Synthetic Luteinizing Releasing Hormone and its Clinical Application

Ryosuke NAKANO and Fumikazu KOTSUJI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University, School of Medicine
Kobe, Hyogo 650, Japan (Director : Prof. Shimpei Tojo)

Recently the following decapeptide sequence for porcine luteinizing releasing hormone (LRH) was proposed by Schally's group: (pyro) Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂. According to this report, many investigators have succeeded in synthesizing LRH and this synthetic LRH is now available for clinical study. Then, synthetic LRH of Daiichi Pharmaceutical Company, Tokyo, Japan was tested in the human being. Two hundred micrograms of synthetic LRH was injected into the following 8 women and serum LH response was tested by double antibody radioimmunoassay (RIA): 2 volunteers of follicular phase, 2 volunteers of luteal phase, 2 anovulatory females of amenorrhea with estrogenic activity and 2 anovulatory females of amenorrhea without estrogenic activity. Single iv injection of 200 micrograms of synthetic LRH induced a significant increase in LH release into the blood within 30 minutes in 7 of 8 subjects. Only one exception was a case of hypopituitarism and no response of LH release was to be found after injection. This study demonstrate that synthetic LRH will be utilized effectively for the study on the function of hypothalamo-pituitary gonadal axis. Moreover, induction of ovulation by synthetic LRH and inhibition of ovulation by antibody of LRH is promising in the human being.

(See pp. 115~121)

Synthetic Luteinizing Releasing Hormone と 臨床応用の可能性

神戸大学医学部産科婦人科学教室（主任：東条伸平教授）

仲野良介，小辻文和

（昭和47年2月23日受付）

synthetic luteinizing releasing hormone（合成 LRH）の臨床応用として，正常排卵婦人4例，無排卵症婦人4例の計8例に，合成 LRH 200 μ g を静脈内に投与し，血中への LH の放出の状態を二抗体法による radioimmunoassay（RIA）によつて検討した．排卵婦人4例と無排卵症婦人4例のうちの3例は，血中 LH が LRH 投与後15分から上昇し始め，投与後30分前後でピークを示して，以後漸減するという平均的パターンを示したが，下垂体機能低下症の1例のみは LRH に対して反応を示さなかった．

LRH の研究の歴史について文献的考察を行うとともに，今後の研究発展の可能性について論及した．

緒 言

視床下部—下垂体—性腺系という精緻をきわめた機能環は生殖生理学の分野における最も重要なテーマの一つであり，その複雑なメカニズムは古くから多くの研究者達の関心を集めていた．

この機能環のうち，視床下部と下垂体とのつながりについては，1960年代に入つて Kobayashi et al. (1961)¹⁾ や Igarashi & McCann (1964)²⁾ らによつて両者を機能的に結ぶ mediator の存在が想定され，多くの実験的事実の裏付けから gonadotropin releasing factor (GRF), follicle stimulating hormone releasing factor (FSH-RF), luteinizing hormone releasing factor (LH-RF) などの概念がこの分野に導入されるに至つた．しかし，この GRF は抽出，精製の過程が複雑であり，かつ収量が微量であるなどの問題点もあつて，その臨床応用はなかなか実現されなかつた．

周知のように，視床下部からは GRF のほかに多くの releasing factor (RF) が分泌されており，それぞれの分野で広範な研究が行われていたが，その一つである thyrotropin releasing hormone (TRH) が，1969年に至つて (Pyro) Glu-His-Pro-NH₂ なるアミノ酸配列を有する tetrapeptide であることが確認され，その合成も可能となつた³⁾⁴⁾．かくして，その臨床応用が各方面で行われるようになり，視床下部—下垂体—甲状腺系の分野における研究は飛躍的に発展した．

luteinizing releasing hormone (LRH) についても，1971年 Schally らのグループによつて，その構造が (Pyro) Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ から成る decapeptide であることが発表され⁵⁾⁶⁾，その合成も可能となつたので，TRH の場合と同様，今後，その臨床応用により生殖生理学の分野に一大発展のもたらされることが期待される．

われわれは，今回，第一製薬株式会社から synthetic luteinizing releasing hormone（合成 LRH）である DS-2521 (lot 3) 2mg の提供を受け，これを臨床応用する機会を得たので，少数例ではあるが，ここにその成績を報告し，あわせてこれまでの GRF に関する研究の文献的考察と，合成 LRH を用いての今後の研究発展の可能性について論及する．

なお，hypothalamic releasing hormone については，目下，用語法の統一がみられず，いろいろな名称が錯綜して用いられているが，本稿では原著者の用語法をそのまま用いた．

研 究 方 法

1) 対 象

合成 LRH の投与による血中 LH の反応を検討するため、次の 8 例を対象として選んだ。

例 1) 大〇節〇, 34才, 正常卵胞期

例 2) 山〇長〇, 37才, 正常卵胞期

例 3) 板〇美〇, 29才, 正常黄体期

例 4) 橘〇節〇, 24才, 正常黄体期

例 5) 坂〇千〇, 28才, 無排卵症。第 1 度無月経。無排卵症の病因は視床下部一下垂体-卵巢系の機能失調と考えられる。クロミッドの投与によつて排卵の誘発は可能。

例 6) 瀬〇良〇 34才, 無排卵症。第 1 度無月経。生検により卵巢は多嚢胞型。クロミッド投与により, 排卵誘発可能。

例 7) 木〇洋〇 36才, 無排卵症。第 2 度無月経。生検により卵巢は線条型 (streak type)。いわゆる卵巢性無排卵症で, クロミッド, HMG-HCG などの投与に対して反応は認められない。

例 8) 音〇文〇 21才, 無排卵症。第 2 度無月経。臨床内分泌学的検査によつて視床下部一下垂体系の異常が疑われ, 中枢性の無排卵症と考えられる。クロミッドに対して反応性なし。

以上, 4 例の対照群と 4 例の無排卵症例の計 8 例を対象とした。

2) 合成 LRH とその投与方法

第一製薬株式会社から提供をうけた synthetic luteinizing releasing hormone (合成 LRH) である DB-2521 (lot 3) を用いた。合成 LRH は (Pyro) Glu-His-Trep-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ から成る decapeptide で, すでに Wister 系雌ラットを用いた動物実験によつて, 悪急性毒性検査が行われて, その安全性が確認されており⁷⁾, ヒトに投与した際の副作用もほとんど認められないことが立証されている⁸⁾。

この合成 LRH 200 μ g を上記の各対象に single shot により静脈内 投与し, 投与前, 投与後 15 分, 30 分, 45 分, 60 分, 120 分の血中 LH の値を二抗体法による radioimmunoassay (RIA) によつて測定した。

3) RIA の方法

Odell et al. (1967)⁹⁾ による double antibody radioimmunoassay を一部改変した方法によつた。方法の詳細についてはすでに報告した¹⁰⁾。標準品としては LER 907 を用い, 血中 LH の値を μ g equivalent LER 907/100ml serum として表した。データーの算出には dose response curve on logarithm-logit paper を用いた¹¹⁾。

結 果

8 例の対象に合成 LRH 200 μ g を静脈内に投与した際の血中 LH の値の経時的変動を Fig. 1~Fig. 8 に示した。

例 1 (Fig. 1) と例 2 (Fig. 2) は対象である正常卵胞期の 2 例であるが, 血中 LH の値はいずれも, 投与後 15 分から上昇し始め, 投与後 30 分で投与前の 6~8 倍という値のピークを示して, 以後, 漸減の傾向を示した。

例 3 (Fig. 3) と例 4 (Fig. 4) は同じく対象の正常黄体期の 2 例であるが, 血中 LH は前述の正常卵胞期の 2 例と相似のパターンを示した。

例 5 (Fig. 5) は視床下部一下垂体-卵巢系の機能失調による無排卵症と考えられる症例であるが, 合成 LRH 投与後 15 分から血中 LH は上昇し始め, 投与後 30 分で投与前値の約 3 倍の値を示してピークを形成し, 以後, 次第に減少した。

例 6 (Fig. 6) は多嚢胞卵巢症候群の例であるが, 投与前の血中 LH の値は高値を示し, 合成 LRH の投与に反応して LH の値はさらに上昇し, 投与後 30 分で投与前値の 2.5 倍の値を示して, 以後, 減少の傾向

Fig. 1. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Normal volunteer : follicular phase)

Fig. 3. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Normal volunteer : luteal phase)

Fig. 2. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Normal volunteer : follicular phase)

Fig. 4. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Normal volunteer : luteal phase)

を示した。

例 7 (Fig. 7) はいわゆる線条卵巢 (streak ovary) の症例で、無排卵の原因を卵巢に求めうる症例であるが、合成 LRH の投与によつて、血中 LH は対照群とほぼ同型のパターンをもつて反応し、視床下部一下垂体系の機能は、ほぼ正常に保たれていることを示している。

例 8 (Fig. 8) は臨床的に中枢に原因の考えられる無排卵症例であるが、合成 LRH の投与によつて、血中 LH には全く反応が認められず、何らかの下垂体機能障害の存在が推測される。

以上の 8 例について、合成 LRH の投与による血中 LH の反応を総括してみると、対照群では合成 LRH 200μg の静脈内投与によつて、血中 LH の値は投与後 15 分から上昇し始め、投与後 30 分前後で最高値を示してピークを形成し、以後、次第に減少の傾向を示すという平均的パターンを呈した。無排卵症例でも今回の症例では、ほとんどが上記の対照群とアナログの反応パターンを示したが、下垂体機能障害の疑われる 1 例のみは、合成 LRH に対して全く反応を示さなかった。

なお、合成 LRH (DB-2521) の静脈内投与に起因すると思われる副作用には全く遭遇しなかった。

Fig. 5. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Anovulation : Amenorrhea 1°)

Fig. 7. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Anovulation : Amenorrhea 2° : Streak ovary)

Fig. 6. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Anovulation : Amenorrhea 1° : Polycystic ovary)

Fig. 8. Serum LH response after iv injection of synthetic LRH (Anovulation : Amenorrhea 2°)

考 按

性腺の機能が下垂体の支配下にあり、下垂体の機能がさらに上位の中枢である視床下部の支配を受けていることは、かなり古くからよく知られていた事実であつた。このテーゼは生殖生理学の分野に、視床下部—下垂体—性腺系という精緻をきわめた一つの機能環という概念体系を樹立していた。

この視床下部—下垂体—性腺系という機能環のダイナミックスについては、フィードバック機構を中心として数々のすぐれた業績が報告されてきたが、視床下部—下垂体を一つの単位と見做した中枢に対する性腺という標的器官との関係という観点からの報告が多く、視床下部と下垂体との有機的機能体としてのつながりについては解明不十分な点が多かつた。

1960年代になつて、視床下部から下垂体門脈系を通じて下垂体に達し、その機能を調節する mediator の存在が立証され、ここに releasing factor (RF) あるいは inhibiting factor (IF) などという概念が導入されるに至つた。

gonadotropin releasing factor (GRF) については Kobayashi et al. (1961)¹¹, follicle stimulating hormone releasing factor (FSH-RF) については Igarashi & McCann (1964)²³, Mittler & Meites (1964)¹², Kuroshima et al. (1965)¹³, また luteinizing hormone releasing factor (LH-RF) については McCann et al. (1960)¹⁴, Campbell et al. (1961)¹⁵ などがそれぞれ動物実験によつて releasing factor (RF) の存在を証明した。

その後も、FSH-RF や LH-RF に関する研究は盛んに行われ、主として動物実験によつてその実験内分泌学的意義が追求されたが、この間の推移について逐一文献の紹介を行うスペースがないので、ここには McCann & Ramirez (1964)¹⁶ をはじめ、いくつかの優れたモノグラフ¹⁷⁾¹⁸⁾や綜説¹⁹⁾²⁰⁾を紹介するに止める。

ところで、ヒトにおける GRF 研究の問題は比較的最近になつて、ようやくクローズアップされて来た。すなわち、Igarashi et al. (1968)²¹ はウシの視床下部から抽出した FSH-RF を14例の無排卵症婦人に投与して、血中の FSH が上昇することを認め、少数ながら排卵を誘発し得た症例もあつたことを報告して、他種動物の FSH-RF がヒトにも有効であることを立証した。この報告は、他種動物の RF を最初にヒトに臨床応用し、その有効性を立証したもので、その意義は高く評価されるべきであろう。つづいて、Root et al. (1969)²³ がヒツジの LH-RF を、Kastin et al. (1969)²², (1970 a)²⁴, (1970 b)²⁵ がブタの LH-RH をヒトに臨床応用して、その有効性を立証した。以上の一連の報告によつて、GRF には種特異性がないことが証明されたし、GRF に対するヒト下垂体の反応についても、一応の知見が得られた。

一方、ヒトの視床下部の RF についての研究は Schally のグループを中心として推進されて来た。Schally et al. (1967)²⁶ はヒトの視床下部に各種の下垂体性の tropic hormone に対する RF が存在することを立証していたが、さらに 1970 年に至つて、339個のヒト視床下部から、各種の RF を抽出、精製して hypothalamic releasing hormone と命名した²⁷。Kastin et al. (1971)²⁸ がこれをヒトに臨床応用して、LRH としての効果を立証した。

また、GRF の化学構造についても、多くの研究が続けられて来たが、1971年に至り、Schally のグループによつて、ブタの視床下部から抽出された LRH のアミノ酸配列は (Pyro) Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-NH₂ から成る decapeptide であることが報告された⁵⁾⁶⁾。これらの報告をもとにして、decapeptide である LRH の合成が各方面でなされはじめ、わが国でもこの synthetic LRH は動物による毒性試験やヒトの volunteer による副作用の検討がなされて、すでに臨床応用の段階に達している。

われわれは今回、第一製薬株式会社より、合成 LRH, DS-2521 (lot 3) の提供を受けたので、前述のように8例の対象に各 200 μ g を静脈内に投与して、投与後の血中 LH の反応を RIA によつて追求した。提供された DS-2521 が 2 mg という少量であり、少数例の検討しかできなかったのも、今回の臨床実験のみから結論を下すことは差し控えたい。ただ、思弁的推論が許されるとすれば、8例のデータからわれわれは次のような推論を下している。

すなわち、対照群である正常卵胞期の2例と正常黄体期の2例について、LRH 投与後の血中 LH の反応パターンを観察すると、いずれも投与後15分から血中 LH の上昇が認められ、投与後30分でピークを示して、以後、漸減の傾向を示した。

無排卵症については、臨床内分泌学的に第1度無月経と診断された2例、すなわち、視床下部一下垂体一卵巢系の機能失調を疑はしめる1例と、多嚢胞卵巢症候群の1例は、いずれも LRH によく反応し、対照群とはほぼ同様の血中 LH の反応パターンを示した。またこれら2例は、いずれもクロミッドの投与によつて排卵を誘発し得た症例である。次に、第2度無月経の2例、すなわち、線条卵巢 (streak ovary) による卵巢性無排卵症の1例と、視床下部一下垂体系に何らかの異常の想定される、いわゆる中枢性無排卵症の1例とであるが、前者は LRH の投与に対して対照群と同様の反応を示したが、後者では全く反応が認められ下垂体機能障害の存在が推測された。なお、両者ともクロミッドの投与による排卵の誘発が不成功に終わった症例である。

合成 LRH よりもやや早く、合成に成功した合成 TRH³⁾⁴⁾については、これを臨床応用して視床下部一

下垂体-甲状腺系, なかんずく下垂体機能の検索が進められ, 多くの報告がなされているが, 合成 LRH についても, これを応用して視床下部-下垂体-性腺系の異常に関する病態究明がさらにすすめられるであろうし, また, 合成 TRH と合成を LRH 組み合わせての多角的, 総合的な下垂体機能の検査法も開発され得るであろう。

上記の診断学的な応用の可能性の他に, 治療学上の問題としては, 合成 LRH の単独投与で, あるいはクロミッド, ゴナドトロピンなどとの併用による排卵誘発も非常に魅力ある課題であるし, 逆にもし, 合成 LRH に対する抗体の作成が可能であれば, これを利用した排卵抑制の可能性も十分に想定されるところである。

また, LRH の測定法が完成されれば, 本稿のはじめに, 「精緻をきわめた」と表現した視床下部-下垂体-性腺系の機能環のメカニズムが, 神秘的ヴェールをとって, われわれの前にその全貌を現わし, 生殖生理学研究分野に新しい局面が展開されるであろう。

なお, decapeptide である LRH とは別に (Pyro) Glu-Tyr-Arg-Trp-NH₂ なる構造式を有する新しい synthetic tetrapeptide にも LRH 活性の存在することが Chang et al. (1971)²⁹⁾ や Bowers et al. (1971)³⁰⁾ によつて報告されており, この synthetic tetrapeptide についても, 更に検討が進められるものと考えられる。

稿を終るにのぞみ, 東条伸平教授の御校閲に深謝します。

合成 LRH (DS-2521) を提供していただいた第一製薬株式会社と, RIA のための LER 960, LER 907 などを提供していただいた National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases (NIAMD) に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Kobayashi, T., T. Kobayashi, T. Kigawa, M. Mizuno, and Y. Amenomori : *Endocrinol. Japon.* 8 : 223, (1961).
- 2) Igarashi, M. and S.M. McCann : *Endocrinology* 74 : 446, (1964).
- 3) Folkers, K., F. Enzmann, J. Bøler, C.Y. Bowers and A.V. Schally : *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37 : 123, (1969).
- 4) Burgus, R., T.F. Dunn, D. Desiderio and R. Guillemin : *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 269 : 1870, (1969).
- 5) Matsuo, H., Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura and A.V. Schally : *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 43 : 1334, (1971).
- 6) Baba, Y., H. Matsuo and A.V. Schally : *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 44 : 459, (1971).
- 7) 高橋日出彦, 白石武昌, 宮下武美, 松本圭史 : 「Wistar 系雌ラットに対するDS-2521 の腹腔内投与による悪急性毒性について」 (1971).
- 8) 青野敏博 : Personal Communication
- 9) Odell, W.D., G.T. Ross, and P.L. Rayford : *J. Clin. Invest.* 46 : 248, (1967).
- 10) 仲野良介 : 日産婦誌, 23 : 1051 (1971).
- 11) 仲野良介 : 日内泌誌 47 : 589, (1971).
- 12) Mittler, J.C. and J. Meites : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 117 : 309, (1964).
- 13) Kuroshima, A., Y. Ishida, Y. Bowers and A.V. Schally : *Endocrinology* 76 : 614, (1965).
- 14) McCann, S.M., S. Taleisnik and H.M. Friedman : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* 104 : 432, (1960).
- 15) Campbell, H.J., G. Feuer, J. Garcia and G.W. Harris : *J. Physiol. London* 157 : 30, (1961).
- 16) McCann, S.M. and V.D. Ramirez : *Rec. Progr. Horm. Res.* 20 : 131, (1964).
- 17) 五十嵐正雄 : 第19回日本産科婦人科学会宿題報告要旨「脳下垂体性ゴナドトロピンの分泌に関する研究」(1967).
- 18) 小林拓郎 : 第20回日本産科婦人科学会招請講演要旨「間脳-下垂体-性腺系の動的考察」(1968).
- 19) 熊原雄一, 宮井 潔, 福地 稔, 松岡 徹 : 代謝, 7 : 419, (1970).
- 20) 鈴木雅州, 平野睦男 : ホと臨, 19 : 927, (1971).
- 21) Igarashi, M., N. Yokota, Y. Ehara, R. Mayuzumi, T. Hirano, S. Matsumoto and M. Yamasaki : *Am. J. Obst. & Gynec.* 100 : 867, (1968).
- 22) Kastin, A.J.,

- A.V. Schally, C. Gual, A.R. Midgley, C.Y. Bowers and A. Diaz-Infante : J. Clin. Endocr. 29 : 1406, (1969).
23) Root, A.W., G.P. Smith, A.P.S. Dhariwal and S.M. McCann Nature 221 : 570, (1969).
24) Kastin, A.J., A.V. Schally, C. Gual, A.R. Midgley, C.Y. Bowers and F. Gomez-Perez : Am. J. Obst. & Gynec. 108 : 177, (1970).
25) Kastin, A.J., A.V. Schally, C. Gual, A.R. Midgley, M. C. Miller and F. Flores : J. Clin. Endocr. 31 : 689, (1970).
26) Schally, A.V., E.E. Muller, A. Arimura, C.Y. Bowers, T. Saito, T.W. Redding, S. Sawano and P. Pizzolato : J. Clin. Endocr. 27 : 755, (1967).
27) Schally, A.V., A. Arimura, C.Y. Bowers, I. Wakabayashi, A.J. Kastin, T.W. Redding, J.C. Mittler, R.M.G. Nair, P. Pizzolato and A.J. Segal : J. Clin. Endocr. 31 : 291, (1970).
28) Kastin, A.J., A.V., Schally, C. Gual, A.R. Midgley, A. Arimura, M.C. Miller and A. Cabeza : J. Clin. Endocr. 32 : 287, (1971).
29) Chang, J., H. Sievertsson, C. Bogentoft, B.L. Currie, K. Folkers and C.Y. Bowers : Biochem. Biophys. Res. Comm. 44 : 409, (1971).
30) Bowers, C.Y., J. Chang, H. Sievertsson, C. Bogentoft, B.L. Currie and K. Folkers : Biochem. Biophys. Res. Comm. 44 : 414, (1971).

附記 本稿脱稿後に合成 LRH の臨床応用に関して、次の文献が発表された。
斉藤史郎, 阿部 薫 : ホと臨 20 : 85 (1972).