Studies on a Biological Action of Synthetic Hypothalamic Hormone TRF

1. Effect of synthetic TRF in vivo and in vitro

**Masahiro SAKODA, Tsuneo FUKUDA, Masanori TAMAOKA,
Hiroyoshi FUKATSU and Toshio OKUBO**

2nd Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

Although the chemical nature and structure of TRF (Thyrotropin-Releasing Factor) has been discussed and studied for 10 years, it is not quite clear. In 1969 Folkers had synthesized a tripeptide, pyroglutamylhistidylproline amide, based on knowledge of chemical nature obtained earlier and observed distinct TRF activity of this tripeptide.

However, there remained to be studied in details the biological action of synthetic TRF. Since we have received synthetic TRF preparation from Dr. Folker, the studies concerning biological action of synthetic TRF were performed in vivo and in vitro. Three assay systems for detecting TRF activity were adopted in vivo using rat or mice and in vitro using rat pituitary incubation.

1. TRF assay by estimation of rat plasma TSH

T_4 -pretreated male rats of Swiss-Webster strain weighing 120—130 g were used. Under pentobarbital anesthesia synthetic TRF was injected into the jugular vein. Blood was collected at 10 and 12 minutes after the injection, and plasma TSH was measured by McKenzie's method. 1.0, 5.0 and 10.0 μ g of synthetic TRF induced the most prominent increase of plasma TSH at 10 min. after the injection respectively. A clear dose-response relation was recognized between the doses ranging from 1.0 to 10.0 μ g of synthetic TRF, and plasma TSH was found to be increased with each TRF doses.

2. TRF assay by estimation of mouse blood 131 I levels.

As reported by Redding, 5 μ Ci of Na 131 I and 1.0 μ Ci T_4 were administered to mice of D D strain weighing 13—15 g. Blood radioactivity was checked before and 2 hrs. after administration of synthetic TRF on the 3rd day of experiment. In this assay 50 and 100 ng of synthetic TRF increased blood radioactivity.

3. TRF assay in vitro using short term incubation of rat pituitary.

Three halves of rat anterior pituitaries were placed in one flask and incubated by modified Saffran's technique, one flask for the test and the other as control. 1.0 μ g of synthetic TRF were added to the incubation medium. A distinct increase of TSH activity in the medium was observed after 60 minutes' incubation. From these findings described above, synthetic TRF (pyroglutamylhistidylproline amide) has a prominent TRF activity both in vivo and in vitro.

(See pp. 821~825)

Studies on a Biological Action of Synthetic Hypothalamic Hormone TRF

2. Specificity and modifying factor of synthetic TRF action

**Masahiro SAKODA, Makoto OTSUKI, Takaaki KUSAKA,
Hidetaro MORI, and Takashi MINEYAMA**

2nd Department of Internal Medicine, Kobe University School of Medicine

Recently a number of neuroendocrinological studies have revealed that releasing factor (RF) plays an essential role in the regulation of pituitary tropic hormone secretion. Though a fascinating problem about chemical structure of TRF has long been obscure, Folkers and his colleagues had synthesized a preparation called pyroglutamylhistidylproline amide which has distinct TRF activity both in vivo and in vitro.

Using this synthetic TRF preparation received from Dr. Folkers, prominent effects were observed in rat and mouse as reported before by us. However, it is very important whether these actions of synthetic TRF are specific or not, and also whether there may exist modifying factors of TRF action or not. From these points of view, the following experiments were performed.

1. Specificity of action of synthetic TRF

10.0 μ g of synthetic TRF induced the most prominent increase in rat plasma TSH at 10 minutes after i.v. injection. On the contrary, no TRF effect was observed when 10.0 μ g of synthetic TRF was given to the mice directly, showing absence of TSH or TSH like activity in synthetic TRF. TSH effect was found to be not altered when synthetic TRF was administered, mixed with a known amount of beef TSH preparation. These findings may indicate that there is no TSH like activity or potentiation of TSH in synthetic TRF.

2. Influence of thyroxine on synthetic TRF activity.

We studied the pituitary responsiveness to synthetic TRF in T_4 pretreated rats. Plasma TSH levels at 10 minutes after injection of synthetic TRF were estimated in rats pretreated with various doses of L-thyroxine Na 4 hrs previously. The rats pretreated with 3.0 μ g of T_4 showed no TSH increase after administration of 1.0 μ g synthetic TRF, whereas the rat treated with 3.0 μ g of T_4 showed distinct TSH increase when 10.0 μ g of synthetic TRF was administered. However, 10.0 μ g of synthetic TRF could not evoke TSH increase when rats received 10.0 μ g of T_4 . It was concluded that there is a dose dependent negative interaction between synthetic TRF and thyroxine in regulation of pituitary TSH secretion.

(See pp. 826~829)

合成視床下部ホルモン TRF (Thyrotropin-Releasing Factor) の生物作用にかんする研究

第1篇 in vivo, in vitro における合成 TRF の効果

神戸大学医学部第2内科

佐古田 雅 弘, 福 田 恒 夫
玉 岡 昌 則, 深 津 泰 良
大久保 理 夫

(昭和45年7月1日受付)

従来 TRF の化学構造について不詳の点が多かつたが Folkers らの合成になる Tripeptide (pyroglutamylhistidylproline Amide) の TRF 作用を検討した。この合成 TRF はマウス、ラットを使用した in vivo の検定、ラット下垂体による in vitro の検定の両方で明らかな TRF 作用を有する事を観察した。同時に in vivo では合成 TRF 投与量と TSH 放出反応との間に用量反応関係を有し、投与後10分でピークを示す TSH 放出の時間経過を示した。

I 緒 言

中枢神経系による下垂体前葉分泌の調節機構として視床下部起源の液性因子が想定されて既に久しいがこの Releasing Factor (RF) の化学的本態については必ずしも明らかでなかつた。Thyrotropin Releasing Factor (TRF) についても1966年に Schally, Guillemin らによつて3種類の構成アミノ酸が明らかにされていたが TRF の化学構造は不明のまま残されていた。1969年秋に Folkers らは従来の TRF にかんする構造特性に基いて Tripeptide を合成し、その TRF 作用について一部を報告しているが詳細は明らかでない。

吾々は Folkers より彼らが合成した TRF preparation の提供を受けその生物作用について検討する機会を得たのでここにその結果を報告する。

II 実験方法

1. 実験動物

体重13—15gのDD系雌マウス、体重120—130gのSwiss Webster系雄ラットを低ヨード含有飼料及び蒸溜水にて飼育したものを用いた。

2. TRF 検定法

a) in vivo マウス法：ラベル甲状腺ホルモン放出による血中放射能変動を指標とする Redding¹⁾変法によつた。即ち実験2日前に5 μ ciの¹³¹I Naを腹腔内投与、1日前にT₄ 1.0 μ gを皮下注射し実験当日前採血のち検体を静注し2時間後再度採血して両者のBloodradioactivityを測定、増加率を%で表した。

b) in vivo ラット法：血漿 TSH の変動を指標とする佐古田²⁾の方法によつた。即ち実験4時間前にT₄ 0.4 μ g/100g体重を皮下注射しペントバルビタール麻酔下に頸静脈より検体投与後10分で採血し TSH 検定に供した。

c) *in vitro* 法 (下垂体短時間インキュベーション法) : Saffran³⁾ 変法によつた。即ち3頭からのラット下垂体前葉を狭部にて正確に2等分し Krebs-Ringer-Bicarbonate-Glucose (200mg/dl)-Buffer (以下 KRBG と略す) (pH=7.2) 2ml を入れた容量 25ml の2つのフラスコに夫々3半切片を別々に入れ実験群及び対照群とした。95%O₂-5%CO₂ にてフラスコを充し37℃にて60分の Preincubation を行なつたのち下垂体を別のフラスコに入れ実験群には検体を添加した KRBG 液にて Finalincubation を60分行ない Medium 内の TSH 活性を実験群と対照群で比較した。(paired incubation)

3. TSH 測定法

McKenzie 変法⁴⁾によつた。最低測定可能値は 0.1musp, 精度指数は0.359である。

4. 合成 TRF

Dr. Folkers の合成⁹⁾提供によるもの (IBR 228, Institute for Biomed Research, Univ. of Texas) で構造は Pyroglutamylhistidilproline amide [(pyro) Glu-His-Pro(NH₂)] (Fig. 1) であり使用に際しては生理食塩水に溶解した。

5. 結果の推計学的処理

In vivo, in vitro で放出された TSH の検定には 1 群 6—8 匹のマウスを使用し群間の差の検証は Student の t test によつた。

III 實驗成績

1. マウスにおける合成 TRF の効果 (Table 1)

合成 TRF 50ng(0.05 μ g), 100ng(0.1 μ g) (夫々マウス一頭当りの投与量) 投与群では Blood radioactivity は投与 2 時間後に増加しこの両群の増加率は生理食塩水投与群に比べ推計学上有意に高かった. 50ng 投与

Table 1. Effect of synthetic TRF on T₄ pretreated mice*

Treatment	¹³¹ I Release from thyroid gland of mice % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs ± S.E.	P Value
Saline	102.0 ± 9.8	—
Synth. TRF 50ng	214.0 ± 25.3	<0.005
Synth. TRF 100ng	208.0 ± 13.3	<0.005

* 1) Mice were pretreated with T_4 $1.0\mu g$ 24hrs before experiment

2) Synth. TRF were administered intravenously

群と 100ng 投与群との間には差を認めなかつたがこれはマウス内因性 TRF の最大放出に基くためではないかと推定される。

2. ラットにおける合成 TRF の効果 (Table 2)

ラット 100g 体重あたり 1.0 μ g, 5.0 μ g, 10.0 μ g の合成 TRF を投与すると夫々の群で投与10分後血漿 TSH 活性は上昇した。この TSH 上昇は生理食塩水投与群に比べいずれも推計学的に有意の上昇である。且つ 1.0 μ g, 5.0 μ g, 10.0 μ g の合成 TRF 投与量と TSH 上昇との間に用量反応関係が成立した。

3. ラットにおける合成 TRF に対する TSH 反応の時間経過 (Table 3)

合成 TRF 10.0 μ g 投与の場合のラット血漿 TSH の時間反応をみると6分で既に上昇を示すが10分で最も高く12分では6分とはほぼ同じレベルを示した。この各時間における TSH 値は投与前 TSH 値に比べ何れも推計学上有意に高い。

4. ラット下垂体短時間インクベーションにおける TRF の効果 (Table 4)

Final incubation の Medium に添加した合成 TRF は下垂体より Medium 中に TSH を放出させ、

Table 2. Effect of synthetic TRF on rat* plasma TSH

Treatment	¹³¹ I Release from thyroid gland of mice, % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs. $\pm$ S.E.	P
Saline	67.0 $\pm$ 8.2	—
Synth. TRF 1.0 μ g	206.0 $\pm$ 16.7	<0.005
Synth. TRF 5.0 μ g	230.2 $\pm$ 22.8	<0.005
Synth. TRF 10.0 μ g	324.0 $\pm$ 17.1	<0.005

- * 1) Rats were pretreated with 0.4 μ g T₄ 4hrs before experiment
- 2) Synth. TRF were administered intravenously and Blood samples for TSH assay were obtained from jugular vein 10 min. after TRF administration

Table 3. Time course of rat plasma TSH response after i.v. administration of synthetic TRF.

Time	¹³¹ I Release from thyroid gland of mice, % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs. $\pm$ S.E.	P
Before	67.0 $\pm$ 8.2	
6 min. after	241.2 $\pm$ 12.3	<0.005
10 min. after	324.0 $\pm$ 17.1	<0.005
12 min. after	247.0 $\pm$ 22.4	<0.005

Table 4. Effect of synthetic TRF on incubated rat pituitary

Additon to incubation medium*	¹³¹ I Release from thyroid Gland, % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs. $\pm$ S.E.	P
Saline	119.6 $\pm$ 6.1	—
Symth. TRF 1.0 μ g	175.2 $\pm$ 2.5	<0.005

* 2ml of Krebs Ringer Bicarbonate Glucose Buffer

この場合の Medium TSH 濃度は対照として生理食塩水を添加した場合の Medium TSH 濃度より有意に高い。

IV 考 按

1. TRF の化学的性状

TRF の化学的性状について1966年以前に知られていた点は視床下部よりの抽出純化の過程で Gel 濾過のち有効分画の精製の段階ではアミノ酸を含んでいることでこのような事実から TRF を polypeptide と想定する研究者が多かつた^{6)~8)}。即ち夫々の純化精製の段階で14種⁶⁾⁸⁾ 11種⁷⁾ 7種⁹⁾ のアミノ酸をもっている事が報告され著者らを含む3研究機関で構成アミノ酸も共通した。この当時最も純化された TRF は Schally¹¹⁾ による豚 TRF であり Glutamine, Histidine, Proline の3種のアミノ酸をもつ事が報告されたがアミノ酸配列その他の構造特性を明らかにするためには至らなかつた。その後1969年に Schally¹⁰⁾ らは改めて16.5万頭の豚視床下部より抽出純化を行ないこの TRF が Glu, His, Pro, の3種のアミノ酸から成り夫々が equimolar ratio で存在してアミノ酸配列は Glu-His-Pro であること及びその他の構造特性が判明した。この高純化 TRF は in vivo で ng(m μ g), in vitro で pg (0.001m μ g) で有効のあつたが, Glu-His-Pro を始めとする3種アミノ酸によるその他の配列をもつた合成 peptide には TRF 効果が認められなかつたという。1969年秋に Folkers⁹⁾ らは上述その他の TRF の構造特性を考慮に入れて Pyro-glutamylhisdilproline Amide [(pyro)-Glu-His-Pro(NH₂)] を合成し T₃ 前処置マウスで TRF 活性を検定し極めて高い TRF 活性を証明したが吾々も (pyro) Glu-His-Pro (NH₂) がマウス, ラットによる in vivo 検定, in vitro 検定の3検定法に於て TRF 効果を有することを確認した。

2. 合成 TRF の生物作用

Folkers らは上記の Tripeptide である合成 TRF の生物作用について検討し速報しているがその詳細は必ずしも明らかではない。

先づ合成 TRF の有効量を前述した高純化 TRF のそれと比較しているが in vivo における T₃ 前処置マウス法で 6~54mg の投与量で TRF 効果を発揮しこれは 2~8~18ng の高純化豚 TRF の効果とはほぼ等しい事をみている。今回吾々の成績でもマウス法で 50ng で既に有効であり合成 TRF は高純化 TRF とほぼ等しい用量力価関係をもつといえる。in vivo ラット法で Folkers はその有効量を報告していないが吾々は合成 TRF が 1 μ g で既に有効である事を確認した。これはラットにおける検定の最低可能値である。ラットでは投与合成 TRF 量 1.0~10.0 μ g と TSH 放出との間に用量反応関係が成立することを認めた。又、合成 TRF 投与後の TSH 反応の時間的推移をみると6分, 10分, 12分後の反応では10分にピークを認め、これは著者らが抽出した牛 TRF における所見¹²⁾ と全く等しい。

更にラット下垂体短時間インキュベーション法を利用した in vitro の検定法でも合成 TRF は有効であつたので、(1) 用量反応関係の存在 (2) in vivo, in vitro の効果の一致性 (3) 反応の時間経過の諸点に於て合成 TRF のもつ効果が特異的なものであることを強く支持する結果であつたがこの点については更に TSH 賦活化作用, TSH 不活化抑制作用, 甲状腺レベルでの直接作用, 内因性 TRF 放出作用等を合成 TRF がもたないか否かを確める必要があり、吾々はこの点にも研究を進めており第2編に述べたい。

V 結 論

Folkers らの合成になる Tripeptide [(pyro) Glu-His-pro(NH₂)] の TRF 効果を観察し以下の結果を得た。

1. T₄ 前処置マウスに於て合成 TRF は 50ng の投与量で TSH 放出効果を示した。
2. ラットに於て合成 TRF は 1.0 μ g の投与量で TRF 効果を示し且つ 1.0~10.0 μ g の範囲で投与量と TSH 放出との間に用量反応関係を認めた。又 TSH 放出は合成 TRF 投与後10分に於て最大であつた。
3. ラット下垂体短時間インキュベーションによる in vitro の条件下でも合成 TRF は有効であつた。

4. 用量反応関係の存在, in vivo in vitro における効果の一致, 反応の時間経過等の点で合成 TRF の作用が特異的なものである事が推定される。

文 献

- 1) Redding, T.W., Bowers, C.Y., and A.V. Schally : Endocr. 79 : 229, (1966)
- 2) 佐古田雅弘 : 第17回日本医学会総会学術講演集III, pp.322, 1967.
- 3) Saffran, M., and A.V. Schally : Canad. J. Bioch. Physiol. 33 : 408, (1955)
- 4) McKenzie, J.M. : Endocr. 63 : 372, (1958)
- 5) Folkers, K., F. Enzmann, J. Boler, C.Y. Bowers and A.V. Schally : Bioch. Biophysic. Comm. 37 : 123, (1969)
- 6) Schally, A.V., C.Y. Bowers, and T.W. Redding : Endocr. 78 : 72.6, (1966)
- 7) Guillemin, R., E. Sakiz, and D.N. Ward : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 118 : 1132, (1965)
- 8) Tsuji, S., M. Sakoda, and M. Asami : In "Integrative mechanism of neuroendocrine system" (Itoh, S. ed.) Hokkaido Univ. Med. Libe. Ser. pp. 63, Sapporo, (1968)
- 9) Schally, A.V., T.W. Redding, J.F. Barrett, and C.Y. Bowers : Fed. Proc. 25 : 348, (1966)
- 10) Schally, A.V., T.W. Redding, C.Y. Bowers, and J.F. Barrett : J. Biol. Chem. 244 : 4077, (1969)
- 11) Schally, A.V., Bowers, C.Y., Redding, T.W., and J.F. Barrett : Bioch. Biophys. Res. Comm. 25 : 165, (1966)

合成視床下部ホルモン TRF (Thyrotropin-Releasing Factor) の生物作用にかんする研究

第2篇 合成 TRF の生物作用の特異性及び作用修飾因子

神戸大学医学部第2内科

佐古田 雅 弘, 大 槻 真
日 下 孝 明, 森 額太郎
嶺 山 隆 司

(昭和45年7月1日受付)

Folkers らの合成になる Tripeptide (pyro-glutamylhistidylproline amide) の TRF 作用を観察しこの合成 TRF が TSH の賦活作用をもたず, TSH 様作用を有せず, 既報のように投与量と TSH の反応との間に用量反応関係を有し in vivo と in vitro での効果の一致性からみてその TRF 作用は特異的なものである事を証明した. 合成 TRF は T_4 によつて抑制を受けこの T_4 の抑制作用は T_4 投与量と合成 TRF 投与量とに容量依存的である.

1 緒 言

下垂体 TSH 分泌の調節に働く視床下部起源の液性因子が TRF と呼ばれ, その抽出分離への努力が続けられて来た. 1969年までの数年間にわたる諸家の研究¹⁾²⁾³⁾により TRF が Glutamine, Histidine, Proline の3アミノ酸を含むことその他の構造特性が判明し1969年秋には Folkers らによつて合成された pyro Glutamylhistidylproline Amide [(pyro) Glu-His-Pro(NH₂)] と呼ばれる Tripeptide に TRF 作用がある事が報告された.

この様な経過途上に TRF がホルモンとしての条件を満し Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)⁴⁾ と呼ばれるようになった. このように合成 TRF の生物作用特異性を検討することはホルモンとしての位置性格を想定する場合には不可欠であると考えられるがこの点については合成者である Folkers らの報告でも不詳である. 第1篇で Folkers より提供された合成 TRF の in vivo, in vitro における効果を観察したが本篇では合成 TRF の作用特異性の検討に通じる作用点, 作用機序, 作用修飾因子等の点を明らかにしたい.

II 実 験 方 法

1. 実験動物

体重13—15gのDD系雌マウス, 体重120—130gのSwiss Webster系雄ラットを低ヨード含有飼料及び蒸溜水にて飼育したものをを用いた.

2. TRF 検定法

a) in vivo マウス法: ラベル甲状腺ホルモン放出による血中放射能変動を指標とする Redding¹³⁾ 変法によつた. 即ち実験2日前に $5\mu\text{Ci}$ ^{131}I Na を腹腔内投与, 1日前に T_4 $1.0\mu\text{g}$ を皮下注射し実験当日前採血のち検体を静注し2時間後再度採血して両者の Bloodradioactivity を測定, 増加率を%で表した.

b) in vivo ラット法: 血漿 TSH の変動を指標とする佐古田¹⁴⁾の方法によつた. 即ち実験4時間前に

T₄ 0.4 μ g/100g 体重を皮下注射しペントバルビタール麻酔下に頸静脈より検体投与後10分で採血し TSH 検定に供した。

c) in vitro ラット法 (下垂体短時間インクベーション法) : Saffran¹⁵⁾変法によつた。即ち3頭からのラット下垂体前葉を狭部にて正確に2等分し Krebs-Ringer-Bicarbonate-Glucose (200mg/dl)-Buffer (以下 KRBG と略す) (pH=7.2) 2ml を入れた容量 25ml の2つのフラスコに夫々3半切片を別々に入れ実験群及び対照群とした。95% O₂-5% CO₂ にてフラスコを充し37°Cにて60分の Preincubation を行なつたのち下垂体を別のフラスコに入れ実験群には検体を添加した KRBG 液にて Final incubation を60分行ない Medium 内の TSH 活性を実験群と対照群で比較した。(Paired incubation)

3. TSH 測定法

McKenzie 変法¹⁶⁾によつた。最低測定可能値は 0.1musp, 精度指数は1.359である。

4. 合成 TRF

Dr. Folkers¹⁷⁾の合成, 提供によるもの (IBR 228, Institute for Biomed. Research, Univ. of Texas) で構造は Pyroglutamylhistidylproline amide [(pyro) Glu-His-Pro (NH₂)] であり使用に際しては生理食塩水に溶解した。

5. 下垂体剔除

田中氏外聴道法⁵⁾により施行剔除後72時間で実験に供した。実験終了後, 下垂体組織の残存のないことを確認した。

6. 結果の推計学的処理

in vivo, in vitro で放出された TSH の検定には1群6—8匹のマウスを使用し群間の差の検証は Student の t test によつた。

III 実験結果

A. 合成 TRF の作用特異性にかんする観察

1) 合成 TRF の TSH 賦活作用の否定 (Table 1)

合成 TR が TSH 賦活作用を有していてその結果, 一見 TSH 放出効果をもつ如く認識される危険を除くため牛 TSH (Thhytopar, Armour) と TRF を混合し15分間37°Cにて incubate しその後にマウスに投与した。この結果合成 TRF は TSH の賦活効果を全く有しなかつた。

2) 合成 TRF の TSH 様作用の否定 (Table 2)

合成 TRF が甲状腺レベルに働いて TSH 様作用を発揮するため一見 TSH 放出効果をもつ如く認識される危険を除くため (a) TSH 検定のための前処置を受けたマウス (即ち 10 μ g T₄ により内因性 TSH 放出は抑制されたマウス) に合成 TRF を投与。 (b) 下垂体剔除ラットに合成 TRF を投与しその血漿を TSH 検定, の2つの点を検討したが何れの場合にも TSH 様作用を全く認めなかつた。

B. 合成 TRF に対する Thyroxine の影響 (Table 3)

Table 1. Absence of potentiation for TSH by synthetic TRF

Preparation	¹³¹ I Release from thyroid Gland of mice, % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs. $\pm$ S.E.	P
beef TSH* 0.2mUSP	147.0 $\pm$ 13.9	—
beef TSH 0.2mUP+TRF 10 μ g	186.0 $\pm$ 15.0	N. S.
beef TSH 0.4mUSP	249.0 $\pm$ 26.0	—
beef TSH 0.4mUSP+TRF 10 μ g	244.0 $\pm$ 19.5	N. S.

* Thytopar (Armour pharmac. Co.) were used as beef TSH preparation

Table 2. Absence of TSH activity of synthetic TRF

Preparation	Animal	¹³¹ I Release from thyroid Gland, % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs.±S.E.	P
Saline	Untreated rat	67.0± 8.2	—
Synth. TRF 10μg	Untreated rat	324.0±17.1	<0.05
Synth. TRF 5μg	Hypophysectomized rat	87.5± 4.1	N.S.
Synth. TRF 10μg	Hypophysectomized rat	88.6± 5.4	N.S.
Saline	T ₄ pretreated mice	80.0± 6.0	—
Synth. TRF 0.1μg	T ₄ pretreated mice	105.0± 7.4	N.S.

Table 3. Effect of increasing dose of T₄ on synthetic TRF activity

Treatment	¹³¹ I Release from thyroid Gland, % of initial blood ¹³¹ I at 2hrs.±S.E.	P
No T ₄ +Synth. TRF 1.0μg	236.2±11.0	—
1.0μg T ₄ +Synth. TRF 1.0μg	262.2±11.2	N.S.
3.0μg T ₄ +Synth. TRF 1.0μg	172.2± 7.7	<0.005
No T ₄ +Synth. TRF 10.0μg	263.0±22.3	—
1.0μg T ₄ +Synth. TRF 10.0μg	251.0±20.0	N.S.
3.0μg T ₄ +Synth. TRF 10.0μg	187.6± 4.7	N.S.
10.0μg T ₄ +Synth. TRF 10.0μg	172.5±12.7	<0.025

予め4時間前にラットに種々の量の Thyroxine (以下 T₄) を皮下注射し種々の量の合成 TRF を投与して血中 TSH の変動をみた。合成 TRF 1.0μg 投与の場合は予め投与した T₄ 3.0μg, により TRF の TSH 放出作用は抑制された。一方合成 TRF 10.0μg 投与では予め投与した T₄ 3.0μg, により TRF の TSH 放出作用は抑制を受けず T₄ 10.0μg 投与で初めて抑制された。即ち T₄ は合成 TRF 作用を抑制するがこの抑制は予め投与する T₄ 量と合成 TRF の投与量とに容量依存的であるといえる。

IV 考 按

1. 合成 TRF の作用特異性

TRF の存在が想定されその抽出分離の過程で問題となつたのは TRF 効果の検定に於て特異的な TRF 作用を確保する点にあつた。このために著者らを含めて幾人かの研究者⁸⁾⁷⁾⁸⁾から TRF としての Criteria が提示された。その目的とするところは下垂体に作用点を有して (即ち内因性 TRF の動員に働かず、且つ甲状腺レベルに働くのではなく) TSH を放出させ (即ち TSH の賦活化又は不活性化の抑制に働かず) ホルモンの特徴である用量反応関係と一定の作用パターンをもつ事実を確保するにある。この視点からみて合成 TRF の特異性に対する検討は重要と思われる。がこの点については Folkers からも明らかにしていない。著者らは前述の様に合成 TRF が TSH の賦活作用をもたず、又甲状腺レベルに働く TSH 様作用を有せず、且つ生理的的刺激である寒冷に対する TSH 反応を抑制しうる T₄ 量の前処置下 (1~5μg の T₄ 前処置) に於ても合成 TRF が TSH 放出を引起す事実を明らかにしたがこの事実は合成 TRF の作用特異性を強く支持するものと考えられる。更に第1篇で述べた用量反応関係の存在, in vivo, in vitro の一致性を加えるところに合成 TRF の作用特異性は確保されたといえる。

2. 合成 TRF に対する Thyroxine の影響

純化 TRF による TSH 放出が T_4 によつて抑制される事実が Guillemin⁹⁾, Schally¹⁰⁾, 著者¹¹⁾ らによつて指摘されている。即ち T_4 の投与量を次第に増加して、一方 TRF の種々の量を与えると一定量の T_4 前処置では一定量の TRF の TSH 放出作用が抑制される。逆に TRF 投与量を次第に増加することによつて T_4 による抑制を突破して TSH 放出を起す。ここには TRF と T_4 との間に dose dependent な negative interaction と呼ばれるべき関係が存在するといえる。今回合成 TRF について T_4 の影響を観察したが合成 TRF についても全く同様の事実が認められた。即ち実験成績にみるように合成 TRF 1.0 μ g の効果は T_4 3.0 μ g, の前処置で抑制されている。合成 TRF 投与を 10.0 μ g に増進すると T_4 3.0 μ g, では抑制を受けず 10.0 μ g の T_4 で初めて TRF 作用抑制の傾向を示す。

前述のような T_4 による純化 TRF 作用抑制の背景には下垂体の蛋白代謝に関連する機序が想定され著者らも且つて報告した¹²⁾がこの点について合成 TRF を使用して T_4 の抑制機序を検討する必要があると考えられる。

V 結 論

Folkers の合成になる Tripeptide [(pyro) Glu-His-Pro (NH₂)] の TRF 作用の特異性及び作用修飾因子について検討し以下の結果を得た。

1. 合成 TRF は牛 TSH に対する賦活作用をもたない。
2. 合成 TRF は TSH 様作用をもたない。
3. TSH 賦活作用, TSH 様作用をもたず且つ前編に述べた合成 TRF 投与量と TSH 放出との間の用量反応関係, in vivo, in vitro に於ける効果の一致性, 特徴的な TSH 放出の時間経過と併せ考え合成 TRF の作用は特異的なものであるといえる。
4. T_4 は合成 TRF の作用を抑制する。この T_4 の抑制作用は前投与する T_4 量と合成投与 TRF 量に容量依存的である。

文 献

- 1) Schally, A.V., T.W. Redding, C.Y. Bowers, and J.F. Barrett : J. Biol. Chem. 244, 4077, (1969)
- 2) Burgus, R., Stillwell, R.N. McCloskey, J.A., Ward, D.N., Sakiz, E., and R. Guillemin : The physiologist 9 : 149, (1966)
- 3) Tsuji, S., M. Sakoda, and M. Asami : In "Integrative mechanism of neuroendocrine system" (Itoh, S.ed.) Hokkaido Univ. Med. Libr. Ser. pp. 63, Sapporo, (1968).
- 5) 田中 明 : 境之義研究所年報, 第 5 号, (1957).
- 6) Guillemin, R. : Rec. Prog. Hor. Res. 20 : 89, (1964).
- 7) McCann, S.M. and Dhariwal, A.P.S. : In "Neuroendocrinology I" Acad. Press pp. 261, (1966).
- 8) 佐古田雅弘 : 日本医師会雑誌, 60 ; 561, (1968).
- 9) Vale, W., R. Burgus, and R. Guillemin : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 125 : 210, (1967).
- 10) Bowers, C.Y., Schally, A.V. Reynolds, G.A. and D.W. Hawley : Endocr. 81 : 741, (1967).
- 11) Tsuji, S., M. Sakoda, and T. Okuno : Proc. 3rd Asia Ocean. Cong. Endocr. part II, 362, (1967).
- 12) Tsuji, S., Sakoda, and H. Fukatsu : Endocr. Jap. Supp. I, 35, (1969).
- 13) Redding, T.W., Bowers, C.Y., and A.V. Schally : Endocr. 79 : 229, (1966).
- 14) 佐古田雅弘 : 第 17 回日本医学会総会学術講演集 III, pp. 322, (1967).
- 15) Saffran, M., and A.V. Schally : Canad. J. Bioch. Physiol. 33 : 408, (1955).
- 16) McKenzie, J.M. : Endocr. 63 : 372, (1958).
- 17) Folkers, K., F. Enzmnn, J. Boler, C.Y. Bowers and A.V. Schally : Bioch. Biophysic. Res. Comm. 37 : 123, (1969).