Studies on the Hypothalamic Neurohumoral Factor with Special Reference to the Thyrotropin Releasing Factor

Minoru ASAMI

The 2nd Department of Internal Medicine, Kobe University, School of Medicine,
Kobe, Japan (Director : Professor Shozo Tsuji M.D.)

Recently, a number of neuroendocrinological studies have revealed that certain releasing factors play an essential role in the regulation of pituitary tropic hormone secretion. With regard to T R F (Thyrotropin Releasing Factor) there is also a great deal of evidence indicating its existence, but the nature of T R F is not quite clear. The author has thus tried to isolate active principle acting as TRF from bovine hypothalamus and to clarify the nature of TRF.

Bovine hypothalamus (anterior part and posterior part) and cerebral cortex were extracted by the method according to Kamm Aldrich which was reported as an extracting method for posterior pituitary hormones. These crude extracts were injected into the rats, and thyroidal effect was estimated by the Leblond's method and antidiuretic effect was tested by Van Dyke's method. Distinct thyroidal effect and antidiuretic activity were found in the crude extract of the anterior hypothalamus, but not in the extract of the posterior hypothalamus and cerebral cortex. The thyroidal effect of crude extract was not observed in the hypophysectomized rat. And plasma TSH activity after injection of these crude extracts in dogs, increased only in the case of anterior hypothalamic extract. Judging from these phenomena it was considered that hypothalamic extract acted via hypophyseal TSH.

The crude anterior hypothalamic extract was then fractionated by DEAE-Sephadex A-50 column using phosphate buffer with stepwise increasing ion-density. Five fractions, i.e., A, B, C, D and E were obtained. These 5 fractions were tested thyroidal effect, antidiuretic activity and TRF activity.

These 5 fractions were injected into the rat and thyroidal ^{131}I release was determined by Brown-Grant's method. Most significant ^{131}I release was observed after injection of fraction D and a very slight increase after injection of fraction B, but in hypophysectomized rats the thyroidal effect of fraction D was not observed. ADH activity was seen in fraction D most significantly and slightly in fraction A when estimated by Dicker's method. To determine TRF activity these 5 fractions were administered to the rats intravenously and plasma TSH levels were followed up by Mc Kenzie method. A marked increase of plasma TSH level was observed only after injection of fraction D.

It was verified that fraction D did not contain any TSH contamination and it did not inhibit metabolic degradation of TSH in peripheral tissue, and furthermore, this material did not act via endogenous TRF but directly on the pituitary itself.

Thus, the author has clearly shown that the thyrotropin releasing effect of fraction D is of a nature quite specific. A chromatographical study of fraction D showed that this fraction is a sort of biologically active peptide, but is different from known active amines and peptides in biological and chromatographic behavior. (See pp. 189~206)

視床下部液性支配因子

—特に TSH 放出因子—に関する研究

神戸大学医学部第二内科 (指導 辻 昇三教授)

阿 佐 美 実

(昭和44年12月18日受付)

視床下部にその存在が想定されている TSH 放出因子 (TRF) の抽出分離を試み、且つ TRF の本態を確めるために、大量の牛視床下部を Kamm Aldrich の方法で抽出し、更に DEAE-Sephadex A50 を使用したカラムクロマトにより分画化して得られた D 分画に特異的な TRF 効果を認めた。TRF の本態は後葉ホルモンや既知の活性アミン類や Peptide とは異つた特異的なものである事を示した。

緒 言

外界刺激や環境の変化が個体の内分泌機能に影響を与えていることは、古くより知られている所である。下垂体甲状腺系もこの例外ではなく、甲状腺疾患が外界や環境の変化により影響されている事は古くより認められている。そして、近年の Neuroendocrinology の発達により、視床下部が下垂体前葉の機能を支配している事が明らかとなるにつれ、外界と個体との反応が、外界—神経系—視床下部—下垂体—内分泌系といった一連の反応形式で理解されるようになって来た。そして、神経系と内分泌系の接触点という意味で、視床下部が脚光を浴びてきたが、前葉の分泌神経の存在が全般としては否定されている今日では、視床下部の内分泌機能に対する役割の一つは、Feed Back 機構に関連して、下垂体門脈を介した液性因子を前葉に送りこむ機能が想定されている。そして、近年、視床下部の液性因子の探求もようやく試みられ、視床下部に RF (Releasing Factor) を認めたという報告も散見されるようになってきた。この RF の研究で最も早く手のつけられたのが CRF であり、その本態は後葉ホルモン類似の Basic Peptide であると想定されている。所が TSH に対する視床下部液性因子 (TRF) の探求は、未だ殆んど手がつけられておらず、その本態は勿論、その存在の立証すら確認されていない現状である。それ故、視床下部抽出物より TRF の探求を行つた報告は極めて少ない。

そこで著者は Vasopressin の抽出方法に従へば、類似した Peptide も contaminant として抽出されてくるものと考え、牛視床下部を Kamm Aldrich¹⁾の方法で抽出を行い、更にカラムクロマトグラフィにより精製を行い、各々の抽出物について TRF 効果、抗利尿効果を検討し、みるべき成績をあげたので以下に報告する。

第1章 実験対象と実験方法

第1節 実験対象

実験対象としては、犬、ラット、マウスを使用した。犬は体重 8～12kg の雄成犬を十分にならして使用した。ラットはウィスター純系の雄ラットの体重 150～200g のものを使用した。マウスは DD 系の雌マウス (体重 15±1g) を使用した。実験動物は環境、温度、湿度、照明等を常に一定に保つように努力し、特に食餌のヨード含有量を一定ならしめるよう考慮を払つた。

第2節 実験方法

1) 抗利尿効果 (犬)

犬を用いる抗利尿効果の判定は両側輸尿管外瘻造設術を行つた犬について、Van Dyke³⁾の方法に準じて行つた。即ち、犬の両側輸尿管を取り出し、腎側にポリエチレンチューブを挿入して外瘻を作り、術後数日を経たのち実験に供した。実験当日は絶食とし、ペントバルビタールソーダ麻酔下で、胃管により約500ccの水を注入し、その後5分毎に尿量を測定し、尿量の一定化してきた所で検体を静脈内に投与した。そして、検体投与前15分間の1分当り尿量をA、検体投与後15分間の1分当り尿量をBとするととき $\frac{A-B}{A} \times 100$ を算出し、これを便宜上、尿量減少率 (Antidiuretic Index) という表現で記した。

2) 抗利尿効果 (ラット)

ラットを用いた抗利尿効果の測定は Dicker³⁾ 及び糸賀の⁴⁾方法に準じて行つた。即ち、24時間水のみを投与したラットに、12%エタノール 5.0cc/100g B.W.を経口的に投与して麻酔を行い、膀胱カテーテルにより持続的に採尿する。尚、排尿量にひとしく2%エタノールを経口的に投与する。尿量の一定してきた時に尾静脈により検体を静脈内に投与し $\frac{\text{検体投与後10分間の尿量}}{\text{検体投与前10分間の尿量}} \times 100 = \text{ADR (Antidiuretic Response)}$ で表した。

3) ラット下垂体甲状腺機能指標⁵⁾⁶⁾i) 甲状腺 ¹³¹I 摂取率

¹³¹I 25cμ を 0.5cc の生理的食塩水に溶解して、ラットの腹腔内に投与し、正確に 24 時間後に心臓穿刺により失血死せしめた後、甲状腺の左葉を摘出秤量し、2N 苛性ソーダ 10cc と共に加熱溶解し、正確にその 1cc をとり乾燥後 GM 管で計測した。

ii) PB ¹³¹I 転換率

上記の血清 0.5cc を 10%硫酸亜鉛と 0.5N 苛性ソーダで除蛋白洗滌した沈澱物を、2N 苛性ソーダで溶解し、乾燥後 GM 管で計測した。別に血清 0.5cc を乾燥させて GM 管で計測し、その比を百分率で示した。

iii) T/S ¹³¹I 濃度比

上記ラットについて $\frac{\text{甲状腺 1mg の C.P.M}}{\text{血清 0.1cc の C.P.M}}$ で示した。

4) ラット ¹³¹I 放出率測定

Brown Grant⁷⁾ 及び Schreiber⁸⁾ の方法に準じて行つた。即ち、ラットに ¹³¹I 25μc を腹腔内に投与した後、頸部カウンターの減衰のパターンを観察する方法である。ラットを軽くエーテルで麻酔した後、頸部を固定し、直径 1cm の口径を有するコリメーターを取りつけた GM 管をラットの頸部に当てて計測する。この場合、GM 管と甲状腺の距離は、厳密に一定にする必要がある。このよいにして 30秒ずつ 5 回計測を行い、その平均値を頸部カウンタとした。¹³¹I 投与後、24時間目の頸部カウンタを 100 とし、その後のカウンタを百分率で示し、半対数グラフに ¹³¹I 放出曲線を示した。

5) ラット下垂体剔除法

田中氏⁹⁾の脳下垂体剔除法に従つた。尚、実験終了後、下垂体のないことを確めた。

6) 血漿 TSH

i) 犬血漿 TSH 様活性の測定は牛甲状腺スライスを用いる in vitro の Bakke-小倉法¹⁰⁾により測定した。

ii) ラット血漿 TSH 活性

ラット血漿 TSH 活性の測定は in vivo の Mc Kenzie 法¹¹⁾により測定した。即ち、1群 8~10匹の♀マウス (体重 15g) に 10μc の ¹³¹I を腹腔内に投与した後、正確に 4 時間及び 24 時間後にそれぞれ 10μg の T₄ を皮下に投与する。第 2 回目の T₄ 投与後 48 時間を経て後、一側眼静脈叢より正確に 0.2cc 採血し、¹³¹I 量を測定する。次で尾静脈より 0.4cc の検体を投与し、その後 2 時間を経て、他側眼静脈叢より 0.2cc 採血し ¹³¹I 量を測定する。

$\frac{\text{検体投与後 2 時間目の } ^{131}\text{I 量}}{\text{検体投与前の } ^{131}\text{I 量}} \times 100$ で TSH 量を表した。

7) 主な使用薬物

Vasopressin : Pitressin (Parke Davis)

合成 Vasopressin : Lysine-8-Vasopressin, (Sandoz)

Arginin-8-Vasopressin (Sandoz)

TSH : Pretiron (Schering A.G.)

 α -MSH : (Schally's Laboratories)

第2章 牛視床下部粗エキスの抗利尿効果並びに下垂体甲状腺系機能に対する影響

第1節 抽出方法

屠殺後出来るだけ早期に牛視床下部を、粉末状にしたドライアイスで凍結せしめた後、血管を除去し、前は視束交叉の前縁、後は乳頭体後縁、上は視床下溝、下は下垂体柄の根元で下垂体と切り離した。この場合、腺葉、神経葉は勿論のこと、結節部も含まないように注意した。横は中線より約0.5cmの巾を切りとり、更に二分して前及び後視床下部とした。そして1回の抽出には約100頭づつを使用し、総計約一万頭の牛視床下部を使用した。抽出方法は(Fig. 1)に示すように Kamm Aldrich¹⁾の方法に準じて行つた。即ち、前及び後視床下部を秤量後、希醋酸水で加熱抽出を行い、更に冷却せる希醋酸水で抽出を二回繰り返す。この抽出液を合して硫酸アモンで塩析を行ない、蛋白成分を析出させる。

これを醋酸で抽出してエーテルと石油エーテルで有効成分を沈澱させた後、醋酸抽出、エーテル沈澱をくり返したものを視床下部粗エキスとした。尚、対照として同じ牛の頭頂葉皮質をも同様の方法で抽出した。抽出した粗エキスは、乾燥デシケーターに入れて冷暗所に保存し、早期に実験に供した。尚このようにして抽出しうる粗エキスの量は、牛視床下部 100g より約100ないし300mg程度であつた。

第2節 抗利尿効果

前及び後視床下部粗エキス並びに大脳皮質抽出物の一定量を秤量し、0.5ccの生理的食塩水に溶解して十分に遠沈した後、その上清を輸尿管外瘻を設定した犬の静脈内に投与した。

それぞれの検体を投与した場合の抗利尿効果は (Table 1) に示す様に、各抽出物とも投与量を増せば、その尿量減少率は多少増加の傾向を認めるが、前視床下部粗エキス投与群は、後視床下部粗エキス投与群や皮質抽出物投与群にくらべて、極めて高い尿量減少効果を示している。尚、本法によると Pitressin 1単位は52.2%の尿量減少率を示し、前視床下部粗エキス 5mg 投与の場合に近い抗利尿効果を示した。

第3節 ラット下垂体甲状腺機能に対する影響

体重 150g の雄ラットに前及び後視床下部並びに大脳皮質より抽出した粗エキスを、それぞれ 1mg づつ 0.5cc の生理的食塩水に溶解して、5日間筋肉内に投与し、最後の注射ののち24時間で失血死せしめた後、第1章でのべた方法に従つて、甲状腺重量、¹³¹I 摂取率、PB ¹³¹I 転換率、T/S ¹³¹I 濃度比を測定した。尚、生理的食塩水を 0.5cc づつ5日間投与したものを対照群とした。

Fig. 1. Preparation method of crude extract.

Table 1. Antidiuretic effect of crude extracts

$$\text{Antidiuretic index \%} = \frac{\left(\text{Urine Vol. of 15min.} \right)_{\text{before administ.}} - \left(\text{Urine Vol. of 15min.} \right)_{\text{after administ.}}}{\left(\text{Urine Vol. of 15min.} \right)_{\text{before administ.}}} \times 100$$

	Dosis	No. of animal	Antidiuretic index % mean $\pm$ S.E.
Pitressin	1 U	5	52.2 $\pm$ 2.4
Anterior hypothalamus	1.0mg	5	37.0 $\pm$ 8.0
	2.5mg	3	47.0 $\pm$ 1.4
	5.0mg	5	52.0 $\pm$ 11.5
Posterior hypothalamus	2.5mg	6	6.3 $\pm$ 3.9
	5.0mg	5	6.4 $\pm$ 4.6
Cerebral cortex	2.5mg	5	0
	5.0mg	5	6.8 $\pm$ 3.3

Table 2. Effect of crude extracts on the function of thyroid gland in normal rats and hypophysectomized rats

		No. of rats	Thyroid weight mg/B.W.	¹³¹ I-Uptake %	PB ¹³¹ I Conversion ratio	T/S ¹³¹ I %
Normal rats	Saline (control)	10	5.17 $\pm$ 0.26*	26.0 $\pm$ 0.81	50.6 $\pm$ 1.85	22.7 $\pm$ 1.35
	Anterior hypothalamus	7	7.00 $\pm$ 0.09 P < 0.01**	36.2 $\pm$ 3.20 P < 0.01	57.0 $\pm$ 2.11 P = 0.05	27.8 $\pm$ 1.61 P < 0.05
	Posterior hypothalamus	7	5.06 $\pm$ 0.09	27.4 $\pm$ 3.40	54.4 $\pm$ 2.20	22.6 $\pm$ 2.20
	Cerebral cortex	7	6.10 $\pm$ 0.05	21.7 $\pm$ 1.13	48.2 $\pm$ 4.76	19.9 $\pm$ 1.93
Hypophysectomized rats	Saline (control)	6	4.90 $\pm$ 0.45	15.1 $\pm$ 1.22	25.3 $\pm$ 1.64	16.3 $\pm$ 0.88
	Anterior hypothalamus	6	4.60 $\pm$ 0.20	15.1 $\pm$ 1.63	25.0 $\pm$ 0.52	16.0 $\pm$ 0.65

* mean $\pm$ S.E. ** P-Value compared with control

その結果は (Table 2) に示すように、前視床下部粗エキスイタ群はそのいずれの指標に於ても、後視床下部粗エキスイタ群や皮質粗エキスイタ群、並びに生食を投与した対照群にくらべ、甲状腺機能を亢進させる作用のあることがわかる。

次にこの前視床下部粗エキスイタの甲状腺効果が、下垂体 TSH を介した作用であるか或いは、甲状腺への直接作用であるのかを確かめるために、垂別ラットについて同様の実験を行つた。即ち垂別 5 日目より前視床下部粗エキスイタ 1mg を 5 日間筋肉内に投与したものと、生理的食塩水を 5 日間投与したものとについて甲状腺機能を比較した。その結果は、(Table 2) に示しているように、垂別ラットは正常ラットに比べ明らかに甲状腺機能の低下を認めると共に、前視床下部粗エキスイタ投与群と生理的食塩水投与群の間には、その甲状腺機能に有意の差を認めない。即ち、前視床下部粗エキスイタは垂別ラットに対しては、正常ラットに示した様な甲状腺効果を示さない。それ故、本抽出物は下垂体 TSH を介して甲状腺に働くものと考えられる。

第 4 節 犬血漿 TSH 様活性に及ぼす影響

前及び後視床下部、並びに大脳皮質より抽出したそれぞれの粗エキスを 2mg を 0.5cc の生理的食塩水に溶解し、雄成犬の頸静脈内に投与した。そして、投与前及び投与後、30分、60分、120分、に他側頸静脈より採血して、血漿 TSH 様活性を Bakke-小倉法¹⁰⁾で測定した。

今、検体投与前の TSH の値を 1 とし、その増減の倍率を半対数グラフに示すと、(Fig. 2) の様になる。尚、点線は増減の倍率の平均値である。この事から前視床下部粗エキスには、後視床下部粗エキスや皮質エキス投与群にくらべ血漿 TSH 様活性を上昇させる作用があるといえる。

Fig. 2. Effect of hypothalamic extracts on plasma TSH activity.

第5節 粗エキスの電気泳動

(方法) 東洋汙紙C号型電気泳動装置を用い、濾紙は Whatman No. 1 を巾 15cm、長さ 35cm に切り、10°Cの恒温室で泳動を行った。

緩衝液としては Holt¹²⁾ の Veronal 緩衝液 (pH 8.6, イオン強度 0.05) を使用し、5mA 定電流のもとに 8 時間泳動を行った。試料としては前視床下部粗エキスの分離を目的とし、TSH、血清等との平行泳動を行った。

泳動終了後の汙紙はアミド黒¹³⁾により染色した。

(結果) 前視床下部粗エキスは電気泳動により、尚、5ケの分画に分離された。(Fig. 3) 今仮に、この5ケの分画を陰極側よりそれぞれ、No. 1, No. 2, No. 3, No. 4, No. 5分画とすると、No. 1分画は陰極側に移動し、No. 2分画は原点附近にとどまり、No. 3, No. 4, No. 5分画は平行泳動した血清のβないしγグロブリンの間に移動している。又、平行泳動した TSH は No. 5分画附近に移動する。

Fig. 3. Electrophoresis of crude extract from bovine anterior hypothalamus.

PH 8.6 μ 0.05 0.5 mA/cm 7 hr

小 括

牛の前及び後視床下部並びに頭頂葉皮質を Kamm Aldrich の方法に準じて抽出を行い抗利尿効果、甲状腺効果を調べた所、前視床下部粗エキスに於て、抗利尿作用及び下垂体甲状腺機能亢進効果を認めた。この

前視床下部粗エキスを電気泳動により、尚、数ケの分画に分離し得た。

第3章 牛視床下部精製分画の抗利尿効果並びに下垂体甲状腺系機能に対する影響

第1節 DEAE-Sephadex による粗エキスの分画化

従来、蛋白質ないし Peptide のクロマトには優れた方法がなかったが、近年のゲル濾過法の導入により、これらの物質が比較的簡単に、しかも従来のイオン交換樹脂を用いた方法と組み合わせる事により、或程度十分に分離しうるようになってきた。

(方法) 内径2cm、長さ1mのカラムに DEAE-Sephadex A50 を pH 6.8, 0.02M の磷酸緩衝液で平衡化した後、25cm の高さに迄カラムに充填する。溶出はこの磷酸緩衝液にそれぞれ、0.07M, 0.17M, 0.38M, になるように NaCl を加へて、イオン強度を段階的に上昇せしめて溶出を行い、溶出液を 8cc づつ採取して 278m μ で吸光度を測定した。

(結果) このような方法で前視床下部粗エキスを分画化すると (Fig. 4) に示すように、A, B, C, D, E, の5ケの分画に分離しうる。このうち、A分画はアミド黒により染色される。その他の B, C, D, E. 分画はニンヒドリン¹⁴⁾では染色されるが、アミド黒では染色されない。

第2節 各分画の抗利尿効果

抗利尿効果の測定は Dicker³⁾, 糸賀⁴⁾ のラットを用いる方法によつた。本法を用いて種々の量の Lysine Vasopressin, 及び、視床下部それぞれの分画 1mg を 0.5cc の生理的食塩水に溶解して、尾静脈より投与し、それぞれの抗利尿効果 (ADR) の対数 (Log. ADR) を表にすると (Table 3) の如くである。

今 Lysine Vasopressin について縦軸に Log. ADR をとり、横軸に投与 Vasopressin 単位をとり、縦軸を Y, 横軸を X とすれば、 $y = 1.988 - 2.5x$ $r = -0.18$ の回帰方程式をえた。(Fig. 5) 尚、この式より算

Fig. 4. Fractionation of bovine hypothalamic extract on DEAE sephadex A 50.

Fig. 5. Antidiuretic effect of various fractions.

Table 3. Antidiuretic effect of lysine vasopressin and hypothalamic fractions

	Dosis	Antidiuretic effect Log. ADR %	P
Lysine vasopressin	0 γ	2.00 ± 0.014	Control
	50 γ	1.88 ± 0.031	
	100 γ	1.70 ± 0.018	
	200 γ	1.51 ± 0.018	
Hypothalamic fractions	A 1mg	1.80 ± 0.057	$0.05 > P > 0.02$
	B 1mg	2.00 ± 0.036	
	C 1mg	2.14 ± 0.061	$0.05 > P > 0.02$
	D 1mg	1.77 ± 0.065	
	E 1mg	2.05 ± 0.042	

定すれば、D分画1mgは約0.09mu、A分画1mgで約0.08m.u.のLysine Vasopressinに等しい抗利尿活性を示すことになる。その他のB, C, E分画には抗利尿活性は全く認められない。

第3節 各分画のラット¹³¹I放出曲線に対する影響

ラットに¹³¹Iを投与して後、24時間後の頸部カウントを100とし、その後、48, 72, 96, 120, 時間後の頸部カウントをそれぞれ%で示したものを半対数グラフに示すと一直線になる。又、¹³¹I投与後48時間目に0.5ccの生理的食塩水を筋肉内に投与した時も、その後の¹³¹I放出曲線には何ら変動を認めない。

所が、¹³¹I投与後48時間目に1u.s.p.のTSHを投与したもものでは、¹³¹I放出促進効果が著明に認められる。今、これらの事実を数量的に表をすために、Schreiberらに従って、生理的食塩水投与後、24時間(¹³¹I投与後72時間)及び48時間(¹³¹I投与後96時間)後の頸部カウントを、生理的食塩水投与直前(¹³¹I投与48時間目)の頸部カウントの百分率で示すと、それぞれ $81.1 \pm 0.75\%$ 及び $68.4 \pm 1.63\%$ という値になる。所が、TSHを投与したもものではこの値が、 $67.0 \pm 1.19\%$ 及び、 $51.5 \pm 2.15\%$ となり $P < 0.01$ の危険率でTSHに¹³¹I放出促進効果のあることが分る。これらの結果を図示すると(Table 4)(Fig. 6)の如くである。

そこで、視床下部よりの各分画1mgを0.5ccの生理的食塩水に溶解し、各群8ないし10匹づつ、¹³¹I投与後48時間目にラットの筋肉内に投与して、その後の¹³¹I放出曲線に与える影響を追跡した。この結果、D分画投与群に於て著明な¹³¹I放出促進効果が認められ、B分画投与の場合にも有意の¹³¹I放出促進効果を認めている。そこでこの事実の有意性を確めるために、検体投与後24時間及び48時間目の頸部カウントを、検体投与直前の頸部カウントの百分率で示すと(Table 4)及び(Fig. 7)の如く、D及びB分画には¹³¹I放出促進効果がある事がわかる。

第4節 Lysine Vasopressin 及び α -MSH の¹³¹I放出曲線に対する影響

前節迄の結果からD分画1mgは甲状腺¹³¹I放出促進効果を示し、且つ、D分画1mgは約0.09muのLysine Vasopressinに相当する抗利尿活性がある事が判つた。そこでこのD分画の本態がVasopressinで

Table 4. Effect of hypothalamic fractions lysine vasopressin and α -MSH on thyroidal ¹³¹I release

		Dosis	No. of rat	% of 24hrs. after inject.	P	% of 48hrs. after inject.	P
Non treated		—	9	77.0 ± 1.41	—	62.9 ± 0.71	—
Saline		0.5cc	10	81.1 ± 0.75	Control	68.4 ± 1.63	Control
TSH		1.0usp	8	67.0 ± 1.19	<0.01	51.5 ± 2.15	<0.01
Hypothalamic fractions	A	1mg	8	80.1 ± 2.22	<0.01	65.9 ± 2.07	<0.01
	B	1mg	10	72.5 ± 1.92		59.8 ± 2.37	
	C	1mg	8	81.0 ± 1.36		65.3 ± 1.33	
	D	1mg	10	67.7 ± 2.01		58.5 ± 1.72	
	E	1mg	8	81.3 ± 2.34		68.2 ± 1.78	
Lysine vasopressin		0.1mu	7	80.6 ± 0.9	<0.02	66.2 ± 1.68	<0.01
		1mu	7	81.9 ± 0.91		67.5 ± 1.94	
		10mu	7	82.5 ± 0.71		70.1 ± 2.21	
		100mu	7	84.1 ± 0.92		73.2 ± 1.58	
		1000mu	10	74.0 ± 2.46		59.8 ± 2.30	
α -MSH		50 μ g	8	85.0 ± 2.58		72.3 ± 1.14	
		300 μ g	7	86.1 ± 1.39		73.4 ± 1.52	

Fig. 6. Effect of TSH on thyroidal ^{131}I release.

あるか否かを確かめるために、逆に種々の量の Lysine Vasopressin を投与して、 ^{131}I 放出曲線に及ぼす影響を観察し、又併せて $\alpha\text{-MSH}$ の ^{131}I 放出曲線に対する影響を検討した。方法は、前節と全く同じ方法を取り、 ^{131}I 投与後48時間目にそれぞれ 0.1mu, 1mu, 10mu, 100mu, 1000mu, の Lysine Vasopressin 及び 50 μg , 300 μg の $\alpha\text{-MSH}$ を、それぞれ 0.5cc の生理的食塩水に溶解してラットの筋肉内に投与した。

その結果、検体投与後24時間、48時間目の ^{131}I 量を検体投与直前の頸部 ^{131}I 量の百分率で示すと (Table 4) の如くである。即ち、Lysine Vasopressin そのものでは 100mu 迄を投与しても甲状腺 ^{131}I 放出に影響を示さない。D分画 1mg の抗利尿活性の 10,000 倍以上に相当する 1000mU を投与した時に於てのみ、わずかに甲状腺効果を示すにすぎない。それ故、D分画の ^{131}I 放出促進効果は Vasopressin によるものではないと考えられる。又、50 μg , 300 μg の $\alpha\text{-MSH}$ では甲状腺 ^{131}I 放出に何等影響を認めなかった。

小 括

牛の前視床下粗エキスを DEAE-Sephadex A50 を用いたカラムクロマトで分画化すると、A, B, C, D, E, の5ケの分画が得られた。これらの内、抗利尿活性はD分画、次でA分画に認められ、甲状腺 ^{131}I 放出促進効果はD分画、次でB分画に認められた。これらの結果を要約すると (Fig. 8) の如くである。又、D分画の本態は Vasopressin そのものではないと考えられる。

Fig. 7. Effect of hypothalamic fractions on thyroidal ^{131}I release

Fig. 8. The comparison of ADH activity and TRF activity (^{131}I release method) in various fractions.

第4章 牛視床下部精製分画の TRF 効果について

第1節 各分画のラット血漿 TSH 活性に及ぼす影響

低ヨード食で飼育した体重 150g の雄ラットに、 T_3 $0.6\mu\text{g}$ の皮下注射を行った後、4時間を経て、ペントバルビタールソーダで麻酔し、頸静脈より 0.8cc のヘパリン採血を行い、直ちに検体をその静脈内に投与し、投与後正確に 3分、6分、12分後に他側の頸静脈より 0.8cc ずつ採血する。この場合、検体としては、A, B, C, D, E 各々の分画を $100\mu\text{g}$ ずつ 0.4cc の生理的食塩水に溶解したものを用いた。

このようにして一群 6～8匹のラットより採血したそれぞれの血液を合して血漿を分離し、一夜氷室に保存した後、その血漿 TSH 活性を Mc Kenzie 法¹¹⁾により測定した。

その結果は (Table 5) に示すように、D分画投与群に於ては、検体投与後 6分、12分後に著明な TSH 活性の上昇を認めている。

所が、B分画投与群では投与 3分後に軽度の TSH 上昇をみるが、推計学的には有意ではない。A, C, E, 分画投与群では TSH 上昇効果は全く認められない。以上の事より D分画には TSH 上昇効果があるといえる。

Table 5. Changes in plasma TSH levels after injection of various fractions ($100\mu\text{g}$)

Fraction	Time min.	^{131}I Release from thyroid gland of mice % of initial blood ^{131}I at 2hrs. $\pm$ S.E.	P-Value compared with control
A	0	108.1 $\pm$ 6.6	Control
	3	79.4 $\pm$ 15.5	N. S.
	6	118.0 $\pm$ 26.8	N. S.
	12	91.6 $\pm$ 11.0	N. S.
B	0	101.0 $\pm$ 18.5	Control
	3	142.9 $\pm$ 16.9	N. S.
	6	104.8 $\pm$ 9.3	N. S.
	12	130.9 $\pm$ 7.2	N. S.
C	0	64.5 $\pm$ 6.9	Control
	3	83.0 $\pm$ 12.1	N. S.
	6	68.0 $\pm$ 9.3	N. S.
	12	64.5 $\pm$ 8.6	N. S.

D	0	105.1 $\pm$ 7.2	Control
	3	121.2 $\pm$ 10.7	N. S.
	6	232.4 $\pm$ 15.7	<0.02
	12	185.0 $\pm$ 19.3	<0.05
E	0	86.2 $\pm$ 5.1	Control
	3	106.5 $\pm$ 4.1	N. S.
	6	108.5 $\pm$ 14.1	N. S.
	12	100.1 $\pm$ 15.4	N. S.

第2節 D分画の TRF 効果の特異性について

D分画の TSH 上昇効果が果してD分画の TRF 作用に基づくものであるか、或はD分画の中に TSH の混入があるか否かを確かめるために、A, B, C, D, E, それぞれの分画を 100 μ g づつ0.4ccの生理的食塩水に溶解して、そのままマウスの尾静脈内に投与して、各分画の TSH 含量を測定した。その結果、D分画に於ては、他の A, C, E, 分画とともに TSH 活性は全く認められない。B分画に於ては、軽度の TSH 様効果がみられたが、推計学的には有意とはいえない。これらの事実から、D分画には TSH の contamination はないと考えられる。(Table 6)

次にD分画が TSH を Potentiate したり、TSH の不活性化を抑制したりする作用があるか否かを確かめるために、血漿或は既知量の TSH にD分画を添加して、非添加群と比較した。その結果、検定当日或は24時間前に血漿にD分画を添加しても、非添加との間に差を認めず、又、既知量の TSH に検定当日或は24時間前にD分画を添加しても非添加との間に差を認めない。これらの事より、D分画が TSH の活性を Potentiate したり、TSH の不活性化を抑制する作用をもたない事が判る。(Table 7)

Table 6. Absence of TSH effect in various fractions

Fraction	Dosis	% of initial blood ¹³¹ I at 2hr. mean $\pm$ S.E.	P
Saline	0.4cc	83.1 $\pm$ 12.1	Control
A	100 μ g/0.4cc	97.4 $\pm$ 13.3	N. S.
B	100 μ g/0.4cc	150.1 $\pm$ 16.9	0.2 > P > 0.1
C	100 μ g/0.4cc	115.1 $\pm$ 14.7	N. S.
D	100 μ g/0.4cc	87.7 $\pm$ 13.3	N. S.
E	100 μ g/0.4cc	87.1 $\pm$ 15.3	N. S.

Table 7. Absence of TSH potentiating effect in fraction D

Preparation (0.4cc vol)	Mixture	% of initial blood ¹³¹ I at 2hr. mean $\pm$ S.E.	P
Plasma	—	108.0 $\pm$ 9.4	Control
Plasma + D 100 μ g	immediately after	97.7 $\pm$ 9.3	N. S.
Plasma + D 100 μ g	24hrs after	111.0 $\pm$ 9.6	N. S.
TSH 0.4musp	—	235.0 $\pm$ 33.6	Control
TSH 0.4musp + D 100 μ g	immediately after	213.5 $\pm$ 24.7	N. S.
TSH 0.4musp + D 100 μ g	24hrs after	228.0 $\pm$ 21.6	N. S.

次に予め種々の前処置を行つたラットについてD分画を投与し、投与前及び投与10分後の血漿 TSH 活性を Mc Kenzie 法で測定した。即ち、

- i) 両側視床下部を電氣的に破壊した後3週間を経たラット。
- ii) 塩酸モルヒネ 6mg を 0.4cc の生理的食塩水に溶解したものを3日間皮下注射を行い、最後の注射のち4時間を経たラット。
- iii) 下垂体剔除を行つたのち3週間を経たラット。

これらの前処置を行つたラットについて、前節に記した方法に従つて頸静脈より 0.8cc の前採血を行い、D分画 100 μ g をその静脈内に投与した。D分画投与後正確に10分を経たのち、他側頸静脈より 0.8cc づつ採血する。一群8匹のラットについて、これらD分画投与前及び投与後の血漿をそれぞれプールして、TSH 活性を測定した。その結果は (Table 8) に示すように、両側視床下部を破壊したラットやモルヒネを投与したラットに於ても、D分画は明らかな TSH 上昇効果を認めるが、垂剔を行つたラットではD分画を投与しても血漿 TSH 活性の上昇は全く認められない。

Table 8. Effect of fraction D on various pretreated rats

Pretreatment	Time min.	% of initial blood ^{131}I at 2hrs. $\pm$ S.E.	P
Hypothal. lesion	0	89.7 $\pm$ 17.0	Control
	10	227.0 $\pm$ 22.9	P<0.01
Morphine	0	91.0 $\pm$ 10.2	Control
	10	205.8 $\pm$ 8.5	P<0.05
Hypophysectomized	0	122.0 $\pm$ 18.1	Control
	3	104.0 $\pm$ 9.5	N. S.
	6	98.1 $\pm$ 17.0	N. S.
	12	113.0 $\pm$ 15.7	N. S.

尚これら実験の終了後に視床下部破壊及び下垂体剔除が完全に行なはれていることを確めた。

次にD分画の種々の量をラットに投与して投与10分後の血漿 TSH 活性を比較測定した。即ち、前節と同じようにして前採血を行つたラットに、0 μ g, 10 μ g, 50 μ g, 100 μ g, 500 μ g, のD分画をそれぞれ0.4cc の生理的食塩水に溶解して頸静脈内に投与し、投与10分後の血漿 TSH 活性を測定した。その結果は (Fig. 9) の如く、投与したD分画の量と血漿 TSH 活性の間に用量反応関係が認められる。

第3節 D分画の本態に関するクロマトグラフィーによる検索

D分画をブタノール：醋酸：水=2：1：1及び、ブタノール：ピリジン：水=1：1：1の溶媒で、上行法によりクロマトグラフィーを行つた後、ニンヒドリンで染色するとD分画は尚2～3ケの分画に分ち得た。

Fig. 9. Effect of varying dosis of fraction D on plasma TSH levels.

この場合、D分画の移動度は Adrenaline, Noradrenaline, Serotonin, Histamine, Acetylcholine, Bradykinin, Octapressin, Kallidin, α -MSH 等とは移動度を異にするが、Lysine Vasopressin, Arginine Vasopressin とはその移動度が比較的近似している。(Fig. 10)

Fig. 10. Chromatographic comparison of fraction D with active amines and peptides.

(附) D分画の構成アミノ酸について

D分画 20mg を 6N 塩酸で 110°C, 48時間加水分解を行い、アミノ酸自動分析器により構成アミノ酸を検討した所、14種のアミノ酸よりなる事が判つた。その構成アミノ酸の種類は Lot No. による相違はなく、又分析をお願いした各々の研究機関で一致している。(Table 9)

Table 9. Amino acid analysis of fraction D

	Insitute for protein resarch Osaka Univ. Lot No. 6603		Kobe Univ. Lot No. 6603		Osaka City Univ. Lot No. 6504	
1	Lys.	6.4	Lys.	9.3	Lys.	6.4
2	His.	3.0	His.	3.1	His.	5.2
3	Arg.	3.4	Arg.	5.2	Arg.	3.6
4	Asp.	12.0	Asp.	9.5	Asp.	12.7
5	Thr.	4.9	Thr.	5.5	Thr.	5.5
6	Ser.	7.9	Ser.	6.4	Ser.	3.7
7	Glu.	9.3	Glu.	12.9	Glu.	7.6
8	Pro.	6.1	Pro.	4.8	Pro.	4.4
9	Gly.	9.0	Gly.	15.4	Gly.	5.3
10	Ala.	13.6	Ala.	11.7	Ala.	10.0
11	Val.	8.3	Val.	6.7	Val.	7.0
12	Iso.	1.3	Iso.	0.9	Iso.	8.3
13	Leu.	10.0	Leu.	7.6	Leu.	18.6
14	Phe.	4.3	Phe.	1.9	Phe.	16.9

小 括

A, B, C, D, E. のそれぞれの分画をラットに投与して血漿 TSH 活性のパターンを検討した所、D分画投与群に於て著明な TSH 活性の上昇を認めた。D分画には TSH の contamination はなく、TSH 活性を Potentiate したり、TSH の不活性化を抑制する作用もない。D分画は視床下部破壊を行つたラットやモルヒネを投与したラットに於ても、著明な TSH 上昇効果を示すが、垂割を行つたラットでは TSH 上昇効果は全く認められない。即ち、D分画は内因性の TRF に働きかけないで、直接下垂体に働くものである事を示している。更にD分画には用量反応関係が認められる。これらの事からD分画の TRF 効果は特異的なものであるといえる。そして、この分画の本態はクロマトグラフィーで調べると、Vasopressin とは比較的近似した移動度を示すが、その他の活性アミン類や peptide とは移動度が異つている。

考 按

臨床的に甲状腺機能や甲状腺疾患が環境や外界刺激により影響を受ける事は、古くより知られている所である。一方、実験的にも大脳の核の破壊¹⁵⁾や、大脳辺縁系の刺激¹⁶⁾が、甲状腺機能に影響を与える事実は、中枢神経系と甲状腺との間に密接な連絡がある事を暗示している。この場合、中枢神経系と甲状腺を結ぶ経路として、次の二通りの道が想定される。その一つは、神経系—視床下部—下垂体—甲状腺の経路であり、他の一つは、視床下部自律神経中枢を介した自律神経による甲状腺への連絡である。この第一の経路に於て問題となるのは、神経系と内分泌系の接触している視床下部と下垂体との結びつきである。視床下部と下垂体甲状腺系の関係をみた実験として

- 1) 動物を寒冷暴露の状態におくと甲状腺腫が現われるが、柄切離を行つた動物では甲状腺腫が出現しない¹⁷⁾。
- 2) 下垂体を視床下部から切離して移植すると甲状腺が萎縮する¹⁸⁾¹⁹⁾。
- 3) 視床下部を刺激すると TSH 分泌が亢進する²⁰⁾²¹⁾。
- 4) 視床下部を破壊すると TSH 分泌が減少する²²⁾²³⁾。

これらの事実は視床下部と下垂体甲状腺系の間に密接な関係のある事を示している。この場合、下垂体前葉には分泌神経が存在しないこと、及び視床下部と下垂体との間には下垂体門脈が存在し、その流れの方向は視床下部より下行性に前葉に向つて流れている事実は、視床下部と下垂体との関係が神経性に連絡されているのではなく、視床下部の神経終末で放出された液性因子 (RF) が、中央隆起の下垂体門脈の第一次毛細管叢にとりこまれ、門脈を介して前葉に達し、TSH の分泌を促がすという考え方の根拠となつている。この下垂体門脈の働きについても、Brown-Grant²⁴⁾や Purves²⁵⁾は視床下部は中央隆起の第一次毛細管叢で甲状腺ホルモンとを河過し、或は甲状腺ホルモンと結合するような物質を出して、下垂体へ行く甲状腺ホルモンを抑え、Feed Back により TSH の分泌を抑制しているのであらうといつている。

所がこの様な Feed Back による河過説で視床下部の機能を説明しようとする、前述の1)～4)の実験の説明が困難である。更に、甲状腺ホルモンの Feed Back は視床下部以外に、下垂体自身も Feed Back の receptor となりうる²⁶⁾²⁷⁾。その上、最近の視床下部抽出物に TSH 放出作用があるという報告と共に、柄切離や下垂体移植の実験で明らかなように、下垂体が視床下部下垂体門脈との結合によつてのみその機能が維持されるという事実は、下垂体門脈の中に TSH 分泌を促進する或特殊な液性因子が含まれているためであると考えざるを得ない。Harris¹⁹⁾が下垂体門脈の存在を強調して以来、視床下部の液性因子が前葉ホルモンを分泌させるという考え方は既に一般化しており、門脈の周囲や門脈腔内、更に前葉の Pars distalis にも、視床下部液性因子と密接な関係にあると考えられている神経分泌物の存在が認められている²⁸⁾²⁹⁾。この神経分泌物の本態についても、後葉ホルモンであるとか、その担体であるとかいわれているが、視床下部に液性因子が存在するという一つの有力な根拠となつている。

視床下部液性因子の本態として以前は、Adrenaline, Noradrenaline, Serotonin, Histamin, Acetylcholine 等が問題となつたが、近年最も注目されたものは後葉ホルモンである。後葉ホルモンが視床下部に存

在する事は既に多くの学者によつて認められている所であり、それ故、後葉ホルモンと下垂体甲状腺系の関係を検討した報告も多い。所が、後葉ホルモンの下垂体甲状腺系に対する効果については、後葉ホルモンが下垂体甲状腺機能を亢進させるとするもの、影響がないというもの、或は反対に低下させるとする報告等があり、意見の一致をみていない。

Vasopressin 以外の既知物質として最近、MSH が問題となつていますが、MSH の下垂体甲状腺作用について、Guillemin³¹⁾らは in vitro, in vivo の実験に於て否定的な結果を得ており、Schally³⁰⁾によると仮に MSH が多少の向甲状腺効果を有していても、それは甲状腺への直接作用であろうと推定している。TRF の存在が理論的には認められておりながら、既知の活性アミン類や、後葉ホルモンに TRF 効果がないとするならば、TRF の探究は当然視床下部そのものから TRF を抽出分離していく方法に頼らざるを得ない。Azzali³²⁾³³⁾, Ragnose³⁴⁾, Petrovic³⁵⁾, Bachrach³⁶⁾らは in vivo, in vitro の実験で視床下部抽出物を与えると甲状腺機能亢進効果が起ることを観察しているが、これらの抽出物は下垂体を介さず甲状腺への直接作用によるものであるという。

渋沢³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾らは犬の視床下部の水抽出物から、下垂体 TSH を放出させる作用のある物質をとり出し、このものが視床下部の神経分泌細胞で生産され、血液を介して主として尿に排出されるという。所が、Reichlin⁴¹⁾らは、この渋沢らの TRF をラットに投与して、血漿 TSH 量を Mc Kenzie 法¹¹⁾で測定したが、有意の増加を認めなかつたとしている。

Odell⁴²⁾は兎の甲状腺を培養し、これに視床下部と下垂体を加えると、下垂体のみを加えた時よりも甲状腺の重量の減少が抑制される事実を認め、これは視床下部に TRF が含まれているためであろうと考えた。Flosheim⁴³⁾はマウスの下垂体の短時間 incubation 標本に視床下部粗エキスを添加しても、何等影響をみながつたといつていますが、Mc Kenzie⁴⁴⁾はラット下垂体を同様に incubation し、視床下部粗エキスを添加すると、medium 中への TSH 放出が促進されるという。Meites⁴⁵⁾⁴⁶⁾は in vitro で incubation したラットの下垂体に視床下部粗エキスを添加すると、下垂体より放出された TSH の量が、加えた視床下部の量と相関々係にある事をみている。

以上の様な視床下部粗エキスの TRF 効果を検討する段階から、更に進んで TRF の純化を試みた報告は著者らの他に、Schreiber, Guillemin, Schally らの報告があるのみである。

Schreiber⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾は in vitro で incubate したラット下垂体に、視床下部の醋酸抽出物を加えると、下垂体の酸性フォスファターゼ活性が上昇すること、又、下垂体の酸性フォスファターゼ活性と下垂体 TSH 産生量とが、ほぼ平行すること⁵⁰⁾を確めた。又、垂別ラットの前眼房に下垂体を移植し、その前眼房に視床下部抽出物を投与すると、副腎や性腺は萎縮するが、甲状腺の萎縮は抑えられるという⁵¹⁾。彼等はこの有効物質を精製するために、視床下部醋酸抽出物を高圧濾紙電気泳動で分画化して得た分画が、in vitro の下垂体の酸性フォスファターゼ活性を高めること⁵²⁾、及びラットの下垂体を短時間 incubation して medium 中の TSH 量を Eckertova 法⁵³⁾で測定したところ、この分画が有意の TSH 効果を示すことをみた⁵⁴⁾。又、この有効分画を Sephadex G25 のカラムで純化したものが in vivo のラット ¹³¹I 放出法⁷⁾に於ても、in vitro の下垂体 incubation 法に於ても有意の TSH 放出効果のあることを確めた⁵⁵⁾⁵⁶⁾。そして、この有効分画は下垂体 TSH の合成と放出に働くものであり、この物質の本態は8ケのアミノ酸よりなる peptide であり、後葉ホルモンや TSH 或は他の既知物質とは異なるものであるという⁸⁾⁵⁷⁾⁵⁸⁾。

1962年来、Guillemin らは羊の視床下部の醋酸抽出物を Sephadex G25 のカラムを用いて分画化し、in vivo で TRF 活性を示す分画を得た⁵⁹⁾⁶⁰⁾。この分画を凍結乾燥したもの1mgの示す TRF 活性を 1TRF 単位として用いている⁶¹⁾。彼等は更にこの方法で得られた TRF を、CMC カラムを用いて精製し⁶²⁾、in vitro の短時間下垂体 incubation 標本に添加すると、medium 中の TSH が増量していること、この有効物質の作用機序は下垂体自身の TSH 放出を促進するものであつて、TSH を potentiate した結果ではない事を確めた。そして、この有効物質の本態は CRF, GRF, Oxytocin, Vasopressin, MSH 等とは異つたものであるという⁶³⁾。更に Guillemin⁶⁴⁾らは TRF の純化を目的として、大量の羊の視床下部の醋酸抽出物

を, Sephadex G25 カラム, 交流分配法, IRC カラム, 薄層クロマトの順に純化精製し, このものが11種類のアミノ酸よりなる Peptide であること, 又, このものには CRF 作用や GRF 作用がない事を確めた⁶⁵⁾⁶⁶⁾. ごく最近に到つて彼等は TRF の分離にイオン交換 Sephadex を使用する事を試みており, 醋酸で抽出した羊視床下部を, Sephadex G25, CM-Sephadex C50, Sephadex G25 の順にクロマトを行い, Norit A 吸着, エタノール溶出して薄層クロマトにかける方法で, 極めて高い活性を有する TRF の抽出に成功したという⁶⁷⁾⁶⁸⁾.

1965年以降に, Schally らは豚, 牛, 羊等の視床下部の醋酸抽出物を Sephadex G25 で分画抽出したものが, *in vitro* の下垂体短時間 incubation 法⁶⁹⁾及び *in vivo* の甲別ラット TSH を指標とする方法で TRF 効果を示すことを報告した⁷⁰⁾⁷¹⁾. 更にマウス血中 ¹³¹I 濃度を指標とする方法⁷²⁾によつて, この抽出物の最少有効量が 100 μ g であることを見出した⁷³⁾. 次でこの分画をフェノールで抽出し, CMC カラムを通すことにより, TRF 活性を有する14種類のアミノ酸よりなる塩基性ペプチドの抽出に成功した⁷⁴⁾.

後葉ホルモンが視床下部で作られており, 又同一臓器よりの分泌物は比較的類似しているという生物体の法則より考えると, 後葉ホルモン, RF 等は互に類似した物質ではないかと想像される. 又, 臓器抽出 Vasopressin (Pitressin) の中には視床下部由来と思はれる RF が contaminate されていることも想像されているので, 視床下部を直接後葉ホルモンの抽出法に従つて抽出すれば, これらの Contaminant がより高濃度で抽出されると考えられる.

以上の観点より著者は, 犬, 兎, ラット, 鯨, 牛等の視床下部を Kamm Aldrich の方法に従つて抽出したところ, 比較的, 大量の材料の得られる牛視床下部抽出物に於て, 抗利尿活性, 並びに TRF 活性を認め得た. この場合, 臓器抽出物の非特異反応を検討するために, すべての実験に於て前視床下部, 後視床下部, 大脳皮質等を同じ方法で抽出し, 又, 同一の方法で生物学的活性の検定を行った.

この結果, 前視床下部抽出物に於てのみ, 抗利尿効果及び下垂体甲状腺機能亢進効果を認めた. そして, 視床下部抽出物の甲状腺効果は垂別ラットには効果がなく, 又直接血漿 TSH を上昇させる作用のある事より, 本抽出物は下垂体に働いて TSH を放出させるものであると考えられる.

この場合, 前視床下部抽出物の TSH 上昇効果が, 視床下部由来の抗利尿ホルモンに基づくのか, 或は別の物質に基くものであるかが問題となる, そこで, DEAE-Sephadex を用いてこの前視床下部粗エキスを分画化した所, 尚, D分画に於て抗利尿効果と TRF 効果の重複を認めた. 所がD分画 1mg は強力な TRF 効果を示すが, その抗利尿活性は Lysine Vasopressin として約 0.09 μ u の抗利尿活性を有するにすぎない. 一方, Lysine Vasopressin のみではその程度の量では勿論のこと, その10倍, 100倍, 1000倍の量を投与しても, TSH 上昇効果を認めない.

それ故, D分画の TRF 効果は Vasopressin によるものとは考えられない. Guillemin⁵⁹⁾⁶⁴⁾や Schally⁷⁴⁾の最近の報告に於ても, TRF と Vasopressin 分画は極めて接近して検出されており, 著者の D分画の抗利尿活性は, 微量の Vasopressin の混入によるものか, 或は大量の TRF はアミノ酸構成の類似のために, 抗利尿活性を示したのと考えられる. 事実, Sephadex G25 を用いた Long カラムでD分画を更に再分画すると, TRF 活性を示す分画と抗利尿活性を示す分画は分離しうる事, 又, 種々の量の Lysine Vasopressin, Arginine Vasopressin をラットの頸静脈に投与しても血漿 TSH の上昇を認めない事実等⁷⁵⁾から, D分画の TRF 効果は ADH によるものではないといえる. 又, D分画を垂別動物に投与しても甲状腺効果は勿論のこと, 血漿 TSH 活性の上昇を全く認めず, 更に, D分画の TSH 活性を Mc Kenzie 法で測定しても TSH 活性は全く認められない.

これらの事からD分画には TSH の contamination はないといえる. 次に両側視床下部を電氣的に破壊したラットやモルモヒネを投与したラットに於ても D分画は明らかな TSH 放出効果を示すが, 垂別ラットではその効果がなく, D分画の投与量と TSH 増量の間 10 μ g~500 μ g の間で用量反応関係が成立している. 又, D分画は *in vitro* で培養した下垂体に於ても, TSH 放出効果が認められている⁷⁶⁾. このように D分画は TSH の contamination をもたず, TSH を末梢に於て potentiate せず, 内因性の TRF に働

きかけないで、下垂体に直接作用して TSH を放出させ、且つ、用量反応関係を示すことから、D分面の TRF 効果は特異なものであり、既知の活性アミン類やペプチドとは活性の上からもクロマトに於ける移動態度からも異つた物質であると考えられる。D分面がクロマトにより尚3ケのスポットに分れること、D分面の構成アミノ酸は14種であるが、D分面を更に Sephadex G25 を用いた Long カラムで再分画した時に、TRF 活性を示す分面 (D II 分面) の構成アミノ酸は11種であること⁷⁵⁾、等から考えてD分面は更に精製の余地があると考えられる。

結 語

1) 牛の前及び後視床下部、頭頂葉皮質を Kamm Aldrich の方法に従つて抽出した所、前視床下部抽出物に於て、抗利尿効果及び甲状腺機能亢進効果を認めた。

2) この前視床下部抽出物の甲状腺効果は、垂馴動物には効果がなく、又直接血漿 TSH 様活性を上昇させる事より、本抽出物は下垂体 TSH を介して甲状腺に働いているといえる。

3) この前視床下部抽出物は電気泳動により尚、数ケの分面に分離しうる。そこで、DEAE-Sephadex を用いたカラムクロマトで、この前視床下部抽出物を分画化すると、A, B, C, D, E の5ケの分面に分離しえた。

4) 以上5ケの分面のうち、抗利尿活性はD分面、次でA分面に認められ、甲状腺 ^{131}I 放出促進効果は、D分面次でB分面に認められる。

5) それぞれの分面をラットに投与して、血漿 TSH のパターンを調べた所、D分面投与群に於てのみ著明な TSH 上昇効果を認めた。

6) D分面の TRF 効果は特異なものであり、又、その本態は後葉ホルモンや既知のペプチド、活性アミン等とは異つたものである。

稿を終えるに当り、終始御懇篤な御指導と激励を賜り、又御校閲を賜つた恩師、辻昇三教授に深甚な感謝の意を表します。又、直接実験に御協力御指導を賜つた佐古田博士をはじめ、間脳研究班の諸先生に心からの謝意を表します。又、特に電気泳動の御指導を賜つた神戸女子薬大、橋本庸平教授、森五彦博士、及び抗利尿ホルモンの抽出を御指導下さつた帝国髄器、松島早苗博士、Sephadex, MSH 等の提供を頂いた Dr. Schreiber, Dr. Schally, に厚く御礼申し上げます。

尚本論文の要旨は第34回、第38回、第40回日本内分泌学会総会、及び第10回、第14回西日本内分泌学会に於て発表した。

文 献

- 1) KAMM, O., ALDRICH, T.B., GROTE, I.W., ROWE, L.W., and E.P. BUGBEE : J. Am. Chem. Soc. 50, 573, (1928)
- 2) VANDYKE, H.B., K. ADAMSONS, J.R., and S.L. ENGEL : Rec. Prog. in Horm. Res. 11, 1, (1955)
- 3) DICKER, S.E. : J. physiol. 122, 149, (1953)
- 4) 糸賀宣三 : ホルモンと臨床, 8, 135, (1960)
- 5) LEBLOND, C.P., and J. GROSS. : Endocrinol 43, 306, (1948)
- 6) SOLIMAN, E.A., and E.P. REINECK : Am. J. physiol. 178, 89, (1954)
- 7) BROWN GRANT, K., and G. PETHES : J. physiol. 151, 40, (1960)
- 8) SCHREIBER, V., ECKERTOVA, A., FRANC, E., RYBAK, M., GREGOROVA, I., KMENTOVA, V., and V. JIRGL : Physiol. Bohemoslov. 12, 1, 1963
- 9) 田中 明 : 塩野義研究所年報, 第5号, (1957)
- 10) 小倉 一 : 日本内科学会雑誌, 48, 1045, (1959)
- 11) Mc KENZIE, J.M. : Endocrinol 63, 372, (1958)
- 12) HOLT, C.V., VDIGHT, K.D., and K. GAEDE : Biochem. zeitsch. 323, 345, (1952)
- 13) GRASSMANN, W., and K. HANNIG : Naturwissenschaften 37, 496, (1950)
- 14) POLLARD, F.H., MCOMIE, J.F.W., and I.M. ELBEIH : Nature 163, 292, (1949)
- 15) MESS, B. : Endokrinol. 37, 104, (1959)
- 16) SHIZUME, K., MATSUZAKI, F., IINO, S., MATSUDA, K., NAGATAKI S., and S. OKINAKA : Endocrinol 71,

- 456, (1962) 17) UOTILA, U.U. : *Endocrinol.* 25, 605, (1939) 18) NIKITOVITCH, W., and L.J.W. EVERRET : *Endocrinol.* 65, 357, (1959) 19) HARRIS, G.W. : *Neural Control of the Pituitary Gland*, Edward Arnold Publ Ltd., London (1955) 20) HARRIS, G.W., and J.W. WOOD : *Ciba found, Colloq on endocrinol.* 10, 3, (1957) 21) SHIZUME, K., MATSUDA, K., IRIE, M., IINO, S., ISHII, J., NAGATAKI, S., MATSUZAKI, F., and S. OKINAKA : *Endocrinol* 70, 298, (1962) 22) REICHRIN, S. : *Endocrinol* 66, 340, (1960) 23) AVERILL, R.L.W., PURVES, H.D., and N.E. SIRETT : *Endocrinol* 69, 735, (1961) 24) BROWN GRANT, K., : *Ciba Found, Colloq on Endocrinol.* 10, 97, (1957) 25) PURVES, H.D. : *Acta Endocrinol. Supple.* 50, 21, (1960) 26) D'ANGELO, S.A. : *J. of Endocrinol.* 17, 286, (1958) 27) VON EULER, C., and C. HOLMGREN : *J. Physiol.* 131, 125, (1956) 28) 野田秀俊 : *日本内分泌学会雑誌*, 32, 509, (1956) 29) SHIBUSAWA, K., SAITO, S., FUKUDA, M., KAWAI, T., and F. YOSHIMURA : *Endocrinol. Jap.* 2, 47, (1955) 30) BOWERS, C.X., REDDING, T.W., and A.V. SCHALLY : *Endocrinol.* 74, 559, 1964 31) YAMAZAKI, E., SAKIZ, E., and R. GUILLEMIN : *Annales de Endocrinol.* 24, 795, (1963) 32) AZZALI, G. : *Acta Neuroveg.* 13, 456, (1956) 33) OTTAVIANI, G., and G. AZZALI : *Acta Neuroveg.* 13, 80, (1956) 34) RAGNOSE, P. : *Excerepta Med. Endocrinol.* 13, 504, (1959) 35) PETROVIC, A., and A. PORTE : *C.R. Soc. Biol.* 157, 1051, (1963) 36) BACHRCH, D., LASZLO, A., SYABO, E.B., PETTKO, E., and B. KORPASSY : *Nature* 194, 538, 1962 37) SHIBUSAWA, K., SAITO, S., NISHI, K., YAMAMOTO, T., TOMIZAWA, K., and C. ABE : *Endocrinol. Jap.* 3, 116, (1956) 38) SHIBUSAWA, K., SAITO, S., NISHI, K., YAMAMOTO, T., and K. TOMIZAWA : *Endocrinol. Jap.* 3, 138, (1956) 39) 山本隆信 : *日本内分泌学会雑誌*, 33, 870, (1958) 40) 洪沢喜守雄 : *最新医学*, 16, 727, (1961) 41) REICHLIN, S., BOSHANS, R.C., and J.G. BROWN : *Endocrinol.* 72, 334, 1963 42) ODELL, W.D. : *Endocrinol.* 72, 39, (1963) 43) FLOSHEIM, W.H., IMAGAWA, D.T., and M.A. GREER : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 95, 664, (1957) 44) SOLOMON, S.H., and J.M. Mc KENZIE : *Endocrinol.* 78, 699, 1966 45) SINHA, D., and J. MEITES : *Fed. Proc.* 24, 128, (1965) 46) SINHA, D., and J. MEITES : *Endocrinol.* 78, 1002, (1966) 47) SCHREIBER, V., RYBAK, M., CHAVAT, J., and V. KMENTOVA : *Physiol. Bohemoslov.* 8, 291, (1959) 48) CHARVAT, J., SCHREIBER, V., and V. KMENTOVA : *Nature* 182, 62, (1958) 49) SCHREIBER, V., RYBAK, M., CHARVAT, J., and V. KMENTOVA : *Nature* 183, 473, (1959) 50) SCHREIBER, V., and V. KMENTOVA : *Endocrinol.* 38, 69, (1959) 51) SCHREIBER, V., RYBAK, M., and V. KMENTOVA : *Experientia* 16, 466, (1960) 52) SCHREIBER, V., KOCI, J., ECKERTOVA, A., FRANC, Z., and V. KMENTOVA : *Physiol. Bohemoslov.* 10, 417, (1961) 53) ECKERTOVA, A., and Z. FRANC : *C.S.I. Fysiologie* 10, 48, (1961) 54) SCHREIBER, V., ECKERTOVA, A., FRANC, Z., KOCI, J., RYBAK, M., and V. KMENTOVA : *Experientia* 17, 264, (1961) 55) SCHREIBER, V., and V. KMENTOVA : *Physiol. Bohemoslov.* 12, 358, (1963) 56) SCHREIBER, V., RYBAK, M., ECKERTOVA, A., JIRGL, V., KOCL, V., KOCI, J., FRANC, Z., and V. KMENTOVA : *Experientia* 18, 338, (1962) 57) SCHREIBER, V., RYBAK, M., KOCI, J., ECKERTOVA, A., FRANC, Z., JIRGL, V., KMENTOVA, V., KAPITOLA, J., SEBESIK, V., and V. KMENTOVA : *Acta Univ. Carol. Ser. Med. Supple.* 17, 105, (1963) 58) SCHREIBER, V. : *Ann. d. Endocrinol.* 25, 315, (1964) 59) GUILLEMIN, R., YAMAZAKI, E., JUTISZ, M., and E. SAKIZ : *C.R. Acad. Sci.* 255, 1018, (1962) 60) GUILLEMIN, R. : *J.de. Physiol.* 55, 26, (1963) 61) GUILLEMIN, R., and E. SAKIZ :

- Nature 207, 297, (1965) 62) JUTISZ, M., YAMAZAKI, E., BERALAT, A., SAKIZ, E., and R. GUILLEMIN : C.R. Acad. Sci. 256, 2925, (1963) 63) GUILLEMIN, R., YAMAZAKI, E., GARD, D.A., JUTISE, M., and E. SAKIZ : Endocrinol. 73, 564, (1963) 64) GUILLEMIN, R., SAKIZ, E., and D.N. WARD : Proc. Soc. exp. Biol. med. 118, 1132, (1965) 65) DUCOMMUN, R., SAKIZ, E., and R. GUILLEMIN : Endocrinol. 77, 792, (1965) 66) SAKIZ, E., and R. GUILLEMIN : Endocrinol. 77, 797, (1965) 67) BURGUS, R., STILLWELL, R.N., MCCLOSKEY, J.A., WARD, D.N., SAKIZ, E., and R. GUILLEMIN : The physiologist. 9, 149, (1966) 68) GUILLEMIN, R., BURGUS, R., SAKIZ, E., and D.N. WARD : C.R. Acad. sci. 262, 2278, (1966) 69) SAFFRAN, M., and A.V. SCHALLY : Cand. J. Bioch. Physiol. 33, 408, (1955) 70) BOWER, C.R., REDDING, T.W., and A.V. SCHALLY : Endocrinol. 77, 609, (1965) 71) SCHALLY, A.V., REDDING, T.W., and C.Y. BOWERS : Fed. Proc. 24, 191, (1965) 72) REDDING, T.W., BOWERS, C.Y., and A.V. SCHALLY : Endocrinol. 79, 229, (1966) 73) SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., and T.W. REDDING : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 718, (1966) 74) SCHALLY, A.V., BOWERS, C.Y., and T.W. REDDING : Endocrinol. 78, 726, (1966) 75) 佐古田雅弘 : 第17回日本医学学会総会学術講演集, 日本医書出版, 東京Ⅲ, 322, (1967)