Experimental Studies on the Mechanism of Human Chorionic Gonadotropin in Rabbit Ovary

Yahito KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University Medical School, Osaka, Japan.
(Director Prof. : Keiichi Kurachi)

It has been well-known that gonadotropin's function on the ovary is to induce such changes as ovulation, luteinization and its maintenance, and that gonadotropin also plays another important role in the metabolism of steroid hormones.

However, the mode of action of gonadotropin has not been clarified yet. As the first step to clarify the mode of action of gonadotropin, specific relations between HCG administered and rabbit ovary was studied in this experiment.

1) Intravenous administration of HCG in a rabbit

1500 I.U. of HCG was injected into the auricular vein of a rabbit and blood level of HCG was measured by radioimmunoassay during the lapse of time. Then 2.5 μCi (S.A. 210 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) of ^{131}I -HCG and 10 I.U. of HCG were combinedly administered to the rabbit and radioactivity in blood was recorded by a well-type gamma detector. As a result, both cases showed two-phase decrement curves with $t^{1/2}=37.9$ min and $t^{1/2}=8.35$ hr.

2) Suppression of ovulation by anti-HCG serum

Anti-HCG serum was administered following to the intravenous administration of 10 I.U. of HCG in a rabbit.

As a result, ovulation was suppressed when the administration of anti-HCG serum was made within 30 minutes.

By the administration after 30 minutes, however, ovulation was not suppressed. The above experiment showed that the matter of ovulation in a rabbit due to the HCG administration was brought into a inner part of ovary, within a short time, where anti-HCG serum is unable to reach.

3) Distribution of ^{131}I -HCG in organs

According to the paired labelled technique, 50 μCi (S.A. 200–300 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) of ^{131}I -HCG, 250 μCi (S.A. 130–180 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) of ^{125}I -human serum albumin, 10 I.U. of cold HCG and 10 mg of cold human serum albumin were mixed and administered to a rabbit. After a fixed time, the chest of the rabbit was opened and 5L of physiological saline was circulated from the artery to evacuate blood, and then organs were extirpated.

The value of ^{131}I -HCG uptake per ^{125}I -albumin uptake was calculated. In ovary, the value started to rise from 60 minutes after the administration and the highest value

of 8.20, compared to the other organs, was shown two hours later.

When anti-HCG serum was administered at the same time, it showed the low value of 0.18

In kidney and liver, a high value was observed in 15 to 30 minutes after the administration and then gradually decreased. A low value was maintained in skin, uterus and lung. From the above findings, it was considered that HCG showed specific distribution to ovary.

4) Effect of HCG on the activity of adenylcyclase in homogenate of rabbit ovary

At the 6th day after intravenous injection of 30-50 I.U. of HCG, the ovary of rabbits was extirpated to make homogenate. According to the method of Krishina (1968), the effect of HCG on the activity of adenylcyclase in the homogenate was evaluated. The effect was found to be more active at the ovary where the most luteinization takes place. When FSH was administered instead of HCG, the effect of adenylcyclase was not activated. Although it was activated by the administration of TSH, it may be attributable to contamination by LH, taking into consideration the purity of TSH employed in this experiment.

(See pp. 412~421)

家兎卵巢における絨毛性 Gonadotropin の作用機序に関する実験的研究

大阪大学医学部産科婦人科学教室 (主任 倉智敬一教授)

小 林 彌 仁

(昭和47年 5 月 6 日受付)

家兎を用いて、投与した HCG の血中動態を明らかにすると共に、HCG による排卵は抗 HCG 血清の追いかけて投与で30分以内なら阻止されるがそれ以後では阻止されない事を証明した。paired labeled thechnic の応用により ^{131}I -HCG が家兎卵巢に特異的な分布を示す事を証明した。また HCG は黄体形成の認められる家兎卵巢ホモジネート中の adenylyclase 活性を高めるが、FSH と TSH はその作用が弱い事を証明した。

I 緒 言

Gonadotropin はその標的臓器である性腺に作用して、形態学的には排卵現象 (FSH+LH), 黄体化 (LH) とその維持 (LTH), 精子形成の促進 (FSH), など種々な変化を起させ、機能的には性腺における steroid hormone 代謝に大きな役割を演じていることがよく知られている。gonadotropin による排卵現象に関しては、古くから広瀬 (1920)¹⁾, 白井 (1928)²⁾, Friedman (1929)³⁾, らにより研究が進められ、その成果は妊娠反応に応用されて来た。また卵巢における steroid 代謝と gonadotropin との関係は isotope で標識した steroid やその前駆物質を用いることにより、その代謝経路を in vitro の incubation や perfusion 実験により確実に把握できるようになり、Savard (1961)⁴⁾ を始め Huang (1963)⁵⁾, Hammerstein (1964)⁶⁾, その他により詳細な報告があいついでいる。

さらに近年各種ホルモンの作用機序に関して、Haynes ら (1965)⁷⁾による ACTH 作用に始まり gonadotropin の分野でも Hall & Koritz (1964)⁸⁾, Marsch, Butcher, Savard & Sutherland (1964)⁹⁾, Marsch & Savard (1966)¹⁰⁾ らにより cyclic AMP がホルモン作用の mediator として注目をあびるようになった。最近 cyclic AMP の測定法も改良され、Dorrington & Baggett (1969)¹¹⁾らが ^{14}C -ATP を用い、卵巢ホモジネートによる incubation 実験を行い LH が adenylyclase 活性を促進することを報告し、gonadotropin の細胞レベルでの作用機序の解明もその緒につきはじめているが、まだまだ不明の点が少なくない。

そこで今回 HCG の家兎卵巢に対する作用について細胞レベルでの作用機序を解明する為に種々な面から検索をこころみ、始めてその第1段階である HCG と卵巢の特異的な関係を明らかにしたのでここに報告する。

II 実験方法

1) 投与 HCG の血中動態

体重 2.5~3.0kg の雌性成熟家兎 5羽を使用した。

i) 高単位 HCG の血中動態

HCG (Pregnyl-Organon) 1500IU を 2羽の家兎の一侧耳静脈より投与し、大腿静脈にポリエチレンチューブを挿入固定し毎回約 2 mlの血液を経時的に採血し、分離した血清0.4ml 中の HCG 値を Radioimmu-

noassay 法 (谷沢1967)¹²⁾ にて測定した。

ii) 低単位 HCG の血中動態

3羽の家兎の耳静脈より HCG (Pregnyl-Organon) 10IU および谷沢 (1967)¹²⁾ の方法で調整した ¹³¹I HCG 2.5 μ c (S.A. 210 μ c/ μ g) を混合投与し、大腿静脈から経時的に採血し分離した血清 0.3ml 中の放射能を well-type gamma detector で測定した。またさらにこの血清に 5% trichlor acetic acid を加えて生じて沈降物中の radioactivity をも測定した。

2) 抗 HCG 血清による排卵阻止実験

2週間以上単独隔離飼育した体重 2.5—3.0kg の雌性家兎22羽を対照群も含めて6群に分け、一側耳静脈より HCG (Pregnyl-Organon) 10 IU を投与し、次いで反対側の耳静脈より in vitro の抗原抗体反応 (passive hemagglutination) での中和量の3倍量 (30 IU 中和量) に相当する100倍稀釈抗 HCG 血清 5cc を追いかけて投与して、48時間後に開腹し排卵の有無を観察した。

この際用いた抗血清は complete Freund's adjuvant を用い抗原 (Pregnyl-Organon) と等量の water in oil type の emulsion を2週間の間隔で3回以上家兎の両足趾間および背部皮内数ヶ所に分注し、最終の adjuvant 注射後2週間目に booster injection を3日間隔で2回筋肉内注射して7~10日後に採血し分離した血清を、抗体価検定の上で用いた。

3) 各臓器における投与 ¹³¹I-HCG の分布の測定

2週間以上隔離飼育した体重 2.4~3.2kg の雌性成熟家兎 11羽を用い、谷沢 (1967)¹²⁾ の方法により標識した ¹³¹I-HCG (S.A. 200-300 μ c/ μ g) 50 μ g および ¹²⁵I-ヒト血清 albumin (S.A. 130-180 μ c/ μ g) 250 μ c, cold HCG 10 IU (Pregnyl-Organon), cold ヒト血清 albumin 10mg の混合液を各家兎の耳静脈より注入し、原則として投与10分, 15分, 45分, 90分, 120分後に開胸、大動脈を切断し末梢側にむかつて生理的食塩水 5 l で還流脱血し、各臓器が灰白色を呈したのち剔出して取り込まれた ¹³¹I および ¹²⁵I の放射能を well-type gamma detector で同時測定した。ついで全投与量に対する各臓器あたりの ¹³¹I および ¹²⁵I の分布の % を計算して ¹³¹I-HCG uptake 対 ¹²⁵I-albumin uptake 比を算出した。

さらに前述の混合液注入と同時に他側耳静脈より混合液中の HCG を in vitro で中和する量 (passive hemagglutination にて) の3倍の量の抗 HCG 血清を同時に注入して2時間後に還流脱血し、各臓器の uptake 比を算出し比較検討した。なおこの際使用する HCG は出来るだけ精製したものが必須なので Cohen 谷沢変法により精製した HCG (8000IU/mg) を用いて標識し、さらに¹³¹I標識後も agar gel electrophoresis を行い、albumin 分画への denature HCG の多い batch ではこれを除く様にした。

4) 卵巣ホモジネート中の adenylcyclase 活性におよぼす HCG の作用について

i) 家兎卵巣ホモジネートの作製

2週間以上隔離飼育した体重 3.1~3.4kg の雌性成熟家兎 4羽に各々生理的食塩水または HCG (Pregnyl-Organon) を 30 IU, 50 IU (5ml の生理的食塩水に溶解して) づつ耳静

Fig. 1

Procedure

脈より投与し、6日後に卵巣を剔出、0.25M sucrose (1:3 W/V) 溶液を加えて ice bath 内にて硝子ホモジナイザーで軽く磨碎して (single up-down) 家兎卵巣ホモジネートを作製し、直ちに次の incubation を行つた。

ii) incubation

(i) にて作製した 卵巣 ホモジネート 0.01ml に Fig. 1 のように各ホルモン製剤: HCG として Pregnyl (Organon) の 2 IU/0.01ml 液, FSH として NIH-FSH-S₈ の 13 μ g/ml 液, bovine TSH としてチトロパール (Armor) の 26.7 IU/ml 液, を各 0.01ml, adenosine-8-C₁₄-5'-triphosphate (S.A. 38mc/mM, Ranioc-chemical Centre, Amersham) の 1 μ c/0.02ml 液を 0.02ml 加え, さらにこれに incubation 時の final concentration が tris-HCl buffer 19.6mM/L, ATP (Sigma) 1.2mM/L teophyllin (Sigma) 7.5mM/L, bovine serum albumin (片山化学K.K.) 0.08%, MgCl₂ 2mM/L, pH 7.5 となるように調整した buffer 0.035ml を加えて, 37°C で incubate した。

iii) cyclic-3', 5'-AMP の抽出

Krishina (1968)¹³⁾ の方法に従い incubation 後直ちに ATP (Sigma) 40.0mM/L, C-3', 5'-AMP (Sigma) 12.5mM/L 混合液を 0.1ml 加えて 100°C の沸とう水中に 4 分間入れ, ついで 0.4ml の水を加え 2000rpm で 10 分間遠沈, その上清を 0.45 $\times$ 5.4cm の Dowex 50 H⁺ form のカラムを通し, 最初の 3.0ml を捨て次の 4.0ml を採取した。次にこの採取した液 4.0ml に 5% ZnSO₄ (第 1 化学), 0.3N Ba(OH)₂ (第 1 化学) を各々 0.2ml ずつ加えて 2000rpm で 10 分間遠沈し, その上清に再度この操作をおこなつた後, その 0.2ml に Bray's solution 10.0ml を加えて liquid scintillation counter (Nuclear Chicago) で測定した。なお実験に際しては各々 3~5 サンプルずつの incubation を行いその平均値をとつた。

この際 C-3', 5'-AMP の精製に関する各段階毎の ¹⁴C-ATP の contamination の有無を検討したが最終段階における ¹⁴C-ATP の contamination は 0.0005% 以下であり, この操作による C-3', 5'-AMP の回収率は ³H-C-AMP (Radiochemical purity 98%, Schwarz Bio Resench) を用いて検討した結果 52.07% であつた。

III 実験成績

1) 投与 HCG の血中動態

測定値を Table 1 に示したが, HCG 1500IU を家兎耳静脈から投与した場合は Fig. 2 のように投与後数分以内に 15IU/ml 程度に上昇した血中 HCG 値は 45~60 分迄は急激な下降を示し, 次いでゆるやかな勾配で下降する 2 相性の減衰曲線を示した。

又実際の排卵に関与するに十分な 10 IU レベルの HCG を投与した場合も, Fig. 3 のごとく高単位 HCG を投与した場合とほぼ同様の減衰曲線が得られた。

2) 抗 HCG 血清による排卵阻止効果

Fig. 4 に示したように, HCG 投与 15 分以内に抗 HCG 血清を投与すると全例に排卵阻止がおこなわれるが, 45 分以後の投与では阻止できなかった。また 30 分後の投与群では 5 羽中 3 羽に排卵がおこった。従つて投与により生ずる家兎の排卵は HCG 投与後 30 分以内に抗 HCG を投与すれば阻止されるが, それ以後では阻止されなかった。

3) 各臓器における投与 ¹³¹I-HCG の分布

実験に使用した家兎 11 羽の各臓器における ¹³¹I-HCG uptake/¹²⁵I-albumin uptake 比を Table 2 に示した。さらに家兎 No. 2, No. 3 を 15 分後還流群, No. 6, No. 7 No. 8 を 2 時間後還流群, No. 9 No. 10, No. 11 を抗 HCG 血清同時投与・2 時間後還流群として各々の平均値 (Table 3) をグラフ化したのが Fig. 5, Fig. 6, Fig. 7 である。また Table 2 より卵巣, 腎臓, 肝臓, 子宮, 皮膚, 肺臓の値の時間的経過を示したのが Fig. 8 である。すなわち ¹³¹I-HCG uptake/¹²⁵I-alb. uptake 比は, HCG 投与後 15 分では腎臓, 肝臓に 0.66, 1.94, と高く, 尿, 胆汁でも 71.45, 1.37, とかなり高い値を示すが, 卵巣への選択的取り込みは認められなかった。しかし 60 分以後ではその値は上昇し, 肝臓, 腎臓が時間とともに下降するパターン

Table 1. Serum levels of administered HCG

time after injection	administration of HCG 1500IU/Rabbit		administration of HCG 10IU/Rabbit		
	No. 1 3.00kg	No. 2 2.70kg	No. 3 2.50kg	No. 4 2.80kg	No. 5 2.95kg
5	15.2	14.2	5243	3564	5550
15	10.4	8.4	3992	3222	4518
30	8.4	6.6	3698	2614	3668
45	6.4	7.6	3386	2399	3358
1	5.1	5.2	3096	2009	2744
1 30	4.9	5.6	3237	1768	2646
2	4.1	4.6	2433	1630	2234
3			2007	1349	2308
4	2.6	3.3	1821	1301	2257
6			1634	853	2142
8	1.2	1.6			1901
14				601	1608
16	0.5	0.7	911		
21	0.2	0.4			
hr. min.	IU/ml		cpm/0.3ml		

Fig. 2

を示すのに反し、卵巣では時間と共に上昇する傾向がみられ、2時間後では8.20と他の臓器に比して明らかに優位に高い uptake 比を示した。一方抗血清を同時投与した群では卵巣の uptake 比は著明に減少 (0.18) しており、同時投与した抗血清が HCG の卵巣への分布を妨げている事を示している。

4) 卵巣ホモジネート中の adenylyclase 活性におよぼす HCG の作用について

4羽の家兎について各々その最終採取液 4 ml 中の ^{14}C -3', 5' AMP の DPN 値を Table 4 に示した。さら

Fig. 3. Serum levels of administered HCG (small dose)

Fig. 4. Inhibition of ovulation by anti-HCG

Table 2. The ratio of ^{131}I -HCG uptake to ^{125}I -albumin uptake in each organ

Rabbit	group	HCG, Albumin administered group								HCG, Albumin anti-HCG administered group		
	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	B.W.	3.15kg	3.20kg	2.90kg	2.90kg	3.15kg	2.40kg	2.90kg	2.40kg	3.05kg	2.40kg	2.55kg
Time after injection	10'	15'	45'	90'	120'	130'	120'	130'	120'	130'		
Ovary	*	0.49	0.71	0.51	2.19	6.66	12.37	5.57	0.15	0.26	0.12	
Adrenal	*	0.57	0.68	0.79	0.27	4.72	1.30	1.69	1.18	0.55	0.41	
Kidney	2.15	7.71	5.61	14.05	2.15	2.96	5.01	1.72	17.16	10.94	13.75	
Liver	0.75	0.47	3.41	2.81	0.76	1.69	2.55	1.51	23.25	13.31	22.67	
Thyroid	0.08	0.41	0.75	0.50	0.27	*	0.77	0.75	1.47	0.31	0.21	
Lung	—	0.13	0.39	0.42	—	—	0.79	0.62	0.16	0.48	0.10	
Spleen	0.27	0.72	1.58	6.74	—	0.97	1.70	1.40	0.63	2.90	1.57	
Uterus	0.68	0.89	1.11	0.53	0.68	—	1.18	0.89	0.20	0.30	0.29	
Muscle	—	0.84	1.02	0.53	—	—	1.01	1.03	0.81	0.71	0.51	
Skin	—	—	0.62	0.33	—	—	0.76	0.93	0.36	0.73	0.37	
Serum	2.37	0.29	0.32	0.24	2.59	5.59	0.78	0.53	0.15	0.25	0.09	
Urine	2.87	—	71.45	11.30	—	0.85	1.15	2.18	4.93	1.60	2.74	
Bile	—	—	1.37	—	—	—	0.81	1.52	—	1.09	—	

*unable to calculate because of low recovery of ^{131}I

にこの表から HCG による C-3', 5'-AMP 産生の時間的経過をグラフ化したのが Fig. 9 で, incubation 時間30秒では対照との間に明確な差が認められないが, 3分以後においては明らかな差を示しており, HCG は明らかに卵巣ホモジネート中の adenylylase 活性を促進させている。このグラフをそれぞれの対照群に対する比率であらわしたのが Fig. 10 で, incubation 時間5分迄は急激に増加するが, 10分後ではもはや増加傾向を示していない。

いつばう家兎の卵巣側因子を検討する為, 卵巣剔出の6日前に HCG 30 IU 及び 50 IU を静脈内投与した場合と, 対照として生理的食塩水を投与した場合を5分間の incubation time で比較したのが Fig. 11 で, HCG premedication を行い黄体形成の多数みられる 50 IU 投与した卵巣において cyclic AMP の産生に対する HCG 作用がより顕著にあらわれる成績を得た。

Table 3. The mean ratio of ^{131}I -HCG uptake to ^{125}I -alb. uptake in each organ

	Washing after 15minutes	Washing after 120~130 minutes	Simultaneous administration of anti-HCG and washing after 120minutes
Ovary	0.60	8.20	0.18
Adrenal	0.63	2.57	0.71
Kidney	0.66	3.23	13.95
Liver	1.94	1.92	19.74
Thyroid	0.58	0.76	0.66
Lung	0.26	0.71	0.25
Spleen	1.15	1.36	1.70
Uterus	1.00	1.04	0.26
Muscle	0.93	1.02	0.68
Skin	0.62	0.85	0.49
Serum	0.31	2.30	0.16
Urine	71.45	1.40	2.76
Bile	1.37	1.17	1.09

Fig. 5. The ratio of ^{131}I -HCG uptake to ^{125}I -alb. uptake in each organ

(washing after 15 minutes)

Fig. 6. The ratio of ^{131}I -HCG uptake to ^{125}I -alb. uptake in each organ

(washing after 2 hours)

Fig. 7. The ratio of ^{131}I -HCG uptake to ^{125}I -alb. uptake in each organ

(simultaneous administration of Anti-HCG and washing after 2 hours)

Fig. 8. Time course of ^{131}I -HCG uptake/ ^{125}I -Alb. uptake ratio in each organ Table 4. Accumulation of ^{14}C -3', 5'-AMP

Rabbit No.	Body weight and Ovarian weight	Dose of HCG premedicated (6 days ago)	Incubation time (min)	Addition of hormone in incubation medium	DPN of ^{14}C -3', 5'-amp
1	3.15kg 412mg	30IU	3	—	104.4
				HCG	162.9
			10	— HCG	218.3 365.7
2	3.35kg 500mg	0IU	5	— HCG	195.7 399.1
3	3.05kg 665mg	50IU	5	—	559.5
				HCG	1152.8
				FSH TSH	554.7 719.2
4	3.10kg 618mg	30IU	1/2	—	197.3
				HCG	229.1
			5	— HCG	383.6 599.7

さらに同一の卵巢ホモジネートを用いて (Rabbit No 3) HCG の他に FSH, TSH を比較したのがFig. 12である. HCG に比較して FSH 添加例では対照との間に差が認められなかった. TSH 添加例ではやや増加を認めた.

Fig. 9. Time courses of accumulation of ^{14}C -3', 5'-AMP Fig. 10. Time courses of accumulation of ^{14}C -3', 5'-AMP Fig. 11. Influence of HCG premédication on accumulation of ^{14}C -3', 5'-AMP Fig. 12. Effects of protein hormones on ^{14}C -3', 5'-AMP

IV 考 案

家兎は一般に交尾によつて初めて排卵する動物であるが、広瀬 (1920)¹⁾ は胎盤乳剤を注射することにより人工黄体の出現を発見し、白井 (1928)²⁾ は妊婦尿を注射することにより出血卵胞の出現を見出してトロホプラストホルモン反応と称した。また Friedman (1929)³⁾ は妊婦尿静注24時間後に排卵現象がおくことを発見し妊娠反応に応用した。今回 HCG が家兎に投与されて排卵が生じる際の HCG の血中動態ならび

にどのくらいの作用時間が排卵にとって必須条件なのかを明らかにしたいと考えて(1), (2), の実験を行った。投与された HCG は 1500 IU という高単位の場合も, 実際に排卵に関与するに十分な 10 IU レベルの場合も, ほぼ同様のパターンが得られ, これは *Tait* (1963)¹⁴⁾らの steroid hormone における two compartmental model に類似するものであつた。すなわち最初の phase の半減期 $t_{1/2}=37.9\text{min}$, 第2の phase の半減期 $t_{1/2}=8.35\text{hr}$ であり, ヒトに HCG を投与した谷沢 (1970)¹⁹⁾の成績とはほぼ一致している。そこで HCG 投与後抗 HCG 血清の追いかけて投与による血中 HCG の in vivo での中和実験を行い, 排卵に対して血中 HCG がどの位の時間持続して作用 する必要があるか検討した結果, HCG による家兎の排卵は30分という比較的短時間の間に抗血清を投与しなければ阻止できないことを知つた。この理由としては HCG が30分以内に抗血清が中和出来ない inner pool に迄十分とり込まれたか, あるいは早くも排卵に対する引き金の役割を終了したなど, 2, 3の可能性が考えられるが, その詳細は今後の検討にまたねばならない。

そこで実際に標識 HCG を用いて卵巣に特異的にとりこまれるかどうかを検討する目的で ¹³¹I および ¹²⁵I で標識した HCG を単独投与してみたが, 卵巣に分布する絶対量は少なく (0.04%以下) その uptake の特異性は判然としなかつた。そこで比較する為の標準として血清アルブミンを選びその uptake と比較することにより卵巣への特異性を検討したいと考え, ¹³¹I-HCG と ¹²⁵I-albumin を混合投与し, 試料内の ¹³¹I, ¹²⁵I を同時に測定比較する, いわゆる paired labeled technic (*Tsuzuku* ら, 1967)¹⁵⁾を応用して実験を行った。その結果, 子宮, 皮膚, 肺臓等関連性の少ない臓器では albumin に比し HCG は特に高いとり込みを示さず, 肝臓, 腎臓では投与後に高く時間とともに下降する排泄パターンを示すことがわかつたが, 卵巣においては他の臓器と異り明らかに時間と共に高まる uptake 比の増加カーブを示した。しかもこの卵巣への HCG の分布は, 抗 HCG を同時投与した際は著しく uptake 比が減少する事からも, HCG の卵巣に対する特異的な分布が生じているものと考えられよう。この点に関しては, 著者ら (1970)¹⁶⁾¹⁷⁾がラットに ¹²⁵I-HCG を投与し, その卵巣の radioautography にて theca cell layer および間質腺細胞上に ¹²⁵I が分布する事を見出した事を考え合わせれば興味深いものがある。

なお ¹³¹I と HCG の再遊離の問題に関しては, 実験方法 (1) に述べた trichlor acetic acid による検査の他に, 甲状腺への ¹³¹I の取り込みがほとんどみられない事からも, この実験に要した程度の時間では余り問題はないと考えられる。

また2時間以上の長時間にわたる実験も行つたが, 卵巣に関しては2時間値を peek としてその uptake 比は次第に漸減する像を示し, 腎臓, 肝臓以外の臓器も一定低値を保つが, 腎臓, 肝臓においてはデータ値のばらつきがみられる。これは HCG および albumin の分解機能が次第に進行し, 種々の形の分解産物および free となつたアイソトープの混在についての問題がからんでくる為さらに今後の検討が必要であらう。

次に HCG の卵巣における細胞レベルでの作用機序の詳細は現在のところ未解決の問題であるが, 最近副腎における Steroid 産生に対する ACTH 作用が *Haynes* ら (1965)⁷⁾によりくわしく検討されるにつれ, cyclic AMP 説が注目される様になつた。cyclic AMP すなわち 5-adenosine-3', 5-monophosphate は *Sutherland* と *Rall* によつて1958年肝ホモジネート中に発見されて以来種々の hormone の chemical transmitter として hormone 研究史上一時期を画するものとなつた。gonadotropin に関しては *Hall & Koritz* (1964)⁸⁾, *Mursch, Bucher, Savard & Sutherland* (1966)⁹⁾, *Marsch & Savard* (1966)¹⁰⁾ らが, 牛黄体スライスを用いて検討し, cyclic AMP が LH, HCG と同様に progesterone の合成を増加させることを報告し, cyclic AMP が LH 作用の mediator であることを示唆した。しかしこうした方面の研究では組織中の cyclic AMP の量は非常に微量であり測定が困難である事, 特に卵巣は周期性を持ち cell free のホモジネートにおいてもその condition の heterogeneity が著しい事などの為, 直接 cyclic AMP の増減を測定しデータとする事が困難であつた。しかしながら最近 cyclic AMP の測定法も進歩し, *Dorrington & Baggett* (1969)¹¹⁾ は ¹⁴C-ATP を用いて家兎卵巣による incubation 実験を行い LH が adenylylase 活性を促進する事を報告した。今回の実験においても HCG が卵巣ホモジネート中の adenylylase 活性

を明らかに促進し、その作用は HCG 投与後 5 分以内に生じる事、黄体形成の多い卵巣程その作用が強い事を証明した。この事から排卵後の卵巣における steroid 合成代謝に対する HCG 作用の一部は少なくとも cyclic AMP を介して行われるものと言えよう。

さらにこの卵巣ホモジネートに FSH を投与しても adenylylase 活性は全く変化せず、また TSH の場合も使用していた製剤の純度からみて、その変化はこの中に混在している LH の作用と考えられ、ここに設定した条件下での卵巣ホモジネート中の adenylylase 活性は HCG により強く促進されるが、FSH、TSH ではその作用が弱く、これは Pastan ら (1967)¹⁸⁾ が甲状腺と TSH の関係において見出した結果と類似する成績であり、HCG の卵巣に対する作用の特異性と関連して興味深いものがある。

V 要 約

1) 雌性成熟家兎に投与した HCG の減衰曲線は 45~60 分を境とする two compartmental model に従った。

2) HCG 投与後 30 分以内に抗 HCG 血清を投与すると排卵は阻止されるが、それ以後の投与では排卵が生じることから、HCG による家兎の排卵は比較的短時間のうちに抗体では中和できない卵巣内部に問題が持ち込まれることが判明した。

3) Paired labeled technic の応用により、HCG は家兎卵巣に対して他臓器とは異なる特異的な分布を示すことが判明した。

4) HCG は家兎卵巣ホモジネート中の adenylylase 活性を高め、しかもその作用は黄体形成の強い卵巣程著明であつた。しかもこの状態の卵巣ホモジネートにおいて FSH は adenylylase 活性を促進させず、TSH も著明な促進を示さなかつた。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜わつた倉智敬一教授に謹んで感謝の意を捧げる。本研究に着手以来実験方法の初歩より現在に至る迄直接御懇篤なる御指導をいただいた谷沢修講師に衷心より感謝す。又本研究に関して御助言、御協力下さつた多数の方々に感謝す。

なお本研究の要旨は昭和 43 年第 20 回日本産科婦人科学会総会、昭和 45 年第 45 回日本内分泌学会総会、日本産科婦人科学会誌第 20 巻第 11 号速報、昭和 45 年第 22 回日本産科婦人科学会谷沢修講師招請講演の一部として発表した。

参 考 文 献

- 1) 広瀬豊一：日婦会誌，16：1055，(1920)。
- 2) 白井貞次郎：大阪医誌，28：984，(1928)，
- 3) Friedman, M.H. : Am. J. Physiol., 99：617，(1929)
- 4) Savad, K., Marsch, J.M. and Rice, B.F. : Recent Prog. Hormone Res., : 285, (1965).
- 5) Huang, W.Y. and Pearlman, W. : J. Biol. Chem., 238：1308, (1963).
- 6) Hammerstein, J., Rice, B.F. and Savard, K. : J. Clin. Endocr., 24：597, (1964)
- 7) Haynes, R.C., Sutherland, E.W. : Recent Prog. Hormone Res., 16：121, (1965)
- 8) Hall, P.F., and Koritz, S.B. : Fed. Proc., 23：462, (1964)
- 9) Marsch, J.M., Butcher, R.W., Savard, K. and Sutherland, E.W. : Fed. Proc., 23：462, (1964).
- 10) Marsch, J.M. and Savard, K. : Steroids, 8：133, (1966).
- 11) Dorrington, J.H. and Baggett, B. : Endocrinology, 84：989, (1969)
- 12) 谷沢 修：阪大医誌，19：105，(1967)。
- 13) Krishina, G. : JPET., 163：379, (1968)
- 14) Jait, J.F. : J. Clin. Endocr. 23：1285, (1963)
- 15) Tsuzuku, O., Yagi, Y. and Pressman, D. : Immun. 99：1, (1967)
- 16) 小林弥仁，谷沢 修：日産婦誌，22：405，(1970)。
- 17) 小林弥仁：現在投稿中。
- 18) Pastan, I. and Katzen, R. : B.B.R.C., 296：(1967)
- 19) 谷沢 修：産婦人科領域におけるホルモンの免疫学的測定法とその応用に関する研究，(1970)，48，谷沢 修，大阪