981
- 8) 星合 昊, 上原茂樹, 長池文康, 桃野耕太郎, 森良一郎, 鈴木雅洲, Lin YC: 男性用経口避妊薬 Gossypol の基礎的検討 I In vivo study. 日本不妊学会雑誌 **26**: 393-397, 1981
- 9) Chang CC, Gu Z and Tsong YY: Studies on gossypol. I. toxicity, antifertility, and endocrine analysis in male rats. *Int J Fertil* **27**: 213-218, 1982
- 10) Lin T, Muroso EP, Osterman J, Nankin HR and Coulson PB: Gossypol inhibits testicular steroidogenesis. *Fertil Steril* **35**: 563-566, 1981
- 11) 星合 昊, 上原茂樹, 長池文康, 桃野耕太郎, 星和彦, 鈴木雅洲, Lin YC: 男性用経口避妊薬 Gossypol の基礎的検討 II In vitro study. 日本不妊学会雑誌 **27**: 156-160, 1982
- 12) Kalla NR, Weinbauer GF, Rován E and Frick J: Effects of gossypol on testicular testosterone production *in vitro*. *J Androl* **4**: 331-335, 1983
- 13) Zhuang LZ, Phillips M, Gunsalus GL, Bardin CW and Mather JP: Effects of gossypol on rat Sertoli and Leydig cells in primary and established cell lines. *J Androl* **4**: 336-344, 1983
- 14) 原田宏行: 雄性ラットにおける Gossypol の下垂体睾丸系におよぼす影響について. *西日泌尿* **49**: 1425-1429, 1987
- 15) Hsueh AJW, Dufau ML and Catt KJ: Gonadotropin-induced regulation of luteinizing hormone receptors and desensitization of testicular 3':5'-cyclic AMP and testosterone responses. *Proc Natl Acad Sci* **74**: 592-595, 1977
- 16) 藤井光正: Testosterone 投与後の“はねかえり現象”に関する実験的研究—特に睾丸組織内 Testosterone 濃度について—. *泌尿紀要* **25**: 1171-1178, 1981
- 17) Kalla NR, Foo TWJ and Sheth AR: Studies on the male antifertility agent-gossypol acetic acid. V. effect of gossypol acetic acid on the fertility of male rats. *Andrologia* **14**: 492-500, 1982
- 18) Weinbauer GF, Rován E and Frick J: Toxicity of gossypol at antifertility dosage in male rats: statistical analysis of lethal rates and body weight responses. *Andrologia* **15**: 213-221, 1983
- 19) Hoffer AP: Ultrastructural, biochemical and endocrine studies on the effects of gossypol and its isometric derivatives on the male reproductive tract. In: Gossypol: a potential contraceptive for men., edited by Segal J, pp. 143-186, Plenum Press, New York, 1985
(1987年12月25日迅速掲載受付)