In Vitro Studies on the Mechanism of ACTH Secretion

Hiroshi TANIGUCHI

The Second Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine,
Kobe, Japan (Director : Professor Shozo Tsuji, M.D.)

It has been a well-known fact that ACTH is released from the adenohypophysis in the case of subjection of an animal to stress, but it is not yet clearly understood whether and how the synthesis in the pituitary gland is related to the release of ACTH under the effect of acute stress. The author has attempted to clarify this problem using in vitro investigation of ACTH release from incubated rat anterior pituitary gland. The pattern of ACTH release from the rat anterior pituitary gland observed with the standard incubation technique using KRBG* as incubation medium which was named by the author arbitrarily as "spontaneous ACTH release". The response of this pattern to lysine-8-vasopressin was studied under various conditions.

Methods

Female rats of Wistar strain, weighing 120–150 gm, were used as pituitary donors. After removal of pituitary gland, each anterior lobe of pituitary gland was hemisected and placed in a flask containing 2 ml of KRBG. Four pituitary halves supplied by four different rats were placed in one of each pair of flasks, one containing the agents to be tested and the other being used as a control. All flasks were incubated in a metabolic incubator under atmospheric conditions of 95% of oxygen and 5% of carbon dioxide at 37°C. Every 30 minutes the incubation medium was replaced with an equal volume of fresh medium. Incubation was thus continued for several hours. The ACTH activity released in the medium was determined by the in vitro method of ACTH bioassay described by Yasui (Folia Endocr. Jap., 41: 643, 1965). After the final incubation the adenohypophyseal RNA** and DNA*** contents were determined by the method of Schmidt, Thannhauser and Schneider.

The results are summarized as follows:

(I) Spontaneous ACTH release was gradually reduced for 2 hours in the course of incubation, showing the minimum value at this point, and was thereafter demonstrable without cessation during the course of a 5-hour experiment after the onset of incubation, although it was a small amount. The RNA / DNA ratio in the adenohypophysis showed no remarkable change during the whole course of experiment.
free medium.

*Designation of Krebs-Ringer bicarbonate solution containing 200 mg glucose/100 ml.

**Designation of ribonucleic acid.

***Designation of desoxyribonucleic acid.

(II) Effect of agents added to the medium on spontaneous ACTH release.

(1) The same pattern of ACTH release as in KRBG medium was shown in glucose-

(2) Addition of 10 ug of actinomycin D in the first incubation medium depressed the release of ACTH in the medium, but after the exchange of medium the release pattern returned to the basal level as in spontaneous ACTH release.

(3) Addition of 50 ug of puromycin in the first medium induced almost no change in the basal pattern for the first 2 hours. The release of ACTH was, however, depressed later in the course.

(4) 60 mU of lysine-8-vasopressin added to the medium 1, 2 or 3 hours after the commencement of incubation caused significant ACTH release in the medium containing the agent at every time point. Thereafter the release pattern returned to the basal level.

(5) Based upon the above-mentioned results, it is suggested that ACTH in the adenohypophysis consists of the readily releasable pool of ACTH and the inactive ACTH pool. These pools are likely to possess a sufficient reserve ability, enough to release ACTH during one and a half hours according to the present study. The plausible explanation of this phenomenon can be drawn from the possible existence of equilibrium between the ACTH content of incubation medium and the ACTH release from the adenohypophysis as in the case of the equilibrium between the steroid content of medium and the steroid release from adrenocortical slices. Following this concept, the equilibration of ACTH content between the incubation medium and the adenohypophysis should be deranged by the addition of lysine-8-vasopressin, which causes ACTH release, resulting in reduction of the readily releasable pool of ACTH and inducing the mobilization of ACTH from the inactive ACTH pool to supplement the former pool. The changes in the ACTH generating system seem to be induced in this way. As soon as the equilibrium of ACTH content between the medium and the readily releasable pool is established, the series of this ACTH generating system gradually enters into the equilibration, thus resulting in a uniform rate of synthesis and release of ACTH.

(III) ACTH releasing action of lysine-8-vasopressin in vitro.

(1) The anterior pituitary gland responded sufficiently to 60 mU of lysine-8-vasopressin after a preincubation period for 0.5, 1.5 or 2.5 hours.

(2) ACTH activity appeared immediately in 5 minutes and showed no further elevation in the medium after 30 or 120 minutes' period. The response of the adenohypophysis to 60 mU of lysine-8-vasopressin was found not in the incubation studies of 5 minutes, but in 30 minutes. The responses was slightly more prominent in the experiments of 120 minutes duration than in those of 30 minutes duration.

(3) The response of the anterior pituitary gland to 60 mU of lysine-8-vasopressin was remarkable after the preincubation with 10 ug of actinomycin D or 50 ug of puromycin.

(4) The above-mentioned results seem to indicate that lysine-8-vasopressin acceler-

ates the transformation of ACTH from the inactive ACTH pool to the readily releasable pool. Thus, an increase of the readily releasable pool inevitably leads to the release of ACTH. Another possible explanation of the effect of lysine-8-vasopressin can be sought in the acceleration of the permeability of membrane of ACTH producing cells. These actions of lysine-8-vasopressin seem unlikely to have any direct relations with protein synthesis in the anterior pituitary gland. It is, therefore, considered that the release of ACTH is caused under acute stress before the synthesis of ACTH in the adenohypophysis takes place.

(See pp. 1066~1080)

ACTH 分泌機序に関する実験的研究

神戸大学医学部第二内科学教室 (指導 辻 昇三教授)

谷 口 洋

(昭和45年7月1日受付)

下垂体内での ACTH の存在形式, 更にはその分泌機序の解明の為, *in vitro* 連続 incubation 法を用い, ラット下垂体前葉組織片からの spontaneous ACTH release の pattern 及び各種薬物のその pattern に及ぼす影響と stressor としての Lysine-8-Vasopressin に対する反応性との二面からの解析を行なった結果, 下垂体前葉内に於て ACTH は readily releasable pool とその前段階の inactive ACTH pool の型で存在し, Lysine-8-Vasopressin は後者から前者の pool への変換を促進し, 一部には細胞膜の透過性も亢進することにより ACTH の放出を来し, medium と readily releasable pool との間の平衡の成立と共に ACTH の生成, 放出反応が一定となると解された. 又急激な刺激下では蛋白合成更には ACTH 合成よりも先ず ACTH の放出が起こると想定された.

1 緒 言

生体が特殊な外部, 或は内部環境におかれた時, その環境の変化に適応して下垂体から ACTH の放出がおこるが^{1)~3)}, その際下垂体内の ACTH 合成機転の有無を下垂体内 ACTH 含量^{1), 4)~6)}, 放射性同位元素で標識したアミノ酸の下垂体内 ACTH^{7)~9)}, 又は蛋白へ^{8), 18)}のとりこみ, 下垂体内 RNA, DNA の変動等^{10)~15)}を通じて観察した研究が数多く報告されている. しかし未だその詳細な機序に関しては不明点が多く残されている. この ACTH 合成, 分泌機序の研究手段として, 我々は *in vivo* による方法と *in vitro* による方法とを利用している. *in vivo* による方法は, 中枢神経系—視床下部—下垂体前葉—副腎皮質という連続性のある系統の中で下垂体 ACTH 合成, 分泌機能を出来るだけ分離して純粋に観察しようとするものであるが, 中枢よりの影響と副腎 Corticoid の feedback を受けることは避け難い. これに対して *in vitro* による方法ではそれらの連続性を切断して各臓器レベル, 即ちこの場合では下垂体前葉, 或は細胞レベル, 細胞下レベル等での反応性を検討することが出来る. 従つて薬物のある臓器への直接作用, 或は大臓器の反応の自律性を研究する場合には *in vitro* による方法は極めて有用である.

著者はラット下垂体の *in vitro* 連続 incubation 法を用いて, 下垂体レベルでの spontaneous ACTH release のパターン及びそれに影響を及ぼす各種薬物による変化と, stressor としての Lysine-8-Vasopressin に対する反応性との二面からの解析的研究を行ない, 下垂体内での ACTH の存在形式, 更にそれを通じての分泌機序の検討を試みたので以下に報告する.

II 実験材料及び方法

実験開始1週間前より室温約23℃の飼育室にてオリエンタル固形飼料で飼育した体重120~150gmのWistar 系雌ラットを午前9時から10時迄の間に断頭屠殺後, 直ちに下垂体を摘出し, 後葉を除去, 前葉を正中線にて切半し, 各々を生理的食塩水中で3回洗滌した. Fig. 1 に示すように4個の下垂体より重複しないように4 halves の下垂体前葉をとり出し, test material を含む2 ml の medium を入れた incubation flask 中に置き, この medium を O₂ 95%, CO₂ 5% の混合ガスで飽和させた後37℃で incubate した. 残りの4個の pituitary halves を control medium 中で同様に処理をして incubate した. medium と

Fig.1. Method of in vitro incubation experiment

して 200mg% の glucose を含有する Krebs-Ringer Bicarbonate buffer (以下 KRBG と略す) を用いた. test material としては Synthetic Lysine-8-Vasopressin (以下 L-8-V と略す) (Sandoz), Actinomycin D (以下 Act. D と略す) (日本メルク万有), Puromycin (以下 Puro. と略す) (Nutritional Biochemicals Corporation) を KRBG で溶解希釈して, KRBG の 2 ml 中に L-8-V は 60 mU, Act. D は 10 μ g, Puro. は 50 μ g. 含有される様にした. なお一部の試験では test medium として glucose-free の Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (以下 KRB と略す) を用いた. 各 medium の pH は 7.2~7.4 とした. 一部の試験を除き medium の交換は 30 分毎に 8~10 回施行し, 各 medium 交換前に下垂体を生理的食塩水中で 3 回洗滌した. KRBG の medium 中で incubate した下垂体は final incubation 後 homogenize し, Schmidt-Thannhauser-Schneider 法¹⁶⁾で RNA, DNA を定量した. 各 incubation 後の medium は 0.1N 塩酸で pH を 3.0 とし, 一夜 4 $^{\circ}$ C で放置後 first incubation 及び incubation number の偶数番目の medium を 10 倍希釈して medium 中に放出さ

れた ACTH 活性を辻一安井の開発した牛副腎皮質薄片を使用する in vitro bioassay 法¹⁷⁾にて測定した. 表現する単位としては μ g/gm を用いた. この意味は 10 倍に希釈した medium 1ml. が牛副腎皮質 1gm. 当り放出させるステロイド量である.

なお著者の用いた in vitro ACTH bioassay 法に対する蛋白合成阻害剤の影響をみる為に highly purified corticotrophin (Organon) を用いて上記同様の試験方式の下に, 既知量の ACTH に対するこれ等薬剤の影響を検討した.

III 実験成績

(I) ACTH assay 系に於ける効力比

著者の用いた in vitro 法によって medium 中に放出された ACTH 活性と standard ACTH (IIIrd International Working Standard) との間の平行性を検討した. 2 $\times$ 2 point assay にて測定すると Fig. 2 の如く平行性が証明され, 両者の間の potency ratio は 0.00438 であった. 以下の試験では medium の high dose 即ち 10 倍希釈のみ用いた.

(II) 連続 incubation による spontaneous ACTH release に及ぼす各種薬物の影響

(1) KRBG medium に於ける spontaneous ACTH release の pattern について (Fig. 3)

先ず KRBG を medium として連続 incubation をした場合の下垂体前葉から medium 中に放出された ACTH 活性とその時の各時点での下垂体前葉内の RNA/DNA 比を測定した. medium 中の ACTH 活性は No. 1 の medium では $38.66 \pm 1.55 \mu\text{g/gm}$, No. 2 の medium では $28.31 \pm 1.63 \mu\text{g/gm}$ と低下し, No. 4 の medium では $19.24 \pm 1.05 \mu\text{g/gm}$ と最小となり, その後 No. 6, 8, 10 の medium では各々 22.28 ± 1.70 , 24.51 ± 2.98 , $22.04 \pm 2.99 \mu\text{g/gm}$ とほぼ一定であった. 下垂体内 RNA/DNA 比は incubation 前は 0.77 ± 0.06 であったのが, No. 1, No. 2 の incubation 後各々 0.66 ± 0.04 , 0.66 ± 0.06 とやや低下の傾向

Fig. 2. Potency ratio of test medium to standard ACTH

Fig. 3. Spontaneous ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro & its RNA/DNA ratio

Fig. 4. Effect of glucose on ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro

を示し、その後 No. 4, No. 6 の incubation で各々 0.83 ± 0.07 , 0.82 ± 0.06 とやや増加の傾向を示し、更に No. 8, No. 10 の incubation 後各々 0.72 ± 0.05 , 0.71 ± 0.13 と前値に復した。しかしこれらの各時点での下垂体内 RNA/DNA 比の間には有意差はなかつた。この事実から下垂体前葉より medium 中に放出さ

れた ACTH 活性が減少しても下垂体内 RNA/DNA 比は前値に比し一定又はやや増加の傾向を示し、少なくとも減少しないことが判明した。

(2) glucose-free medium の影響について (Fig. 4)

次に glucose の spontaneous ACTH release に及ぼす影響を観察する為に glucose-free の medium (KRB) と glucose 200mg % を含む medium (KRBG) について実験を行なった。下垂体前葉より KRB medium 中に放出された ACTH 活性は No. 1 medium に於ては $32.43 \pm 2.16 \mu\text{g/gm}$, No. 2 medium では $37.14 \pm 6.42 \mu\text{g/gm}$ であった。その後 No. 4, No. 6, No. 8 medium では各々 14.42 ± 5.52 , 18.55 ± 5.67 , $13.69 \pm 4.41 \mu\text{g/gm}$ となり KRBG medium 中に放出された ACTH 活性と比較してやや減少の傾向を示したが、統計学的に有意差はなかった。

(3) 蛋白合成阻害剤の影響について

この spontaneous ACTH release のパターンに及ぼす蛋白合成阻害剤の影響を知る目的で Act. D $10 \mu\text{g/flask}$, 又は Puro. $50 \mu\text{g/flask}$ を No. 1 medium に添加して ACTH 放出のパターンを観察した。No. 2 incubation 以後は KRBG を medium として用いた。Act. D 処置群 (Fig. 5) では No. 1, 2, 4, 6, 8 の medium 中に放出された ACTH 活性は各々 16.44 ± 3.12 , 23.75 ± 2.05 , 21.84 ± 1.83 , 26.03 ± 2.86 , $25.74 \pm 2.44 \mu\text{g/gm}$ であった。即ち無処置群と比較して No. 1 medium 中に放出される ACTH 活性は減少するが、その後の ACTH 放出のパターンには有意差がみられなかった。他方, Puro. 処置群 (Fig. 6) に於ては No. 1, 2, 4, 6, 8 の medium 中に放出された ACTH 活性は各々 35.63 ± 2.41 , 25.18 ± 1.80 , 14.11 ± 2.00 ,

Fig. 5. Effect of actinomycin D added in No. 1 medium on ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro

Fig. 6. Effect of Puromycin Added in No. 1 medium on ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro

14.91 $\pm$ 2.12, 12.22 $\pm$ 2.05 μ g/gm であった。Puro. 処置群では初期には無処置群と同様な ACTH 放出パターンを示すが, No. 4 incubation 以後その ACTH 放出は減少した。

なお Act. D の本実験に用いた in vitro ACTH assay 系に及ぼす影響を検討した (Fig. 7)。ACTH (highly purified corticotrophin) 及び Act. D を 2 ml の KRBG を含む flask 中に各々 2×10^{-2} mU, 10 μ g となるように溶解し, O₂ 95%, CO₂ 5% を含む混合ガスで飽和後 37°C で 30 分間 incubate した。その後 0.1N 塩酸で pH を 3.0 とし, 4°C で一夜放置後 KRBG で 10 倍希釈して ACTH assay を行なった。control としては ACTH 2×10^{-2} mU/flask を用いて同様の操作をした。この assay 系に於ては ACTH は 5×10^{-4} mU, Act. D は 0.5 μ g の環境濃度を測定したことになる。ACTH 単独では副腎 1mg 当りのステロイド産生量は 24.49 $\pm$ 9.29 μ g/gm であり, ACTH+Act. では D 23.32 $\pm$ 9.34 μ g/gm であり, ACTH 単独に対して Act. D を添加した為に生じるステロイド産生量の増加率は 100.21 $\pm$ 14.54% であった。即ち Act. D は本実験で用いた ACTH assay 系に影響を及ぼさなかったとしてよい。

(4) L-8-V 添加の影響について

次に L-8-V 60mU/flask を添加して spontaneous ACTH release のパターンに及ぼす影響を観察した。

先ず No. 2 の medium に L-8-V を添加した場合 (Fig. 8) medium 中に放出された ACTH 活性は No. 2 の medium では 45.16 $\pm$ 2.61 μ g/gm であり非添加群に比し有意に高く, No. 4 の medium では

Fig. 7. In vitro effect of actinomycin D on Corticoid production

Fig. 8. ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro after addition of lysine-8-vasopressin in No. 2 medium

$31.14 \pm 3.25 \mu\text{g/gm}$ となり依然として有意に高い活性を示し, No. 2 medium に添加した L-8-V の影響が 1 時間後まで持続した. その後 No. 6, 8 の medium に於ては各々 29.21 ± 3.54 , $22.07 \pm 3.43 \mu\text{g/gm}$ であり非添加群と同程度の活性を示しそれより低くはならなかった. なお No. 1 medium に於ける ACTH 活性は $44.08 \pm 3.29 \mu\text{g/gm}$ であり非添加群との間に有意差はなかった.

次に L-8-V を No. 4 の medium に添加すると (Fig. 9) 添加された medium 中に放出される ACTH 活性は $42.48 \pm 6.03 \mu\text{g/gm}$ と非添加群より有意に高くなつたが, その後の incubation に於ては各 medium 中の ACTH 活性は非添加群より低くはならなかった. 即ち No. 6, 8 の medium に於ける ACTH 活性は各々 21.72 ± 4.93 , $32.83 \pm 3.15 \mu\text{g/gm}$ であつた. なお No. 1 及び 2 の medium 中の ACTH 活性は 52.27 ± 2.95 及び $31.57 \pm 2.19 \mu\text{g/gm}$ であり非添加群との間に有意差はなかった.

No. 6 medium に L-8-V を添加すると (Fig. 10) その medium 中の ACTH 活性は $32.95 \pm 1.99 \mu\text{g/gm}$ となり非添加群に比し有意に高い活性を示したが, その後の incubation に於ける ACTH 活性は No. 8, No. 10 medium で各々 23.36 ± 6.29 , $18.81 \pm 6.50 \mu\text{g/gm}$ であり非添加群より低くはならなかった. なお本処置群の No. 1, 2, 4 medium 中に放出された ACTH 活性は各々 37.31 ± 3.77 , 26.63 ± 3.04 , 17.56 ± 1.80

Fig. 9. ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro after addition of lysine-8-vasopressin in No. 4 medium.

Fig. 10. ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro after addition of lysine-8-vasopressin in No. 6 medium

$\mu\text{g/gm}$ であり非添加群と同じ程度の活性を示した。

以上の実験より L-8-V 添加後の incubation に於て各 medium 中の ACTH 活性が非添加群より低くはならないことが判明した。

(Ⅲ) L-8-V に対する反応性

Stressor としての L-8-V に対する下垂体前葉の反応性を検討する目的で各種条件下で実験を試みた。

(1) preincubation の回数と反応性の関係について (Fig. 11)

Fig. 11. Effect of frequency of preincubation on responsiveness to lysine-8-vasopressin in ACTH release from rat anterior pituitary gland in vitro.

先ず L-8-V に対する反応性に及ぼす preincubation の頻度の影響を観察する為に L-8-V 60mU/flask を No. 2, 4又は6の medium に添加した。各 medium に於ける ACTH 活性は No. 2, 4, 6に於て L-8-V 非添加群では 28.03 ± 1.82 , 12.92 ± 1.67 , $19.13 \pm 3.10 \mu\text{g/gm}$ であつたのに対して、添加群では 43.81 ± 2.59 , 28.45 ± 5.73 , $35.70 \pm 1.12 \mu\text{g/gm}$ であつた。非添加群に対する L-8-V 添加群の medium 中に放出された ACTH 活性の比は No. 2, 4, 6medium に於て各々 168.42 ± 9.71 , 237.21 ± 66.38 , $208.23 \pm 27.84\%$ であつた。即ち L-8-V 添加群は非添加群に比し medium 中の ACTH 活性の増加の絶対量は L-8-V を添加する前の incubation の回数が3回の場合が他の場合に比べ劣るが、preincubation の頻度に関らず有意に大きい。又その非添加群に対する比については preincubation の回数による差異が認められなかつた。

(2) L-8-V 添加時間と反応性の関係について (Fig. 12)

次に下垂体前葉を30分間 preincubation した後で L-8-V 添加或は非添加の際の ACTH 放出に対する incubation time の影響を観察した。L-8-V 非添加群では incubation time が5分間の場合 medium 中に放出される ACTH 活性は $30.42 \pm 3.12 \mu\text{g/gm}$ であり、30分間及び120分間の incubation を施行した場合各々 28.03 ± 1.82 , $34.39 \pm 4.56 \mu\text{g/gm}$ であり、incubation time の長短に関らず medium 中の ACTH 活性の増加する反応には差異は認められなかつた。一方 L-8-V 添加群では5分間の incubation で放出される ACTH 活性は $28.28 \pm 4.80 \mu\text{g/gm}$ であり非添加群との間に有意差が認められなかつたが、30分間、120分間の incubation では $43.81 \pm 2.59 \mu\text{g/gm}$, $58.23 \pm 5.88 \mu\text{g/gm}$ となり有意の増加を示した。L-8-V 添加群の非添加群に対する ACTH 活性比は incubation time が5分間、30分間、120分間の場合各々 91.72 ± 11.09 , 168.42 ± 9.71 , $181.41 \pm 17.42\%$ であつた。即ち L-8-V に対する反応は5分間の incubation では認められなく、30分間以上では120分間 incubation してもその反応性の増大はおこななかつた。

(3) 蛋白合成阻害剤の L-8-V に対する反応性に及ぼす影響について

Act. D $10 \mu\text{g/flask}$ 又は Puro. $50 \mu\text{g/flask}$ の条件下で30分間 preincubation 後、その下垂体前葉を用いて L-8-V 60mU を含む 2 ml の KRBG の medium 中で30分間 incubate し、放出された ACTH 活性

Fig. 12. Effect of final incubation time on spontaneous and lysine-8-vasopressin-induced ACTH release in vitro.

Fig. 13. Effect of pretreatment with actinomycin D on responsiveness to lysine-8-vasopressin in ACTH release in vitro.

Fig. 14. Effect of pretreatment with puromycin on responsiveness to lysine-8-vasopressin in ACTH release in vitro.

を測定した。

Act. D 前処置実験に於て (Fig. 13) medium 中の ACTH 活性は L-8-V 非添加群では $26.81 \pm 1.84 \mu\text{g/gm}$, L-8-V 添加群では $41.64 \pm 4.24 \mu\text{g/gm}$ であり, その非添加群に対する添加群の比は $154.41 \pm 4.78\%$ であった。即ち下垂体前葉は Act. D で前処置しても十分に L-8-V に反応した。

Puro. 前処置実験に於て (Fig. 14) L-8-V 非添加群では medium 中の ACTH 活性は $27.28 \pm 2.43 \mu\text{g/gm}$ であったが, L-8-V 添加群では $45.79 \pm 3.71 \mu\text{g/gm}$ であった。なお後者の前者に対する比は $180.17 \pm 14.04\%$ であり, Puro. で前処置しても下垂体は十分に L-8-V に対する反応性を保持していることが判明した。

IV 考 按

急激な外部環境の変化が生体に加わると, 下垂体より ACTH が分泌される事実に関しては多くの報告が

ある^{1)~3)}。その際 ACTH 分泌の背景として下垂体内の合成機構が関与しているか否か、又関与しているとすればどの時点でどのように関与しているかその詳細に関しては未解決である。外部又は内部環境の変化時に於ける下垂体内 ACTH 含量乃至^{1),4)~6),10),11),14),18)} DNA, RNA 含量^{12),13)}及び ACTH 分泌の変化より ACTH の合成をとりあげたり、アミノ酸又は核酸を放射性同位元素で標識して下垂体内の ADTH 分画^{7)~9)}又は蛋白へ^{8),18)}のとりこみを観察したり、蛋白合成阻害剤で前処置後の下垂体前葉のアミノ酸^{18),19)}乃至は核酸¹⁹⁾のとりこみを観察することにより下垂体内での ACTH の変化をとらえようとした報告がある。しかしこの変化を合成というレベルだけで理解するよりも下垂体内に於ける ACTH の存在形式という面ではとらえねば ACTH 分泌現象の背景にある下垂体内 ACTH の変化を理解し難く思われる。この下垂体レベルでの ACTH の存在形式を検討する為には前記の如く種々の方法があるが、著者は下垂体のホルモン分泌、合成機能をみる目的で下垂体孵置法(下垂体の *in vitro incubation* 法)による観察を行なつた。その方法によれば他の内分泌腺及び神経系の影響を除外することが可能であり、直接下垂体に種々の作用物質を作用させ得るし、更に incubation medium 中に放出された ACTH 活性と同時に下垂体内の化学的变化を知ることができるので、下垂体レベルでの ACTH 分泌現象の解析が可能であるという利点がある。そして連続 incubation 法による下垂体からの spontaneous ACTH release のパターン及び各種薬物の添加によるそのパターンの変化と、stressor としての L-8-V に対する反応性の二面からの解析を行なつた。なお L-8-V の ACTH 放出作用の機序に関しても検討を加えた。

先ず本実験に於ては下垂体前葉を *in vitro* にて incubate し、medium 中に放出される ACTH 活性を牛副腎皮質薄片を使用せる bioassay 法にて測定しているわけであるが、下垂体前葉の incubation の段階で medium 中に確実に ACTH が放出されていることを証明することが必要である。Medium の10倍希釈群、100倍希釈群と標準 ACTH の 0.001mU, 0.0001mU の間で平行性の検定を行なつた結果 Fig. 2 に示した如く平行性が証明され、従つて著者の方法で下垂体前葉を incubation すれば medium 中に確実に ACTH が放出され得ることを知つた。なおこの平行性検定から得られた値より換算すると下垂体 1 mg 当り ACTH 放出の安定した No. 8 の時点で30分間の incubation 中に 0.00048mU の ACTH の放出が認められ、この値は Fleischer 等²⁰⁾、Saffran 等²¹⁾の値に比して極めて低値であるのは測定に供した medium が7回もの medium 交換後の8回目の incubation medium を用いた為であると考えられる。

(I) spontaneous ACTH release について

下垂体前葉を KRBG の medium のみにて incubate した場合 medium 中に ACTH が放出される現象を著者は spontaneous ACTH release と称した。これは下垂体前葉が *in situ* で有している metabolic condition を直接反映した現象と解される。著者の研究の焦点の一つはこの spontaneous ACTH release の連続性の有無と、もし連続性が証明されればその連続性がどのような条件下で変化するかを検討することにある。

Solomon 等²²⁾は同様に *in vitro* での TSH 放出の連続性を検討し、1時間々隔の medium 交換で少なくとも6回の medium 交換迄は TSH 放出が漸減しながらも認められたことを報告している。著者の観察した ACTH 放出の連続性は30分間隔での medium 交換の条件下で No. 4 の medium 即ち2時間迄は放出量は減少するが、それ以後 No. 10 medium 即ち5時間迄微量ながら絶えることなく放出されていること、即ち少なくとも5時間迄は連続性が保証されていることを知つた。この放出パターンの中で No. 1 のそれは断頭屠殺されたラットの *in situ* の下垂体前葉の反応性を反映したものであり、そのような処置が stressor として働き下垂体前葉内での放出され易い ACTH 含量が増加している状態を反映しているものと解される。一般に内分泌腺のホルモン分泌には環境のホルモン濃度よりする feedback 的抑制が想定されており、例えば incubation medium 中の steroid 濃度と incubate された副腎皮質の steroid 放出能との間には或る程度の平衡関係が証明されている。この場合にもこの種の作業仮説を援用すれば説明に便である。即ち恐らく medium 中に放出された ACTH の濃度と incubation 中の下垂体前葉との間に feedback regulation が作動してある程度以上の ACTH 放出は抑制されてしまうのであろうと推定され、No. 2 の incubation

に於てなおかなりの高濃度の ACTH 放出が認められているのは No. 1 の incubation で放出を抑制された下垂体前葉内 ACTH が新しい ACTH-free の medium 中に於て新しい feedback 関係を形成する為と解される。No. 4 以後 No. 10 incubation迄の微量ながら放出されている ACTH も各 incubation に於ける下垂体前葉の状態と medium 中の ACTH 濃度の間に feedback 的な equilibration が形成される迄放出され得ると推定されるが詳細な機序に関しては不明である。

〔II〕 spontaneous ACTH release のパターンと medium 内添加薬剤の関係について

生体から遊離された下垂体前葉が in vitro に於て10回もの medium 交換で合計5時間にわたる incubation の間微量ながら ACTH 放出が保持されていることを認めたが、この驚異的な ACTH 放出の連続性は下垂体前葉内での代謝機転が或る程度保持されている為と考えられる。Lee 等²³⁾は ^{14}C -leucine の下垂体前葉内蛋白へのとりこみが glucose-free の medium に於て著明に減少することを認め、前葉組織の代謝に於ける glucose の占める役割を高く評価している如く、medium 中の glucose が energy source として ACTH 放出の連続性維持に重要であると考えられるのであるが、著者の観察では対照との間に有意な ACTH 放出の減少を証明することはできなかつた。しかし No. 4 以後の incubation に於て放出の低下の値向を認めた。No. 8 即ち4時間目の incubation ではかなりの減少が認められる点より前葉の ACTH 放出に関する自動性保持には glucose はある程度必要と思われる。Goodner²⁴⁾ もその観察に於て glucose が energy source として重畳であろうと示唆している。

一方、前葉内の蛋白代謝がこの ACTH 放出の連続性に何等かの関与をしていることが当然考えられる。

下垂体前葉からの各種ホルモン放出に対する蛋白合成阻害剤の影響に関しては諸家の報告がある。例えば、in vitro で TSH の spontaneous release 及び TRF に対する TSH の放出を Act. D も Cycloheximide も抑制しない²⁵⁾、in vivo でも同様の報告がある²⁶⁾。その他にも in vitro で LH の放出及び LH-RF に対する LH 放出も Act. D 及び Puro. で障害されぬとする報告²⁷⁾、in vivo での Act. D に関する同様の報告²⁸⁾、FSH の放出は in vitro で Act. D 及び Puro. によつても障害されないが、hypothalamic extract に対する FSH 放出は両者によつて抑制されるとする報告²⁹⁾があり、GH-RF に対する GH 放出は in vivo 及び in vitro で Act. D により抑制される³⁰⁾ともいう。これらの in vitro 並びに in vivo に於ける蛋白合成阻害剤の各種下垂体前葉ホルモン分泌に対する影響に関してあるホルモンは抑制され、あるホルモンは抑制されないという奇妙な解離が何に起因するのか問題であるが、ACTH 放出の in vitro での観察に於ける蛋白合成阻害剤の影響に関しては未だ報告が少ない。先ず著者の興味は前項で観察し得た in vitro に於ける spontaneous ACTH release の連続性に対して蛋白合成阻害剤の添加がどのような影響を与え得るかにある。添加された蛋白合成阻害剤が ACTH の分泌に至る迄のどの部分に作用するか不明であり、又 ACTH の分泌に至る迄の過程にのみ特異的であるとは結論できないのであるが、Act. D と Puro. の作用部位の差異を考慮に入れてその影響を観察した。

DNA dependent RNA synthesis の阻害剤といわれる Act. D³¹⁾³²⁾を No. 1 medium に添加した処、その medium 中への ACTH 放出が減少しその後の ACTH 放出のパターンには非添加群と比べ変化がなかつた。Act. D は in vitro に於て60分間 incubate して ^3H -uridine の核酸へのとりこみを $10\mu\text{g/ml}$ 、 $1\mu\text{g/ml}$ で各々98%、86%抑制し、 ^3H -leucine の蛋白へのとりこみを $10\mu\text{g/ml}$ では39%しか抑制しなく、 $1\mu\text{g/ml}$ では抑制がみられないといわれている²⁵⁾。又 $0.5\mu\text{g/ml}$ の Act. D が ^3H -uridine 及び ^{14}C -leucine のとりこみを83%及び23%抑制したとの報告もある¹⁹⁾。in vivo でラットに体重 100g 当り $100\mu\text{g}$ の Act. D を投与すると20時間後にも ^3H -uridine のとりこみの抑制がみられ²⁸⁾、in vitro で $20\mu\text{g/ml}$ で6時間後に75%の抑制が報告されている²⁹⁾。著者の実験結果即ち Act. D 添加時にはその medium 中の ACTH 活性が著明に低いが、その影響は No. 2 incubation 以後では殆んどないという現象に関して次のことが考えられる。第一は Act. D による ACTH 放出の抑制、第二に放出された ACTH の Act. D による不活化、第三は用いた ACTH assay 系への抑制等が考えられ、Arimura 等¹⁹⁾は in vitro の実験より Act. D が下垂体内の ACTH の readily releasable pool を減少させるのではないとも言っているが、著者の実験も

デルではこの考えを肯定し難い。即ち下垂体内の ACTH の readily releasable pool が Act. D によって減少させられるということはその ACTH が medium 中へ放出されたということであるが、著者の No. 1 medium 中ではむしろ ACTH 活性が極めて低値であつた。又 No. 1 incubation に於てそのような現象が起これば、No. 2 incubation に於てもその影響が現れ、ACTH 放出が減少する筈であるが、実験結果ではそれは認められなかつた。又 medium をそのまま希釈して in vitro の ACTH assay 系に供するという著者の実験モデルでは medium 中の Act. D が副腎皮質レベルで ACTH 作用を抑制する可能性が存在するが、これは Fig. 7 で示した予備実験で否定され、Ferguson 等³³⁾ もその in vitro の実験で否定している。又この Fig. 7 の実験結果より ACTH の不活化も否定される。以上の考察から従つて、Act. D は下垂体前葉からの spontaneous ACTH release を抑制するのではないかと考えられる。そして現象的には No. 1 medium に添加された Act. D の影響は No. 2 incubation 以後に及ぶことなく No. 8 incubation に至る迄 spontaneous ACTH release のパターンは Act. D によつて影響されない。

Act. D の作用時間が30分間という短い時間であつたことを考慮に入れる必要はあるが、少なくとも Act. D では孵置下垂体前葉の連続的な ACTH 放出は抑制されないことを知つた。

これに対して sRNA からアミノ酸の合成を妨げ³⁴⁾、更には ACTH 合成をも抑制するといわれる Puro. の影響について観察すると、No. 1 medium に添加後 No. 2 incubation 迄は非添加群との間に差異はないが、No. 4 incubation 即ち3回の medium 交換後の medium 中への ACTH 放出に減少が認められ、No. 8 incubation に於ては殆ど medium 中に ACTH 活性が認められなくなっていることを知つた。即ち spontaneous ACTH release の連続性は Puro. によつて阻害された。

Watanabe 等²⁹⁾は下垂体前葉を6時間 incubate し、Puro. 20 μ g/ml による ¹⁴C-アミノ酸の蛋白へのとりこみが9.3%抑制されることを報告しているが、このアミノ酸の蛋白へのとりこみを抑制する Puro. と uridine の RNA へのとりこみを抑制するといわれる Act. D とを同じように No. 1 medium へ添加し、30分間それら蛋白合成阻害剤と接触させられた下垂体前葉がその後の spontaneous ACTH release に於て相異した反応パターンを示したことは興味あることである。それは spontaneous release を来し得る ACTH の下垂体内での動員様式に関して示唆を提供するからである。

この下垂体前葉内での直ちに放出可能な ACTH のプール即ち ACTH の readily releasable pool の想定と spontaneous ACTH release の連続性の背景とを考察する場合、ある種の stressor を用いて readily releasable pool の変動を強制した後の spontaneous ACTH release を観察することが必要と思われる。Fig. 8, Fig. 9, Fig. 10 は in vitro での stressor として L-8-V を用いてその観察を行なつた結果である。L-8-V の ACTH 放出現象の作用部位に関しては論が多いところであり、視床下部に作用して CRF を動員させるという立場³⁶⁾、或は CRF 分泌神経細胞の axon が下垂体門脈の開口部に作用する可能性を唱えている立場³⁷⁾等があり混乱しているが、著者等の研究グループの一連の in vivo^{2), 3), 38)}, in vitro^{38), 39)}の観察では L-8-V はむしろ下垂体前葉への直接作用が大であるように考えられる。in vivo 於ては^{40), 41)}ともかく、in vitro に於て下垂体前葉への直接作用を支持する報告は多い⁴²⁾。この L-8-V を No. 2 medium に添加し ACTH 放出を強制させられた下垂体前葉は No. 4 incubation に於て ACTH 放出が消失する可能性があるかと想定されたが、実際には非添加群に比して高濃度の ACTH を放出していることが観察され、No. 6, No. 8 incubation に至る迄 ACTH 放出が維持されていることを知つた。又 No. 4 medium に添加した場合も、No. 6 medium に添加した場合も前者では No. 8 incubation、後者では No. 10 incubation 迄明らかに ACTH 放出が持続している。

下垂体内或は体液中の ACTH の存在形式に関しては実験的試みと speculative な展望とが数多く報告されている。即ち Dasgupta 等は1958年牛の下垂体粗抽出物を酸処理又は尿素処理すると Sayers test で活性を示すことを見出し、これを corticotrophin の precursor という意味で precorticotrophin と名付けた⁴²⁾。そして下垂体内の全 corticotrophic activity の少なくとも80%はこの precorticotrophin の形で存在していると報告している⁴³⁾。又 Currie 等は ACTH はヒト下垂体内で 2.5% TCA で抽出可能な low

molecular weight component と protein 又は protein-bound component の二型に分けられて存在し、前者は全 ACTH 活性の約30%であると述べている⁴⁴⁾。

著者は本実験、即ち spontaneous ACTH release 並びにその放出パターンに及ぼす Act. D, Puro., L-8-V 添加の影響から下垂体内の ACTH プールに関して次の想定を行なつた。即ち下垂体内に於て ACTH は readily releasable pool¹⁹⁾ とその前段階の inactive ACTH pool の型で存在するのではないかと想定した。Puro. はこの両プールの前段階の蛋白合成を障害すると考えられ、Puro. により No. 4 incubation 以後で spontaneous ACTH release が障害されることからこの両プールの ACTH 放出予備能は1時間半以下という小さいものと考えられる。又 medium 中に stressor として L-8-V が添加されると medium と下垂体前葉との間の新しい homeostasis が形成される迄 medium 中への ACTH 放出が持続するが、その完成と共に ACTH 放出は終止し、下垂体前葉内での ACTH の readily releasable pool もそれに従つて新しい equilibration に入るものと想定される。

〔Ⅲ〕 in vitro に於ける L-8-V の ACTH 放出作用について

Fig. 11 に示した如く preincubation の回数の差異に関らず下垂体は L-8-V に対して十分な反応性を有して、その L-8-V 添加群の非添加群に対する ACTH 放出の増加量は preincubation が1, 3, 5 回の時各々 15.78, 15.53, 16.57 $\mu\text{g/gm}$ と略等しかつた。下垂体は同じ強さの stress に対してはその preincubation の頻度の差異という条件付け、即ち L-8-V による stress 前の readily releasable pool の大きさに関らず殆ど同じ大きさの反応を示している。それが十分に可能な readily releasable pool を有するとの考え方からすれば下垂体はこのような反応の中を十分にもっているものとせねばならない。

更に spontaneous ACTH release は5分間の incubation で十分起こることが証明されたが、incubation 時間を延長しても ACTH 放出の増加が認められないことは medium 中の ACTH と readily releasable pool の ACTH の間に平衡関係が成立する為と解される。又 L-8-V に対する反応の出現には5分以上要した。この lag time 及び Fig. 11 で示された如く readily releasable pool のまだ十分残存していると考えられる No. 2 incubation と、そのプールが最も減少して inactive ACTH pool からの交換によつてその補充を行ない初めて ACTH を放出していると思われる No. 4 incubation とに於て略等しい量の ACTH 放出が認められることは L-8-V が細胞膜にのみ作用してその透過性を亢進して大量の ACTH を放出していると考えられるよりも、inactive ACTH pool から readily releasable pool への変換を促進してそのために十分に大量の ACTH を放出できる程の readily releasable pool を形成している、又はその両者であると考えた方が妥当である。

著者の未発表の成績では L-8-V 添加後15分間の incubation で30分間の場合と略等しい量の ACTH 放出を示した。この時間的關係は老韮²⁾の報告している種々の stress の下で CRF が発動されて plasma ACTH の上昇するまでの時間に略一致している。このことより CRF の ACTH 放出作用は inactive ACTH pool から readily releasable pool への変換を促進し、一部は細胞膜の透過性を亢進することにあると推論するのが妥当であろう。

L-8-V 添加の非添加に対する ACTH 放出の増加量は30分間の incubation では 15.78 $\mu\text{g/gm}$ であり、120分間の場合は 23.84 $\mu\text{g/gm}$ であり統計学的に有意差を認めた。これは L-8-V の作用時間の差異によるものであろう。しかし更に長時間の incubation を施行するなら、inactive ACTH pool は比較的小さいから L-8-V による ACTH 放出の増加量は時間と共に減少し、遂には一定となるであろうと考えられる。

前述のような急激な刺激下に於ける ACTH 放出と下垂体内の蛋白合成との関係は興味深い問題である。Vernikos-Danellis¹⁾ は stress 後の下垂体の ACTH 放出能力は新 ACTH の合成能力に依存するらしいと述べている。著者は先に L-8-V の作用部位を想定したが、もしこの L-8-V が蛋白合成レベル以下に作用するか、又はその作用が少なくとも蛋白合成に無関係であるならば、in vitro に於て蛋白合成阻害剤で前処置後の下垂体に stressor として L-8-V^{39)~41)}の作用させても十分反応する筈である。著者の実験では下垂体は絶対量に於ても又 L-8-V 非添加群に対する比に於ても L-8-V 添加により ACTH 放出を十分に引

起す成績を得た。この反応性は Puro. で120分間前処置した後も同様であつた。(未発表)。この事実は L-8-V の作用部位が蛋白合成レベル以下又は少なくとも L-8-V の ACTH 放出作用が蛋白合成に無関係であることを証明するものであり、且又急激な刺激下で蛋白合成、更には ACTH 合成よりも先ず ACTH の放出が起こることを意味している。同様のことが in vivo に於て Estep 等¹⁸⁾により報告されている。以上の L-8-V に対する下垂体の反応性と preincubation の回数、L-8-V の添加時間及び蛋白合成阻害剤との関係より下垂体は急激な刺激に対する十分な ACTH 放出予備能を保持し、その際蛋白の合成よりも ACTH の放出が一次的に起こると解された。又その stressor の一つである L-8-V は inactive ACTH pool から readily releasable pool への変換の促進、又はそれと同時に細胞膜の透過性の亢進により下垂体から大量の ACTH を放出させ、これは蛋白合成とは無関係であろうと推察された。なお CRF の ACTH 放出作用も L-8-V に於けると同様であると推論された。

V 結 論

in vitro 連続 incubation 法を用い、下垂体前葉組織片からの spontaneous ACTH release のパターン及び各種薬物のそのパターンに及ぼす影響と stressor としての L-8-V に対する下垂体前葉組織片の反応性の二面からの解析を行ない、次の結論を得た。

(I) spontaneous ACTH release について

(i) 下垂体前葉を KRBG の medium のみにて incubate した場合、medium 中に ACTH が放出される現象を spontaneous ACTH release と称した。

(ii) 下垂体前葉からの spontaneous ACTH release は2時間目迄は徐々に減少し、その後5時間目迄微量ながらその放出の連続性を認めた。その間を通じ下垂体前葉内 RNA/DNA は略一定であつた。

(II) spontaneous ACTH release に及ぼす medium 内添加薬剤の影響について

(i) glucose-free の medium (KRB) でも 200mg % の glucose を含む medium (KRBG) と同様の ACTH 放出のパターンを示した。

(ii) 最初の incubation medium に Act. D を添加した場合、その時のみ ACTH 放出の減少があつたが、その後の spontaneous ACTH release は障害されなかつた。

(iii) Puro. を最初の incubation medium に添加した場合は2時間目以後 ACTH 放出の減少が認められた。

(iv) L-8-V を incubation 後1, 2又は3時間目の medium に添加すると、各々の場合下垂体前葉は十分な反応を示し、略等しい量の ACTH を放出し、その後の spontaneous ACTH release は L-8-V 非添加群と比較して減少を示さなかつた。

(v) 以上の実験結果より、下垂体前葉内に於て ACTH は readily releasable pool とその前段階の inactive ACTH pool の型で存在し、その pool は著者の in vitro に於ける実験では約1時間半の ACTH 放出予備能を有すると推察された。そして L-8-V 添加により medium と下垂体前葉との間の平衡が破れ、ACTH 放出が起こり、readily releasable pool の減少が inactive ACTH pool からの動員を誘発し、こうして順次 ACTH 生成系の変動を起こす。medium と readily releasable pool との間の新しい平衡の成立と共にこの一連の系も徐々に平衡関係を樹立し、ACTH の生成、放出反応が一定となると解された。

(III) in vitro に於ける L-8-V の ACTH 放出作用について

(i) preincubation の頻度に関係なく下垂体は L-8-V に対して十分反応性を有した。

(ii) spontaneous ACTH release は5分間で認められ、その後 incubation 時間を120分迄延長しても変化はなかつた。L-8-V に対する下垂体の反応は5分間の incubation では認められなかつた。30分間の incubation で認められ、120分間の incubation では一層 ACTH の放出が増加した。

(iii) 蛋白合成阻害剤で前処置後の下垂体の L-8-V に対する反応性は十分に認められた。

(iv) 以上の実験結果より、L-8-V は inactive ACTH pool から readily releasable pool への変換を促

進し、後者の pool の増大をもたらし ACTH 放出を来すが、一部には細胞膜の透過性も亢進すると考えられ、これらは蛋白合成とは無関係であろうと推察された。なお CRF の ACTH 放出作用もこれと同様であると推論された。更に急激な刺激下では下垂体内の蛋白合成更には ACTH 合成よりも先ず ACTH の放出が起こると想定された。

尚本論文の要旨は第42回日本内分泌学会総会に於て発表した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師辻昇三教授に深甚なる謝意を表します。又研究の当初より種々御指導、御教示を戴きました安井博和博士に深謝致しますと共に実験に当り御協力戴いた教室 ACTH 研究グループの諸先生方に心から感謝致します。

文 献

- 1) Vernikos-Danellis, J. : *Endocrinology*, 72 : 574, (1963).
- 2) Oimomi, M. : *Folia Endocr. Jap.*, 44 : 1056, (1968).
- 3) Kohzuki, Y. : *Folia Endocr. Jap.*, 45 : 939, (1969).
- 5) Gemzell, C.A., D.C. Van Dyke, C.A. Tobias and H.M. Evans : *Endocrinology*, 49 : 325, (1951)
- 5) Sydnor, K.L. and G.Sayers : *Endocrinology*, 55 : 621, (1954).
- 6) Fortier, C. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100 : 13, (1959).
- 7) Jacobowitz, D., B.H. Marks and J. Vernikos-Danellis : *Endocrinology*, 72 : 592, (1963).
- 8) Wool, I.G., R. Scharff and N. Mages : *Amer. J. Physiol.*, 201 : 547, (1961).
- 9) JACOBOWITZ, D., B.H. Marks and J. Vernikos-Danellis : *Fed. Proc.*, 22 : 507, (1963).
- 10) Hess M., J.J. Corrigan, Jr. and J.A. Hodack : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100 : 763, (1959).
- 11) Hess, M., J.J. Corrigan, Jr. and J.A. Honack : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106 : 420, (1961).
- 12) Kraicer, J. and S.C. Cheng : *Amer. J. Physiol.*, 214 : 158, (1968).
- 13) Kraicer, J., M. Herlant and F. Duclos : *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, 45 : 947, (1967).
- 14) Ducommun, P., S. Ducommun, M. Jobin, M. Jobin, J. Kraicer, P. Mialhe, C. Mialhe-Voloss and C. Fortier : *Schweiz. Med. Wschr.*, 94 : 892, (1964).
- 15) Yasui, H., M. Cimomi, Y. Kohzuki, H. Taniguchi, M. Higashi, S. Itoh and S. Tsuji : *Folia Endocr. Jap.*, 44 : 754, (1968).
- 16) Schneider, W.C. : *J. Biol. Chem.*, 164 : 747, (1946).
- 17) Yasui, H. : *Folia Endocr. Jap.*, 41 : 643, (1965).
- 18) Estep, H., P.F. Mullinax, R. Brown, K. Blaylock and E. Butts : *Endocrinology*, 80 : 719, (1967).
- 19) Arimura, A., C.Y. Bowers, A.V. Schally, M. Saito and M.C. Miller III : *Endocrinology*, 85 : 300, (1969).
- 20) Fleischer, N. and W. Vale : *Endocrinology*, 83 : 1232, (1968).
- 21) Saffran, M. and A.V. Schally : *Canad. J. Biochem. Physiol.*, 33 : 408, (1955).
- 22) Solomon, S. H. and J.M. McKenzie : *Endocrinology*, 78 : 699, (1966).
- 23) Lee, K.L., C.Y. Bowers and O. Neail Miller : *Endocrinology*, 83 : 754, (1968).
- 24) Goodner, C.J. : *Endocrinology*, 75 : 846, (1964).
- 25) Vale, W., R. Burgus and R. Guillemin : *Neuroendocrinology*, 3 : 34, (1968).
- 26) Bowers, C.Y., K. Lee and A.V. Schally : *Endocrinology*, 82 : 303, (1968).
- 27) Crighton, D.B., S. Watanabe, A.P.S. Dhariwal and S.M. McCann : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128 : 537, (1968).
- 28) Schally, A.V., C.Y. Bowers, W.H. Carter, A. Arimura, T.W. Redding and M. Saito : *Endocrinology*, 85 : 290, (1969).
- 29) Watanabe, S., A.P.S. Dhariwal and S.M. McCann : *Endocrinology*, 82 : 674, (1968).
- 30) Schally, A.V., E.E. Muller and S. Sawano : *Endocrinology*, 82 : 271, (1968).
- 31) Samuels, L.D. : *New. Eng. J. Med.*, 271 : 1301, (1964).
- 32) Hurwitz, J., J.J. Furth, M. Malamy and M. Alexander : *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 48 : 1222, (1962).
- 33) Ferguson, Jr., J.J. and Y. Morita : *Biochim. Biophys. Acta*, 87 : 348, (1964).
- 34) Nathans, D. : *Fed. Proc.*, 23 : 984, (1964).
- 35) Adiga, P.R., I. Uemura and T. Winnick : *Biochemistry Wash.*, 4 : 246, (1965).

- 36) Hedge, G.A., M.B. Yates, R. Marcus and F.E. Yates : *Endocrinology*, 79 : 328, (1966). 37)
Hedge, G.A. and P.G. Smelik : *Neuroendocrinology*, 4 : 242, (1969). 38) Yasui, H. : *J. Jap.*
Med. Ass., 60 : 552, (1968). 39) Nakai, Y. : *Folia Endocr. Jap.*, 43 : 957, (1967). 40)
Grindeland, R.E., F.E. Wherry and E. Anderson : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 110 : 377, (1962)
41) Gwinup, G., T. Steinberg, C.G. King and J. Vernikos-Danellis : *J. Clin. Endocr.*, 27 : 927, (1967)
42) Dasgupta, F.R., and F.G. Young : *Nature*, 182 : 32, (1958). 43) Dasgupta, P.R., S.A.
Margolis and R.I. Dorfman : *Acta Endocr.*, 55 : 31, (1967). 44) Currie, A.R. and B.M.A.
Davies : *Acta Endocr.*, 42 : 69, (1963). 45) Ando, S., L.B. Guze and E.M. Gold : *Endocrinology*, 74 : 894, (1964).