

CRF の Radioimmunoassay 開発の研究

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

宇井 和美 牧野 恒久 卓山 誉千
谷本 敏 中村 淳 飯塚 理八

Study on Development of Radioimmunoassay for Corticotropin Releasing Factor (CRF)

Kazumi Ui, Tsunehisa MAKINO, Shigekazu TAKAYAMA,
Satoshi TANIMOTO, Jun NAKAMURA and Rihachi IIZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

概要 CRF の RIA 系の確立を試み、以下の結果を得た。

1) 合成ヒツジ CRF を glutaraldehyde 下で BSA と conjugate し, Freund's complete adjuvant と共に家兎に免疫し, 抗血清を作製したところ, 希釈濃度 1 : 12,000 倍で ^{125}I -CRF と約 40% の結合能を示す抗血清が得られた。

2) 作製した抗血清を, 各種ホルモンと反応させその特異性を検討したが, いずれも有意な交叉反応を示さなかった。

3) 合成ヒツジ CRF を Chloramine-T 法によりヨード化し, Sephadex G-50 を用いたゲルクロマトグラフィーにより精製した。CRF の RIA は, 緩衝液に 0.1% BSA, 20mM EDTA, 200KIU/ml トラジロールを含む 0.03M phosphate buffer (pH 7.2) を用い, B/F 分離には Dextran-Charcoal 法を用いた。本 RIA 系での最小検出感度は 20~100pg/tube で, これを用いて 0.5M 酢酸 boiling 法により抽出したラットの視床下部中の immunoreactive CRF (I-CRF) につき検討したところ, CRF 標準曲線と平行に近い曲線が得られた。

4) 本 RIA 系を用いて, 卵巣摘出後ラット, 雌ラットおよび雄ラットの視床下部中の I-CRF を測定したところ, 卵巣摘出後ラットおよび雄ラットにおいて, 雌ラットに比べ高い傾向がみられ, とくに雄ラットは雌ラットより有意の ($p < 0.05$) 高値を示した。

Synopsis A newly developed specific radioimmunoassay for corticotropin releasing factor (CRF) was performed.

1) Synthetic ovine CRF was conjugated to bovine serum albumin (BSA) with glutaraldehyde and used as an immunogen to generate antibodies in rabbits. One of the antisera revealed 40% binding with ^{125}I -CRF at 1 : 12,000 dilution in RIA.

2) The antiserum did not show any significant crossreaction with other hormones.

3) The Chloramine-T method was used to label CRF with ^{125}I and purified by Sephadex G-50 fine (1 × 103cm) chromatography with 0.03M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.1% BSA, 20mM EDTA, 200 KIU/ml Trasylol was used for the RIA buffer and the separation of free and antibody-bound CRF was performed by the Dextran-Charcoal method. The tentative minimum sensitivity of the assay was 20~100pg/tube. The dilution curve of ^{125}I -CRF in the hypothalamus of rat was parallel to that of the standard.

4) Immunoreactive CRF content in the hypothalamus of male, female and post ovariectomized rats was measured by RIA. The content in those of male and post ovariectomized rats was significantly higher than in female rats. These data indicate that the pituitary-adrenal axis may have some effects on post-menopausal status.

Key words: CRF · RIA · Hypothalamus · Castration · ACTH

緒 言

1981年に Vale et al.¹⁸⁾によりその構造が決定された視床下部ペプチドホルモンである Cor-

ticotropin releasing factor (CRF) は, ACTH の放出因子であることから, ストレスに関与しているとされており, すでに内科領域において, その

臨床応用が検討されている。一方、産婦人科の分野においても、最近ストレスと深い関係のある副腎皮質一下垂体系因子の研究が進められているが、その一端を担うべく、今回まず独自のCRFのRIA系を確立し、卵巣との関係をみるための動物実験と、若干の考察を加え、CRFの産婦人科領域への応用性を検討した。

研究方法

1. CRF 抗体の作製

合成ヒツジ CRF 1mg とウシ血清アルブミン (BSA) 15mg を生食4ml に溶解し、静かに攪拌しながら、2.48% glutaraldehyde 溶液 (三光純薬、東京) 1ml を滴下し、さらに室温で遮光の下に24時間反応させ結合せしめた。この反応液を、室温 0.01M PBS (pH 7.2) で24時間透析した。こうして作製した CRF-BSA 結合物1ml を、等量の Freund's complete adjuvant (Difco Co. U.S.A.) と乳濁化し、雌の New Zealand White Rabbit の背部に皮内注射して免疫した。免疫は2週間の間隔で9回行ない、7回免疫以降はそれぞれ8~10日目に耳静脈より採血し、抗血清を得た。以上の作製過程を表1に示した。

2. CRF の標識法および標識 CRF の精製法

合成ヒツジ CRF 5 μ g と Na ¹²⁵I 0.5mci を 0.5M phosphate buffer (pH 7.4) 30 μ l 中で混和し、20 μ l の chloramine-T (20 μ g/20 μ l) を加え、30秒後

に20 μ l の sodium metabisulfate (100 μ g/20 μ l) を加え反応を止めた。さらに、ヨードカリ液 (KI, 10% 溶液) 10 μ l を加えた。標識物の精製は Sephadex G-50 (S.F. 1 $\times$ 103cm) を用いたゲルクロマトグラフィーにて行ない、0.1% BSA を含む 0.2 M 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 5.5) にて溶出した。以上の操作過程を表2に示した。

3. CRF の RIA

測定系の緩衝液としては、0.03M phosphate buffer (pH 7.2) に、20mM EDTA, 0.14M NaCl, 0.1% BSA, 0.02% NaN₃, 200KIU/ml トラジロールを加えたものを使用し、B/F 分離には DCC (dextran-coated charcoal) 法を用いた。まず緩衝液200 μ l に標準 CRF またはサンプル100 μ l, CRF 抗体 (1:10,000倍希釈) 100 μ l, 標識 CRF (10,000cpm) 100 μ l を加え攪拌の後、4 $^{\circ}$ C で48時間 incubate した。次に、NHS (normal horse serum) 100 μ l, DCC (dextran T-70 5g/l, char-

表2 Iodination procedure of CRF

CRF solution (5 μ g/5 μ l)	5 μ l
Phosphate buffer (0.5M pH7.4)	30 μ l
Na ¹²⁵ I	0.5mci/10 μ l
Chloramine-T (20 μ g/20 μ l 0.05M phosphate buffer)	20 μ l
↓ Mix. for 30sec	
Sodium metabisulfate (100 μ g/20 μ l 0.05M phosphate buffer)	20 μ l
KI (10%)	10 μ l
↓	
Gel-filtration	

表1 Production of antiserum for CRF

Synthetic ovine CRF 1mg/0.15M saline 3ml
+
BSA (bovine serum albumin) 15mg/0.15M saline 1ml
+
Glutaraldehyde (2.48% solution) 1ml
↓ added drop by drop with continuous stirring
Incubation for 24hrs at room temp
↓ (gentle stirring)
Dialysis
↓
The conjugate 1ml
+
Freund's complete adjuvant 1ml
↓ injected at 2 weeks intervals on multiple dorsal sites
New Zealand white female rabbit

表3 Radioimmunoassay procedure for CRF

Buffer (0.03M phosphate buffer c 0.14M NaCl, pH7.2)	200 μ l
Standard or sample	100 μ l
Antiserum	100 μ l
¹²⁵ I-CRF	100 μ l
↓ Incubate for 48hr at 4 $^{\circ}$ C	
NHS (normal horse serum)	100 μ l
DCC	500 μ l
↓ Incubate for 30min at 4 $^{\circ}$ C	
Centrifuge for 15min at 1000G 4 $^{\circ}$ C	
↓	
B/F separation	
↓	
Count	

coal 50g/l) 500 μ lを加え攪拌後, 4℃30分 incubate し, 遠沈(1,000G, 15分, 4℃)分離した. 以上の操作過程を表3に示した.

4. 組織の抽出

実験には, 10~12週のSD系雌ラット(体重180~230g) 9匹を用い, pentobarbital 麻酔下で開腹し, 両側卵巣を摘出し, 4週目に断頭した. また, 他群の雌ラットについては連日腔細胞診にて性周期を確認した後, Diestrusの時期を選んで断頭した. 断頭後, 視床下部を摘出し, 抽出には酢酸 boiling 法を用いた. 即ち, 0.5M 酢酸中で homogenize した後, 約10分間沸騰させ, 室温にて遠沈し上清を分離した(表4).

研究結果

1. CRF 抗体の特異性の検討

表4 Extraction procedure for CRF from hypothalamus

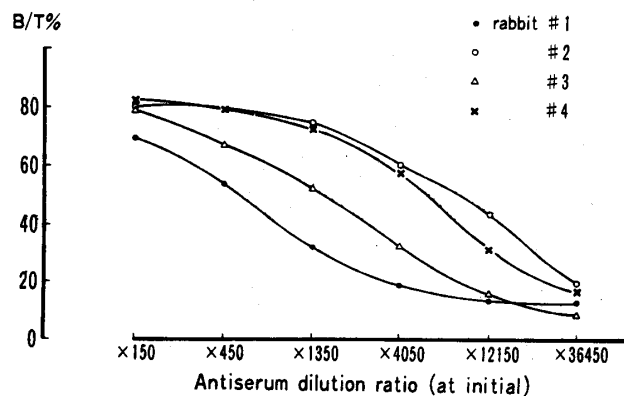
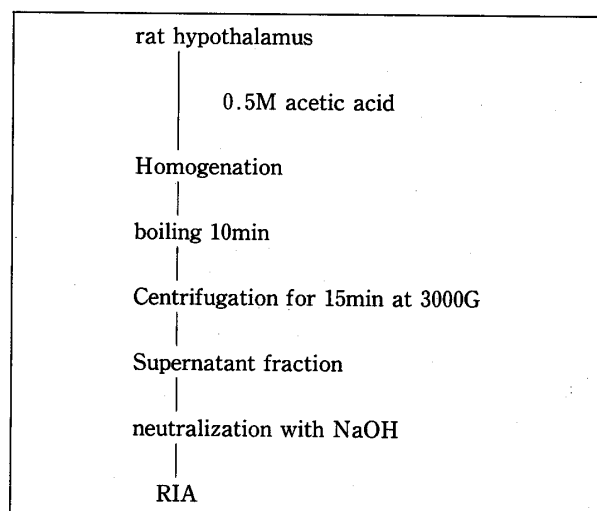


図1 Titration curves of anti-CRF rabbit sera

免疫は4羽の家兎に行なつたが, 8回免疫した時点で, 抗体価はほぼ平衡に達し, 2羽の家兎に良好な抗体が産生された(図1). これらの抗血清は, 希釈濃度1:12,000で¹²⁵I-CRFと約40%の結合能を示した. 抗体の特異性を検討するため, Leucin-Enkepharin, Meta-Enkepharin, α -En-

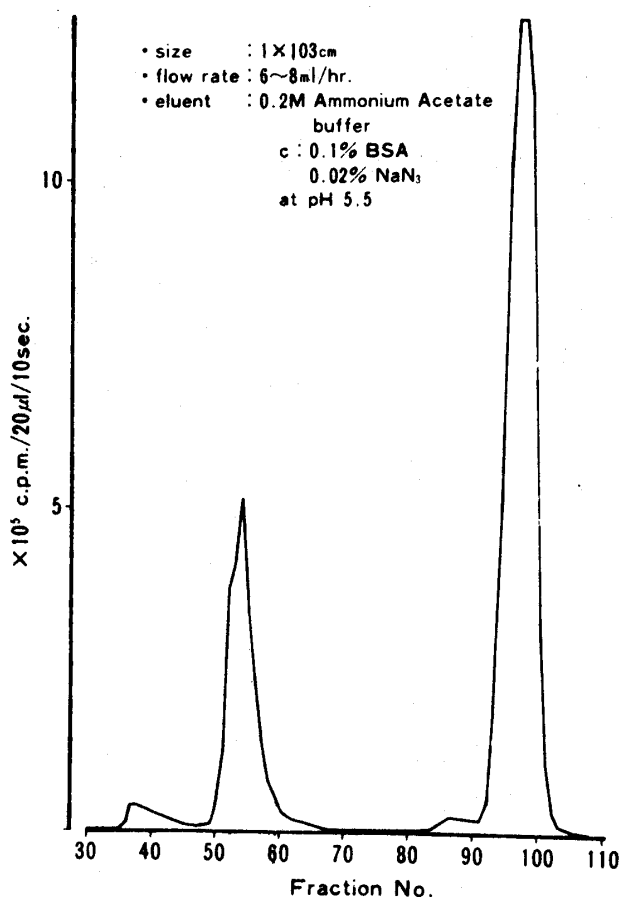


図2 ¹²⁵I-CRF elution profile on sephadex G-50 (super fine)

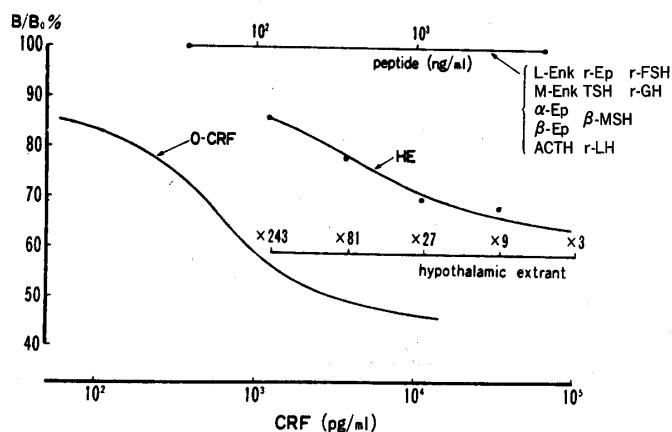


図3 Dose response curves of CRF and male rat's hypothalamic extract in CRF RIA

dorphin, β -Endorphin, γ -Endorphin, ACTH, TSH, β -MSH, rat-LH, rat-FSH, rat-GH と反応させたが、いずれも有意な交叉反応を示さなかつた(図3)。

2. CRFの標識と精製およびRIA

^{125}I -CRFをSephadex G-50カラムを用いたゲルクロマトグラフィーにて精製したが、その溶出曲線は図2に示すように、最初のピークが ^{125}I -CRFで、第2のピークが無機 ^{125}I である二峰性の溶出パターンが得られた。

次にCRFの標準曲線を描くため、合成ヒツジCRFを反応させたところ、100pg~1ngの間で鋭敏に反応したが、感度については、さらに改善の余地があると思われる。さらに、ラットの視床下部抽出物につき同様に反応させたところ、ある範囲で平行に近い曲線が得られた(図3)。

3. 卵巣摘出後ラットの視床下部中CRF値

卵巣摘出4週後のラットの視床下部抽出物中のImmunoreactive CRF (Ir-CRF) 値は $83.68 \pm 33.23\text{ng/hypothalamus}$ (mean $\pm$ S.E.), 同じく雌ラットは $54.90 \pm 13.51\text{ng/hypothalamus}$, 雄ラットは $85.60 \pm 20.92\text{ng/hypothalamus}$ となり、卵巣摘出後および雄ラットで、雌ラットに比べ高い傾向がみられ、とくに雄ラットと雌ラットとの値の間には有意差が認められた(図4)。

考 察

CRFのRIA系に関してはVale et al.によりそ

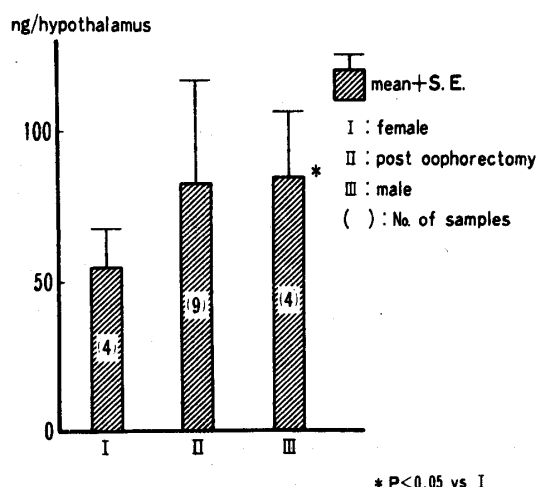


図4 CRF concentrations in the hypothalamus of rat

の構造が決定されて以来¹⁸⁾, 開発が進められてきているが、今までの報告では、抗原としては合成ヒツジCRF⁸⁾¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾の他, analogとしてのTyr-CRFが用いられ¹³⁾¹⁷⁾¹⁹⁾, いずれもChloramine-T法によりヨード化した後, Sephadex G-50 column chromatography 又はHPLC⁸⁾にて精製している。またRIAにおけるB/F分離には二抗体法¹¹⁾¹⁵⁾¹⁶⁾, またはDCC法¹³⁾¹⁷⁾¹⁹⁾が用いられ, その最小感度は20~30pg/tubeの範囲にあるが, Hollander et al.¹³⁾は monoclonal antibody を開発し, 2.5pg/tubeとしている。我々のRIA系の最小感度は20pg/tubeであつたが, 抗体価からみてさらに感度をあげることは可能であると思われる。一方CRFはin vivo¹⁸⁾においてもin vitro¹⁾においても, ACTHあるいは β -Epの放出活性を有することが認められているが, ratでは視床下部のmedian eminence (ME)をはじめとして広く分布しており¹¹⁾, 最近ではヒトの視床下部にも存在することが示唆されている²⁾。またSuda et al.¹⁶⁾は, ヒトの第3脳室にも存在することから, CSFにも含まれる可能性を示唆し, ヒトCRFはヒツジCRFと同じ分子量であり, その含量は1/50であると報告している。

今回の研究では卵巣摘出4週後のラットの視床下部中のIr-CRFを測定したが, control群に比べ高い傾向が認められた。われわれはこれまでに卵巣摘出後のラットの視床下部, 下垂体, 末梢血中の β -LPHを測定したところ, 視床下部の β -LPHは摘出後11日目で上昇し, 17日目でやや減少し, 21日目で再び上昇しており, 下垂体, 末梢血ではピークは少しずれるものの同様の変化が認められており⁴⁾, 本研究では摘出後の経時的変化は検討していないが同様の意味をもつものと思われる。副腎摘出後およびストレスでのCRFの変化については, これまでに幾つかの報告があり, いずれも初め減少し, ついで高値を呈するとしているが¹²⁾¹⁵⁾, 卵巣摘出後のCRFレベルに関してはいまだ報告がなかつた。本研究は閉経後のホルモン環境にCRFが関与していることを示唆するものと思われる。

一方, 一般に閉経後の内分泌環境の変化, とく

に卵巣ホルモンやゴナドトロピンの変化を論ずる報告は多いが、副腎皮質ホルモンとの関連性を論ずる報告は少ない。Genazzani et al.⁷⁾は、22例の postmenopausal women を対象に、 β -Ep、 β -LPH および ACTH を測定した結果、 β -Ep と β -LPH は著しく減少しており、また β -LPH/ β -Ep ratio は著しく増加しているが、ACTH には変化がみられなかつたと述べており、さらに卵巣摘出6カ月後でも同様に β -Ep、 β -LPH の減少がみられるが、hot flush を有する婦人では高値を示したと述べており、これらのことから Estrogen (E) の欠如が前駆物質から ACTH、 β -LPH への転換の酵素に対する反応性などに干渉しているものと推測し、これらの結果は postmenopausal や surgical castration 後の症候を説明する際に重要であると述べている。また Clerico et al.⁶⁾は、卵胞期婦人と閉経後婦人の血中 cortisol 濃度を比較し有意差がなく、従つて estrogen などステロイドホルモンの欠落は、血中の cortisol レベルに影響を及ぼさないと報告している。一方 Greenblatt et al.⁹⁾は閉経後 hCG の静注により卵巣の estrogen は変化しないが、androgen 産生は増加し、さらに ACTH の静注によつては卵巣、副腎の estrogen 産生は無反応であつたと報告している。また Reid et al.¹⁴⁾は、閉経後 β -Ep の静注により LH レベルは変化しないが、PRL は著しく増加したと述べており、卵巣ステロイドのフィードバックが欠如し、ゴナドトロピンの過剰分泌のような状態では LH-RH の放出障害がおこっているのではないかと推測している。以上の報告は、閉経期の内分泌環境にゴナドトロピンなどとの関連性を含めて、副腎皮質一下垂体系ホルモンが関与していることを示唆するものであるが、最近では更年期症候別に分析し、hot flash を有する場合は LH、FSH がやや高く、 E_2 、androsterone は低い、また不眠症では FSH は高く E_2 は低い、抑うつのある場合は PRL がやや高い¹⁰⁾、perimenopausal 期のうつ状態では LH、FSH 共に基礎値も高く LH-RH test に過剰反応を呈する⁵⁾、逆に閉経後期のデプレッションでは低値を呈する³⁾、などとの報告もあり、将来において更年期症候の分類や治療などの臨床面に応

用されるものと思われる。

稿を終わるに臨み、本研究の遂行に御指導および御助言をいただいた大塚アッセイ研究所橋村悦朗氏に深謝の意を表します。

また、本研究にあたり終始御協力をいただいた大塚弘子女史に感謝の意を表します。

文 献

1. 村上和春, 橋本浩三, 景山甚郷, 高原二郎, 太田善介: In vitro に於ける合成 ovine CRF の ACTH 放出活性. 日内分泌誌, 59: 983, 1983.
2. 毛利虎一, 須田俊宏, 佐々木厚, 吉永 馨, 安藤紀昭, 笹野伸昭, 武井義雄, 高瀬 学, 戸沢史子: 人視床下部における CRF の免疫組織化学的研究. 日内分泌誌, 59: 486, 1983.
3. 中野弘一, 西田昂平, 筒井末春: LH-RH による LH, FSH 反応からみたデプレッションの2症例. 心身医, 21: 55, 1981.
4. 卓山蒼子, 宇井和美: 卵巣摘出術ラットにおける視床下部中 β -LPH, unpublished data.
5. 山口 剛: 更年期うつ状態患者群の自律神経ならびに内分泌機能. 心身医, 18: 79, 1978.
6. Clerico, A., Strigini, F., Del Chicea, M.G., Paoletti, A.M., Melis, G.B. and Fioretti, P.: Apparent free cortisol concentration in normal men, non-pregnant, pregnant and postmenopausal women. J. Nucl. Med. All. Sci., 26: 181, 1982.
7. Genazzani, A.R., Facchinetti, F., Ricci-Danero, M.G., Parrini, D., Petraglia, F., La Rosa, R. and DeAntona, N.: Beta-lipotropin and beta-endorphin in physiological and surgical menopause. J. Endocrinol. Invest., 4: 375, 1981.
8. Gebbs, D.M. and Vale, W.: Presence of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in hypophysial portal blood. Endocrinology, 111: 1418, 1982.
9. Greenblatt, R.B., Colle, F.M.L. and Mahesh, V. B.: Ovarian and adrenal steroid production in the postmenopausal woman. Obstet. Gynecol., 47: 383, 1976.
10. Hagen, C., Christiansen, C., Christiansen, M.S. and Transbol, I.: Climacteric symptoms, fat mass, and plasma concentrations of LH, FSH, Prl, oestradiol-17 β and androsterone in the early post-menopausal period. Acta Endocrinol., 101: 87, 1982.
11. Hashimoto, K., Murakami, K., Ohno, N., Kageyama, J., Aoki, Y., Takahara, J. and Ota, Z.: A specific radioimmunoassay for corticotropin releasing factor (CRF) using synthetic ovine CRF. Life Sciences, 32: 1001, 1983.

12. Hashimoto, K., Yunoki, S., Kageyama, J., Ohno, N., Takahara, J. and Ofuji, T.: Vasopressin and CRF-ACTH in adrenalectomized and dexamethasone-treated rats. *Neuroendocrinology*, 32: 87, 1981.
13. Hollander, C.S., Audhya, T., Russo, M., Passarelli, J., Nakane, T. and Schlesinger, D.: Levels of corticotropin releasing factor-like immunoreactivity in mammalian hypothalamic and extrahypothalamic brain tissue as determined with monoclonal antibody to the ovine material. *Endocrinology*, 112: 2206, 1983.
14. Reid, R.L., Quigoey, M.E. and Yen, S.S.C.: The disappearance of opioidergic regulation of gonadotropin secretion in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 1107, 1983.
15. Suda, T., Tomori, N., Tozawa, F., Mouri, T., Demura, H. and Shizume, K.: Effects of bilateral adrenalectomy on immunoreactive corticotropin-releasing factor in the rat median eminence and intermediate-posterior pituitary. *Endocrinology*, 113: 1182, 1983.
16. Suda, T., Tozawa, F., Mouri, T., Demura, H. and Shizume, K.: Presence of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human cerebrospinal fluid. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 225, 1983.
17. Torres-Aleman, I., Vigh, S., Merchenthaler, I., Somogyvari-Vigh, A., Carter, W.H. and Schally, A.V.: Radioimmunoassay of CRF-like material in rat plasma: Validation of the method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 173: 355, 1983.
18. Vale, W., Spiess, J., Rivier, C. and Rivier, J.: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin. *Science*, 213: 1394, 1981.
19. Vigh, S., Merchenthaler, I., Torres-Aleman, I., Sueiras-Diaz, J., Coy, D.H., Carter, W.H., Petrusz, P. and Schally, A.V.: Corticotropin releasing factor (CRF): Immunocytochemical localization and radioimmunoassay (RIA). *Life Science*, 31: 2441, 1982.

(No. 5792 昭60・7・10受付)