

シバヤギ学術情報

ストレス、麻酔薬と血中ホルモンレベル

若林克己
群馬大学名誉教授
株式会社シバヤギ技術顧問
(10/04/13)

動物実験では採血が付き物ですが、採血操作によって動物に肉体的、精神的な苦痛を与え、それがストレスとなって、そのために測定しようとする物質の血中レベルが変わってしまう危険性を常に孕んでいます。このストレスを軽減するため、或いは動物をおとなしくさせて採血を容易にするため、麻酔を行うことも多いのですが、麻酔薬はストレスに劣らず、しばしば血中の測定対象物質を変化させてしまいます。頸静脈から心房へのカニューレーションを行い、頸部背側に固定する手術を行い、conscious, free moving で採血するのが最適といえますが、様々な実験計画のために誰もが何時でも出来るわけではありません。

そこでストレスによって何がどう変化するのか、また使用される麻酔薬は生理活性物質の血中レベルにどのような影響を与えるのか、を過去の文献を調べて多少纏めてみました。

実験の際に参考にされ、測定対象物質にとって好ましい条件を選択されることを願っております。

I. ストレス、麻酔薬の種類から見る

ストレスの影響

寒冷暴露ストレス (Cold exposure)

室温乃至は 30℃から 4℃ (冷蔵室) へ移すことがよく行われています。

○5 分間の暴露で (1)

プロラクチン：上昇(2 倍)

GH：有意に下降 295±180 →128ng/ml

Corticosterone：有意に上昇

○寒冷暴露 4℃, 30 分, 60 分 (2)

TSH 上昇

この上昇反応は、エーテル、ウレタン、抱水クロラールで完全に抑制された。

Thiopental, で部分的に抑制された。Pentobarbital では抑制したが有意ではなかった。

Halothane, Methoxyflurane では上昇の遅延が見られた。(2)

○寒冷暴露 25 分後 (11)

TSH：Basal level の 0.1µg/ml から 0.49µg/ml へと上昇

緊縛ストレス (Immobilization, Restraint)

台上に固定、或いは動けないような小さな容器(restraining cage)に入れる

○5 分間の緊縛ストレスで(1)

プロラクチン：上昇 (10 倍)

GH：有意に下降

Corticosterone：有意に上昇

○毎日 8 時間, 10 日間の immobilization (成熟雌ラット) で (7)

血漿レベル

GH, プロラクチン, LH, TSH：低下する。

FSH：やや下がるが有意差なし。

下垂体含量

FSH, LH : 増加する.

GH, プロラクチン, TSH : 変化なし.

視床下部の TRH, GnRH, ソマトスタチン含量 : 変化なし

GnRH+TRH の静脈内投与により

血漿中レベル

LH, TSH, FSH : Non-stressed rat よりも反応性が高い.

プロラクチン : 上昇する

GH : 投与前も低いですが更に低下する.

慢性ストレスによって惹起された下垂体ホルモンの血漿レベルは、放出ホルモンに対する下垂体の反応性によるものではなく、視床下部の放出ホルモンの変化とも関係ない.

ストレス中の放出ホルモン投与による LH, FSH の放出効果は下垂体含量の増大による二次的現象であろう. (7)

○Immobilization で血清中の

プロラクチン : 10 分間で上昇 その後下降

TSH : 10 分間でやや下降, その後 60 分で半減, 300 分で更に半減

Cortisosterone : 60 分まで上昇, その後 180 分で下降.

10 分間の immobilization を繰り返すとプロラクチンは固定時に上昇, 解除で下降, 繰り返しにより上昇の程度は下がって行く

300 分の immobilization 後フォルマリン 0.2ml 皮下注射

プロラクチンは上昇 10 分後に最高レベル, 後下降する. Immobilization 無しでは無変化.

300 分の immobilization の有無に関わらず, pimozide (dopamine receptor blocker) の投与 (0.63mg/kg, iv) で上昇 10 分後に最高値, その後も高値を継続.

300 分の immobilization 後 TRH 投与

プロラクチン : 10 分後に上昇 (投与前に既に高値であるが更に上昇)

immobilization 無しでは TRH による変化なし.

TSH : Immobilization の有無に関わらず, 10 分後には上昇する. その後低下し 30 分後では半減.

Pimozide による前処理 (immobilization の 20 分前)

プロラクチン : 前処理による上昇, immobilization が始まると 10 分後で低下, 60 分後に再び上昇, immobilization 中高値が続く.

無処理群では immobilization 開始後 10 分で高値, 後 immobilization 中低下を続ける. (以上 9)

○Conscious rat (restraint cage 使用) のテストステロン分泌速度は $4.2 \pm 0.6 \text{ ng/g testis/min}$ (mean \pm SE)であったが, halothane-anesthetized rat では $6.7 \pm 1.2 \text{ ng/g testis/min}$ であった. Restrained conscious rat でテストステロンの secretion rate が低いのは stress factor によると考えられる (20).

電気ショックストレス (Inescapable electric footshock) (3)

○プロラクチン 上昇

β -エンドルフィン 上昇

ACTH 上昇

3 者の上昇は dexamethasone による前処理で block される.

Dexamethasone は PRL, ACTH, β -エンドルフィンの basal レベルも下げる (3).

絶食 (Fasting, Starvation)

ストレスとは違いますが、動物実験ではよく行われるので、付け加えておきます。

○Fasting で (10)

LH : 有意に下降

FSH:有意に下降

テストステロン : 有意に下降

血糖低下に伴い、インスリン : 低下, GH : 増加

○Ketamine の項参照 (21)

エーテル—Stress 及び麻酔の影響

エーテルは単に麻酔作用のみではなくストレスを与える薬物として扱われるのでここに置きました。

○TSH : (浅及び深麻酔で) 低下 (30 分後 浅麻酔: $p < 0.05$, 深麻酔: $p < 0.01$) (2)

○エーテル麻酔は TRH による TSH 分泌の用量—反応曲線の勾配を小さくする。

寒冷暴露中のエーテル麻酔は寒冷暴露による TSH の上昇を完全に block する。

寒冷麻酔の 3 分前にエーテル麻酔をすると寒冷暴露による TSH 上昇のピークを抑制, 遅延する. (11)

○プロラクチン : 上昇 pimozone で dopaminergic receptor を block するとプロラクチンは上昇するがエーテルで更に上昇する. (4)

雄ラットでエーテル stress 10→40 ng/ml

エストラジオール投与の雄ラット 100→400 ng/ml (5)

エーテル stress は PRF を介してプロラクチンレベルを上げるとされている. (5)

エーテル麻酔で 2.5 分後プロラクチンの血清レベル上昇 5 分後には半分に雄では 5 分後約 2 倍, 雌では 5 分後約 4 倍. (6)

○卵巣摘除ラットでエーテル吸入により (8)

2 分以内に血漿レベル

プロラクチン, LH, FSH が上昇.

その上昇の程度は, プロラクチン > LH > FSH であった.

再度のエーテル処理で

プロラクチンは更に上昇

LH, FSH は不変.

これらのプロラクチン, LH 上昇は 1 時間後には control(non-stress, decapitated) 以下に下降した.

○300 分の immobilization ごエーテル吸入 1 分間で血清中 (9)

プロラクチン : 上昇して 5 分後に最高レベル. その後下降

Immobilization 無しでは無変化

○エーテル容器に入れ unconscious になったら取り出し, 部分的に意識を回復したら断頭. (11)

LH : 有意に上昇

FSH : 有意に上昇

テストステロン : 変化なし

○雌ラットで diestrus の時に 3 回短時間のエーテル処理をすると, プロラクチンレベルは倍増したが, LH レベルは変わらなかった. Proestrus では同様のエーテル処理はプロラクチンレベルを半減し, LH レベルを 2 倍とした. (16)

○卵巣摘除ハムスター (実験 3 週前に摘除, LH の血中レベルは 400-600ng/ml に達している)

でエーテル麻酔(deep)は 30-60 分後に LH を上昇させた。(19)

○In vitro の実験でエーテルは膵臓片でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した。(29)

様々な麻酔薬投与或いは吸入の影響

Pentobarbital sodium

○室温では TSH レベルを下げないが、寒冷暴露での TSH 上昇を 90%抑制した。

TRH の用量-反応曲線の勾配は大きくなった。Pentobarbital 投与ラットでは TRH に依る TSH 上昇がコントロール群よりも大きい。(2, 11)

○Pentobarbital 腹腔内投与 30 分後で、血清プロラクチンレベルが有意に上昇した。この上昇は雌ラットで特に高かった(10 倍以上になる。雄では 3-7 倍)。(6)

○Pentobarbital を発情前期雌ラットに午後早くに投与すると 30 分間プロラクチンの血中レベルが上昇する。そして遅い午後のいわゆるプロラクチンと LH のサージを完全にブロックする。In vitro で 3 μ g の pentobarbital を下垂体とインキュベートするとプロラクチン放出が抑制される。(12)

○Pentobarbital 40mg/kg を雌ラットの発情前期の午後早く 13:20 (いわゆる critical period) に腹腔内投与すると preovulatory LH surge を block し、排卵を block する。投与直後にはプロラクチンを急速に上昇させるが、夕方の自発性 preovulatory プロラクチン上昇はブロックする。(18)

○ハムスターでは pentobarbital を発情前期の午後早く(いわゆる critical period)に投与しても排卵は block しない。

ハムスターでは発情前期の午後早く 2-5 時間の pentobarbital, エーテルでの麻酔は排卵を block しないが LH の ovulatory surge に対する神経刺激を遅らせる。

ハムスターでは LH surge は 14:00~15:00 に起きるが、pentobarbital, エーテルで 13:00~15:00 に麻酔すると LH の最初の上昇は 1 時間遅れる。エーテルでは上昇レベルは変わらないで平行に遅延するが、pentobarbital ではピークの高さも低くする。(13)

○ラットに於いて発情期の朝 pentobarbital を投与 (14)

後 cervix uteri を刺激すると血中の LH, プロラクチンは上昇し、偽妊娠の発生を妨げる。この際刺激無しでは LH, プロラクチンは低値にとどまる。

非投与群では cervical stimulation は偽妊娠を起こす。(15)

○L-DOPA をラットの発情前期の午後 1 時に動脈内投与すると、25mg/kg で急速に LH が上昇する。Pentobarbital 麻酔を 12:30 に行うと、L-DOPA の LH 急速放出作用をブロックする。この量の L-DOPA は diestrus ラットでは LH 放出を起こさない。

○Pentobarbital はエーテル麻酔によるプロラクチンの上昇を抑制した。

Pentobarbital は α -methyl-m-tyrosine (catecholamine 合成の inhibitor) によるプロラクチンの上昇を完全に抑制した。

Pentobarbital はエストロゲン処理したラットで見られるプロラクチンの上昇を抑制した。

Pentobarbital は卵巣摘除ラットでエーテル麻酔中高くなるプロラクチンレベルを 10 分以内に低下させ、120 分は低値が継続する。(17)

○卵巣摘除ハムスター (実験 3 週前に摘除, LH の血中レベルは 400-600ng/ml に達している) で pentobarbital sodium (8mg/100g ip)による深麻酔は LH レベルを一時的に低下させた。(19)

○Pentobarbital sodium は給餌, 絶食ラットで急性の高血糖を起こさなかった。(21)

○Pentobarbital は血漿中のグルコースレベルを変化させなかったが、インスリン濃度を増大

させた (0.59ng/ml→2.13ng/ml). (38)

Thiopental sodium (Sodium pentothal)

- Thiopental 投与ラットでは TRH に依る TSH 上昇がコントロール群よりも大きい. (2)
- Sodium pentothal 20mg/kg を発情前期の critical period に 3 回動脈内投与(ラット)すると preovulatory LH, プロラクチン surge をブロックし, 排卵もブロックした.
しかし, pentobarbital と異なり, 投与直後のプロラクチン上昇は起こさなかった. (18)
- イヌを thiopentone の infusion 下に静脈耐糖試験をすると insulinogenic index が増大する.
高血糖がインスリン分泌を促進していると思われる. (36)

Phenobarbital

- 卵巣摘除ハムスター (実験 3 週前に摘除, LH の血中レベルは 400-600ng/ml に達している) で phenobarbital は麻酔は起こさなかったが, pentobarbital よりも遥かに LH を低下させた.
LH の低下は麻酔作用とは関係ない. (19)

Ketamine

- 給餌, および絶食 SD ラットにおける ketamine(100mg/kg)および xylazine(10mg/kg)の同時投与による麻酔. (21)
給餌ラットでは投与によって急性の高血糖(178.4±8.0mg/dl)を 20 分以内に惹起した.
その際, インスリン, ACTH, Cortisosterone レベルの低下を伴った.
またグルカゴンと GH のレベルが上昇した.
急性高血糖は yohimbine(1-4mg/kg)の投与で dose-dependent に抑制された.
したがって K+X の効果は α 2-adrenergic receptor を刺激することにより糖代謝関連のホルモンを変化させていると考えられる.
Ketamine 単独では高血糖は起こさなかった.
絶食ラットでは K+X 同時投与でも急性高血糖は起こさなかった.
これらの事実は, 糖尿病やグルコース, 糖制御ホルモンレベルが実験結果を左右するようなモデルでは, 麻酔薬の選択や動物の給餌, 絶食の状態を考慮すべきであることを示している.
(21)

抱水クロラール

- 抱水クロラール投与ラットでは TRH に依る TSH 上昇がコントロール群よりも大きい. (2)

Isoflurane

- 給餌ラットに対する Isoflurane 麻酔は急性の高血糖を 20 分以内におこしたが,
絶食ラットでは起こさなかった. (21)
- Japanese white rabbit で, 静脈内糖耐性試験(IVGTT)を行う際, glucose0.6g/kg i.v.投与の 30 分前に isoflurane 麻酔(1.0 minimum alveolar concentration)を行うと, insulinogenic index {GTT におけるインスリン濃度(μ U/ml)増大/血糖値(mg/dl)の増大}を阻害した
Isoflurane はインスリンの分泌とグルコース utilization を阻害する. (22)
- Isoflurane 2%は単離されたランゲルハンス島において, glucose 20mmol/l により起こされるインスリン分泌を basal non-stimulated レベルにまで低下させた. Glycerinaldehyde と phorbol ester を用いてのインスリン分泌増大も抑制した. つまり抑制作用は glycerinaldehyde や phorbol ester よりも先で起きていることが示唆される. (23)
- オスの Dwarf hamster (Phodopus spp.)を無麻酔で手で押さえ採血すると, 1 分後には cortisol の上昇とプロラクチンの低下が見られる. ケージに入れたまま isoflurane を導入して麻酔すると, これらの変化は見られなくなる. (24)
- ヒトでの虫垂摘出手術で, 手術で通常起きるプロラクチン, cortisol, T4 の顕著な上昇は, isoflurane 麻酔でも同じように起こった. 即ち isoflurane 麻酔は外科手術に伴うこれらホルモンの上昇を抑制しなかった. (25)

- ラットに於いて isoflurane 麻酔(30% in propyleneglycol)は hematology と blood chemistry の項目に関して, Ca イオン濃度の少々の変化を除いてはエーテル麻酔の結果と変わらなかった. また isoflurane 麻酔では, 血中のプロラクチンと corticosterone の結果からエーテル麻酔よりもストレスが少ないことが示された. (26)
- Isoflurane は雌ラットで赤血球, hemoglobin, hematocrit を減少させた. 雄に於いては glucose 濃度を上昇させた. 雌ではクロライドを減少させた. 血清タンパク, ナトリウム, 無機リン酸, カルシウム, マグネシウム, カリウムも減少. T3, T4 葉減少, プロラクチンは増加, 一方 Erythrocyte cholinesterase 活性は不変. 血清および脳の cholinesterase 活性も不変. Isoflurane は選択すべき麻酔薬である. (27)
- Isoflurane はイヌで急速な広範な代謝への影響を与える. 10 分の麻酔で血漿中の遊離脂肪酸とパルミチン酸の代謝が有意に減少し, グルコースの産生が増加し, 3.5 時間の麻酔では末梢のグルコース利用が低下する. 即ち, 末梢でのインスリン抵抗性の増大, 脂肪分解の減少を惹起し, 麻酔の継続に比例してタンパク質合成の低下とアミノ酸の酸化の割合を増大させる. (28)
- ヒトでの isoflurane 麻酔下に行った静脈内耐糖試験 (IVGTT)では insulinogenic index, acute insulin response 及び glucose disappearance rate が非麻酔の場合と比べて低下した. (37)
- Isoflurane は給餌ラットで hyperglycemia を惹起した. がインスリン濃度には影響しなかった. Isoflurane による高血糖は glibenclamide(non-specific K(ATP) channel inhibitor)によって阻止された. グルコース依存性インスリン分泌が障害されている可能性がある. (38)

Halothane

- Halothane による 4 時間の全身麻酔はイヌに於いてタンパク合成の減少とロイシンの酸化速度を増大した. (28)
 - In vitro の実験で halothane は膵臓片でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した. (30)
 - In vitro の実験で halothane は単離された膵島でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した. この作用は glucose oxidation の阻害によるものではない. (31)
 - ウマ(pony)を halothane で 2 時間麻酔 (手術なし). 同じ固体の異なる日麻酔なしでの採血と比較 (32)
- Halothane 麻酔により血漿中のグルコース, lactate, cortisol, ACTH レベルは上昇
インスリンレベルは低下した. 18 ヶ月後に同じ実験を繰り返したが結果は同様であった.
- Halothane による麻酔はウマで実質的にストレス反応を惹き起こしている.
- 絶食授乳中ラットに於いて, 乳腺と肝臓の pyruvate dehydrogenase 活性は, 絶食のみのラットではインスリン投与によって乳腺中での酵素活性が増加したが肝臓では増加しなかった. このインスリン作用は halothane 麻酔で大きく阻害された. (33)
 - Halothane 麻酔は 24 時間ラットでグルコースの代謝率を 20%減少させた. これは睡眠中の場合と類似している. 従ってこれは halothane に特異的な作用とは言えない. 血漿中のインスリン濃度はグルコースの代謝率に逆比例していた. (34)
 - ラットに死には至らない火傷(scald injury)を与え, 70 分後に halothane 麻酔を行った. 麻酔しないラットと比較した. 麻酔の導入した直後及び麻酔の最中, halothane は急速の血糖値を上昇させ, 30 分後にはコントロールレベルに下がった. インスリン濃度も上昇した. 2 時間麻酔を続けるとグルコースの産生と利用を低下させ, 血漿中のインスリンレベルは増加させ, 肝臓でのグリコーゲン量を減少させた. (35)
 - イヌを halothane で麻酔下に静脈耐糖試験をすると insulinogenic index が有意に低下する. (36)

II. ホルモン別のまとめ

インスリン絶食, 麻酔

絶食

- 低下する.
- Ketamine の項参照

エーテル

- In vitro の実験でエーテルは膵臓片でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した. (29)

Pentobarbital

- Pentobarbital sodium は給餌, 絶食ラットで急性の高血糖を起こさなかった. (21)
- Pentobarbital は血漿中のグルコースレベルを変化させなかったが, インスリン濃度を増大させた(0.59ng/ml→2.13ng/ml). (38)

Thiopental sodium

- イヌを thiopentone の infusion 下に静脈耐糖試験をすると insulinogenic index が増大する. 高血糖がインスリン分泌を促進していると思われる. (35)

Ketamine

- 給餌, および絶食 SD ラットにおける ketamine(100mg/kg)および xylazine(10mg/kg)の同時投与による麻酔. (21)
- 給餌ラットでは投与によって急性の高血糖(178.4±8.0mg/dl)を 20 分以内に惹起した. その際, インスリンレベルの低下を伴った.
- 急性高血糖は yohimbine(1-4mg/kg)の投与で dose-dependent に抑制された.
- したがって K+X の効果は α 2-adrenergic receptor を刺激することにより糖代謝関連のホルモンを変化させていると考えられる.
- Ketamine 単独では高血糖は起こさなかった.
- 絶食ラットでは K+X 同時投与でも急性高血糖は起こさなかった.
- これらの事実は, 糖尿病やグルコース, 糖制御ホルモンレベルが実験結果を左右するようなモデルでは, 麻酔薬の選択や動物の給餌, 絶食の状態を考慮すべきであることを示している.

Isoflurane

- 給餌ラットに対する Isoflurane 麻酔は急性の高血糖を 20 分以内におこしたが, 絶食ラットでは起こさなかった. (21)
- Japanese white rabbit で, 静脈内糖耐性試験(IVGTT)を行う際, glucose 0.6g/kg i.v.投与の 30 分前に isoflurane 麻酔(1.0 minimum alveolar concentration)を行うと, insulinogenic index {GTT におけるインスリン濃度(μ U/ml)増大/血糖値(mg/dl)の増大}を阻害した Isoflurane はインスリンの分泌とグルコース utilization を阻害する. (22)
- Isoflurane 2%は単離されたランゲルハンス島において, glucose 20mmol/l により起こされるインスリン分泌を basal non-stimulated レベルにまで低下させた. Glyceraldehyde と phorbol ester を用いてのインスリン分泌増大も抑制した. つまり抑制作用は glyceraldehyde や phorbol ester よりも先で起きていることが示唆される. (23)
- Isoflurane はイヌで急速な広範な代謝への影響を与えた. 10 分の麻酔で血漿中の遊離脂肪酸とパルミチン酸の代謝が有意に減少し, グルコースの産生が増加し, 3.5 時間の麻酔では末梢のグルコース利用が低下した. 即ち, 末梢でのインスリン抵抗性の増大, 脂肪分解の減少を惹起し, 麻酔の継続に比例してタンパク質合成の低下とアミノ酸の酸化の割合を増大させた. (28)

- ヒトでの isoflurane 麻酔下に行った静脈内耐糖試験 (IVGTT)では insulinogenic index, acute insulin response 及び glucose disappearance rate が非麻酔の場合と比べて低下した。(37)
- Isoflurane は給餌ラットで hyperglycemia を惹起したがインスリン濃度には影響しなかった。Isoflurane による高血糖は glibenclamide(non-specific K(ATP) channel inhibitor)によって阻止された。グルコース依存性インスリン分泌が障害されている可能性がある。(38)

Halothane

- In vitro の実験で halothane は膵臓片でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した。(30)
- In vitro の実験で halothane は単離された膵島でのグルコース依存性インスリン分泌を濃度依存的に阻害した。この作用は glucose oxidation の阻害によるものではない。(31)
- ウマ(pony)を halothane で 2 時間麻酔 (手術なし)。同じ固体の異なる日麻酔なしでの採血と比較 (32)
Halothane 麻酔により血漿中のグルコース, lactate, cortisol, ACTH レベルは上昇
インスリンレベルは低下した。18 ヶ月後に同じ実験を繰り返したが結果は同様であった。
Halothane による麻酔はウマで実質的にストレス反応を惹き起こしている。
- 絶食授乳中ラットに於いて、乳腺と肝臓の pyruvate dehydrogenase 活性は、絶食のみのラットではインスリン投与によって乳腺中での酵素活性が増加したが肝臓では増加しなかった。このインスリン作用は halothane 麻酔で大きく阻害された。(33)
- Halothane 麻酔は 24 時間ラットでグルコースの代謝率を 20%減少させた。これは睡眠中の場合と類似している。従ってこれは halothane に特異的な作用とは言えない。血漿中のインスリン濃度はグルコースの代謝率に逆比例していた。(34)
- ラットに死には至らない火傷(scald injury)を与え、70 分後に halothane 麻酔を行った。麻酔しないラットと比較した。麻酔の導入した直後及び麻酔の最中、halothane は急速の血糖値を上昇させ、30 分後にはコントロールレベルに下がった。インスリン濃度も上昇した。2 時間麻酔を続けるとグルコースの産生と利用を低下させ、血漿中のインスリンレベルは増加させ、肝臓でのグリコーゲン量を減少させた。(35)
- イヌを halothane 麻酔下に静脈耐糖試験をすると insulinogenic index が有意に低下 (36).

GH とストレス・麻酔

- 5 分間の寒冷暴露で有意に低下した(43%に)。(1)
- 5 分間の緊縛ストレス(immobilization)で有意に低下した。(1)
- 毎日 8 時間、10 日間の immobilization で低下した。(7)
- この状態で GnRH+TRH の投与で更に低下した。
- 絶食で増加した (10)
- Ketamine(100mg/kg)+Xylazine(10mg/kg)の投与で GH レベルが上昇した。(21)

プロラクチンとストレス・麻酔

ストレスの影響

寒冷暴露ストレス(Cold exposure)

室温乃至は 30°C から 4°C (冷蔵室)へ移すことがよく行われています。

- 5 分間の暴露で (1)
プロラクチンは 2 倍に上昇した。

緊縛ストレス(Immobilization, Restraint)

台上に固定, 或いは動けないような小さな容器(restraining cage)に入れる.

○5分間の緊縛ストレスで(1)

プロラクチンは10倍に上昇した.

○毎日8時間, 10日間の immobilization (成熟雌ラット) で

プロラクチンの血漿レベルが低下した.

下垂体含量に変化はなかった. (7)

ストレス中 GnRH+TRH の静脈内投与によりプロラクチン血漿中レベルは上昇した.

○Immobilization で血清中のプロラクチンは10分間で上昇 その後下降

10分間の immobilization を繰り返すとプロラクチンは固定時に上昇, 解除で下降, 繰り返しのより上昇の程度は下がって行く

300分の immobilization 後フォルマリン 0.2ml 皮下注射

プロラクチンは上昇10分後に最高レベル, 後下降する. Immobilization 無しでは無変化.

300分の immobilization の有無に関わらず, pimozide(dopamine receptor blocker)の投与 (0.63mg/kg, iv)で上昇10分後に最高値, その後も高値を継続.

300分の immobilization 後 TRH 投与するとプロラクチンは10分後に上昇 (投与前に既に高値であるが更に上昇)

Immobilization 無しでは TRH による変化なし.

Pimozide による前処理 (immobilization の20分前) により

プロラクチンは前処理により上昇, immobilization が始まると10分後で低下, 60分後に再び上昇, immobilization 中高値が続く.

無処理群では immobilization 開始後10分で高値, 後 immobilization 中低下を続ける.

(以上文献9)

電気ショックストレス(Inescapable electric footshock)

○プロラクチンは上昇した. この上昇は dexamethasone による前処理で block される.

Dexamethasone は PRL の basal レベルも下げる. (3)

エーテル-Stress 及び麻酔の影響

エーテルは単に麻酔作用のみではなくストレスを与える薬物として扱われるのでここに置きました.

○エーテルでプロラクチンは上昇した.

Pimozide で dopaminergic receptor を block するとプロラクチンは上昇するがエーテルで更に上昇する. (4)

雄ラットでエーテル stress 10→40 ng/ml

エストラジオール投与の雄ラット 100→400 ng/ml (5)

エーテル stress は PRF を介してプロラクチンレベルを上げるとされている. (5)

エーテル麻酔で 2.5 分後プロラクチンの血清レベル上昇 5 分後には半減, 雄では 5 分後約 2 倍, 雌では 5 分後約 4 倍. (6)

○卵巣摘除ラットでエーテル吸入により 2 分以内に血漿プロラクチンレベルが上昇.

その際 LH, FSH も上昇するが, その上昇の程度は, プロラクチン>LH>FSH であった.

再度のエーテル処理でプロラクチンは更に上昇した. (8)

- これらのプロラクチン上昇は1時間後には control(non-stress, decapitated)以下に下降。
- 300分の immobilization 後エーテル吸入1分間で血清プロラクチン:上昇して5分後に最高レベル.その後下降した. Immobilization 無しでは無変化. (9)
 - 雌ラットで diestrus の時に3回短時間のエーテル処理をすると, プロラクチンレベルは倍増した. Proestrus では同様のエーテル処理はプロラクチンレベルを半減した. (16)

Pentobarbital sodium

- Pentobarbital 腹腔内投与30分後で, 血清プロラクチンレベルが有意に上昇した. この上昇は雌ラットで特に高かった(10倍以上になる. 雄では3-7倍). (6)
- Pentobarbital を発情前期雌ラットに午後早くに投与すると30分間プロラクチンの血中レベルが上昇する. そして遅い午後のいわゆるプロラクチンと LH のサージを完全にブロックする. *In vitro*で3 μ gの pentobarbital を下垂体とインキュベートするとプロラクチン放出が抑制される. (12)
- Pentobarbital 40mg/kg を雌ラットの発情前期の午後早く 13:20 (いわゆる critical period) に腹腔内投与すると投与直後にはプロラクチンを急速に上昇させるが, 夕方の自発性 preovulatory プロラクチン上昇はブロックする. (18)
- ラットに於いて発情期の朝 pentobarbital を投与 (14)
後 cervix uteri を刺激すると血中の LH, プロラクチンは上昇し, 偽妊娠の発生を妨げる. この際刺激無しでは LH, プロラクチンは低値にとどまる. 非投与群では cervical stimulation は偽妊娠を起こす. (15)
- Pentobarbital はエーテル麻酔によるプロラクチンの上昇を抑制した.
Pentobarbital は α -methyl-m-tyrosine (catecholamine 合成の inhibitor) によるプロラクチンの上昇を完全に抑制した.
Pentobarbital はエストロゲン処理したラットで見られるプロラクチンの上昇を抑制した.
Pentobarbital は卵巣摘除ラットでエーテル麻酔中高くなるプロラクチンレベルを10分以内に低下させ, 120分は低値が継続する. (17)

Thiopental sodium (Sodium pentothal)

- Sodium pentothal 20mg/kg を発情前期の critical period に3回動脈内投与(ラット)すると preovulatory LH, プロラクチン surge をブロックし, 排卵もブロックした.
しかし, pentobarbital と異なり, 投与直後のプロラクチン上昇は起こさなかった. (18)

Isoflurane

- オスの Dwarf hamster (*Phodopus spp.*)を無麻酔で手で押さえ採血すると, 1分後には cortisol の上昇とプロラクチンの低下が見られる. ケージに入れたまま isoflurane を導入して麻酔すると, これらの変化は見られなくなる. (24)
- ヒトでの虫垂摘出手術で, 手術で通常起きるプロラクチン, cortisol, T4 の顕著な上昇は, isoflurane 麻酔でも同じように起こった. 即ち isoflurane 麻酔は外科手術に伴うこれらホルモンの上昇を抑制しなかった. (15)
- ラットに於いて isoflurane 麻酔(30% in propyleneglycol)は hematology と blood chemistry の項目に関して, Ca イオン濃度の少々の変化を除いてはエーテル麻酔の結果と変わらなかった. また isoflurane 麻酔では, 血中のプロラクチンと corticosterone の結果からエーテル麻酔よりもストレスが少ないことが示された. (26)
- Isoflurane は雌ラットで赤血球, hemoglobin, hematocrit を減少させた. 雄に於いては glucose 濃度を上昇させた. 雌ではクロライドを減少させた. 血清タンパク, ナトリウム, 無

機燐酸, カルシウム, マグネシウム, カリウムも減少. T3, T4 は減少, プロラクチンは増加, 一方 Erythrocyte cholinesterase 活性は不変. 血清および脳の cholinesterase 活性も不変. Isoflurane は選択すべき麻酔薬である. (27)

血中 TSH とストレス, 麻酔について

下垂体での TSH の分泌は視床下部からの TRH (チロトロピン放出ホルモン) によって促進されます. TRH にはプロラクチンの放出作用もあることが知られています.

動物を寒冷暴露, 即ち室温から 4°C の環境に移すと視床下部が刺激され TRH の分泌を高進させる結果血中の TSH レベルが上昇します. 多くの麻酔薬は視床下部に働いて寒冷暴露に対する TRH 分泌反応を抑制します. また寒冷暴露以外のストレスは視床下部での TRH 分泌を抑制します.

血中の TSH の増減は TRH に対する下垂体の感受性にも関連します. ある種の麻酔薬は下垂体にも直接働くことが疑われます. 麻酔下に TRH を投与して TSH 放出に影響するかどうかを検討することで影響の有無を調べる事が出来ます. エーテル麻酔は反応性を低下させ, 他の麻酔薬のいくつかは反応性を増大させることが報告されています. 視床下部-下垂体系に関わる実験では麻酔薬を慎重に吟味する必要があります. 以下にいくつかの文献に現れた結果ををご紹介します.

SD rat 雌 (150-250g BW) での観察

○麻酔の影響

無馴化ラット使用. Ip(腹腔内)投与で麻酔後, 10 分, 30 分で retroorbital plexus から採血. 60 分で断頭採血. Control 群は同じ時期に断頭採血. 気化性の麻酔薬は通常の麻酔器を使用.

○寒冷暴露実験

雄ラット使用

個別ケージで 7 日間 30±2°C で, 暗室内人工照明(07:00-19:00h.)で飼育
麻酔して 10 分後 4°C, 30-60 分寒冷暴露.

採血: 10, 40, 70 分 (麻酔後) (寒冷暴露時からは 0, 30, 60 分)

吸入麻酔の場合は cold room に入れてから開始.

○TRH による TSH 分泌反応の観察 (脳機能との関連)

30°C に慣れさせた雌ラットを麻酔し, 麻酔後 0 タイム, 10, 50 分に採血.

麻酔薬 ip 投与後 50ngTRH を尾静脈に投与, 10 分後採血 (麻酔薬投与から 20, 60 分後) 断頭

無麻酔コントロール 1: 無投与, 2: 生食, 3: Before と TRH(50ng)投与後 10 分

エーテルの場合 2 段階の麻酔深度

Light depth: TRH 投与の刺激に反応する程度

Deep anesthesia: 一部に一過性の呼吸停止を生じる程度

TRH 投与そのものが stress になるので control とは厳密な比較は困難

○血清 TSH 測定: NIAMDD の ratTSH RIA kit

○使用された麻酔薬

Chloral hydrate 300mg/kg, Diethyl ether, Halothane 2%, Methoxyflurane 1.5%,

Pentobarbitone 50mg/kg, Thiopentone 50mg/kg, Urethane 1.5g/kg (半量は ip, 半量は sc)

実験結果

○麻酔薬の投与後血清中の basalTSH レベルは断頭した無処置のコントロールとの間に有意の差はなかった.

○Thiopentone 群では 10 分後における TSH は 60 分とよりも有意に高かった ($p<0.05$)

分散分析では pentobarbitone と chloral hydrate 投与群は全体としてコントロール群よりも高

かった(p<0.05)

- Light ether 麻酔群では 30 分後では basal level より低下した。
Ether(light)群の 10 分後, Control 群の 30 分後よりも低かった (p<0.01)
- Halothane 群では 30 分後には control の 30 分と比べて低かった (p<0.05)
- 分散分析では Ether のカーブは control のカーブと比べて有意差となった。
- 寒冷暴露における TSH レベル上昇について
30 分の寒冷暴露で全ての麻酔薬により TSH の最高値は無処置よりも低くなった。
しかし pentobarbitone では有意差にはならなかった。
上昇反応はエーテル, urethane, chloral hydrate で完全に抑制された。
Halothane と methoxyflurane では上昇の遅延が見られた。
- TRH-induced TSH 分泌反応
TRH による TSH 分泌促進反応は deep ether 群のみで有意に減退した。
- Deep と light エーテル麻酔
両者は TRH 投与の際の basal level を低下させた (Light: p<0.05, Deep: p<0.01)
- Thiopentone(10 分後 : p<0.02), pentobarbitone(10 分後 : p<0.02, 30 分後 : p<0.01), Chloral hydrate(10 分後 : p<0.05) で TRH による TSH 分泌反応を増強した。
(しかし無麻酔ラットでは TRH 注射による stress のため, 厳密な比較は困難である。)

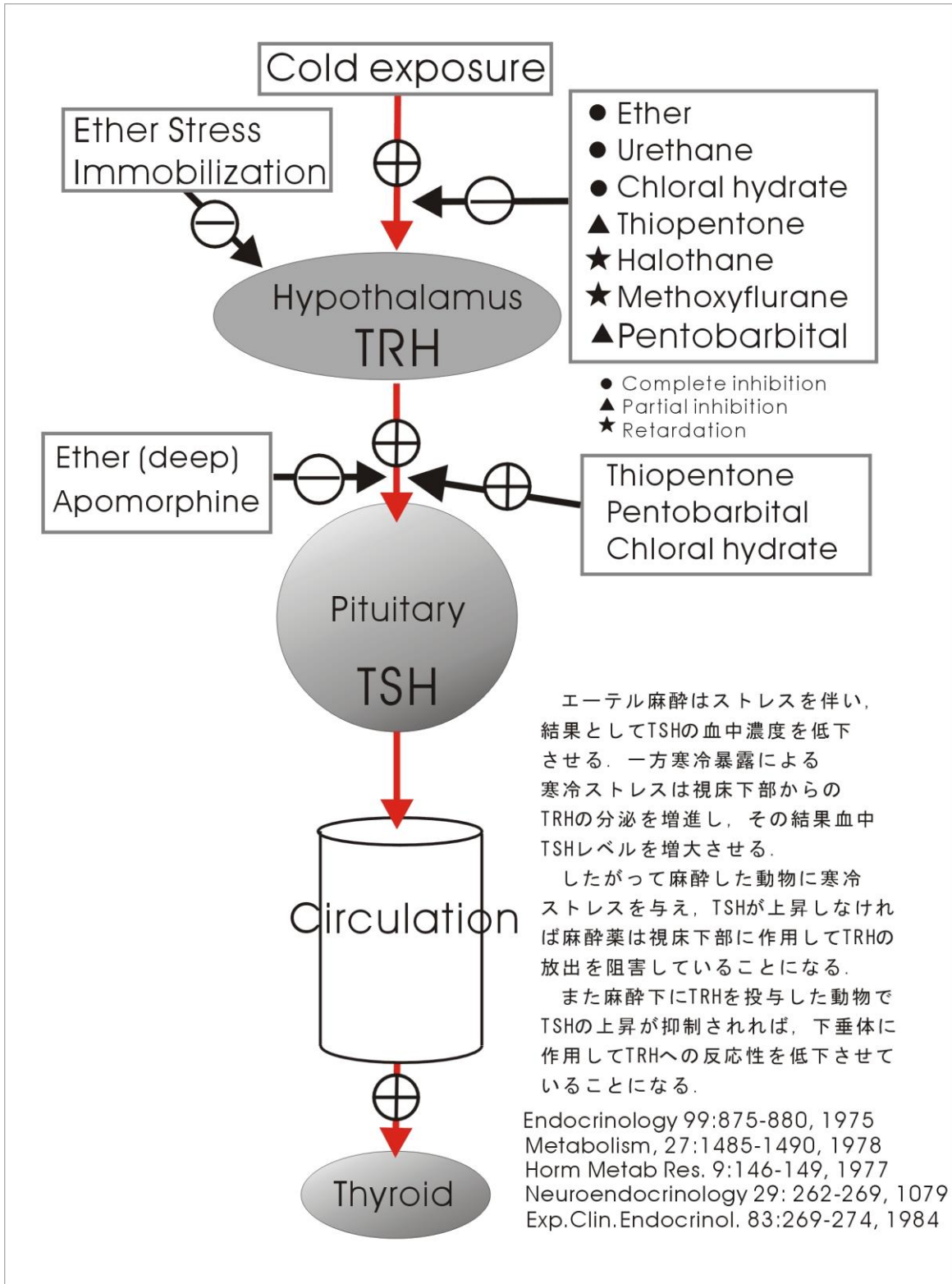
	TRH injected			
	10 min after anesthetic TSH level (ng/ml)		50min after anesthetic TSH level (ng/ml)	
	At time of TRH injection	10 min after TRH injection	At time of TRH injection	10 min after TRH injection
Saline controls	429 ± 136 (5)	255 ± 34 (5)	—	—
TRH controls	261 ± 19 (14)	710 ± 162 (15)	220 ± 27 (10)	830 ± 30 (9)
Thiopentone	311 ± 73 (6)	1770 ± 447* (6)	383 ± 97 (6)	975 ± 198 (6)
Pentobarbitone	214 ± 40 (6)	1908 ± 630* (6)	203 ± 43 (6)	1550 ± 271** (6)
Chloral hydrate	216 ± 6 (6)	1350 ± 149* (6)	200 ± 10 (6)	1200 ± 194 (6)
Urethane	269 ± 20 (10)	589 ± 110 (10)	202 ± 15 (10)	705 ± 120 (10)

*: p<0.05, **: p<0.01 vs TRH controls

以上参考文献(2)

- 緊縛ストレス (immobilization) 10 分間で血中 TSH は減少した。その後緊縛を続けると 60 分で半減, 300 分で更に半減した(9)。
- 無麻酔ラットでは寒冷暴露 25 分で TSH レベルは約 5 倍上昇した。
- 寒冷暴露の間中エーテル麻酔をすると TSH 上昇を完全に抑制した。
- Pentobarbital 麻酔下での寒冷暴露は TSH 上昇が 90%以上抑制された。
- 寒冷暴露前に 3 分だけエーテル麻酔を行うと TSH の上昇のピークを抑制または上昇反応を遅延した。
- 室温でのエーテルでの 2 時間の麻酔中, 血中 TSH 濃度は減少した。
- Pentobarbital 麻酔は室温では TSH 濃度を下げない。
- Pentobarbital 麻酔中 TRH を投与すると, TSH の上昇は無麻酔の場合よりも大きい。
- エーテル麻酔下での TRH 投与による TSH の上昇は無麻酔の場合よりやや低い。
- TRH による TSH 放出の用量-反応曲線の勾配は pentobarbital 麻酔下では大きくなり, エーテル麻酔下では小さくなった(11)。
- Apomorphine の投与も TSH レベルを減少させる, apomorphine の infusion (50µg/20µl/min) では TRH による TSH 放出効果が抑制される。Apomorphine は下垂体レベルで働いていると考えられる(39)。

要約図解



LH とストレス・麻酔

緊縛ストレス

- 成熟メスラットを毎日 8 時間、10 日間の immobilization で LH レベルが低下。
この状態で GnRH+TRH を投与すると LH 放出の反応性が高くなる（下垂体含量の増加によるか？）(7)

絶食

- LH は有意に低下する(10)

エーテル麻酔：

- 卵巣摘除ラットでエーテル吸入により 2 分以内に LH が上昇した。
1 時間後にはコントロール群以下に下降した。(8)
- エーテル容器に入れ unconscious になったら取り出し、部分的に意識を回復したら断頭
LH は有意に上昇した。(11)
- Proestrus ラットで 3 回短時間のエーテル処理をすると LH レベルは 2 倍となった。
Diestrus ラットでは同じ処理で LH レベルに変化はなかった。(16)
- 卵巣摘除ハムスター（実験 3 週間前手術，LH は実験時には 400-600ng/ml）にエーテル深麻酔を施すと 30-60 分後に血中 LH が上昇した。(19)
- Proestrus のハムスターに午後早く(13:00-15:00)に投与してもはい欄はブロックされなかった。血中 LH の ovulatory サージの最初の上昇は 1 時間遅延し、ピークの高さは変わらず平行にずれた。(13)

Pentobarbital

- Proestrus のラットに午後早く(13:20)，いわゆる critical period に投与すると，LH の preovulatory サージをブロックし，排卵もブロックした。(16)
- Proestrus のハムスターに午後早く(13:00-15:00)に投与しても排卵はブロックされなかった。血中 LH の ovulatory サージの最初の上昇は 1 時間遅延した。ピークの高さは低くなった。(13)
- ラットに於いて発情期の朝 pentobarbital を投与 (14)
後 cervix uteri を刺激すると血中の LH，プロラクチンは上昇し，偽妊娠の発生を妨げた。
この際刺激無しでは LH，プロラクチンは低値にとどまる。
非投与群では cervical stimulation は偽妊娠を起こす。
- L-DOPA をラットの発情前期の午後 1 時に動脈内投与すると，25mg/kg で急速に LH が上昇する。Pentobarbital 麻酔を 12:30 に行うと，L-DOPA の LH 急速放出作用をブロックする。この量の L-DOPA は diestrus ラットでは LH 放出を起こさない。(15)
- 卵巣摘除ハムスター（実験 3 週前に摘除，LH の血中レベルは 400-600ng/ml に達している）で pentobarbital sodium (8mg/100g ip)による深麻酔は LH レベルを一時的に低下させた。(19)

Thiopental sodium

- Thiopental sodium 20mg/kg を発情前期の critical period に 3 回動脈内投与(ラット)すると preovulatory LH，プロラクチン surge をブロックし，排卵もブロックした。

Phenobarbital

- 卵巣摘除ハムスター（実験 3 週前に摘除，LH の血中レベルは 400-600ng/ml に達している）で phenobarbital は麻酔は起こさなかったが，pentobarbital よりも遥かに LH を低下させた。LH の低下は麻酔作用とは関係ない。(19)

FSH とストレス・麻酔

緊縛ストレス

○成熟メスラットを毎日8時間, 10日間のimmobilizationでFSHはやや下がるが有意差なし.
下垂体含量は増加した.

この状態でGnRH+TRHを投与するとFSH放出の反応性が高くなる(下垂体含量の増加のためか?)(7)

絶食

○FastingによりFSHは低下する。(10)

エーテル

○卵巣摘除ラットでエーテル吸入により2分以内に血漿FSHが上昇した.

プロラクチン, LHも上昇したがその程度は, プロラクチン>LH>FSHであった。(8)

○エーテル容器に入れunconsciousになったら取り出し, 部分的に意識を回復したら断頭FSHは有意に上昇した。(11)

参考文献

1. Specific hormonal and neurochemical response to different stresses.
Lenox RH, Kant GJ, Sissions GR., et al.
Neuroendocrinology 30:300-308, 1980
2. Anesthetics and thyrotropin secretion in the rat.
Mannisto PT, Saarinen A and Ranta T.
Endocrinology 99: 875-880, 1976
3. Stress-induced release of prolactin: Blockade by dexamethasone and naloxone may indicate β -endorphin mediation.
Rossier J, French E, Rivier C, et al.
Neuroendocrinology 77: 666-669, 1980
4. Physiological evidence for existence of prolactin releasing factor: Stress-induced prolactin secretion is not linked to dopaminergic receptors.
Shin SH.
Neuroendocrinology 31: 375-379, 1980
5. Comparative studies of prolactin secretion in estradiol-primed and normal male rats induced by ether stress, pimozide and TRH.
Piercy M, and Shin SH
Neuroendocrinology 31: 270-275, 1980
6. Effect of pentobarbital and ether stress on serum prolactin levels in rats.
Wakabayashi I, Arimura A. and Schally AV.
PSEBM 137:1189-1193, 1971
7. Effects of chronic immobilization stress on pituitary hormone secretion, on hypothalamic factor levels, and on pituitary responsiveness to LHRH and TRH in female rats.
Du Ruisseau P, Tache Y, Brazeau P, and Collu R.
Neuroendocrinology 29: 90-99, 1979
8. The effect of stress and nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats.
Ajika K, Kalra SP, Fawcett CP, et al.
Endocrinology 90: 707-715, 1972
9. Immobilization stress and prolactin secretion in male rats.
Kawakami M, Higuchi T, and Matsuura M.
Neuroendocrinology 29: 262-269, 1979
10. Changes in serum levels of gonadotropins and testosterone in the male rat in response to fasting, surgery and ether.

- Howland BE, Beaton DB and Jack MI.
Experientia 30:1223-1225, 1974
11. Effects of ether and pentobarbital anesthesia on thyroid function in the rat.
 Ohtake M, Bray GA.
Horm Metab Res. 9: 146-149, 1977
 12. Mechanism of pentobarbital actions on prolactin release.
 Wuttke N, Gelato M, and Meites J.
Endocrinology 89: 1191-1194, 1971
 13. Delay of the proestrous ovulatory surge of LH in the hamster by pentobarbital and ether.
 Norman RL, Blake CA, Sawyer CH.
Endocrinology 91: 1025-1029, 1972
 14. Failure to induce pseudopregnancy in Na-pentobarbital-anesthetized rats: Effect on serum prolactin.
 Wuttke W.
Endocrinology 92: 1280-1284, 1973
 15. L-DOPA as a stimulus for LH release in the proestrous rat: Blockade of its action by pentobarbital anesthesia.
 Weidig JH, Gay VL.
Neuroendocrinology 15: 99-105, 1974
 16. A paradoxical inhibiting effect of ether on prolactin release in the rat: Comparison with effect of ether on LH and FSH.
 Morishige WK, Rothchild I.
Neuroendocrinology 16: 95-107, 1974
 17. The effect of pentobarbital(Nembutal) on prolactin release in the rat.
 Ajika K, Krulich L, McCann SM.
PSEBM 141:203-205, 1972
 18. CNS depression in the absence of prolactin release following intraarterial injections of sodium pentothal in the proestrous rat.
 Wedig JH, Gay VL.
PSEBM 144: 989-992, 1973
 19. Effects of ether and barbiturates on serum LH concentrations in ovariectomized hamster.
 Norman RL, Blake CA and Sawyer CH.
PSEBM 144: 168-171, 1973
 20. Secretion rate of testicular steroids in the conscious and halothane-anesthetized rat.
 Free MJ, Tillson SA.
Endocrinology 93: 874-879, 1973
 21. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: Mechanism and implication for preclinical models.
 Saha JK, Xia J, Grondin JM, et al.
Exp Biol Med (Maywood) 230: 777-784, 2005
 22. Mechanism of impaired glucose tolerance and insulin secretion during isoflurane anesthesia.
 Tanaka K, Kawano T, Tomino T, et al.
Anesthesiology 111: 1044-1051, 2009
 23. Isoflurane inhibits insulin secretion from isolated rat pancreatic islets of Langerhans.
 Desborough JP, Jones PM, Persaud SJ, et al.
Br J Anesth 71: 873-876
 24. Cortisol and prolactin concentrations during repeated blood sample collection from freely moving, mouse-sized mammals (*Phodopus* spp.).
 Rebum CJ, and Wynne-Edwards KE.
Comp Med 50: 184-198, 2000
 25. Neuroendocrine response to anesthesia with isoflurane.
 Lanza V., Mercadante S, Latteri S, et al.
Ann Fr Anesth Reanim 5: 120-123, 1986
 26. Diluted isoflurane as a suitable alternative for diethyl ether for rat anaesthesia in regular

- toxicology studies.
Nagate T, Chino T, Nishiyama C, et al.
J Vet Med Sci 69:1137-1143, 2007
27. The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats.
Deckardt K, Weber I, Kaspers U, et al.
Food Chem Toxicol 45: 1709-1718, 2007
 28. Isoflurane and whole body leucine, glucose, and fatty acid metabolism in dog.
Horber FF, Kraye S, Cryer P, et al.
Anesthesiology 73: 82-92, 1990
 29. Inhibition by ether of glucose-stimulated insulin secretion in isolated pieces of rat pancreas.
Gingelich RL, Paradise RR, Wright PH.
Anesthesiology 51: 34-35, 1979
 30. Inhibition by halothane of glucose-stimulated insulin secretion in isolated pieces of rat pancreas.
Gingelich RL, Paradise RR, Wright PH.
Anesthesiology 40: 449-452, 1974
 31. Effects of halothane on glucose-stimulated insulin secretion and glucose oxidation in isolated rat pancreatic islets.
Gingelich RL, Wright PH, Paradise RR.
Anesthesiology 53: 219-222, 1980
 32. Equine stress response to anaesthesia.
Taylor PM.
Br J Anaesth. 63: 702-709
 33. Halothane anaesthesia can block insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase activity in mammary glands of 24-hour starved lactating rats.
Hutchinson CE, Coore HG.
Br J Anaesth. 52: 573-576, 1980
 34. Rate of glucose utilization and gluconeogenesis in rats in the basal state induced by halothane anaesthesia.
Heath DF, Frayn KN, Rose JG
Biochem J 162:643-651, 1977
 35. Effects of halothane on glucose metabolism after injury in the rat.
Heath DF, Frayn KN, Rose JG.
Br J Anaesth. 50: 899-904, 1978
 36. Intravenous glucose tolerance test during anaesthesia in dogs: insulin response and glucose clearance.
Ishihara H, Kallus FT, Giesecke AH Jr.
Can Anaesth Soc J 28: 381-386, 1981
 37. Insulin secretion and glucose utilization are impaired under general anesthesia with sevoflurane as well as isoflurane in a concentration-independent manner.
Tanaka T, Nabatame H, Tanifuji Y.
J Anesth. 19: 277-281, 2005
 38. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats.
Zuurbier CJ, Keijzers PJ, Koeman A. et al.
Anesth Analg. 106:135-142, 2008
 39. Studies on the inhibitory effect of apomorphine and bromocryptine basal and TRH induced level of TSH and PRL in hypothyroid rats under pentobarbiturate anesthesia.
Langer, P., Mess, B., Foldes, O., Ruzsas, C., Brozmanova, H., Strausove, K., and Geschwendtova, K.
Exp. Clin. Endocrinol., 83: 269-274, 1984

以上