

ヒト卵胞液中のインヒビンに関する研究

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

白石 悟

Studies on Inhibin in Human Follicular Fluid

Satoru SHIRAISHI

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

(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

概要 インヒビン (FSH 分泌抑制因子) がヒト卵胞液 (Human follicular fluid 以下 hFF と略) 中に存在することを, ラット下垂体前葉細胞単層培養系を用いた *in vitro* の実験にて明らかにした。次いでヒト卵巣卵胞液中のインヒビン活性を測定し, 末梢血中の FSH 濃度と hFF 中のインヒビンとを月経周期別に比較検討した。

1) Dextran-coated charcoal (DCC) 処理後の hFF による下垂体培養細胞の FSH 分泌は $3\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度より dose-dependent に抑制され, LH 分泌には影響を認めなかった。

2) 下垂体細胞における hFF による FSH 分泌の抑制効果はステロイド (estradiol, progesterone, testosterone, androstenedione) とは異なっていた。

3) LH-RH 添加時の hFF による FSH 及び LH の分泌は $1\mu\text{l}/\text{ml}$ の濃度より共に抑制された。

4) hFF 及びブタ卵胞液 (Porcine follicular fluid 以下 pFF と略) の FSH 分泌における用量反応には平行性が認められ, 同一の抑制的な作用を有する物質の存在することが示唆された。

5) 月経周期における hFF 中のインヒビン活性は pFF 1nl を 1unit (u) として表わすと, 卵胞期初期 ($113.1 \pm 2.7\text{u}/10\mu\text{l}$, Mean $\pm$ S.E., $n=4$), 中期 ($156.1 \pm 16.5\text{u}/10\mu\text{l}$, $n=5$), 後期 ($178.0 \pm 24.0\text{u}/10\mu\text{l}$, $n=5$) へと順次増加し, 黄体期 ($100.9 \pm 15.9\text{u}/10\mu\text{l}$, $n=6$) では減少して卵胞期初期と有意な差は認められなかった。

6) 卵胞期において hFF 中のインヒビン活性と末梢血中の FSH 濃度との間には負の相関関係 ($r = -0.7395$, $p < 0.01$) が認められた。

以上より, hFF 中には下垂体からの FSH 分泌を抑制する非ステロイド性の物質が存在することが明らかとなった。次いで卵胞液中のインヒビンは, LH/FSH surge 以外では月経周期が進むにつれて増加し, 末梢血中の FSH 濃度と負の相関関係が明らかとなった。従って今まで知られていなかった非ステロイド性のインヒビンが, 下垂体の FSH 分泌に対する重要な調節因子の一つであることがヒトにおいても予想され, さらに卵胞発育ならびに排卵にも関係することが示唆される。

Synopsis In order to investigate whether inhibin (FSH-suppressing activity) is present in human follicular fluid (hFF) and whether inhibin in hFF could be correlated with the FSH level in peripheral serum, the effect of hFF on FSH secretion was studied using monolayer culture of rat anterior pituitary cells.

1) Dextran-coated charcoal (DCC)-treated hFF exerted an inhibitory effect on pituitary FSH secretion but not on LH.

2) The inhibitory effect of hFF upon basal FSH secretion was different from those of steroids such as estradiol, progesterone, testosterone and androstenedione.

3) hFF inhibited the LHRH-stimulated secretion of both FSH and LH.

4) Since hFF and porcine follicular fluid (pFF) produced a parallel dose-dependent decrease of basal FSH secretion, the same suppressing activity may be present in both hFF and pFF.

5) Inhibin activity increased gradually during the follicular phase, but decreased in the luteal phase.

6) Inhibin activity in hFF except during preovulatory surge showed a significant inverse correlation with the FSH level in peripheral serum.

These results might indicate that inhibin activity in hFF increased according to follicular maturation and that inhibin (non-steroidal substance) may be one of the important regulators of FSH secretion in the human pituitary.

Key words: Inhibin • FSH • FSH-suppressing activity • Human follicular fluid • Porcine follicular fluid

緒 言

下垂体よりの FSH 分泌調節には LH-RH 及び性ステロイドが重要な役割を演じているが、近年、性腺由来のインヒビン (FSH 分泌抑制因子) もその調節因子の一つと考えられている¹²⁾¹⁵⁾。インヒビンは未だ精製されていないが、女性においては顆粒膜細胞より分泌されて⁴⁾¹⁴⁾、ブタ²⁰⁾、ヒト⁶⁾などの卵胞液中に存在していることが報告されている。

今回著者は *in vitro* におけるラット下垂体前葉細胞単層培養系を用い、その FSH 分泌に対して性ステロイドとは異なつた作用を有するインヒビンがヒト卵胞液中に存在することを明らかにし、さらにヒト正常月経周期における卵胞液中のインヒビン活性と末梢血中の FSH 濃度を比較検討したので報告する。

材料と方法

1. 対象

正常月経周期を有する25歳より45歳までの主として子宮筋腫による婦人科手術患者20例を対象とし、卵胞期初期、中期、後期、黄体期における最大径を有する卵胞 (直径5mm から22mm, n=20) より採取した卵胞液、及び末梢血を検体として用いた。

2. 実験材料、培養器具ならびに培養条件

下垂体培養には体重200g 前後の Wistar 系成熟雌ラットの下垂体前葉細胞を用いた。

培養液 (Growth Medium) は DMEM (GIBCO) に 25mM Hepes (Sigma), 15% horse serum (GIBCO), penicillin 50IU/ml streptomycin 50μg/ml (GIBCO), gentamycin 50μg/ml (ESSEX NIPPON), fungizone 0.25μg/ml (GIBCO) の割合で加え、pH 7.0に調整した後、滅菌処理したものを使用した。培養容器は Falcon の tissue culture dish (#3047) を用い、培養条件は 37℃, 95%-air, 5 %-CO₂とした。

3. 下垂体前葉細胞の培養法

下垂体前葉細胞培養法は Vale et al. の方法²⁷⁾に基づき、Channing et al. が開発した方法⁵⁾²⁶⁾に従った。即ち、ラットを断頭した後、摘出した下垂体前葉を 25mM Hepes 加 Hanks 溶液 (GIBCO)

(以下 HHBS と略) で 3 回洗浄後、眼科用小鉗で細切した。collagenase (Worthington class II) 4,550units/20 rats, hyaluronidase (Sigma type 1) 4,000units/20rats, BSA (fraction V) 300mg/20 rats の割合で加えた HHBS にて 50 分間 37℃ で攪拌消化した。150×g, 5 分間遠沈し、沈澱細胞を 0.25% pancreatin (GIBCO) 1ml/20rats の HHBS にて同様に 20 分間攪拌消化して、遠沈後の沈澱細胞を Growth Medium で 3 回洗浄した。次いで 0.06% trypan blue を用い、血球計算板で細胞数、細胞生存率を算定し、1 well あたり生存細胞 3×10⁵個/0.5ml の割合になる様、調整し、culture well に散布した。なお、細胞生存率は通常 90% 以上であつた。3 日間培養後、培養細胞を DMEM にてよく洗浄し、検体を加えた後、特に示さない限り、24 時間培養した。培養液は FSH 及び LH 測定のため -20℃ にて凍結保存した。

4. 添加試薬および卵胞液

Sigma より購入した Estradiol (E₂), Progesterone (P₄), Testosterone (T), Androstenedione (Δ₄) 及び第一製薬より提供された LH-RH (lot 103) を用いた。ヒト卵胞液 (hFF) はヒト卵胞より 26 ゲージツベルクリン注射器にて吸引採取した後、600×g, 10 分間で顆粒膜細胞を遠沈分離した上清を使用した。採取した hFF は -20℃ にて凍結保存した。実験に際し、hFF は DCC (1% dextran 10% charcoal) を添加してよく攪拌し、4℃ 24 時間培養後に遠沈したものをそれぞれ Growth Medium にて適宜希釈して検体として使用した。検体はすべてラット下垂体細胞に triplicate で加えた。

5. ホルモン測定

培養液中の FSH 及び LH の濃度は、NIADDK, NIH より提供された抗血清を用い、クロラミン T 法にて標識したホルモンと各ホルモンの標準品 (rFSH-RP1, rLH-RP2) を使用して RIA 法⁵⁾²⁶⁾にて duplicate で測定した。ヒト卵胞液及び末梢血中の FSH 濃度は第一アイソトープ社製の RIA キットを用い測定した²²⁾。卵胞液及び末梢血中の E₂, P₄ の濃度は dextran-coated charcoal 法により RIA にて測定した¹⁾。

6. 統計処理

一元配置法 ($p < 0.05$) ならびに Duncan の new multiple range test ($p < 0.05$) を用いて有意差検定を行なった¹³⁾ (なお, 図中の a, b, c……等の superscript は, 同じアルファベットで示されたデータは有意差がない事を示している).

成 績

1. 培養下垂体前葉細胞の増殖及び FSH, LH の基礎分泌

培養開始より, 2日毎 (2日目から4日目までは毎日) に培養液を全量交換して10日間の培養を行なった. 培養終了時には細胞をよく生食で洗浄後, 0.5ml の0.25% trypsin 液で細胞を剥離させ, 細胞を算定した. また, medium 中の FSH 及び LH を測定した. culture well あたり 3.0×10^5 個ずつ植えられた細胞は, 2日目に $2.0 \pm 0.6 \times 10^5$ cells/well と減少した後, 徐々に増加し始め, 4日目以降より急激な増加を続けて, 10日目には $5.2 \pm 0.7 \times 10^5$ cells/well となった (図1).

FSH 分泌の経時的变化を細胞数 1×10^5 個あたりに換算すると, 培養2日目 634.9 ± 10.5 ng, 4日目 752.7 ± 24.6 ng と増加した後, その分泌は急激に減少した. LH 分泌に関しても, 2日目 11.4 ± 0.2 ng をピークとして, 4日目以降, 急激に減少し

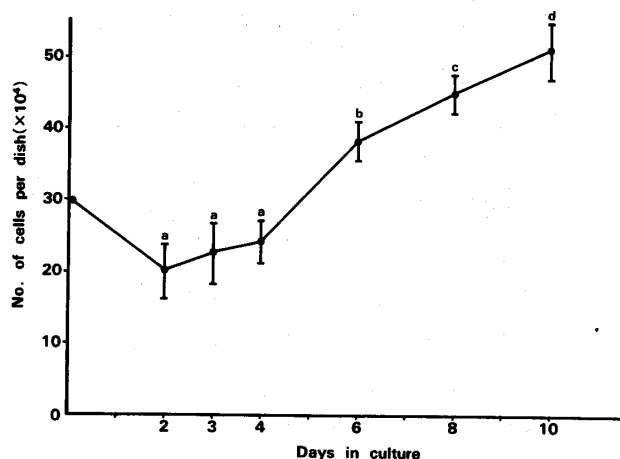


図1 Growth curve of cultured rat pituitary cells
図中のアルファベットの a, b, c……等は一元配置法 ($p < 0.05$) ならびに Duncan の new multiple range test ($p < 0.05$) で有意差検定しているため, 同じアルファベットで示されたデータは有意差がなく, 異なつたアルファベットの場合は有意差がある事を示している.

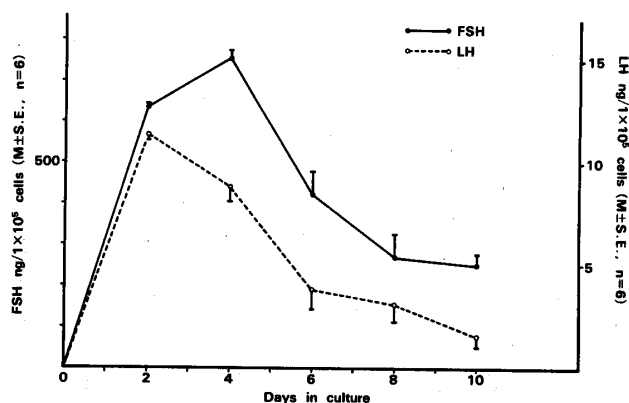


図2 Time course of FSH and LH secretions by rat pituitary cells

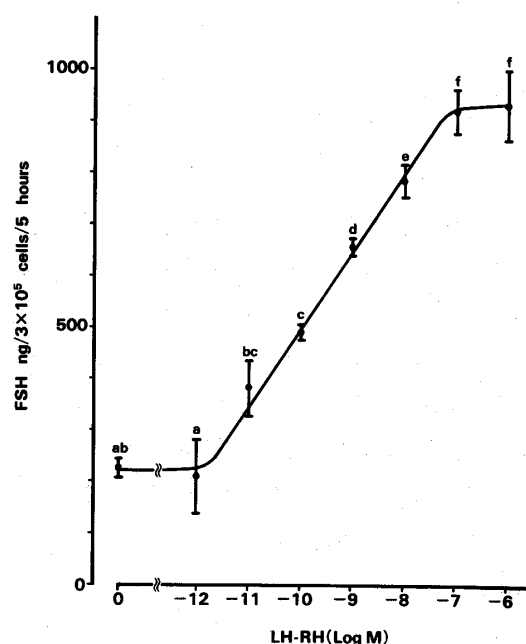


図3 FSH dose-response curve to LH-RH in rat anterior pituitary cells

た (図2).

2. LH-RH に対する FSH, LH 分泌の dose-response と経時的变化

培養3日目の下垂体前葉細胞を用いて, 10^{-12} ~ 10^{-6} M の濃度の LH-RH を添加して5時間培養すると, FSH 分泌は 10^{-11} M で有意に増加し始め, 10^{-10} M より急激な増加を示し, 10^{-7} M 以上の高濃度ではプラトーに達し, コントロールに対して約4.2倍となつた (図3). また, ED_{50} は 6.09×10^{-10} M であつた. さらに LH 分泌も FSH の場合と同様の傾向を示した.

培養3日目の下垂体細胞に 10^{-9} M の濃度の

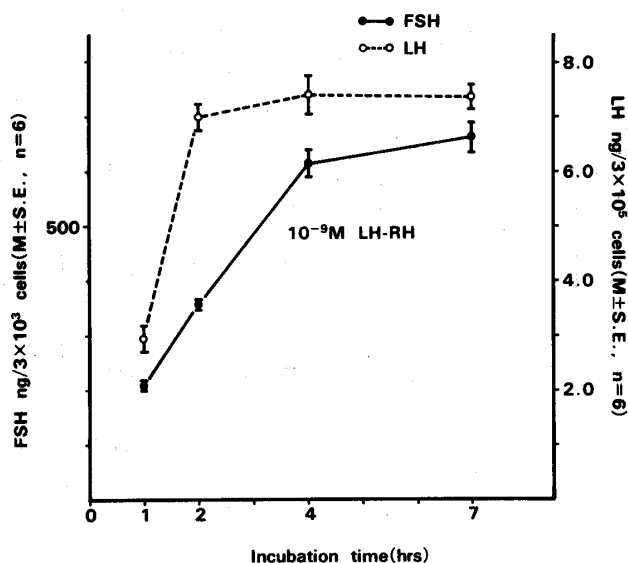


図4 Effect of incubation time on LH-RH stimulated FSH and LH secretions

LH-RH を添加して FSH, LH 分泌の経時的変化をみたところ, FSH 分泌は LH-RH 添加後 4 時間まで急激に増加し, 以後, 次第に減速傾向になった。これに対して LH 分泌は添加 2 時間まで急激に増加し, 以後プラトーになり, FSH 分泌と比較すると最大反応に達する時間は短かった (図 4)。

3. hFF 及びブタ卵胞液 (pFF) に対する FSH, LH 分泌の dose-response

① hFF

培養 3 日目の下垂体前葉細胞に hFF を 0.1~100 $\mu\text{l/ml}$ の濃度範囲で添加して FSH 分泌の影響をみると, hFF 3 $\mu\text{l/ml}$ より急激に減少し hFF 20 $\mu\text{l/ml}$ でプラトーに達してコントロールの約 26% まで FSH を抑制した (図 5)。これに対して LH 分泌では hFF による影響は認められなかった。

② pFF

直径 2mm 以下のブタ卵胞より採取して DCC 処理した pFF を 0.005~20 $\mu\text{l/ml}$ の範囲で添加すると, FSH 分泌は pFF 0.1 $\mu\text{l/ml}$ で有意に減少し始め, pFF 0.5 $\mu\text{l/ml}$ まで著明な減少を示し, それ以上の高濃度ではプラトーになり, FSH をコントロールの約 27% まで抑制した (図 5)。一方, LH に対しては hFF の場合と同様に一定の効果を認めなかった。また, FSH 分泌における hFF 及

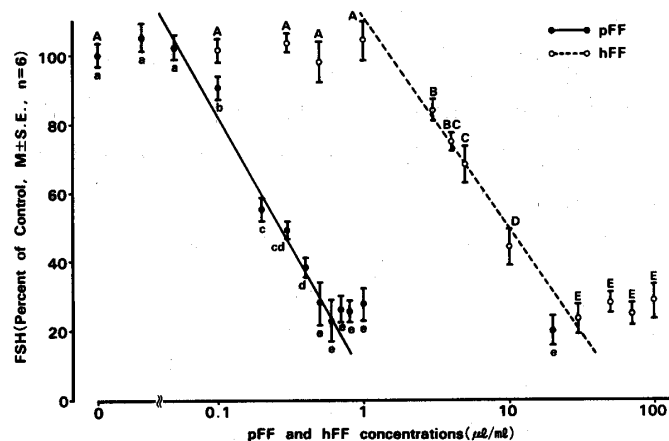


図5 FSH dose-response curves to pFF and hFF in rat pituitary cells

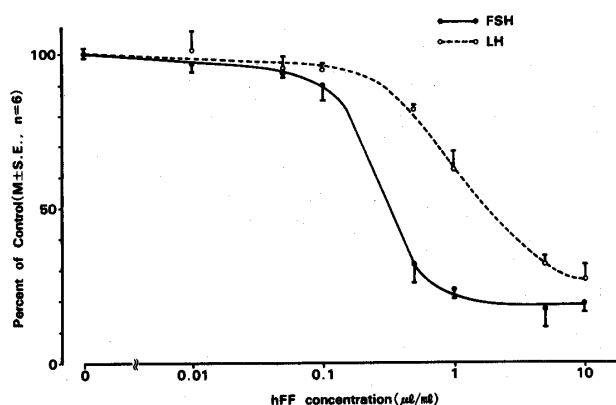


図6 Effect of hFF on LH-RH stimulated FSH and LH secretions

び pFF の用量反応直線に平行性 ($p < 0.01$) が認められた。50%抑制点において両者のインヒビリン活性を比較すると, pFF が hFF の約 32 倍強かった。

4. LH-RH 添加による hFF の FSH, LH 分泌に対する影響

hFF にて 24 時間培養後に, LH-RH 10^{-9}M を添加して 5 時間培養した場合の FSH, LH 分泌の変化では, FSH, LH ともに hFF により dose-dependent に抑制された。しかし, 低濃度の hFF において, FSH 分泌は LH 分泌と比較してより強く抑制された (図 6)。

5. FSH 分泌に対する hFF の経時的変化

培養下垂体細胞の FSH 分泌に対する hFF の ED_{50} は 6.40 $\mu\text{l/ml}$ であり, hFF 5.0 $\mu\text{l/ml}$ の濃度を使用して hFF による FSH 分泌の経時的変化

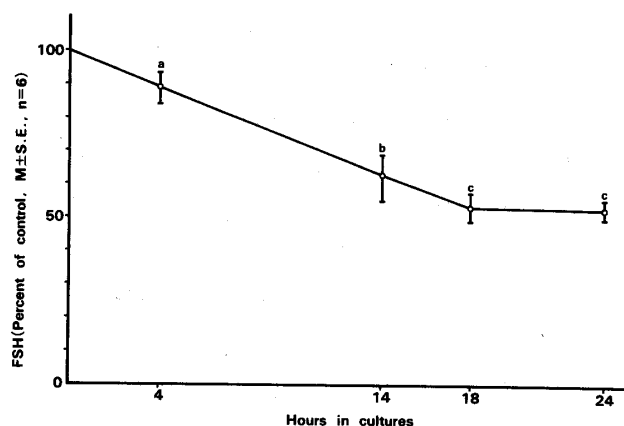


図7 Effect of hFF on FSH secretion in pituitary cells

をみると、hFF 添加群及び非添加群ともに、FSH 分泌は経時的に増加し、培養18時間以降ではプラトーに達した。しかし、hFF 添加による FSH 分泌を非添加群を100として比較してみると、培養4時間で有意に低下し始め、以後、経時的に漸減傾向を示し、培養18時間以降ではプラトーになり、非添加群の約53%となった(図7)。

6. 培養下垂体前葉細胞での FSH 分泌に対するステロイドの影響

E_2 , P_4 , T , Δ_4 を 10^{-11} ~ 10^{-5} Mの濃度の範囲で培養細胞に添加して24時間培養した場合の FSH 分泌の影響を調べた。

① E_2

E_2 の濃度により、FSH 分泌に多少の変化はあるが、有意な差は認められなかった(図8)。

② P_4

10^{-11} M以上の高濃度において、FSH 分泌は有意に増加した(図8)。

③ T , Δ_4

T 及び Δ_4 では一定した傾向を認めなかった。

7. 月経周期別での hFF 及び末梢血中のインヒビン活性

pFF 中のインヒビン活性を標準として、培養液中1nlのpFFによるFSH分泌抑制に相当するインヒビン活性を1unit(u)と表現して、hFF10 μ l中のインヒビン活性を月経周期別に比較検討した。

なお、pFFによる標準曲線は図5に示した通りであり、測定限界の下限は5回の測定で2.5~25u、上限は300~500uであった。また、intra-assay

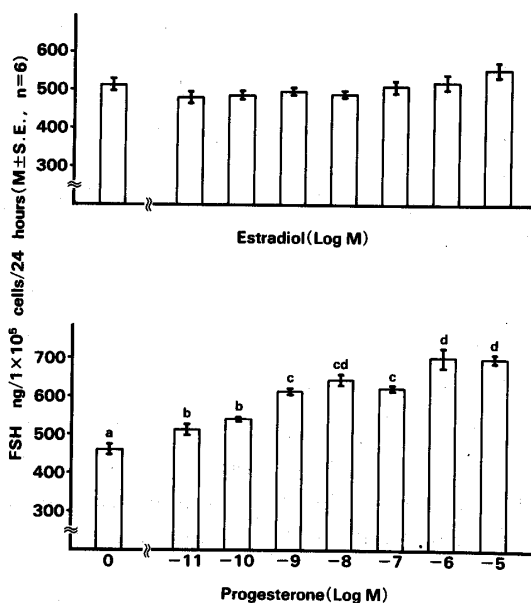


図8 Effects of estradiol and progesterone on FSH secretion

coefficient of variation (CV) は5回の測定で8.5%, inter-assay CVは13.0%であった。

① 卵胞期初期のhFF中のインヒビン活性は $113.1 \pm 2.7u/10\mu l$ (Mean $\pm$ S.E.) ($n=4$), 中期では $156.1 \pm 16.5u/10\mu l$ ($n=5$), 後期では $178.0 \pm 24.0u/10\mu l$ ($n=5$), 黄体期では $100.9 \pm 15.9u/10\mu l$ ($n=6$)であり、卵胞液中のインヒビン活性は卵胞期初期、中期、後期と漸増傾向を示し、黄体期では卵胞期後期に比して有意に減少した(図9)。

② 末梢血中のインヒビン活性は今回の測定方法ではいずれの月経周期においても測定限界25u以下であった。

8. 月経周期別の末梢血及びhFF中のFSH濃度の変化

① 末梢血中のFSH濃度は卵胞期初期 $9.23 \pm 1.20mIU/ml$ ($n=4$), 中期 $7.10 \pm 0.72mIU/ml$ ($n=5$), 後期 $11.55 \pm 2.64mIU/ml$ ($n=5$), 黄体期 $10.08 \pm 1.00mIU/ml$ ($n=6$)と卵胞期中期のFSH値は有意な低値を示し、その他では有意な差を認めなかった。

② hFF中のFSH濃度は卵胞期初期 $3.12 \pm 0.63mIU/ml$ ($n=3$), 中期 $2.90 \pm 0.18mIU/ml$ ($n=5$), 後期 $3.98 \pm 0.50mIU/ml$ ($n=4$), 黄体期 $3.35 \pm 1.39mIU/ml$ ($n=6$)で有意な差は認めなかったが、末梢血中のFSH濃度と同様の傾向であ

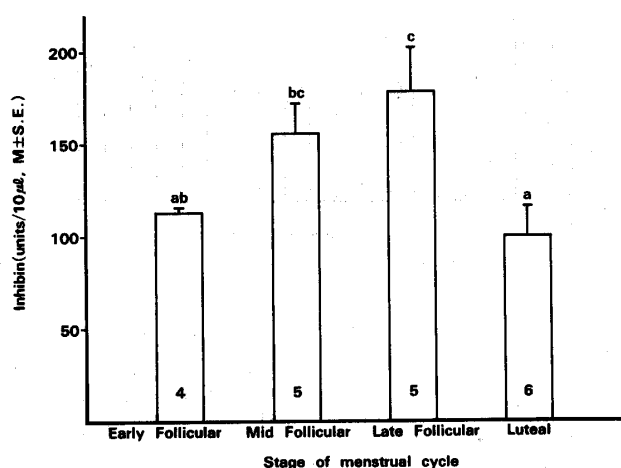


図9 Changes in inhibin levels in human follicular fluid throughout the human menstrual cycle

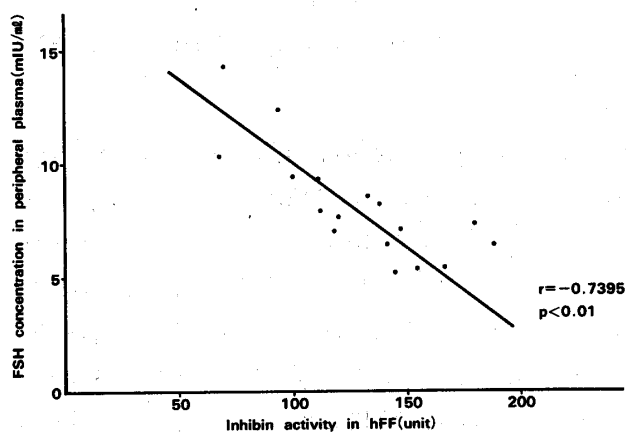


図10 The correlation between inhibin activity in hFF and serum FSH level

つた。

9. hFF中のインヒビン活性と末梢血中のFSH濃度との関係

卵胞期及び黄体期におけるhFF中のインヒビン活性と末梢血中のFSH濃度とを比較してみると、有意な負の相関関係 ($r = -0.74$, $p < 0.01$) が認められた (図10) (但し、LH/FSH surge中の卵胞は除いた)。

考 案

下垂体から分泌されるゴナドトロピンの分泌調節にはLH-RH及び性ステロイドが重要な役割を演じているのは周知の事実である。しかし、去勢された動物では術後に上昇したLHはステロイドで術前のコントロールまで完全に抑制されるが、FSHはステロイドのみでは完全にコントロー

ルまで抑制されず、インヒビンを含む卵胞液を投与すると完全に抑制されたとの報告以来¹⁰⁾²³⁾²⁸⁾、FSH分泌調節におけるインヒビンの研究が種々報告されている¹²⁾¹⁵⁾。本研究ではFSH分泌抑制因子であるインヒビンがヒト卵胞液中に存在し、さらに月経周期における卵胞液中のインヒビン活性と末梢血中のFSH濃度を比較検討することが、生体内でのFSH分泌調節に対するインヒビンの役割を検索する上で重要な意義を持つものと考えられる。

インヒビンの測定は生物活性を測定することにより行なわれている。In vivoでは去勢ラットの血中FSHの上昇を抑制する方法²⁰⁾²⁸⁾等が、in vitroではラット下垂体前葉細胞単層培養法¹¹⁾¹⁷⁾が行なわれている。本研究で用いた下垂体前葉細胞単層培養法はインヒビンの下垂体に対するFSH、LH分泌への直接的作用を検索する上で意義深いものであり、さらにin vivoによる方法と比較して、細胞を一定量で均等に保てること、添加された試料が均一な濃度で細胞に作用し、従って感度も高く、添加された試料の細胞に対する直接的な反応を定量的に検討する上で、極めて有効な方法であると考えられる¹⁰⁾。また、下垂体培養法においてもLH-RH非添加でFSHの基礎分泌の抑制によりインヒビンを測定する方法と、LH-RH添加でFSH分泌を促進し、感度を高めて測定する方法¹⁷⁾がある。本実験において、LH-RH非添加ではインヒビンによる下垂体からのLH分泌に対して影響は認められなかったが、LH-RH添加ではFSHと同様にLH分泌もインヒビンによつてdose-dependentに抑制され、下垂体よりのFSH分泌を抑制する物質としてのインヒビン活性を測定する意味から、インヒビン活性の測定にはLH-RH非添加の実験系で行なつた。

なお、pFF及びhFFとLH-RHによるFSH分泌に対する経時的变化では、それぞれ18時間及び4時間以降徐々にプラトーに達した。従つて本実験ではpFF及びhFFを24時間、LH-RHをED₅₀より 10^{-9} Mの濃度で5時間のIncubation timeとした。

更にin vivoでのFSH、LH分泌調節にはLH-

RH が関与しており、ラット¹⁹⁾、サル³⁾²³⁾、ヒト²⁾などにおいて報告されている末梢血、下垂体門脈血中の LH-RH 濃度からすると、本実験での LH-RH 添加群がほぼ LH-RH ピークの時期に相当すると考えられる。in vivo で proestrus 期のラットの LH がインヒビンにより抑制されるとの Rush et al. の報告²⁴⁾は LH-RH 添加群での pFF 及び hFF による下垂体培養細胞の FSH, LH 分泌が共に抑制されたことと一致する。また、ピーク以外での LH-RH 濃度は低値であるとされ、本実験において LH-RH 10^{-12} M の低濃度では FSH, LH 分泌に有意な影響を認めないことから、LH-RH 非添加群では LH-RH ピーク以外の時期を反映しているものと思われる。

本実験では下垂体培養細胞の FSH 分泌に対して、 E_2 は明らかな影響を認めなかつたが、 P_4 は濃度が増すに従い、促進的な作用を示した。一方、hFF 及び pFF 中のステロイド濃度は、 E_2 がそれぞれにおいて 444.4 ng/ml (約 $1.63 \times 10^{-6}\text{ M}$)、 43.32 ng/ml (約 $1.59 \times 10^{-7}\text{ M}$)、 P_4 が 329.5 ng/ml (約 $1.05 \times 10^{-6}\text{ M}$)、 234.8 ng/ml (約 $7.47 \times 10^{-6}\text{ M}$) であり、ステロイドによる下垂体細胞からの FSH 分泌に対する影響をできる限り少なくする為、試料は DCC 処理を行なった後に使用した。さらに DCC 処理後の hFF 及び pFF 中のステロイド濃度は、 E_2 が hFF 及び pFF においてそれぞれ 0.52 ng/ml (約 $1.91 \times 10^{-9}\text{ M}$)、 0.061 ng/ml (約 $2.24 \times 10^{-10}\text{ M}$)、 P_4 は 2.72 ng/ml (約 $8.65 \times 10^{-9}\text{ M}$)、 1.46 ng/ml (約 $4.64 \times 10^{-9}\text{ M}$) であり、残存しているステロイドの影響をマスクするために、Growth Medium に $E_2 10^{-8}\text{ M}$ 及び $P_4 10^{-6}\text{ M}$ を添加して hFF 中のインヒビン活性を測定した。また、DCC 処理がインヒビン活性に影響を与えないことはすでに報告されており²⁶⁾、著者も in vitro の実験において DCC 処理前の pFF が FSH 分泌をコントロールの約 28.1% まで抑制し、DCC 処理後の pFF も約 27.6% の抑制を示し、インヒビン活性に対して DCC 処理による明らかな影響は認められなかつた。

インヒビンの産生部位は、雄においては精巣のセルトリ細胞²⁵⁾、雌においては卵巣の顆粒膜細

胞¹⁴⁾であると報告されており、ラット¹⁶⁾、ウシ¹⁰⁾、ブタ²⁰⁾、ウマ²¹⁾、ヒト⁶⁾等の卵胞液中にインヒビンが存在することが報告されている。本実験においても pFF 及び hFF は下垂体培養細胞よりの FSH 分泌を dose-dependent に抑制し、活性に差はあるが、その各々の用量反応直線に平行性が認められ、pFF 及び hFF 中には下垂体培養細胞の FSH 分泌に対して、同一の抑制的な作用を有する物質の存在することが示唆される。また、LH-RH 非添加時の LH 分泌は pFF 及び hFF の濃度に関係なく影響が認められないことから、FSH 分泌を抑制するインヒビン活性は細胞毒性によるものではないことは明らかである。本研究で下垂体細胞培養系に添加したステロイドによる FSH 分泌の変化は明らかに hFF による FSH 分泌の抑制とは異なっており、非ステロイド性の物質である可能性が強く示唆される。これは卵胞液を蛋白分解酵素で処理したり、あるいは加熱した後にはインヒビン活性が消失するとの報告⁹⁾と一致する。現在までの諸家の報告によれば、インヒビンの分子量は $23,000\text{ dalton}$ ⁶⁾、 $60,000 \sim 70,000\text{ dalton}$ ¹⁸⁾ など $10,000\text{ dalton}$ 以上と考えられているが、近年 $1,000\text{ dalton}$ 以下のインヒビンも報告されている⁷⁾。

月経周期における hFF 中のインヒビン活性に関して、Channing et al.⁴⁾⁵⁾、Chappel et al.⁸⁾ は卵胞期での hFF 中のインヒビンが黄体期に比して高い活性を有すると報告している。また、viable follicle の hFF 中には atretic follicle の hFF より高濃度のインヒビンが存在すること、また、排卵直前の hFF 中のインヒビンは明らかに低値をとっていること、PCO 卵巣からは正常の卵巣より高濃度のインヒビンが分泌されている可能性のあること等より、インヒビンが卵胞の発育、並びに排卵と深い関係があることを Channing et al.⁴⁾、Tanabe et al.²⁶⁾ は示唆している。本実験においても、卵胞期初期、中期、後期へと最大径を有する卵胞より得られた hFF 中のインヒビン活性は増大し、黄体期では低下して卵胞期初期と有意な差は認められなかつた。一方、hFF 中の E_2 濃度は、卵胞期初期 $42.6 \pm 5.1\text{ ng/ml}$ 、中期 432.0 ± 38.8

ng/ml, 後期 $1,788.5 \pm 648.8$ ng/ml と有意に増加し, 卵胞期においては卵胞が発育するにつれてインヒビン活性が増大することが認められた。

月経周期における末梢血中の FSH 濃度は, 卵胞期中期, 卵胞期初期及び黄体期, 卵胞期後期の順に高値を示す傾向を認めた。また, hFF 中の FSH 濃度でも卵胞期中期が最低値を示し, 末梢血中の FSH 濃度とほぼ同様の傾向が認められた。

末梢血中の FSH 濃度と hFF 中のインヒビン活性の関係を月経周期別にみると, 低いインヒビン活性を有する卵胞期初期及び黄体期での FSH 濃度は高く, 一方, より高いインヒビン活性を有する卵胞期中期での FSH 濃度は低値を示し, 卵胞期では hFF 中のインヒビン活性と末梢血中の FSH 濃度に負の相関関係が認められ, 卵巣からのインヒビンと下垂体由来の FSH とが negative feedback loop を作っていることが示唆される。なお, 卵胞期後期においては FSH, インヒビン共に高値を示すのは, FSH surge が出現した時期に採取された検体による影響と考えられる。

以上により, インヒビン(FSH 分泌抑制因子)が hFF 中に存在することが明らかとなり, 下垂体よりの FSH 分泌に対する重要な調節因子の一つである可能性が示された。また, インヒビンは卵巣の顆粒膜細胞より分泌され, 卵胞の発育, 排卵, 黄体化等に深く関与し, 生殖生理学上, 重要な役割を担っている事が予想される。しかし, 今回の測定方法では末梢血中でのインヒビン活性は測定限界以下であり, 微量に存在するインヒビンを定量するためには, インヒビンを精製し, RIA を行なう必要がある。

稿を終るに際し, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました恩師飯塚理八教授に深甚なる謝意を捧げます。また, 身近に終始御指導いただきました中村幸雄講師, 田辺清男博士に感謝いたします。検体採取に快く御協力いただきました荻窪病院, 日本鋼管病院産婦人科諸兄姉, また, ラット FSH 及び LH RIA kit を提供して頂いた NIAD-DK, NIH (米国), LH-RH を提供して頂いた第一製薬(東京)に感謝いたします。

本論文の要旨は, 第56回日本内分泌学会秋季大会, 第28回日本不妊学会, 第58回日本内分泌学会秋季大会に発表した。

また, 本研究の一部は Rockefeller Foundation grant (RF-83002) によつた。

文 献

1. 松本 茂, 中村幸雄, 川村尚道, 田辺清男, 飯塚理八: RIA によるステロイドホルモンの測定法について. ホと臨床, 24: 29, 1976.
2. Antunes, J.L., Carmel, P.W., Housepian, E.M. and Ferin, M.: Luteinizing hormone-releasing hormone in human pituitary blood. J. Neurosurg., 49: 382, 1978.
3. Carmel, P.W., Araki, S. and Ferin, M.: Pituitary stalk portal blood collection in rhesus monkeys: Evidence for pulsatile release of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH). Endocrinology, 99: 243, 1976.
4. Channing, C.P., Anderson, L.D., Hoover, D.J., Kalena, K., Osteen, K.G., Pomerantz, S.H. and Tanabe, K.: The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. Recent. Prog. Horm. Res., 38: 331, 1982.
5. Channing, C.P., Gaglino, P., Hoover, D.J., Tanabe, K., Batta, S.K., Sulewski, J. and Lebech, P.: Relationship between human follicular fluid inhibin-F activity and steroid content. J. Clin. Endocrinol. Metab., 52: 1192, 1981.
6. Chari, S., Hopkinson, C.R.N., Darene, E. and Sturm, G.: Purification of "inhibin" from human ovarian follicular fluid. Acta Endocrinol. (Copenh.), 90: 157, 1979.
7. Chari, S., Duraiswami, S., Daume, E. and Sturm, G.: Physico-chemical and biological characteristics of human ovarian follicular fluid inhibin in non-steroidal regulators in reproductive biology and medicine, (eds. T. Fujii and C.P. Channing), 61. Pergamon Press, Oxford, 1982.
8. Chappel, S.C., Holt, J.A. and Spies, H.S.: Inhibin differences in bioreactivity within human follicular fluid in the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 163: 310, 1980.
9. de Jong, F.H., Jansen, E.H.J.M. and van der Molen, H.J.: Purification and characterization of inhibin. In Intraovarian Regulation of Reproduction, (eds. P. Franchimont and C.P. Channing), 229. Academic Press Inc., London, 1981.
10. de Jong, F.H. and Sharpe, R.M.: Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. Nature, 263: 71, 1976.
11. de Jong, F.H., Smith, S.O. and van der Molen,

- H.J.* : Bioassay of inhibin-like activity using pituitary cells in vitro. *J. Endocrinol.*, 80 : 91, 1979.
12. *de Jong, F.H.* : Inhibin-fact or artifact? *Mol. Cell. Endocrinol.*, 13 : 1, 1979.
 13. *Duncan, D.B.* : Multiple range and multiple F tests. *Biometrics.*, 11 : 1, 1955.
 14. *Erickson, G.F. and Hsenh, A.J.W.* : Secretion of inhibin by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 103 : 1960, 1978.
 15. *Franchimont, P.* : Inhibin from concept to reality. *Vitam. Horm.*, 37 : 243, 1979.
 16. *Fujii, T., Hoover, D.T. and Channing, C.P.* : Changes in inhibin activity, and progesterone, oestrogen and androstenedione concentrations, in rat follicular fluid throughout the oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.*, 69 : 307, 1983.
 17. *Hudson, B., Baker, H.W.G., Eddie, L.W., Higginson, R.E., Burger, H.G., de Kretser, D.M., Dobos, M. and Lee, V.W.K.* : Bioassay for inhibin: A critical review. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 26 : 17, 1979.
 18. *Jansen, E.H.J.M., Steenbergen, J., de Jong, F.H. and van der Molen, H.J.* : The use of affinity matrices in the purification of inhibin from bovine follicular fluid. *Mole. Cell Endocrinol.*, 21 : 109, 1981.
 19. *Levine, J.E. and Ramirez, V.D.* : Luteinizing hormone-releasing hormone release during the rat estrous cycle and after ovariectomy, as estimated with push-pull cannulae. *Endocrinology*, 111 : 1439, 1982.
 20. *Marder, M.L., Channing, C.P. and Schwartz, N.B.* : Suppression of serum follicul stimulating hormone in intact and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. *Endocrinology*, 101 : 1639, 1977.
 21. *Miller, K.F., Wesson, J.A. and Ginther, O.J.* : Changes in concentrations of circulating gonadotropins following administration of equine follicular fluid to ovariectomized mares. *Biol. Reprod.*, 21 : 867, 1979.
 22. *Nakamura, Y., Tu, B.-K., Shimizu, K., Kawamura, N., Tanabe, K. and Iizuka, R.* : Hormonal studies before and after wedge resection in Japanese patients with polycystic ovary syndrome (PCO). *Keio J. Med.*, 28 : 81, 1979.
 23. *Neill, J.D., Patton, J.M., Dailey, R.A., Tson, R.C. and Tindall, G.T.* : Luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in pituitary stalk blood of rhesus monkeys : Relationship to level of LH release. *Endocrinology*, 101 : 430, 1977.
 24. *Rush, M.E., Ashiru, O.A., Lipner, H., Williams, A.T. and Blake, C.A.* : The actions of porcine follicular fluid and estradiol on preovulatory secretion of gonadotropic hormones in rats. *Endocrinology*, 108 : 2316, 1981.
 25. *Steinberger, A. and Steinberger, E.* : Secretion of an FSH-inhibiting factor by cultured sertoli cells. *Endocrinology*, 99 : 918, 1976.
 26. *Tanabe, K., Gagliano, P., Channing, C.P., Nakamura, Y., Yoshimura, Y., Iizuka, R., Fortuny, A., Sulewski, J. and Rezai, N.* : Levels of inhibin-F activity and steroids in human follicular fluid from normal women and women with polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57 : 24, 1983.
 27. *Vale, W., Grant, G., Amoss, B.R. and Guillemin, R.* : Culture of enzymatically dispensed anterior pituitary cells : Functional validation of a method. *Endocrinology*, 91 : 562, 1972.
 28. *Welschen, R., Hermans, W.P., Dullaart, J. and de Jong, F.H.* : Effects of an inhibin-like factor present bovine and porcine follicular fluid on gonadotropine levels in ovariectomized rats. *J. Reprod. Fert.*, 50 : 129, 1977.

(特別掲載 No. 5915 昭61・2・4 受付)