

原 著

幼若雌ラットの gonadotropin 分泌に及ぼす GnRH antagonist (GnRHant) の影響について

横浜市立大学医学部産科婦人科学教室(主任：平原史樹教授)

高 蒙 歌

Effects of Gonadotropin Releasing Hormone Antagonist (GnRHant) on the Gonadotropin Secretion in Immature Female Rats

Mengge GAO

Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama
(Director : Prof. Fumiki Hirahara)

概要 GnRH antagonist(GnRHant)の gonadotropin 分泌に及ぼす影響の機序を知る目的で、幼若雌ラットを用いて、GnRHant 投与、GnRH agonist(GnRHa)、および GnRHant + GnRHa(併用)投与の各群において、GnRH 投与試験、LH・FSH 分泌量、下垂体 LH 含量、卵巢重量、下垂体の LH β subunit mRNA および GnRH receptor(GnRH-R)mRNA 発現量、の変化を検討した。

血中 LH 値は、GnRHant 投与 5, 24 時間後では、対照群と比較して有意な差は認められなかったが、GnRHa 投与により 5, 24 時間後に有意に上昇した。併用群では、5 時間後の LH 上昇は、GnRHa 群と比較して有意に減弱した。血中 FSH 値は、GnRHa 投与による 5 時間後の上昇では、併用群により有意に減弱し、GnRHant 投与 5 時間後では、有意な変化を認めなかった。下垂体 GnRH-R mRNA 発現量は、投与 5, 24 時間後で、3 群ともに、有意に減少したが、下垂体 LH β mRNA 発現量は、いずれの群でも、有意な変化は認めなかった。一方、1 週間投与の場合、卵巢重量は、GnRHant 群、GnRHa 群で有意に減少したが、GnRHant 群の方が、GnRHa 群より有意に減少した。併用群では、GnRHant 群のそれと同等であった。血中 LH 値および FSH 値には有意な差は認められなかった。しかしながら、GnRH に対する LH の反応性は、3 群とも、有意に減弱した。下垂体の LH 含量は、GnRHa 投与群で有意に減少し、GnRHant 群では有意に増加した。併用群では、対照群と比較して有意な差は認められなかった。下垂体の LH β mRNA 発現量は、GnRHant および GnRHa 群で有意に減少し、併用群では、GnRHant 群および GnRHa 群より更に減少した。下垂体の GnRH-R mRNA 発現量は、GnRHant 群、GnRHa 投与群で、有意に減少し、GnRHant 群のそれは、GnRHa 群のものより有意に減少していた。併用群の下垂体 GnRH-R mRNA 発現量減少は、GnRHant 群と同様であった。

以上の結果から、GnRHant は、GnRHa と同様に、下垂体の LH β mRNA、GnRH-R mRNA 発現を抑制し、下垂体の GnRH に対する反応性を減弱することが明らかとなった。更に、GnRHant を GnRHa と併用すると、GnRHa の flare up 効果を減弱し、その抑制作用は GnRHant と同様ないしそれ以上で、GnRHa に優る効果であった。

Abstract Objective : To determine the mechanism underlying the modification of gonadotropin secretion by GnRH antagonist(GnRHant), we examined the effects of GnRHant treatment without or with GnRH agonist(GnRHa) on the LH secretory system in immature female rats.

Methods : GnRHant without or with GnRHa were administered to immature female rats for 5 and 24 h and 7 days. Thereafter, changes in serum LH secretion, the response of LH to GnRH, pituitary LH content

and ovarian weight were examined, and the levels of LH β subunit mRNA expression and GnRH-R mRNA expression were also determined by northern blot.

Results : Five and 24 h after the GnRHant treatment, the expression of GnRH-R mRNA in the pituitary, but not serum LH and LH β mRNA, was significantly decreased. GnRHant treatment with GnRHa, on the other hand, significantly suppressed GnRH-induced LH and FSH releases. Seven days after the treatment, GnRHant had significantly decreased ovarian weight, LH response to GnRH, LH β subunit mRNA and the GnRH-R mRNA level in the pituitary, whereas it significantly increased pituitary LH content compared with the control. GnRHant with GnRHa prevented a GnRHa-induced decrease in pituitary LH content, but enhanced GnRHa-induced inhibition of ovarian weight, and LH β subunit mRNA and GnRH-R mRNA levels.

Conclusions : From these findings, we concluded that GnRHant as well as GnRHa inhibit LH β subunit mRNA and GnRH-R mRNA levels in the pituitary. Furthermore, GnRHant combined with GnRHa weakened the GnRHa-induced flare-up phenomenon and had a more suppressive effect on LH β subunit mRNA than GnRHant or GnRHa alone.

Key words : GnRH antagonist · LH · GnRH-R mRNA · LH β subunit mRNA · Female rat

緒 言

Gonadotropin 放出ホルモン (GnRH) は、下垂体の gonadotropin 分泌細胞の GnRH receptor (GnRH-R) に結合し、下垂体の gonadotropin 合成、分泌のみならず、下垂体 GnRH 受容体の調節にも関与していることが知られている¹⁾。その合成 GnRH である GnRH agonist (GnRHa) の gonadotropin 分泌への作用については多くの検討がなされ、すでに臨床に広く用いられている。一方、GnRH antagonist (GnRHant) は、GnRH-R に GnRH と競合して作用し、GnRH の作用を阻止し、強力な LH 抑制作用を示す。特に、GnRHa にみられるような一過性の分泌亢進は誘起されず、また、その作用は迅速である²⁾。この GnRHant は現在臨床的応用の段階にきているにもかかわらず、GnRHant の gonadotropin 分泌への影響に関しても、いまだ不明な点が多い。また、臨床的には GnRHa と GnRHant の併用療法も選択できるが、この併用療法についての基礎的な検討をした報告は極めて少ない。そこで、本研究においては幼若雌ラットを用いて、GnRHant の gonadotropin 分泌への影響として、卵巣重量、LH、FSH 分泌、GnRH に対する LH の反応性、下垂体 LH 含量、LH β mRNA および GnRH-R mRNA の発現量について調べた。更に、GnRHa + GnRHant (併用群) の作用を検討し、GnRHa の作用と比較した。

方 法

1. 実験動物および投与薬剤

実験動物は、本学動物センターにおいて、温度 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50~60%、および人工照明条件下 (明/暗、5:00~19:00 の 14/10) で自由摂水および摂食させ飼育した 21 日齢の幼若雌 Sprague Dawley ラットを使用した。GnRHant の単回投与実験では、幼若雌ラットに Cetrorelix acetate ($33\mu\text{g}/100\text{g BW}$, Asta Medica 社) を皮下投与した。GnRHant 投与 5、24 時間後に、血中 LH、FSH、下垂体 LH β mRNA および GnRH-R mRNA を調べた。GnRHant 長期投与実験では、Cetrorelix acetate ($33\mu\text{g}/100\text{g BW/day}$) を 1 日 1 回 1 週間連日皮下投与した。下垂体の GnRH に対する反応性 (GnRH 負荷試験) は、GnRHant 長期投与 (1 週間) 終了後の 24 時間後に ether 麻酔下で、心臓穿刺により採血後、GnRH ($1\mu\text{g}/\text{rat}$) を皮下投与し、30 分後に再び心臓穿刺により採血し、血中 LH、FSH を RIA により測定した。その後、断頭屠殺し、無菌的に下垂体採取、液体窒素中で凍結、 -70°C にて保存し、下垂体 LH β mRNA、GnRH-R mRNA を測定した。また、一部は下垂体 LH 含量測定に用いた。卵巣は摘出し、重量を測定した。なお、GnRHa 群では GnRHa (Leuprolide depot $33\mu\text{g}/100\text{g BW}/4\text{ weeks}$, 武田薬品) を投与し、併用群では GnRHant と GnRHa を併用し、対照群では溶媒を投与した。

2. LH、FSH、GnRH-R mRNA、LH β mRNA の

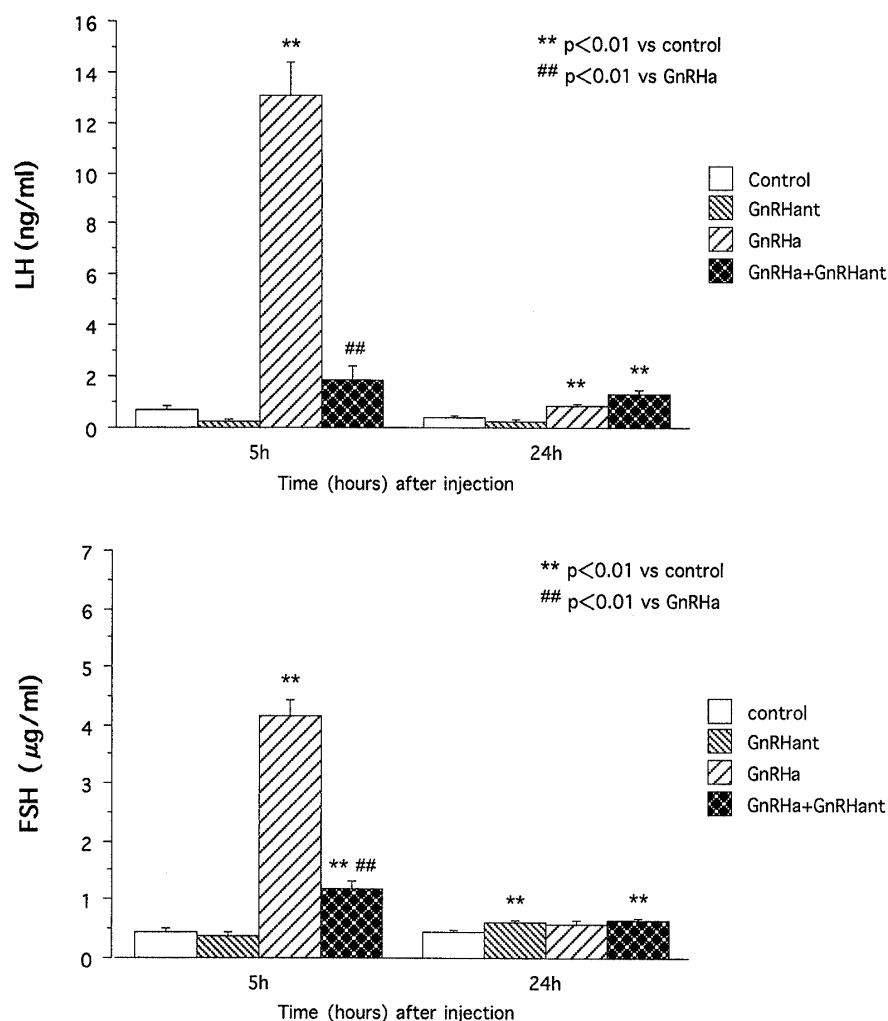


Fig. 1 Serum LH (upper panel) and FSH (lower panel) at 5 and 24 hours after GnRHant administration (mean $\pm$ SE, $n = 10$). Immature female rats were treated with GnRHant ($33 \mu\text{g}/100\text{g BW}$); GnRHa (GnRH agonist depot $33 \mu\text{g}/100\text{g BW}$); or GnRHant together with GnRHa.

測定

血中 LH の radioimmunoassay は, NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) より提供を受けた RIA キット家兔抗 LH 抗体, 標準品を用いて二抗体法で測定し, 血清 LH の濃度は NIH LH-S1 で表現し, FSH も同様な方法で行った³⁾. 下垂体 LH 含量測定については, Daane and Parlow⁴⁾の方法に準じて行った. すなわち, 摘出した下垂体を 0.5ml の distilled water にて, 氷冷下にガラス homogenizer を用いて homogenize し, 3,000rpm にて, 15分間遠沈後, 上清を 1:1,000 に希釈して, RIA にて LH 濃度を測定した.

LH β mRNA の測定は Uemura et al.⁵⁾の方法に準じ, 下垂体から Total RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出し, probe は T₄ Polynucleotide Kinase により [γ -³²P]ATP を end-label した ラット LH β subunit (5'-GCCGGCACAGATGCTGTGGTGAA-3') を用い, Northern blotting により定量した. GnRH-R mRNA の測定は Funabashi et al.⁶⁾の方法に準じ, probe は GnRH-R cDNA を template とした single strand DNA を用い, Northern blotting により定量した. なお, Northern blotting については, RNA 10 μg を 1.5% agarose gel に電気泳動し, その後 ³²P-dCTP で標識した probe を用いて, hybridization し, 洗浄後, BAS-2000 (富士写真

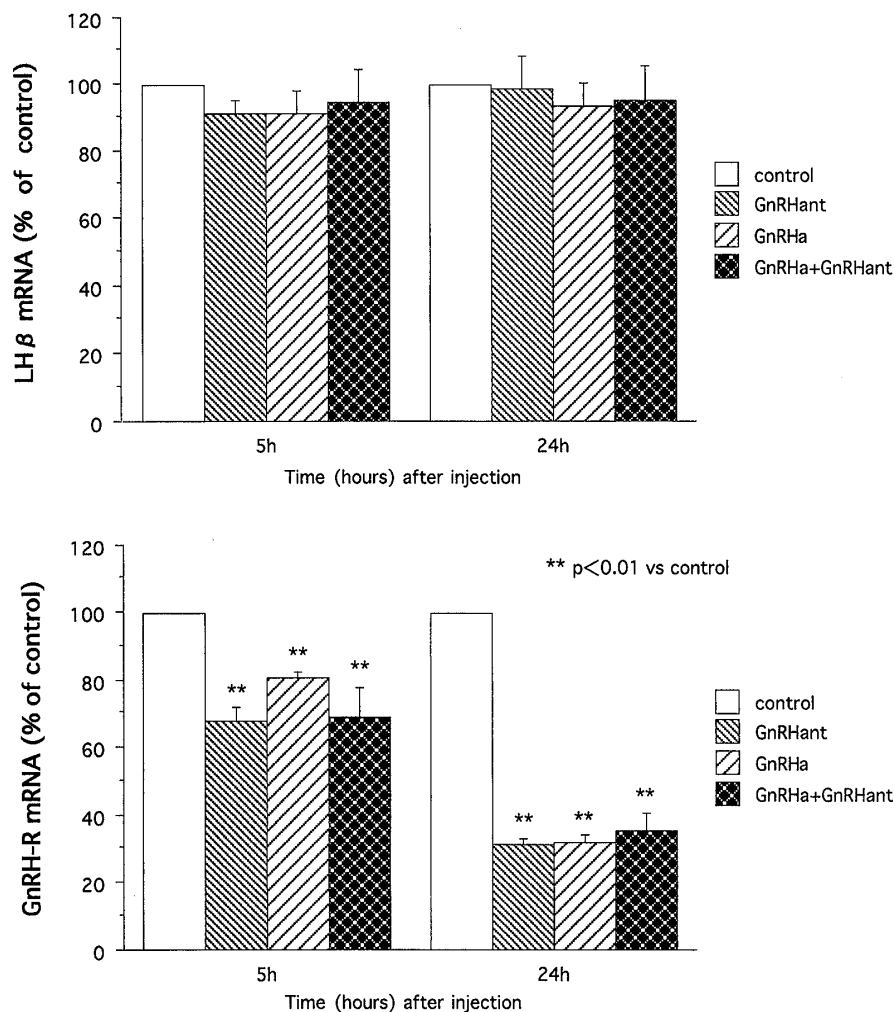


Fig. 2 LHβ mRNA (upper panel) and GnRH-R mRNA (lower panel) at 5 and 24 hours after GnRHant administration (mean ± SE, n = 4). The levels of LHβ mRNA and GnRH-R mRNA are expressed as a percentage of the control values.

フィルム社)で解析した。mRNA の発現量は対照群を100%として%で表示した。

なお、測定値は平均値±標準誤差(mean±SE)で表示し、一元配置分散分析法(ANOVA)で、分散分析および post-hoc test として Fisher の PLDS 法を用いて、統計分析を行った。有意水準0.05以下を有意差ありと判定した。

結 果

1. GnRHant の短期投与成績

Fig. 1 に示したごとく、GnRHant の単回投与により、5, 24時間後の血中 LH 値は、対照群と比較して減少傾向を示すものの、有意な差は認められなかった。それに対して、GnRHa 投与群の5, 24時間後の血中 LH 値は、対照群と比較して有意に

増加した($p < 0.01$)。この GnRHa による5時間後の LH 分泌増加反応は、GnRHant との併用により有意に抑制され(GnRHa vs GnRHant + GnRHa, $p < 0.01$)、対照群の5時間後の値との差は有意でなくなった。しかし、GnRHant + GnRHa 併用群の24時間後の LH 値は、対照群と比較して有意に増加した($p < 0.01$)。一方、GnRHant 群の FSH 値は、対照群と比較して、5時間後では有意な差は認められなかったが、24時間後では有意に増加した($p < 0.01$)。GnRHa 群においては、血中 FSH 値は、5時間後に、対照群より有意に増加したが($p < 0.01$)、24時間後には増加したものの、対照群と比較して有意ではなかった。LH 値の場合と同様に、GnRHa 群にみられた5時間後の FSH 値の

増加は, GnRHant との併用により, 有意に抑制された (GnRHa vs GnRHant + GnRHa, $p < 0.01$). また, GnRHant + GnRHa 併用群の24時間後の FSH 値は, 対照群と比較して有意に増加した ($p < 0.01$).

Fig. 2 上段に示したごとく, GnRHant 群, GnRH-a 群, GnRHant + GnRHa 併用群の5, 24時間後の下垂体 LH β mRNA 発現量は, 対照群と比較して有意な変化は惹起されなかった. 一方, 下垂体 GnRH-R mRNA 発現量は, 5 時間後には, 対照群と

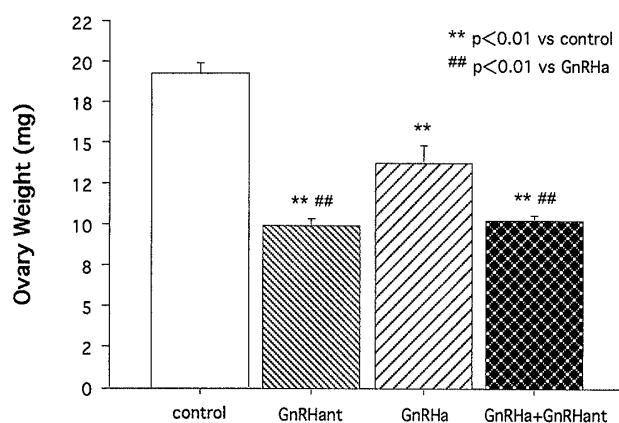


Fig. 3 Ovarian weights in rats treated with GnRHant (mean $\pm$ SE, $n = 10$). Immature female rats treated with GnRHant ($33\mu\text{g}/100\text{g BW/day}$); GnRHa (GnRH agonist depot $33\mu\text{g}/100\text{g BW}/4\text{ weeks}$); or GnRHant together with GnRHa for one week.

比較して約70%となり有意に減少した (Fig. 2 下段, $p < 0.01$). 24時間後では, 対照群と比較して約30%となり, 更に減少した ($p < 0.01$). 投与群による, 下垂体 GnRH-R mRNA 発現量の抑制の違いは認められなかった.

2. GnRHant の長期投与 (1 週間) 成績

GnRHant 投与 1 週間後の卵巣重量は, 対照群と比較して, 有意に減少した (Fig. 3, $p < 0.01$). GnRHa 投与 1 週間後の卵巣重量も, 対照群と比較して有意に減少したが ($p < 0.01$), その効果は, GnRHant 群の方が有意に強かった ($p < 0.01$). また, GnRHant + GnRHa 併用群の 1 週間後の卵巣重量は, 対照群と比較して有意に減少し ($p < 0.01$), GnRHa 群のそれよりも有意に減少した ($p < 0.01$).

Fig. 4 に示したごとく, GnRH に対する LH の反応性を $1\mu\text{g}$ GnRH 投与30分値で検討すると, 対照群と比較して, GnRHant 群, GnRHa 群, GnRHant + GnRHa 併用群のいずれも, 反応性 LH 分泌は, 有意に抑制され ($p < 0.01$), 実際, GnRH 投与前の LH 値とは有意な差は認められなかった.

Fig. 5 に投与後 1 週間の下垂体 LH 含量を示した. GnRHant により, 対照群と比較して, 下垂体 LH 含量は有意に増加したが ($p < 0.05$), GnRHa 投与によって下垂体 LH 含量は有意に減少した

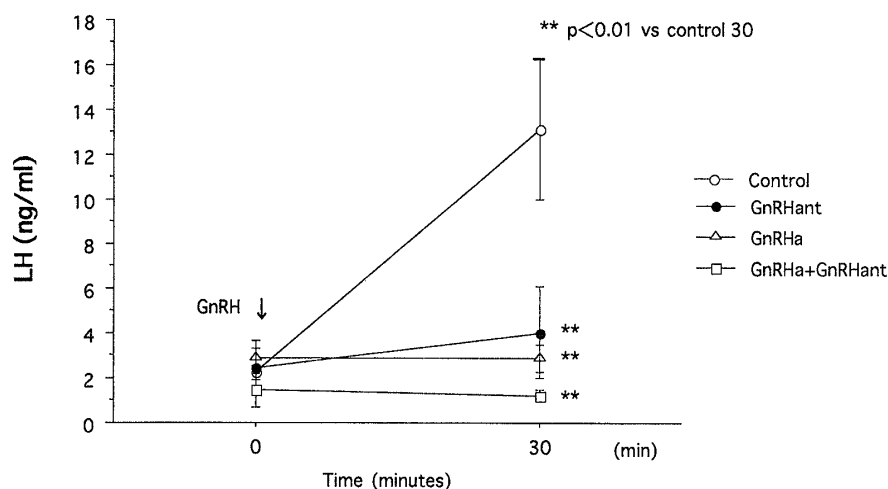


Fig. 4 Serum LH responses to GnRH in rats treated with GnRHant (mean $\pm$ SE, $n = 4$). Immature female rats treated with GnRHant ($33\mu\text{g}/100\text{g BW/day}$); GnRHa (GnRH agonist depot $33\mu\text{g}/100\text{g BW}/4\text{ weeks}$); or GnRHant together with GnRHa for one week. Blood samples were obtained before and 30 minutes after GnRH ($1\mu\text{g}/\text{rat sc}$) administration.

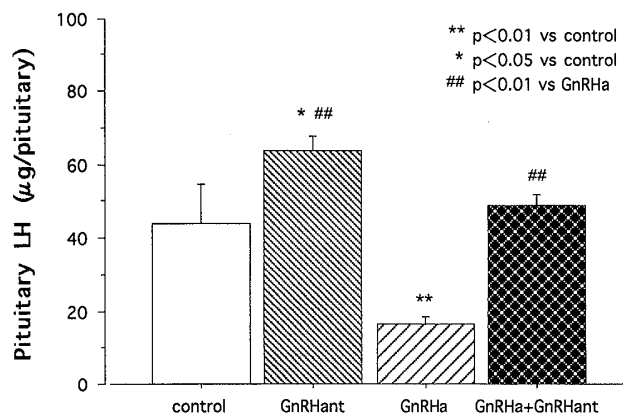


Fig. 5 Pituitary LH content in rats treated with GnRHant (mean $\pm$ SE, $n = 4$). Immature female rats treated with GnRHant ($33 \mu\text{g}/100 \text{ g BW/day}$); GnRHa (GnRH agonist depot $33 \mu\text{g}/100 \text{ g BW/4 weeks}$); or GnRHant together with GnRHa for one week.

($p < 0.01$). GnRHa による下垂体 LH 含量の減少は GnRHant の併用により有意に減弱した ($p < 0.01$).

Fig. 6 上段に示したごとく, GnRHant 投与群, GnRHa 群, GnRHant + GnRHa 併用群の下垂体 LH β mRNA 発現量は, 対照群と比較して有意に減少し, その効果は, GnRHant + GnRHa 併用群 > GnRHa 群 > GnRHant 投与群の順であった. 実際, GnRHant + GnRHa 併用群の下垂体 LH β mRNA 発現量は, GnRHant 群, GnRHa 群のものより, 有意に減少していた. 一方, Fig. 6 下段に示したごとく, GnRHant 群の下垂体 GnRH-R mRNA 発現量は, 対照群および GnRHa 群と比較して, 有意に減少した. GnRHa 投与により, 下垂体 GnRH-R mRNA 発現量は, 対照群と比較して有意に減少したが, 前述したごとく, GnRHant 群より有意に多かった. GnRHant + GnRHa 併用群の下垂体 GnRH-R mRNA 発現量は, 対照群, GnRHa 群より有意に減少し, GnRHant 群と同様であった.

考 察

今回の研究から, GnRHant 単回投与による短期的な作用として, 血中 LH 値や FSH 値, 下垂体 LH β mRNA 発現量には大きな変化を惹起しなかったが, 下垂体 GnRH-R mRNA 発現量を抑制することが明らかとなった. また, 1 週間の長期投与により, 下垂体 LH β mRNA および GnRH-R mRNA

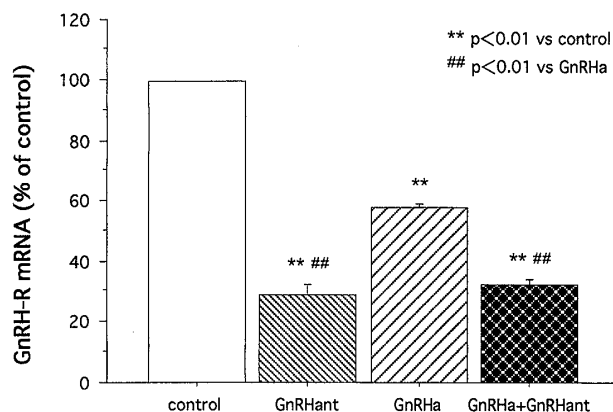
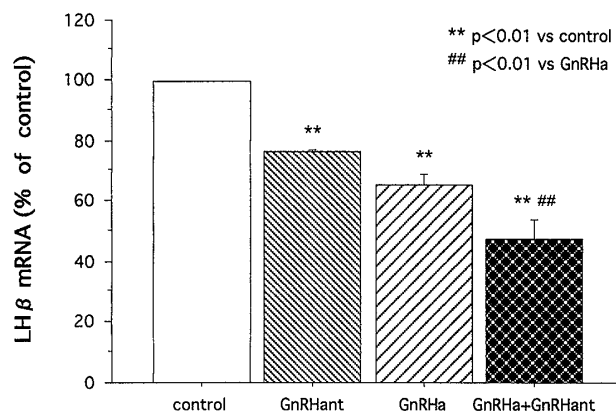


Fig. 6 LH β mRNA (upper panel) and GnRH-R mRNA (lower panel) in rats treated with GnRHant (mean $\pm$ SE, $n = 3$). Immature female rats treated with GnRHant ($33 \mu\text{g}/100 \text{ g BW/day}$); GnRHa (GnRH agonist depot $33 \mu\text{g}/100 \text{ g BW/4 weeks}$); or GnRHant together with GnRHa for one week. The levels of LH β mRNA and GnRH-R mRNA are expressed as a percentage of the control values.

の発現を抑制し, 下垂体 LH 含有量を増加させ, 下垂体の GnRH に対する反応性を抑制し, 卵巣重量を減少することが明らかとなった.

本実験で幼若雌ラットを用いたのは, 成熟ラットは性周期を回帰し, 内分泌状態が大きく変化し, 下垂体の状態も大きく変化することにより結果の解釈が困難となることを避ける目的と, 臨床的応用への基礎データとして, 卵巣への影響も知る目的があったからである. したがって, 本実験では Uemura et al.⁵⁾や Sakakibara et al.⁷⁾と同様に未成熟ラットを使用した, これからの臨床応用をふまえて成熟ラットの内分泌動態についても今後検討して行きたい. 薬剤の投与量については, Pinski et al. は成熟雄ラット (250~300g BW) に

GnRHant(Cetrorelix)100 μ g/rat/dayを4週間投与して、gonadotropin分泌予備能の有意な低下を認めていることから⁸⁾、GnRHant(Cetrorelix)の量を33 μ g/100g BW/dayと設定した。また、GnRHantの投与量について、GnRHaの10倍から30倍が臨床的には用いられていることから²⁾、今回GnRHa depot剤の量を33 μ g/100g BW/4 weeksとした。

今回の研究では、GnRHant投与で、血中LH値には有意な変化は認められなかった。しかし、Bokser et al.はGnRHant(Cetrorelix)を雌ラットにosmotic minipumpで総量27 μ g/dayを60日間投与し、血中LH値の有意な低下を認めており⁹⁾、Pinski et al.¹⁰⁾は成熟雄ラット(220~250g)に2.5mg/ratのGnRHant(Cetrorelix)を投与して、LHの有意な低下を認めている。今回の実験では33 μ g/100g BW/dayを7日間投与しているが、LH値が有意に低下しなかった原因としては幼若雌ラットを用いたこと、投与期間が短いこと、投与量が少ないこと等によると考えられる。しかし、未成熟雌ラットへのGnRHa(GnRHa depot 0.94 mg/rat/4 weeks)の長期投与でも有意なLH低下がみられておらず⁵⁾、したがって、結果の違いは、成熟ラットか未成熟ラットによると考えられるが、一方で以下のことも考慮しなくてはならない。すなわち、ラットLHの抗体がpolyclonal抗体であり、免疫学的には α subunitとも交差することが関与している可能性がある¹¹⁾。GnRHantでも α subunitの減少率の少ないことが報告されており¹²⁾、これらのことが今回の実験でLH値が有意な低下を示さなかったことに関与しているとも考えられる。

GnRHant投与は、血中LH値を減少させないが、GnRHに対するLHの反応性は著明に抑制することから、下垂体のgonadotropin分泌能は十分に抑制されていると考えられる。一方、下垂体LH含量は有意な増加を示した。これは短期的投与ではLH β mRNA発現は抑制されないことから、LHの放出が抑制されることによると推測される。このことはflare up現象をもたらすGnRHa投与で下垂体LH含量が有意に低下すること、GnRHa併用GnRHant投与でGnRHaによるflare up現象は減弱し、下垂体LH含量がGnRHa単独群より

有意に増加することからも裏付けられる。

GnRHantは卵巢重量も有意に減少させた。これにはGnRHantの卵巢に対する直接的な作用も否定できないが、GnRHantの卵巢への直接作用に関しては刺激的作用であると報告されており¹³⁾¹⁴⁾、したがって、下垂体のGnRHに対するLHの反応性分泌の抑制による、gonadotropinを介した作用が主たるものと推測される。矛盾点として、血中のLH値は変化しないことが挙げられるが、幼若雌ラット(24~27日齢)下垂体からのLH分泌はパルス状で1~2LH pulses/4 hoursを認めていることから¹⁵⁾、一点の計測では、LH分泌の変化を検出できなかった可能性がある。

GnRHant投与後1週間の長期投与では、下垂体LH β mRNA発現量は有意に低下した。LH β mRNA発現量は卵巢摘出で16倍にも増加し¹⁶⁾、GnRHant投与でその卵巢摘出によるLH β mRNA増加は阻止される¹⁷⁾。また、ルシフェラーゼレポーター遺伝子(luciferase reporter gene)を導入して、転写活性を測定した成績から、LH β gene転写活性は卵巢摘出で亢進し、GnRHant投与で阻止されることも明らかにされている¹⁸⁾。今回の研究では、幼若雌ラットへのGnRHant単独投与において、7日間投与でLH β mRNAの有意な抑制が認められており、GnRHantは長期投与すると、LH分泌抑制のみならず、強力なLH合成抑制作用を有することが示唆される。

GnRH-RはGnRHによって調節されていることが知られており、卵巢摘出により有意に受容体数は増加するが、その際GnRH-Rの遺伝子発現も増加する¹⁹⁾。また、このGnRH-RのmRNA発現は、GnRHa投与で減少することが報告されている¹⁷⁾²⁰⁾。一方、GnRHantについては、GnRHaに比較して、受容体に結合後細胞内へのinternalizationを誘導しないとされ、GnRH-Rのdown-regulationについては明らかでなかったが、1992年にPinski et al.¹⁰⁾はGnRHant(1.25mg/rat)7日間投与でGnRH-Rの占拠のみならず、GnRH-Rのdown-regulationをもたらすことを報告している。1996年にはHalmos et al.²¹⁾はMnCl₂やNH₄SCNのようなカオトロピック試薬(Chaotropic agent)を用い

て、GnRH-R を非飽和(desaturation)にして、GnRH-R 数を測定し、雄ラットへの GnRHant (Cetrorelix 100 μ g)投与 1 時間後で最大結合能(B_{max})は有意に低下し、3~6 時間に最小値を示し、GnRHant でも down-regulation をもたらすことを明らかにした。

しかし、GnRHant の GnRH-R mRNA への影響についての報告は少なく、著者の知る限りでは、Pinski et al.⁸⁾の報告があるにすぎない。彼らは雄ラットへの GnRHant 投与(4.5mg Cetrorelix pamoate depot)14 日後の GnRH-R mRNA は75~80%の有意な減少を報告している。今回の成績では Pinski et al. の報告した one point の測定ではなく、GnRHant(33 μ g/100g BW/day)を単回および反復投与を行い、GnRH-R mRNA の推移をみた。その結果、対照群に比較して、5 時間で約70%へ、24時間で約30%へ、7 日間で約25%へと著明にその発現量の抑制が認められた。今回の成績では投与 5 時間後より GnRH-R mRNA の有意な減少を認めたが、GnRHa(300 μ g/kg)投与で Lerrant et al.²⁰⁾も同程度の短時間で GnRH-R mRNA の有意な抑制を認めていることから、GnRHant も GnRHa に匹敵する速さで GnRH-R mRNA 発現を抑制するものと考えられる。

本実験の成績は GnRHant の 1 週間連日皮下投与で下垂体の GnRH に対する LH の反応性は有意に抑制され、卵巢重量は対照群より有意に減少し、下垂体 GnRH-R mRNA は対照群に比して有意に減少していることから、GnRHant は強力に下垂体抑制効果を示し、GnRH-R mRNA も GnRHa と同様に抑制することが示された。また、GnRHa 群との比較でも、GnRHant は卵巢重量を GnRHa 群よりも有意に抑制し、GnRH-R mRNA も GnRHa 群よりも有意に低下した。このように GnRH-R mRNA をも減少させることから、GnRHant は臨床的に必ずしも漸増投与の必要がなく、長期投与の可能なことが示唆された。

GnRHa がすでに臨床応用されており、GnRHant が近い将来臨床使用が可能になると、GnRHa と GnRHant の併用した治療効果の期待も生じてくる。しかし、in vivo で両者を併用しての

実験成績は少ない。Illinos et al.²²⁾は雌 baboons で GnRHa(0.83 μ g/kg/12h)による脱感作に及ぼす GnRHant(3mg/kg BW, その後1mg/kg BW/2 days)の影響を調べ、GnRHant が GnRHa の脱感作を減弱すると報告している。しかし、本実験では、薬剤の投与量、実験動物の違いもあるが、GnRHant が GnRHa による下垂体 LH の反応性抑制を減弱する成績を明確には得られなかった。下垂体 LH 含量、LH β mRNA、GnRH-R mRNA について、GnRHa と GnRHant を併用して検討した報告は著者の知る限りではまだ見当たらない。そこで、この点について、検討した。その結果、併用群では GnRHa の flare up 現象による LH、FSH の増加を有意に減弱すること、その結果、下垂体 LH 含量は有意に増加すること、卵巢重量は GnRHant 単独と同様に GnRHa より有意に縮小すること、GnRH-R mRNA も GnRHant 単独と同様に GnRHa より有意に減少すること、更に、LH β mRNA においては、GnRHa より有意に減少するのみならず、GnRHant 単独の場合よりも有意に減少し、GnRHant と GnRHa との相乗効果が認められた。この成績は GnRHant と GnRHa との併用で、GnRHa の初期刺激効果を減弱し、GnRHa 単独よりも下垂体卵巢系への抑制効果が強いことを示しており、今回の実験動物における内分泌学的検討から、GnRHant と GnRHa との併用療法の臨床応用について、有用性を示唆したものといえる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました平原史樹教授、ならび本研究の遂行にあたり終始直接御指導賜りました恩師植村次雄客員教授、藤沢市民病院部長に心から厚く御礼申し上げます。また、御助言を賜りました本学第2生理学教室田中富久子教授、船橋利也講師、産婦人科学教室近藤芳仁講師、榊原秀也講師、実験に御協力いただいた秋山多萬子、稲田真愛、広瀬真紀子各実験助手に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第51回、第52回日本産科婦人科学会学術講演会、第72回日本内分泌学会学術講演会において発表した。本研究の一部は文部省科学研究補助金(09671704)によるものである。なお、Cetrorelix acetate を提供していただいた Asta Medica、AG および LH の RIA のキットを提供していただいた NIDDK に感謝します。

文 献

1. Clayton RN, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptor : characterization, physiological regulation, and relationship to reproductive function. *Endocrine Review* 1981 ; 2 : 186—209
2. 植村次雄. GnRH agonist と GnRH antagonist. 産婦実録 1998 ; 47 : 507—515
3. He D, Funabashi T, Sano A, Uemura T, Minaguchi H, Kimura F. Effects of glucose and related substrates on the recovery of the electrical activity of gonadotropin-releasing hormone pulse generator which is decreased by insulin-induced hypoglycemia in the estrogen-primed ovariectomized rat. *Brain Research* 1999 ; 820 : 71—76
4. Daane TA, Parlow AF. Periovalutary patterns of rat serum follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the normal estrous cycle : effects of pentobarbital. *Endocrinology* 1971 ; 88 : 653—663
5. Uemura T, Shirasu K, Sakakibara H, Kondo Y, Minaguchi H. Regulation of LH β subunit mRNA in immature female rats during GnRH agonist treatment. *Endocrinol Japon* 1990 ; 37 : 695—702
6. Funabashi T, Brooks PJ, Weesner GD, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat pituitary during lactation and the estrous cycle. *J Neuroendocrinol* 1994 ; 6 : 261—266
7. Sakakibara H, Taga M, Ikeda M, Kurogi K, Minaguchi H. Continuous stimulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors by GnRH agonist decreases pituitary GnRH receptor messenger ribonucleic acid concentration in immature female rats. *Endocrine Journal* 1996 ; 43 : 115—118
8. Pinski J, Lamharzi N, Halmos G, Groot K, Jungwirth A, Vellido-Buenfil M, Kakar SS, Schally AV. Chronic administration of the luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) antagonist Cetrorelix decreases gonadotrope responsiveness and pituitary LHRH receptor messenger ribonucleic acid levels in rats. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 3430—3436
9. Bokser L, Srkalovic G, Szepeshazi K, Schally AV. Recovery of pituitary-gonadal function male and female rats after prolonged administration of a potent antagonist of luteinizing hormone-releasing hormone (SB-75). *Neuroendocrinology* 1991 ; 54 : 136—145
10. Pinski J, Yano T, Groot K, Milovanovic S, Schally AV. Comparison of biological effects of a sustained delivery system and nonencapsulated LH-RH antagonist SB-75 in rats. *Peptides* 1992 ; 13 : 905—911
11. Uemura T, Yanagisawa T, Shirasu K, Matsuyama A, Minaguchi H. Mechanisms involved in the pituitary desensitization induced by gonadotropin-releasing hormone agonists. *Am J Obstet Gynecol* 1992 ; 167 : 283—291
12. Hall J, Crowley W. Use of GnRH antagonists as physiologic probes in the female. In : Crowley W, Conn P, eds. *Modes of action of GnRH and GnRH analogs*. New York : Springer-Verlag, 1992 ; 310—321
13. Uemura T, Namiki T, Kimura A, Yanagisawa T, Minaguchi H. Direct effects of gonadotropin-releasing hormone on the ovary in rats and humans. *Horm Res* 1994 ; 41 : 7—13
14. Hsueh AJ, Jones PB. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 1981 ; 2 : 437—461
15. Kimura F, Kawakami M. Episodic 1h secretion in the immature male and female rat as assessed by sequential blood sampling. *Neuroendocrinology* 1982 ; 35 : 128—132
16. Papavasiliou SS, Zmeili S, Herbon L, Duncan-Weldon J, Marshall JC, Landefeld TD. α and luteinizing hormone β messenger ribonucleic acid (RNA) of male and female rats after castration : quantitation using an optimized RNA dot blot hybridization assay. *Endocrinology* 1986 ; 119 : 691—698
17. Wierman ME, Wang C. Androgen selectively stimulates follicle-stimulating hormone- β mRNA levels after gonadotropin-releasing hormone antagonist administration. *Biol Reprod* 1990 ; 42 : 563—571
18. Fallest PC, Trader GL, Darrow JM, Shupnik MA. Regulation of rat luteinizing hormone β gene expression in transgenic mice by steroids and a gonadotropin-releasing hormone antagonist. *Biol Reprod* 1995 ; 53 : 103—109
19. Saito S, Izumi S, Kobayashi M, Saitoh S, Makino T, Yoshimura Y, Nozawa S, Takamatsu K. Ovariectomy-evoked increase in gonadotropin releasing hormone receptor parallels its messenger RNA level, but does not correlate with stimulated gonadotropin release. *Endocrine Journal* 1996 ; 43 : 139—143
20. Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Moumni M, Blumberg-tick J, Counis R. Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin β -

- subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology* 1995 ; 136 : 2803—2808
21. *Halmos G, Schally AV, Pinski J, Vadillo-Buenfil M, Groot K.* Down-regulation of pituitary receptors for luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in rats by LH-RH antagonist Cetrorelix. *Medical Sciences* 1996 ; 93 : 2398—2402
22. *Illions EH, Scott RT, Carey KD, Navot D.* Evaluation of the impact of concurrent gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist administration on GnRH agonist-induced gonadotrope desensitization. *Fertil and Steril* 1995 ; 64 : 848—854 (特別掲載
No. 8133 平12・5・29受付, 平12・9・11採用)
-