合成 Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) の代謝に関する研究

第一製薬株式会社研究所・安全性研究部

立沢 晴男, 藤巻 正慶, 渡辺 敏樹

佐野 光司, 秋元 健

Metabolism of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LH-RH) in the Rat.

**Haruo TACHIZAWA, Masayoshi FUJIMAKI, Toshiki WATANABE,
Mitsuji SANO and Takeshi AKIMOTO**

(Research Institute, Daiichi Seiyaku Co., Ltd.)

The metabolism of ^{125}I -LH-RH was studied in female, male and pregnant rats after an intravenous injection of the drug. The female rats received intravenous doses of 0.6 or 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the drug (hereafter referred to as 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ female group and 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ female group, respectively). The male and pregnant rats both received the intravenous dose of 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of the drug (hereafter referred to as 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ male group and 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pregnant group, respectively). After the intravenous injection, the animals were placed in metabolic cages and sacrificed periodically in order to obtain samples of blood, tissue and urine. The blood and tissue levels of the drug were determined by measuring the radioactivity in the blood and tissues. In addition, whole body autoradiography was also carried out in order to elucidate tissue distribution of the radioactivity in the body. Urinary excretion rates of the drug were determined by measuring the radioactivity in the urine. The radioactivity was measured by a well-type scintillation counter. Determination of plasma and urinary metabolites was performed by means of thin layer chromatography.

The blood levels in the female and male groups showed biphasic patterns in which biological half lives in the first phase were about 7 to 10 minutes, thus suggesting that ^{125}I -LH-RH is rapidly metabolized and eliminated from the circulating blood.

The plasma LH level in the 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ female group increased higher than the control level 30 minutes later and reached a maximum (446 ng/ml) 60 minutes later.

The tissue levels in the 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ female group were high in the order of the thyroid gland, kidney, blood, uterus, ovary, lung, pancreas, hypophysis, liver, adrenal gland, spleen, skeletal muscle, adipose tissue and brain. The uptake of the radioactivity into the hypophysis was not specific and its level was similar to that of the pancreas. The tissue distribution in the 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ female, male and pregnant groups showed similar patterns as those in the 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ female group. On the basis of these results, it was con-

cluded that no difference in the distribution patterns due to dosage, sex or pregnancy is clearly found. The uptake of the radioactivity into the fetus on the 21st day of gestation was considerably high and the same level as that of the placenta.

The drug and its metabolites were mainly excreted into the urine and their excretion rates in the female and male groups were about 18 percent of the injected dose within 60 minutes and increased gradually with time.

The results with respect to the plasma metabolites in all groups indicated that ^{125}I -LH-RH injected intravenously is rapidly metabolized, since the unchanged ^{125}I -LH-RH possibly occupies 50 percent of the total metabolites 10 minutes later.

The metabolites in the fetal plasma and homogenate consisted of the possibly unchanged form having the same Rf value as that of authentic LH-RH, inorganic iodide, unidentified metabolites. This suggests that a minor part of the ^{125}I -LH-RH injected intravenously may be transferred through the placenta into the fetus.

Urinary metabolites in all groups, inorganic iodide and unidentified metabolites existed in the 30 minute urine samples and the excretion rate of inorganic iodide increased with time.

緒 言

視床下部-下垂体-性腺系という機能環は、古くより想定され、その機構についても多くの研究がなされてきた。このうち視床下部と下垂体とのつながりについては、1960年に McCann ら¹⁾が、視床下部酸性粗抽出物中に LH 放出作用を認めて以来、多くの実験的事実の裏付けから luteinizing hormone-releasing factor (LH-RF) の概念が導入されるに至り、あらゆる方面よりその物質の純化精製が試みられてきた。1971年に Schally ら²⁾³⁾により LH-RF は純化精製され、その構造は、pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ からなる decapeptide であることが明らかにされ、luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) と命名され、その合成もなされた。その後、この合成 LH-RH のヒトおよび実験動物における LH 放出作用について数多くの成績が報告されている。しかしながら、この合成 LH-RH の生体内運命に関する報告は、極めて僅かである。Redding ら⁴⁾は、 ^3H 標識 LH-RH をラットに投与し、その血漿中半減期、分布、排泄について報告している。また、Miyachi ら⁵⁾は、 ^{125}I 標識 LH-RH のヒトおよびラットにおける血清中半減期ならびにラットにおける体内分布などを報告している。

今回著者らは、 ^{125}I 標識 LH-RH を雌性、雄性および妊娠ラットに静注し、血中濃度、体内分布、排泄、代謝産物および胎盤通過性について検討した結果、若干の知見が得られたので、その成績を報告する。

実験材料および方法

標識化合物：lactoperoxidase 法⁶⁾により ^{125}I を合成 LH-RH に標識し、Sephadex G-10 カラムにより分離、精製された ^{125}I -LH-RH (第一ラジオアイソトープ研究所製)を用いた。比放射能は、 $12.5\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ および $125\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ のものを使用した。標識化合物は、0.2M 酢酸溶液であるので、これに 0.3M phosphate buffered saline (pH 7.0)を加えて、pH を 6.0 に調整した。

実験動物：体重約200g前後の Sprague-Dawley 系 (日本クレア) 雌性および雄性ラットを使用した。ラットは、水および飼料を自由に摂取させ、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度約50%の条件下で飼育した。なお、動物室照明は 12hr 明、12hr 暗である。雌性ラットは毎日早朝 vaginal smear を観察し、正常4日周期を示す動物を選出した。性周期による血中 LH 濃度の変動および LH-RH に対する下垂体の反応性の相違が報告

⁷⁾⁸⁾されているので, 実験当日に発情休止期像を示した動物を実験に使用した。妊娠動物は, 生後11~13週令の Wistar-Imamichi 系ラット (大宮動物繁殖研究所) を用いた。妊娠動物を得るためにラットは同系統の成熟雄と終夜同居させ, 翌朝, 陰栓を確認した日を妊娠0日とした。実験には, 妊娠12, 14および21日目のラットを使用した。

血中濃度, 体内分布および排泄実験:

1) 雌雄ラットにおける実験

雌性ラットに, 合成 ^{125}I -LH-RH $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ および $6\mu\text{g}/\text{kg}$ を下腿静脈より投与し, 代謝ケージに入れ経時的にヘパリナイズ (200U/0.1ml/ラット) 後, 軽度のエーテル麻酔下に放血致死させ, 血液, 各種組織および尿を採取した。なお, 各ラットの投与放射量は, $75\mu\text{Ci}/\text{kg}$ である。血液は, ヘマトクリット値の測定および全血液中濃度の測定後, 4°C で遠心分離後血漿を採取した。採取した血漿は, その一部を用いて血漿中濃度を測定後, 残りは血漿中代謝産物検索用試料として -20°C にて凍結保存した。各組織は, 摘出後全重量を測定し, 一部を体内分布測定用試料として精秤し, 直ちにその放射能を測定した。尿は, 代謝ケージより経時的に採取した。ただし, 投与後60分まで尿については, 投与前に陰核と共に尿道口を結紮しておき解剖時に膀胱尿として採取した。採取した尿は, 生理食塩水を加えて一定容量とし, その一部について放射能を測定し, 尿中排泄率を算出した。残りの尿は, 尿中代謝産物検索用試料として -20°C にて保存した。なお, 各試料は, プラスチック製チューブに入れ, ウェル型シンチレーションカウンター (Aloka TDC-5型) により放射能を測定した。

2) 妊娠ラットにおける実験

合成 ^{125}I -LH-RH $6\mu\text{g}/\text{kg}$ を妊娠12, 14および21日目のラットの下腿静脈に投与し, 投与後10分および60分に雌性ラットと同様な処置をおこない, 母体側の血液, 各種組織および尿を採取し放射能の測定をおこなった。21日目の胎仔については, 子宮から胎仔を摘出後, 断頭により血液を採取し 4°C で遠心分離後, 得られた血漿を胎仔血漿中代謝産物検索用試料として -20°C にて凍結保存した。また, 血液採取後の胎仔のうち各母動物あたり5匹を, 胎仔組織内における代謝産物検索のため -20°C にて凍結保存し, その残りの胎仔は, 主要組織を摘出しその放射能を測定した。妊娠12および14日目の胎仔については, 子宮から胎仔を摘出し, 胎仔全体の放射能を測定後, 14日目の胎仔については, 代謝産物検索用試料として胎仔をそのまま -20°C にて凍結保存をおこなった。

3) 雄性ラットにおける実験

合成 ^{125}I -LH-RH $6\mu\text{g}/\text{kg}$ を下腿静脈より投与し, 雌性ラットにおけると同様に処置し, 血液, 各種組織および尿中の放射能を測定した。

全身オートラジオグラフィ: 合成 ^{125}I -LH-RH $6\mu\text{g}/\text{kg}$ を雌性ラットと妊娠21日目のラットの下腿静脈に投与後, 雌性ラットは投与後1分, 妊娠ラットは投与後10分にエーテル麻酔死させ, ドライアイス—アセトン中に浸漬して凍結させた。以下, 松岡¹⁰⁾の方法に従ってオートラジオグラムを作成した。

血漿中 LH 濃度の測定: 合成 ^{125}I -LH-RH $6\mu\text{g}/\text{kg}$ を雌性ラットに投与後採取した血漿については, その血漿中 LH 濃度を谷沢¹¹⁾の方法に従って2抗体法によるラジオイムノアッセイにより測定した。測定には, NIAMD のラット LH 測定用キットを用い, 抗原は, ^{131}I をクロラミンT法¹²⁾にて標識した。測定値は, NIAMD-Rat-LH-RP-1 により表示した。

血漿中および胎仔中代謝産物の検索: 経時的に採取した血漿試料約1~2ml を限外濾過器により蒸留水約15mlを加えながら限外濾過し, 分子量1万以上の血漿タンパクを除去後採取した試料をドライアイス—アセトン中にて直ちに凍結後, 凍結乾燥した。この試料にヨウ化カリウムを含む0.2M酢酸を少量加えて溶解し, これを cellulose F プレート (Merk 社製) 上にスポットし, n-BuOH : AcOH : H₂O (4 : 1 : 1) の溶媒系にて thin layer chromatography を実施した。その際, LH-RH の標準品を同時に展開した。LH-RH の呈色は, Ehrlich 試薬により行つた。また, 無機ヨードイオンの検出は, 次亜塩素酸ソーダのスプレーにより行つた。展開後のプレートは, radiochromatogram scanner (Packard 社製) により, 各放射能

ピークを検知後, radioautogram を作成した. 妊娠21日目の胎仔の血漿中代謝産物の検索は, 上記の血漿中代謝物の検索法に準じた. また, 妊娠14および21日目の胎仔については, 胎仔 5 g につき蒸留水 4 ml を加えて homogenate とし, 遠心分離後その上清を採取し, 以下, 血漿中代謝産物の検索法に準じた.

尿中代謝産物の検索: 経時的に採取した尿試料は, 凍結乾燥後ヨウ化カリウムを含む 0.2M 酢酸溶液を少量加え, cellulose F プレート上にスポットし, $n\text{-BuOH}:\text{AcOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:1:1) の溶媒系にて thin layer chromatography を実施した. 展開後乾燥したプレート上にデンブレン溶液と10%亜硝酸カリウムをスプレーして, ヨード-デンブレン反応をおこない無機ヨードイオンを検出し, その位置を確認した. さらに, radiochromatogram scanner により放射能ピークを検知後, radioautogram を作成した.

実験結果

1) 血中濃度および血漿中 LH 濃度

Fig. 1. に全血液中濃度と血漿中 LH 濃度の推移を示した. 合成 $^{125}\text{I}\text{-LH-RH}$ 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群, 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群および 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雄性ラット群のいずれにおいても血中濃度は, 投与後10分をさかいとする2相性のパターンを示した. 第1相 (0~10分後) における血中生物学的半減期は, 0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群, 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群および 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雄性ラット群において, それぞれ, 7.3分, 10.1分および8.5分であつた. 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群における血漿中 LH 濃度は, 投与後30分で上昇し, 60分でピーク (446ng/ml) に達し, 投与後480分には, 投与後30分値と同程度に低下した.

2) 組織内分布

Fig. 1. Blood levels of radioactivity and plasma LH level in female and male rats after intravenous injection of $^{125}\text{I}\text{-LH-RH}$. Each point represents the mean of three animals.

合成 ^{125}I -LH-RH の血液から組織への分布状態を検討するために組織内濃度を経時的に測定し, 組織内濃度と全血液中濃度との比を算出し, その成績を Table 1, 2, 3 および 4 に示した. $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群においては, 組織内濃度は, 甲状腺, 腎, 血液, 子宮, 卵巣, 肺, 脾, 下垂体, 肝, 副腎, 心, 脾, 筋, 脂肪, 脳の順に低下した. 合成 LH-RH の作用部位である下垂体においては, 検討した全時間を通じて血中濃度の約 $2/3$ の濃度であり, 放射能の特異的な取込みは認められなかった. 子宮, 卵巣などの生殖腺への放射能の取込みは, 下垂体より若干大きく, 比較的高濃度が認められた. 最高濃度が認められた甲状腺においては, 投与直後より血中濃度よりも高く, 経時的に増大した. 腎内濃度は, 投与後30分までは血中濃度以上の濃度を示し, 合成 ^{125}I -LH-RH の排泄が極めて速いことを示唆していた.

Table 1. Tissue to blood ratio of radioactivity in female rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH ($0.6\mu\text{g}/\text{kg}$).

Data in a) are expressed as the ratio of radioactivity per g of wet tissue to radioactivity per ml of blood, while data in b) as picomole equivalent to ^{125}I -LH-RH per ml of plasma or blood.

Each value indicates the mean of three animals.

Tissue	Time after intravenous injection (minute)					
	1	5	10	30	60	240
Liver a)	0.38	0.46	0.50	0.46	0.35	0.43
Kidney	1.55	1.74	2.09	1.58	0.66	0.97
Heart	0.39	0.37	0.39	0.34	0.47	0.30
Lung	0.51	0.73	0.73	0.65	0.65	0.72
Muscle	0.08	0.25	0.34	0.30	0.16	0.15
Fat	0.02	0.07	0.10	0.08	0.11	0.08
Adrenal	0.40	0.43	0.47	0.44	0.35	0.41
Spleen	0.38	0.38	0.45	0.43	0.43	0.48
Thymus	0.20	0.29	0.36	0.40	0.41	0.36
Pancreas	0.48	0.67	0.94	0.67	0.42	0.41
Pituitary g.	0.47	0.62	0.50	0.63	0.42	0.39
Thyroid	1.04	2.23	3.92	20.95	58.13	140.90
Brain	0.05	0.06	0.08	0.08	0.06	0.06
Uterus	0.83	0.83	0.88	0.89	0.92	0.81
Ovary	0.46	0.57	0.62	0.76	0.77	0.77
Plasma b)	4.71	2.52	1.75	1.41	1.24	0.90
Blood	3.42	1.89	1.43	1.20	1.04	0.78

$6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群における組織内濃度は, $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群のほぼ10倍レベルにあり, $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で認められた分布様式と大体同一であり, 用量の相違に起因する分布様式の変化は認められなかった.

$6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与妊娠ラット群における母動物側の分布様式は, 妊娠 12, 14 および 21 日目とも, $6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群において認められたのと同様な結果であつた. 胎盤における濃度比は, 各妊娠日ともに投与後 10 分値に比較して, 60 分値が高かつた. 最高値は, 妊娠 21 日目の投与後 60 分で認められた. 胎仔全体の濃度は, 妊娠 12 および 14 日目の投与後 10 分および 60 分では, 母動物の脂肪, 脳などと同程度の低値であつたが, 妊娠 21 日目の 60 分では胎盤につぐ高値を示した. さらに, 妊娠 21 日目の胎仔内主要組織の濃度は, 投与後 10 分に比較して, 60 分に高値が認められた. 同一時点で比較した場合には, 各組織間には有意な差異は認めら

Table 2. Tissue to blood ratio of radioactivity in female rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH ($6\mu\text{g}/\text{kg}$).

Data in a) are expressed as the ratio of radioactivity per g of wet tissue to radioactivity per ml of blood, while data in b) as picomole equivalent to ^{125}I -LH-RH per ml of plasma or blood.

Each value indicates the mean of three animals.

Tissue	Time after intravenous injection (minute)						
	1	5	10	30	60	240	480
Liver a)	0.37	0.45	0.48	0.41	0.38	0.60	0.40
Kidney	1.54	1.43	1.71	1.01	0.78	0.73	0.76
Heart	0.42	0.42	0.43	0.39	0.32	0.32	0.33
Lung	0.47	0.63	0.75	0.74	0.64	0.70	0.78
Muscle	0.12	0.21	0.23	0.32	0.22	0.20	0.31
Fat	0.03	0.11	0.15	0.14	0.16	0.21	0.20
Adrenal	0.39	0.39	0.44	0.35	0.40	0.33	0.31
Spleen	0.27	0.46	0.51	0.46	0.44	0.43	0.44
Thymus	0.20	0.27	0.37	0.40	0.42	0.36	0.39
Pancreas	0.35	0.46	0.73	0.78	0.56	0.37	0.40
Pituitary g.	0.51	0.54	0.85	0.65	0.37	0.39	0.50
Thyroid	0.81	1.46	5.56	14.65	51.30	177.94	435.86
Brain	0.06	0.04	0.06	0.10	0.07	0.09	0.05
Uterus	0.79	0.91	0.91	0.94	0.83	0.82	0.84
Ovary	0.43	0.59	0.69	0.67	0.60	0.91	0.75
Plasma b)	37.00	22.70	16.52	14.00	12.40	6.15	3.79
Blood	26.54	19.16	14.30	12.33	11.19	5.48	3.42

れなかつた。

$6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雄性ラット群における分布様式は、 $6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群と比較して、睪丸を除く組織においては、大体同一の傾向を示した。すなわち、睪丸内濃度は、子宮および卵巣内濃度の約 $1/2$ であり、生殖腺に関してのみ、雌雄の差が認められた。

Table 5. には、雌雄ラットにおける主要組織の分布率を示した。 $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群において、高分布率が認められたのは、胃腸管内容物、肝臓および腎臓であつた。胃腸管内容物は、経時的にその分布率が増大し、投与後240分には投与量の約25%に達した。肝臓および腎臓では、いずれも1分後に最大値(それぞれ投与量の約11%, および8.5%)が認められ、経時的にそれらの分布率は減少した。甲状腺では、経時的にその分布率が増加し、投与後240分には、投与量の約1%の分布率が認められた。その他の組織では、分布率はいずれも1%以下であつた。

$6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群および雄性ラット群のいずれにおいても、主要組織の分布率は、 $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群とはほぼ同様な傾向が得られたが、投与後480分には、雌性ラット群における胃腸管内容物の分布率は、投与量の約13%に減少していた。

妊娠ラットの各妊娠日の投与後10分および60分の主要組織の分布率を Table 6. に示した。母動物側主要組織の分布率は、 $0.6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌性ラット群および $6\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与雌雄ラット群とはほぼ同様な傾向が認められた。しかしながら、子宮においては、妊娠ラットでは雌性ラットに比較して子宮重量が増大しているため、より高値が認められた。主要組織の分布率を各妊娠日ごとに比較した場合、胎盤および胎仔に著明な変化が

Table 3. Tissue to blood ratio of radioactivity in pregnant rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH ($6\mu\text{g}/\text{kg}$).

Data in a) are expressed as the ratio of radioactivity per g of wet tissue to radioactivity per ml of blood, while data in b) as picomole equivalent to ^{125}I -LH-RH per ml of plasma or blood.

Each value indicates the mean of three animals.

Tissue	Time after intravenous injection (minute)					
	Day 12 of gestation		Day 14 of gestation		Day 21 of gestation	
	10	60	10	60	10	60
Liver a)	0.42	0.44	0.40	0.39	0.48	0.51
Kidney	1.69	1.21	1.47	1.06	1.92	1.38
Heart	0.39	0.31	0.45	0.36	0.49	0.38
Lung	0.80	0.71	0.88	0.75	0.85	0.83
Muscle	0.23	0.22	0.27	0.31	0.35	0.30
Fat	0.07	0.06	0.06	0.25	0.09	0.15
Adrenal	0.46	0.39	0.49	0.44	0.62	0.50
Spleen	0.43	0.45	0.49	0.47	0.60	0.50
Thymus	0.41	0.40	0.40	0.28	0.68	0.47
Pancreas	0.77	0.63	0.55	0.66	0.49	1.05
Pituitary g.	0.67	0.59	0.49	0.77	0.64	0.64
Thyroid	8.43	78.30	4.31	105.26	4.37	34.51
Brain	0.06	0.07	0.09	0.11	0.10	0.17
Uterus	0.68	0.69	0.63	0.70	0.76	0.83
Ovary	0.72	0.60	0.56	0.64	0.68	0.64
Placenta	0.38	0.64	0.27	0.57	0.46	1.63
Amniotic fluid	0.10	0.12	0.02	0.08	0.04	0.50
Fetus	0.06	0.15	0.09	0.13	0.21	1.61
Fetal liver	—	—	—	—	0.22	1.25
Fetal kidney	—	—	—	—	0.31	1.32
Fetal heart	—	—	—	—	0.22	1.06
Fetal lung	—	—	—	—	0.25	1.20
Plasma b)	21.43	13.73	23.17	11.72	19.82	9.43
Blood	19.84	11.90	20.85	10.52	18.63	8.91

認められた。これらの組織内分布率は、妊娠が経過するに従い増大する結果が得られた。とくに妊娠21日目の投与後60分の胎仔の分布率は、投与量の約48%に達した。また、胃腸管内容物において、妊娠21日目の投与後60分の値(約13%)は、妊娠12および14日目の投与後60分(約25%)の約1/2に過ぎなかった。

3) 全身オートラジオグラフィ

Fig. 2. に静注後1分の雌性ラットおよび静注後10分の妊娠21日目ラットの全身オートラジオグラムを示した。静注後1分の雌性ラットでは、血液で最も高い放射能が認められた。これについて高い放射能を示したのは、下垂体、肝および胃であり、最も低い放射能を示したのは脳であった。

また、静注後10分の妊娠21日目のラットでは、甲状腺の放射能が全組織中で最も高く、また、腎でも血中濃度を上回る高い放射能を示した。胃、肺、肝および胎盤は比較的高い放射能を示したが、脳および胎仔は低濃度を示した。胎仔内の放射能分布は、脳および胃壁を除いてほぼ一様であり、脳内濃度は他の臓器より

Table 4. Tissue to blood ratio of radioactivity in male rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH ($6\mu\text{g}/\text{kg}$).

Data in a) are expressed as the ratio of radioactivity per g of wet tissue to radioactivity per ml of blood, while data in b) as picomole equivalent to ^{125}I -LH-RH per ml of plasma or blood.

Each value indicates the mean of three animals.

Tissue	Time after intravenous injection (minute)			
	1	10	30	60
Liver a)	0.36	0.54	0.56	0.48
Kidney	1.63	1.67	1.25	1.31
Heart	0.40	0.46	0.38	0.37
Lung	0.59	0.71	0.74	0.80
Muscle	0.13	0.22	0.35	0.36
Fat	0.05	0.10	0.13	0.12
Adrenal	0.47	0.49	0.58	0.58
Spleen	0.31	0.44	0.44	0.49
Thymus	0.20	0.34	0.42	0.44
Pancreas	0.37	0.94	0.88	0.83
Pituitary g.	0.60	0.48	0.58	0.67
Thyroid	1.20	7.58	24.91	102.26
Brain	0.04	0.05	0.10	0.09
Testis	0.05	0.15	0.26	0.27
Plasma b)	32.15	13.49	10.85	7.53
Blood	24.71	11.84	9.48	6.69

Table 5. Radioactivity per whole organ in female and male rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH.

The values represent means of radioactivity recovered expressed as percentages of the injected dose.

Three animals were used at each time.

Tissue	Time after intravenous injection (minute)						
	1	5	10	30	60	240	480
Female rat ($0.6\mu\text{g}/\text{kg}$)							
Liver	11.28	7.78	6.47	4.94	2.54	2.04	—
Kidney	8.49	5.32	4.64	2.90	1.07	0.97	—
Pituitary g.	0.02	0.01	0.01	0.01	0.005	0.003	—
Thyroid	0.04	0.04	0.07	0.18	0.53	1.11	—
Brain	0.31	0.22	0.21	0.19	0.12	0.05	—
Uterus	0.86	0.53	0.39	0.33	0.32	0.19	—
Ovary	0.15	0.11	0.08	0.08	0.07	0.04	—
Gastro-intestinal content	9.73	9.60	9.50	19.95	21.83	25.87	—

	Female rat (6 μ g/kg)						
Liver	9.53	7.97	6.50	4.82	3.80	2.90	1.13
Kidney	6.59	5.05	4.41	2.27	1.62	0.77	0.41
Pituitary g.	0.02	0.01	0.01	0.01	0.005	0.002	0.002
Thyroid	0.02	0.04	0.08	0.27	0.71	1.83	2.36
Brain	0.29	0.16	0.17	0.25	0.17	0.10	0.03
Uterus	0.58	0.69	0.44	0.43	0.40	0.17	0.10
Ovary	0.11	0.15	0.11	0.12	0.09	0.06	0.04
Gastro-intestinal content	5.95	9.72	10.43	23.41	26.46	24.14	12.71

	Male rat (6 μ g/kg)						
Liver	7.79	—	5.59	4.20	2.84	—	—
Kidney	7.05	—	3.50	2.12	1.31	—	—
Pituitary g.	0.01	—	0.05	0.004	0.003	—	—
Thyroid	0.03	—	0.01	0.20	0.53	—	—
Brain	0.15	—	0.16	0.17	0.08	—	—
Testis	0.30	—	0.43	0.57	0.40	—	—
Gastro-intestinal content	6.54	—	8.73	14.17	22.58	—	—

Table 6. Radioactivity per whole organ in pregnant rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH (6 μ g/kg).

The values represent means of radioactivity recovered expressed as percentages of the injected dose.

Three animals were used at each time.

Tissue	Time after intravenous injection (minute)					
	Day 12 of gestation		Day 14 of gestation		Day 21 of gestation	
	10	60	10	60	10	60
Liver	7.62	4.30	7.00	3.87	6.53	3.03
Kidney	4.74	1.81	3.95	1.43	3.46	1.16
Pituitary g.	0.01	0.004	0.01	0.003	0.006	0.003
Thyroid	0.16	1.14	0.11	0.59	0.08	0.32
Brain	0.14	0.09	0.16	0.11	0.16	0.12
Uterus	1.20	0.61	1.67	1.02	2.66	1.56
Ovary	0.08	0.03	0.33	0.04	0.10	0.03
Placenta	0.34	0.31	0.66	0.62	3.38	4.81
Fetus	0.02	0.02	0.23	0.18	11.96	47.81
Gastro-intestinal content	7.54	25.29	9.15	24.69	7.58	13.18

明らかに低く、これに対して胃壁は明らかに高かった。以上の成績は、先に述べた定量的成績とほぼ一致するものであった。

4) 尿中排泄率

Table 7. に雌性ラット、雄性ラットおよび妊娠ラットの尿中に排泄された放射能の累積排泄率を示した。Table 中の数値は、尿中放射能の投与放射能に対する%で示した。

合成 ^{125}I -LH-RH 0.6 μ g/kg および 6 μ g/kg 投与雌性ラット群ならびに 6 μ g/kg 投与雄性ラット群におい

Fig. 2. Autoradiograms showing distribution of radioactivity in female rats (A) and pregnant rats on the 21st day of gestation (B) 1 and 10 minutes after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH ($6\mu\text{g/kg}$), respectively.

Abbreviations...Br : brain, Pi : pituitary gland, L : lung, Ty : thyroid, H : heart, Lv : liver, Bl : blood, S : stomach, K : kidney, Pl : placenta, Fe : fetus

Table 7. Cumulative urinary excretion of radioactivity in female, male and pregnant rats after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH.
Data are expressed as percentages of the injected dose.
Each value indicates the mean of three animals.

Group	Time after intravenous injection (minute)			
	30	60	240	480
Female rat ($0.6\mu\text{g/kg}$)	8.63	18.01	44.53	—
Female rat ($6\mu\text{g/kg}$)	7.65	17.15	33.12	65.47
Male rat ($6\mu\text{g/kg}$)	5.04	18.08	—	—
Pregnant rat ($6\mu\text{g/kg}$)				
12	—	17.63	—	—
Days of gestation 14	—	17.63	—	—
21	—	9.67	—	—

では、ともに投与後60分までに投与量の約17~18%が尿中に排泄され、長時間観察した 6 μ g/kg 投与雌性ラット群の投与後480分までに投与量の約65%が排泄された。

合成 ^{125}I -LH-RH 6 μ g/kg 投与妊娠ラット群においては、妊娠12および14日では投与後60分までに投与量の約17%が尿中に排泄され、雌性ラットと同様な成績を得たが、妊娠21日目では約10%とやや低値を示した。

5) 血漿中および胎仔中代謝産物の検索

Fig. 3. に血漿のスキヤノグラムの一例を示した。スキヤノグラム上に、Rf 値約 0.2, 0.5, 0.8 の3個の放射能ピークが存在することが認められた。Rf 値0.2を示す化合物は、試料中にヨウ化カリウムを添加し、薄層上にスポットして展開後、次亜塩素酸ソーダにより呈色した部位と完全に一致し、無機ヨードイオンと同定された。また、Rf 値0.5を示す化合物は、合成 LH-RH 標準品の Rf 値とほぼ一致し、未変化の合成 LH-RH であると推定された。Rf 値0.8付近の物質は、現在のところ同定されていない。

スキヤノグラム上の3個の放射性ピークの面積比より、無機ヨードイオン、合成 LH-RH および未同定各分画の存在比を算出した成績を、Table 8. に示した。合成 ^{125}I -LH-RH 0.6 μ g/kg 投与雌性ラット群、6 μ g/kg 投与雌性および雄性ラット群のいずれにおいても、合成 LH-RH 分画は、投与後1分で血漿中に検出された放射能の60~70%を占めていたが、経時的に無機ヨードイオン分画の存在比が増加した。未同定分画は、経時的に著明な傾向を示さなかつた。

妊娠ラットの母体側血漿でも、各妊娠日とも、投与後10分の合成 LH-RH 分画は血漿中に検出された全放射能の40~50%を占めていたが、投与後60分では約10%に減少し、雌性ラットと同様な傾向が認

Fig. 3. Radioscannogram on TLC of plasma metabolites in female rats 1 minute after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH (6 μ g/kg).

Table 8. Pattern of metabolites in the plasma of female, male and pregnant rats given ^{125}I -LH-RH intravenously.

Data are expressed as percentages of total radioactivity present in the plasma. Each value except for the fetus indicates the mean of three rats. Each value for the fetal plasma indicates that for samples of pooled plasma from about 30 fetuses.

Figures presented in parentheses denote mean values for samples of obtained homogenate from 5 fetuses.

Time after intravenous injection (minutes)	Percentage of total radioactivity present		
	Fraction		
	I ⁻	LH-RH	unidentified
Female rat (0.6 μ g/kg)			
1	25.9	63.1	11.0
5	40.0	49.0	11.0
10	43.7	44.1	12.3
30	78.6	16.8	4.6

		Female rat (6μg/kg)					
1		17.7	64.1	18.2			
5		27.4	65.0	17.6			
10		35.6	53.7	10.6			
30		46.2	18.9	34.9			
60		83.4	9.7	7.0			
		Male rat (6μg/kg)					
1		20.7	73.8	5.5			
10		49.7	44.9	5.4			
30		56.1	35.9	8.0			
60		69.8	22.2	8.0			
Days of gestation		Pregnant rat (6μg/kg)					
		Mother	Fetus	Mother	Fetus	Mother	Fetus
12	10	45.9	—	41.8	—	12.3	—
	60	93.7	—	4.6	—	1.7	—
14	10	48.0	(35.1)	46.5	(49.3)	5.5	(15.6)
	60	88.7	—	6.2	—	5.1	—
21	10	37.3	53.1 (34.5)	57.7	46.9 (46.8)	5.0	0 (18.7)
	60	82.7	59.9 (70.8)	12.3	23.5 (18.2)	5.0	16.6 (11.0)

められた。また、妊娠21日目の胎仔血漿中においては、投与後60分の合成 LH-RH 分画の存在比が母体側血漿中のものと比較して増加していたものの、母体側血漿中とはほぼ同様な傾向を示した。さらに、断頭採血後の妊娠21日目の胎仔ホモジネート上清中代謝産物の検索結果は、胎仔血漿中の代謝産物検索結果と同様な傾向が認められた。妊娠14日目の投与後10分の胎仔ホモジネート上清中の無機ヨードイオン分画と合成 LH-RH 分画の存在比は、後者で若干多かったが、母体血漿中ではほぼ同一であり、若干の相違が認められた。

6) 尿中代謝産物の検索

Fig. 4. に尿中代謝産物のスカノグラムの一例を示した。スカノグラム上には、Rf 値約0.2, 0.5および0.7~0.9に放射性代謝産物が認められた。Rf 値0.2を示す代謝産物は、TLC 展開後ヨード—デンブンプン反応にて呈色した無機ヨードイオンの部位と一致していた。

スカノグラム上、Rf 値0.2, ヨード—デンブンプン反応陽性の無機ヨードイオン分画と、それ以外の未同定分画の2つに分け、それぞれの存在比を算出した成績を Table 9. に示した。合成 ^{125}I -LH-RH 0.6 μ g/kg および 6 μ g/kg 投与雌性ラット群および 6 μ g/kg 投与雄性ラット群では、無機ヨードイオン分画は経時的に増加し、30分尿で全体の約30%であり、60分尿ですでに尿中放射性物質の60~70%に達した。

Fig. 4. Radioscannogram on TLC of urinary metabolites in male rats 60 minutes after intravenous injection of ^{125}I -LH-RH (6 μ g/kg).

Table 9. Pattern of metabolites in the urine of female and male rats given ^{125}I -LH-RH intravenously.

Data are expressed as percentages of total radioactivity present in the urine.

Each value indicates the mean of three rats.

Time after intravenous injection (minute)	Percentage of total radioactivity present	
	Fraction	
	I-	unidentified
Female rat ($0.6\mu\text{g/kg}$)		
30	33.8	66.2
60	71.8	28.2
240	81.5	18.5
Female rat ($6\mu\text{g/kg}$)		
30	32.3	67.7
60	63.5	36.5
240	79.9	20.1
480	88.4	11.6
Male rat ($6\mu\text{g/kg}$)		
30	38.3	61.7
60	60.7	39.3

考 察

^{125}I -LH-RH $0.6\mu\text{g/kg}$ および $6\mu\text{g/kg}$ を静注した Sprague-Dawley 系ラットの血中放射能濃度は、雌性および雄性ともに明らかな 2 相性を示し、第 1 相における血中半減期は 7～10 分であることが明らかとなった。Redding ら⁴⁾は、 ^3H 標識 LH-RH 約 $0.6\mu\text{g/kg}$ を Sprague-Dawley 系雌性ラットに静注し、その血中半減期が 6 分 48 秒であると報告している。さらに、Miyachi ら⁵⁾は、 ^{125}I 標識 LH-RH を Holzman 系雄性ラットに静注し、その血中半減期が 5～10 分であると報告しており、これらの成績は、いずれも、われわれの成績と一致していた。また、われわれは、血漿中代謝産物についても検討した結果、薄層クロマトグラム上の Rf 値 0.2 付近の代謝産物は、次亜塩素酸ソーダによる呈色部位と完全に一致することから、無機ヨードイオンであり、Rf 値 0.5 付近の物質は、標準品の LH-RH の Rf 値と一致することから、 ^{125}I -LH-RH であると推定した。投与後 1 分における血漿中代謝産物のうち、未変化の ^{125}I -LH-RH と推定されるものは、全体の約 60～70% であり、約 20% が無機ヨードイオンとして存在していた。その後、経時的に ^{125}I -LH-RH の存在する割合は減少し、投与後 60 分には、約 20% に低下した。この成績は、 ^{125}I -LH-RH を静注した際、体内で脱ヨード化が起こることを示すものであり、無機ヨードイオンの血中濃度推移による LH-RH の血中濃度推移への修飾を無視することはできない。事実、無機ヨードイオンの血中半減期は、甲状腺摘出ラットに無機ヨードイオンを投与した Matsuzaki ら¹³⁾の報告では 130 分であると述べられており、真の LH-RH の半減期は、われわれが示した成績よりもさらに短時間であると考えられる。

^{125}I -LH-RH $6\mu\text{g/kg}$ を投与した雌性ラット群の血漿中 LH 濃度は、投与後 60 分でピークを示したが、この成績は、Rippel ら⁹⁾の報告している成績とはほぼ一致していたが、卵巣摘出—エストラジオール—プロゲステロン前処置ラットにおける合成 LH-RH 投与後の血漿中 LH 濃度のピークが投与後 5～10 分に認められるという成績⁸⁾¹⁴⁾とは、明らかに相違していた。

合成 LH-RH の作用部位である下垂体における濃度は、子宮および卵巣などの生殖腺と同程度であり、特異的に放射能が下垂体へ取り込まれるという知見は得られなかった。この点に関して、Redding ら⁴⁾ Miyachi ら⁵⁾は、合成 LH-RH 投与後下垂体濃度は血中濃度より高いことを報告しており、われわれの成績とは相違していた。

肝および腎は、合成 LH-RH の不活性化と排泄に大きな役割を占める⁴⁾と報告されているが、われわれの組織内分布に関する成績においても投与直後の腎内濃度が血中濃度より高く、かつ、他の組織と比べてもはるかに高かった。甲状腺および胃腸管内容物に高濃度の放射能が認められたが、これらの組織は無機ヨードイオンを特異的に貯留するということから説明されうるものと考えられる。

胎仔においては、妊娠14および21日目で高い放射能が認められ、かつ、胎仔血漿中およびホモジネイト中代謝産物の検索結果より無機ヨードイオンの放射性ピークのほかに、合成 LH-RH 標準品の Rf 値とはほぼ一致する放射性ピークを認めた。しかしながら、無機ヨードイオンは胎盤に貯留¹⁵⁾¹⁶⁾し、胎盤を通して胎仔へ移行することが確認されており¹⁷⁾、その移行の割合は妊娠末期になるほど増加することが報告されている¹⁸⁾。これは、ヨウ素の化学的な性質と妊娠末期における胎盤の関門としての器質的、機能的な変化によるものと考えられる。こうした点を考慮すると未変化の合成 ¹²⁵I-LH-RH が胎仔へ移行したと結論するためには、なお今後の検討が必要と考えられる。

尿中排泄に関しては、投与後60分までに投与量の約18%が、480分までには約65%が尿中に排泄され、本物質は主として尿中へすみやかに排泄されるものと推定される。しかしながら、尿中代謝産物の検索結果から60分尿においては、約60%が無機ヨードイオンであり、480分尿ではそのほとんどが無機ヨードイオンであるので、本実験結果から LH-RH は、速やかに尿中に排泄されるとは一概に言えないと思われる。

謝 辞 終りに当り、終始御鞭撻を賜った取締役研究所長古賀直文博士に深謝します。

また、実験に協力された笠原由紀枝氏、橋本文男氏に感謝します。

文 献

- 1) McCann, S.M., S. Taleisnik and H.M. Friedman : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 104 : 432, (1960).
- 2) Matsuo, H., Y. Baba, R.M.G. Nair, A. Arimura and A.V. Schally : Biochem. Biophys. Res. Comm., 43 : 1334, (1971).
- 3) Baba, Y., H. Matsuo and A.V. Schally : Biochem. Biophys. Res. Comm., 44 : 459, (1971).
- 4) Redding, T.W. and A.V. Schally : Life Science, 12 : 23, (1973).
- 5) Miyachi, Y., R.S. Mecklenburg, J.W. Hansen and M.B. Lipsett : J. Clin. Endocrinol. Metab., 37 : 63, (1973).
- 6) Miyachi, Y., A. Chrambach, R. Mecklenburg and M.B. Lipsett : Endocrinology, 92 : 1725, (1973).
- 7) Smith, E.R., C.Y. Bowers and J.M. Davidson : Endocrinology, 93 : 756, (1973).
- 8) 谷沢 修, 青野敏博, 深田信之, 小林弥仁, 南川淳之祐, 河村憲一, 倉智敬一 : 最新医学, 27 : 1654, (1972).
- 9) Rippel, R.H., E.S. Johnson and W.F. White : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 143 : 55, (1973).
- 10) 松岡 理 : 化学の領域, 増刊95号 (1971), 45, 南江堂.
- 11) 谷沢 修 : 第22回日産婦総会招請講演要旨 (1970).
- 12) Greenwood, F.C., W.M. Hunter and J.S. Glover : Biochem. J., 89 : 114, (1963).
- 13) Matsuzaki, S., T. Tonoue and K. Yamamoto : Endocrinol. Japon., 15 : 64, (1968).
- 14) Sandow, J., A.V. Schally, H.G. Schröder, T.W. Redding, W. Heptner and H.G. Vogel : Arzneim.-Forsch., 22 : 1718, (1972).
- 15) Cottino, F., G. Zoppetti, G. Patrito, M. Lombardi, G. Cenderelli and A. Costa : Folia. Endocrinol., 23 : 677, (1970).
- 16) Nelson, N.S., J.F. Stara and R.M. Hoar : AEC Symp. Ser., 17 : 45, (1969).
- 17) Martin, E.W. : マーチン薬の副作用と臨床常用医薬品の相互作用一覧表 (吉利和ほか監訳), 初版 (1974), 286, 広川書店, 東京.
- 18) Moskalev, L.A., A.M. Lyaginskaya, E.P. Ovcharenko and T.M. Egorova : AEC Symp. Ser., 17 : 153, (1969).