

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 中共に 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と比較したが, 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 活性に影響はなかつた. 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つた.

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られると考えられる.

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 には交及反応を示さなかつた. 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 放出を求たすと, 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

脈血中LHが末梢の84%, FSHが80%と有意に低値をとり, 黄体期に於ては同じく90%と有意に低値を示した。

質問 (京都大) 杉並 洋

私達も preovulatory phase, Luteal phase に合成 LH-RH の投与を行なつて血中 steroids の測定を行なつている。先生の data では, luteal phase の測定において, ovarian 及び peripheral vein plasma 中 progesterone の peak に時間的 discrepancy がある様だつたが, この点をいかに考えておられるか。

答弁 (帝京大) 荒井 清

ステロイドの末梢血と, 卵巣静脈血中値のズレは, 先づ卵巣から出たステロイドが全身に廻つてその血中濃度を保つ結果である可能性も考えられよう。然しながら動物実験の時の様に卵巣から流出する血液を一本の静脈にまとめてステロイド分泌量/卵巣/時間と云つた表現をするのは不可能で, ひとつの場合 Plexus を形成する何本かの静脈中, 1本からの採血のみ行つた関係上, 卵巣から分泌されたステロイドの一部をある時間帯に於てのがした可能性もあろう。理論的にはむしろ末梢, 卵巣静脈中ステロイドレベルが並行して変化の方が説明し易い場合もあろう。

質問 (九州大) 楠田 雅彦

私共も LH-RH 投与時の性ステロイドの動態について, 特に黄体期を中心にして検討しており, 内分泌学会でも発表して来ました。

私共の成績も全例をまとめて平均値±SEで示すとおおよそ先生のそれと同じようになりますが, 個々の症例, あるいは同一例でも黄体の各期によつて必ずしも一定しません。この点先生の御意見をうかがいたいと思います。

次に, LH-RH 投与後ほとんどの例に progesterone の一時的低下が認められることははつきりしていますが, その理由についての先生のお考えはいかがですか。

答弁 (帝京大) 荒井 清

1) 個々の値のバラツキが多いので, 同一症例につき投与前値に比した変動率で示した方が統計処理上有意差が出し易いのでこれを採用した。

但し, 黄体期のプロゲステロン値は絶対値平均でも有意の増加となつた。

2) 単なるスペキュレーションであるが, Gにより卵巣内のステロイドが一時的に放出されると云う可能性もあると思う。然しステロイド生合成がごく早期から開始

する可能性も否定出来ない。

46. LH-RH Analogueの構造と機能に関する研究 (大阪大)

衣笠 隆之, 山地 建二, 市位 光

谷沢 修, 倉智 敬一

1971年 Shally, 松尾らによつて豚視床下部より LH-releasing hormone が純化され, pGlu-His-Try-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ の構造をもつ decapeptideであることが明らかにされた。我々は合成 LH-RH と類似の化学構造式を有する15種類の合成 peptide を用いて, LH放出作用ならびに LH-RH との免疫学的交叉反応性を検討する目的で本研究をおこなつた。

(方法) LH-RH のC末端よりの短縮, 延長およびアミノ酸を置換した15種類の LH-RH Analogue について検索した。生物作用は去勢, estrogen, progesterone 処置ラットおよび雌性成熟家兎に sample を投与し, 血清中 LHの増加を NIAMD および我々の開発した heterogeneous な Radioimmunoassay 系 (RIA) で測定した。免疫学的検果には bis-diazotized benzidine (BDB) を用いて LH-RH-BDB-BSA conjugate を作製し, これに対する抗血清を調製し, ¹²⁵I-LH-RH による RIA系を設定し Analogue による阻害曲線から検討した。

(成績) ラットおよび家兎において, やや感受性の程度に相違を認めるものの, [phe³]-, [phe⁵]-, [phe³⁵]-, [Lys⁸]-, [Gly⁹]-LH-RHではLH放出作用を認め, C末端の短縮・延長およびHis²の置換ではすべて活性が消失する。即ち側鎖のフェニール性OH基, indol核, guanidinium 基は必須ではない。更に合成 LH-RH と Analogue の免疫活性について検討を加えると [phe³]-, [phe⁵]-, [phe^{3,5}]-, [Lys⁸]-, [Gly⁹]-LH-RH 並びに [Des His²]-, [Ala²]-, LH-RH では合成 LH-RH の標準阻害曲線と平行関係を示し, [Des Pro⁹ Gly¹⁰]-, [Des Arg⁸ Pro⁹ Gly¹⁰]-, [Arg²]-LH-RH は弱い交叉性を, C末端の延長では交叉性は全く認められない。

以上合成 LH-RH と Analogue の生物活性と免疫活性は必ずしも一致せず, 生物活性はN末端側に, 免疫活性についてはBSAをBDB法で結合させ抗体を作製した場合はTyr 5よりC末端に向うに従い, 化学構造の修飾により抗原性が消失する。

討論 (東京医歯大) 斉藤 幹

討論及びまとめ

ヒト血中 LH-RH の radioimmunoassay による測定については, 本邦では玉田ら(1973), 外国ではKeye(1973),