

答弁 (帝京大) 矢内原 巧

1. 実験的に24時間及び72時間 incubate してみたのですが大きな差が両者になかったので24時間にしております。

2. Rat 視床下部の LH-RH の値は幼若では 671 ± 137 pg/rat 成熟では 923 ± 139 pg/rat です (抄録は pg/tube の間違い) この値は我々の場合カラムの fraction 1 本を assay したもので標準品の LH-RH, 又は ^3H -LH-RH でその回収率をみると18~19%であり、従って実際はこの値の5倍ぐらいであろうと思います。

3. Cross reactivity の検定は近く publication される Arimura, Schally, Yanaihara らの paper で17種の analogues, fragments でみております。それによれば immunoreactivity は LHRH の C 端よりの4つのアミノ酸が必要でありトリプトファン以下の構造をもつたものとよく cross react する様です。

42. ヒト血中 LH-RH の Radioimmunoassay

(東京医歯大)

熊坂 高弘, 齊藤 幹, 矢追 良正
西 望, 加藤 広英, 小山 嵩夫
大蔵 健義, 古屋 徳夫, 有村 章

LH-RH を polyvinylpyrrolidone と混合したものと及び LH-RH の c-terminal に B S A をつけた conjugate LH-RH によつて抗血清を作製し, 更に lactoperoxidase 法によつて標識化した LH-RH を用いヒト血中 LH-RH の radioimmunoassay を試みた。

今回われわれが用いた抗血清は 0.31ng/ml 以下の非標識 hormone の領域ではいわゆる paradoxical binding を示したのでこの性質を利用して普通の competitive binding で測定出来ない微量の血中 LH-RH を測定した。その測定可能領域は 0.25pg/tube から 15pg/tube であった。

Sample の plasma は assay 系に non-specific の interaction を示すので LH-RH の assay はすべて酸性 ethanol 抽出を行い, その凍結乾燥したものについて radioimmunoassay を行つた。この radioimmunoassay では LH, FSH, ACTH, TSH, GH-RH, TRH, MIF とも交叉反応は示さなかつた。

この測定法を用いて健康成人男子に LH-RH 100ug 静脈内投与したときの LH-RH の half-life を測定し, その消退曲線では4分の速いものと60分のおそいものと2つの異つた component を認めた。又5例の正常月経周期婦人の卵胞期, 排卵期, 黄体期の血中 LH-RH を測定して LH surge の日と1日前に全例に LH-RH の上

昇を認め LH の surge が LH-RH の増加によることを確認した。

質問 (群馬大) 五十嵐正雄

血中 LH-RH が黄体期に高値を示した例が1例だけあり, その時血中 LH と FSH がともに高値を示したとのことですが, 黄体期の血中 LH, FSH はかなり低値を示すはずであります。若しそうだとすれば, あの症例は無排卵周期または排卵が遅発した症例の可能性があると思いますが, 排卵があの時点で起つたということはどうのようにして判定されたのでしょうか。

質問 (慶応大) 牧野 恒久

1) 用いた抗体の生物学的活性を検討されたか。

2) 下垂体前葉から LH の放出には LRF によらない tonic release があり, この微量の LH は動物により性周期の維持, 妊娠維持に充分であるが, LRF の抗体を産生する動物では, この tonic release をも阻止するとお考えでしょうか。

答弁 (東京大) 熊坂 高弘

LH-RH の抗体作製した家兎の睪丸の萎縮は組織学的に検討し, その血中 LH 及び LH-RH は測定して居りません。

LH-RH の抗体の LH-RH の生物学的活性の不活性化については行つてません。

質問 (大阪大) 谷沢 修

ヒト血清中 LH-RH の Radioimmunoassay に際し採血後測定迄のとりあつかいはどうしておられますか。

LH-RH 単独では 70°C 2 カ月でも生物活性は低下しないが, 血清中ではかなり活性の低下が早いと考えるが—。

答弁 (東京医歯大) 熊坂 高弘

血中の LH-RH の測定には plasma 採取後直ちに -20°C に凍結した。

測定時には, N. acetic acid と ethanol で酸性抽出して, これを凍結乾燥してこのものについて測定した。

43. LH 放出機序に関する研究—estrogen の影響—

(秋田大) 福島 峰子, 九嶋 勝司

1. 目的: LH-RF を投与して LH 分泌が促進される場合, 放出状態からみると同一個体でも投与時期によりその反応性に種々な状態がみられる。LH が放出される前に内因性 estrogen の増量があるということから estrogen が下垂体の感受性を亢進させるという主張もある。そこで吾々は今回 LH 放出機序における estrogen の意義を知る目的で実験を試みた。

2. 方法: Wistar Imamichi 株白鼠成熟雄下垂体と

0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 μ g 各用量の estradiol 単独, また合成 LH-RF や抽出 LH-TF と同時 incubation 実験, estradiol 静注後の下垂体中 LH-TF 活性の変化, estradiol 10 μ g/ml/rat 皮下注15時間後の下垂体に合成 LH-RF, 抽出 LH-TF を作用させ, 下垂体中および medium 中 LH 含量の変化からそれら因子に対する下垂体の反応性などを検討した. 尚 estrogen や LH-TF 作用の発現は RNA に関係があるか否かを puromycin 10 μ g/ml 投与の影響により検討した.

3. 結果: estradiol 0.5 μ g/ml を medium に添加して下垂体と incubation した結果は下垂体中, medium 共に LH 増加を認めず, また下垂体中 LH-TF 生成もしない. 然し LH-TF と同時に estradiol を添加すると LH-TF 単独を添加した場合より更に著明に medium 中 LH 放出を惹起した. 然しこれらは estradiol の量との関係が考えられるので種々なる量で比較したが, いずれも同様の効果を認めた. estrogen の効果は puromycin を加えることにより消失し, LH-TF 活性に影響はなかった. 尚 estradiol 前処置15時間後の下垂体の合成 LH-RF または抽出 LH-TF に対する反応性は対照群と差を認めなかった.

4. 考按: LH 放出機序において estrogen は下垂体中の LH-trigger factor の作用を強化するという重要な意義をもつていると考えられる.

44. Radioimmunoassay による視床下部の LH 放出因子 (LRF or LH-RH) の生理的変動の研究

(慶応大) 牧野 恒久, 飯塚 理八

視床下部の LH 放出因子 (LRF) による LH ならびに FSH の分泌促進作用については多くの動物実験と臨床成績によつてその効果が証明されているが, in vivo における視床下部内の LRF 自体の合成・放出の研究は少ない. この研究目的のために, 鋭敏で特異性の高い LRF の Radioimmunoassay を開発し, ラット視床下部内の LRF の生理的変動を研究した. (方法) 合成 LRF の NH₂ 端に牛血清アルブミンを結合し, これを抗原として家兎を免疫し, 得られた血清を抗体とし assay に用いた. 2 回の booster 免疫のあと, この抗体は 1:5000 倍に稀釈し, ¹²⁵I-LRF との間で約 30% の結合能を示し, cold LRF を用いた標準曲線では 50~5000 pico グラムの間で直線的関係が得られた. またこの抗体は, ラット LH, FSH, Substance P, Oxytocin, Vasopressin には交差反応を示さなかった. ラットの視床下部は断頭後ただちに 0.2M の酢酸で抽出し, 乾燥凍結後 assay に供

した. (成績) 生後 31 日令, 38 日令の雌ラットの視床下部 LRF 含量は漸次増加し, 生後 46 日ではほぼ最高値に達した. 4 日周期の成熟雌ラットでは Diestrus と Estrus で 3.5~6.2 ng LRF/視床下部で最高値を示し, Proestrus の午後では 1.5 ng と低値であつた. (独創点) これらの結果は視床下部の LRF を直接, 鋭敏な RIA で測定可能であり, 性周期ならびに性成熟度に従つて視床下部の LRF 含量が生理的に変動することを示唆し, 思春期発来と排卵の機序の研究の 1 つの手がかりとなるものと思われる.

45. 合成 LH-RH 投与と卵巣ステロイドホルモン分泌について

(帝京大)

荒井 清, 矢内原 巧, 沖永 荘一

家兎に外因性ゴナドトロピン (G) を投与, 或は交尾などによる内因性 G 放出を来たと, 卵巣ステロイド特にプロゲステロンの分泌が単時間内におこることが報告されている. 然しながら, ひとに於て G に対する卵巣の反応を in vivo で検討した研究は少ないので, 以下のべる実験を行つた.

正常周期を有する婦人 10 例の開腹手術に際し, 子宮摘出後卵胞期では成熟卵胞のある側, 黄体期では新鮮黄体のある側の卵巣静脈にシリコンチューブを挿入し, 肘静脈と同時に経時的採血を行つた. 対照試料を採取採, 合成 LH-RH 100 μ g を末梢静脈へ投与し, 以後 15 分毎に採血した. 血中 FSH, LH は NIAMD キットを用いた RIA で測定, スタンダードとして LER-907 を用いた. 同試料中の E₂ 並びに C はエーテル抽出後ペーパー並びに LH-20 カラムクロマトで分離して夫々の分画を RIA 法で測定した. E 及び P 値はあらかじめ試料に入れたトレーサーの回収率で補正した.

LH-RH 投与後, 末梢及び卵巣静脈血中 G は 15 分後より著明な増加を来とし, LH は 45 分後, FSH は 60 分後ピークに達した. 増加率は各時点とも LH が著明で約 12 倍, FSH は約 4 倍に達した. 卵胞期の卵巣静脈血中 E₂ は G 上昇とはほぼ同時に上昇し始め, 30 分でピークに達した. この投与前値に対する増加率は, 15 分で 149%, 30 分後 193% と有意差になつた. 末梢血中 E₂ も同じ傾向をとつたが有意差はなく, P 値は両者ともあまり変化しなかつた. 黄体期に於ては, 卵巣静脈血中 E₂ は 45 分後 254%, P は 15 分後 217% となり有意の増加率を示した. 又末梢血中 P も 30 分 (177%), 45 分 (361%) 後に夫々有意の増加率を示した. 平均 G 値は卵胞期, 卵巣静