思春期発来時期における夜間睡眠時 luteinizing hormone 分泌パターンの変化について

—高感度 Immunofluorometric assay (IFMA)を用いた検討—

札幌医大泌尿器科
(主任: 熊本悦明教授)

三 熊 直 人, 和 田 英 樹
熊 本 悦 明

Nocturnal Luteinizing Hormone Secretion Patterns at the Onset of
Puberty Measured using a Highly Sensitive Immunofluorometric Assay

**Naohito MIKUMA, Hideki WADA,
and Yoshiaki KUMAMOTO**

Department of Urology, Sapporo Medical College, Chuo-ku, Sapporo, Japan

Nocturnal LH pulse was analyzed in 4 prepubertal, 3 early pubertal and 2 mid-pubertal boys by measuring serum LH concentrations. Blood samples were taken every 30 minutes while awake, and every 20 minutes after subjects had gone to sleep. Serum LH was measured by using immunofluorometric assay (IFMA) with a lower detection limit of 0.02mIU/ml. Pulsatile LH secretion during sleep was detected in all subjects examined. LH pulse amplitude had the tendency to increase with the advance of pubertal stage. After the onset of puberty, LH pulse amplitude was significantly larger than before. The LH pulse was also detected while awake in 4 (1 prepubertal, 2 early pubertal and 1 mid-pubertal) boys. LH pulse frequency was almost the same in each pubertal stage. Serum testosterone levels gradually increased with the progress of pubertal stage.

These results suggest that 1) LH is secreted in a pulsatile manner in the prepubertal subjects as well as in the pubertal subjects, 2) the increase of LH pulse amplitude plays an important role for the onset of puberty, and 3) LH pulse amplitude could be a biological marker that indicates the degree of maturation of the hypothalamo-pituitary unit in prepubertal children.

緒 言

LHの分泌は, 思春期発来後の小児及び成人における研究では, パルス状に行われている事が明らかになっている²⁾³⁾⁴⁾¹⁵⁾²⁰⁾²³⁾³⁰⁾。しかし, 思春期前においても同様に LH がパルス状に分泌されているか否かに就いては, 未だに議論のあるところである。

Boyer らの1972年の報告以来, 夜間睡眠に伴う LH pulse の出現は, 思春期発来の biological marker として用いられ, 思春期以前には認められないとされてきた²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾¹¹⁾¹⁴⁾。しかし一方で思春期前小児における LH pulse の存在を報告している者もあり¹⁵⁾¹⁹⁾²¹⁾²³⁾, 特に従来の RIA の感度 (0.8-2.0mIU/ml)²⁰⁾²¹⁾²⁴⁾より高い感度の測定法を用いた最近の Jakacki ら¹⁰⁾及び Wennink ら²⁸⁾の検討では, いずれも思春期前小児における LH pulse の存在を報告している。思春期前小児の LH 値は非常に低い¹⁾²⁴⁾ことから, こうした報告の食違いは各報告者の用いている測定系の感度の違いが原因である可能性がある。

そこで今回我々は, LH 測定感度が0.02mIU/ml と高い Pharmacia 社製 Delfia kit®を用いて, 思春期前後の小児における夜間睡眠時 LH pulse の存在について検討し, 思春期発来機序について若干の考察を試みた。

対象及び方法

1) 対象

5-10才の prepuberty 小児4例, 11才の early puberty 小児3例, 13才及び14才の midpuberty 小児2例の計9例小児を対象とした(Table 1)。思春期の stage 分類は, Tannner ら¹⁷⁾及び Winter ら²⁹⁾の criteria に準じて行った。

2) 検討 protocol

18:30-21:00の間に, 前腕部静脈内にカテーテルを留置。覚醒中は30分間隔, 睡眠後は20分間隔で採血し, 血中 LH の変動を検討した。また, 覚醒中の血液を用いて, 血中 testosterone を測定した。血液は血清分離後, 測定まで-30度で凍結保存された。

3) LH 測定法

血中 LH の測定は, 最近開発された Immunofluorometric assay (Delfia LH kit®, Pharmacia Inc.) を用い, 各検体 duplicate で測定した。この方法は, 2種類の LH- β subunit に対する monoclonal 抗体を用いる sandwich immunoassay 法である。第一の抗体は測定用の well 内に固相化されており, 第二の抗体は蛍光物質である Europium により, 標識されている。まず, 25 μ l の検体を well に入れ, 次に200 μ lの緩衝液で希釈する。その後, 振盪しながら室温で45分間 incubation 後, well を洗浄液にて1回洗浄。次に assay buffer で希釈された Europium 標識抗体 200 μ lを加え, 15分間室温で振盪しながら incubation 後, well を6回 洗浄する。その後,

Table 1 Primary diagnosis and age of subjects studied.

pubertal stage	name	age	sex	diagnosis
prepuberty	K. K.	5	male	hypospadias
	R. N.	6	male	hypospadias
	M. K.	7	male	bladder diverticulum
	D. K.	10	male	op. VUR
early puberty	Y. O.	11	male	buried penis
	K. T.	11	male	true phimosis
	K. S.	11	male	true phimosis
mid-puberty	T. I.	13	male	cryptorchism
	M. T.	14	male	cryptorchism

増強試薬200 μ lを加え、さらに5分間室温で振盪。10-15分間、室温で放置した後 Arcus 1230 fluorometer (LKB-Wallac) で測定した。LH の standard は、下垂体性 WHO 2nd-IRP HPG を用いている。Blank (zero standard) の mean+3SD より算出した、Delfia kit[®]の測定感度は、3ロットで検討したところ、0.005-0.024mIU/mlであり、0.02mIU/ml を LH の測定限界とした。

4) LH pulse 判定方法

LH pulse の判定基準は、現在のところ統一された基準が無く、各検討者によって勝手な基準が設けられているのが実情である。そこで今回我々は Ross ら²⁵⁾の判定基準に従って、LH pulse の判定をした。即ち、測定値の高さにより変動係数 (CV) が異なる事を考慮し、測定値別に分けて、それぞれの血清をプールし各々の変動係数 (CV) を求めた。そして、LH の nadir から peak までのamplitude が、nadir の CV の3倍を越える場合にそれを有意の LH pulse とした。変動係数 (CV) は、0.02-0.1mIU/ml の範囲で6.4%, 0.11-0.50mIU/ml の範囲で5.8%, 0.51-1.00 mIU/ml の範囲で3.1%, 1.01-5.00mIU/ml の範囲で3.7%, 5.01-10.0mIU/ml の範囲で1.5% であった。

5) testosterone 測定法

血中 testosterone 基礎値の測定には、日本 DPC コーポレーション社製テストステロンキット[®]を用いた。

結 果

1) prepuberty における LH pulse (Fig.1)

今回検討した5才-10才までの4例の prepuberty 小児全例において、睡眠後の有意の LH pulse

Fig. 1 Nocturnal LH pulses in prepubertal boys.
Arrows indicate the time when the subjects went to sleep.
Asterisks (*) indicate the significant LH pulses.

を認めた (*印が有意の LH pulse を, 矢印が入眠した時刻を示す)。また, 覚醒時の LH pulse も5才の K.K. においては, 一回認められた。

ここで注目されるのは, 思春期前の段階でも成長にともなって, LH pulse amplitude が増大する傾向にあったことである。Table 2に示すごとく5才の症例では, LH pulse amplitude の平均値は0.11mIU/ml であるが, 6才, 7才と成長に連れて漸増し, 10才の症例では, pulse amplitude は0.56mIU/ml と5才の症例の約5倍にも達していた。

2) early puberty における LH pulse (Fig.2)

11才のearly puberty の3例でも睡眠時の LH pulse は認められた。しかも, Table 2に示すごとくその pulse amplitude の平均値は2.2-2.7mIU/ml と prepuberty よりも更に増大していた。また, 覚醒時の LH pulse も2症例 (k.T. 及び K.S.) において1回ずつ認められた。

Fig. 2 Nocturnal LH pulses in early pubertal boys.
Arrows indicate the time when the subjects went to sleep.
Asterisks(*) indicate the significant LH pulses.

3) midpuberty における LH pulse (Fig.3)

midpuberty の13才及び14才の2例においても, やはり睡眠にともなう LH pulse を認めた。Table 2に示すごとく13才の症例ではその LH pulse amplitude の平均値が4.87mIU/ml と early puberty よりも更に増大していた。また14才の症例においては, 覚醒時の LH pulse も認められた。

4) LH pulse frequency

LH pulse frequency は, Table 2に示すように pulse amplitude とは異なり, 性成熟に伴う変動を認めなかった。そして, 各症例間での差が大きく0.6-1.5times/hour の範囲にあった。

Fig. 3 Nocturnal LH pulses in midpubertal boys.
Arrows indicate the time when the subjects went to sleep.
Asterisks(*) indicate the significant LH pulses.

Table 2 Mean plasma LH concentrations, pulse amplitude, frequency and testosterone levels.

pubertal stage	age(yrs)	mean LH (mIU/mL)		LH pulse amplitude (mIU/mL)	LH pulse frequency (times/hour)	serum testosterone (ng/dL)
		awake	asleep			
prepuberty	5	0.05±0.01	0.08±0.02	0.11	0.6	n. d.
	6	n. d.	0.12±0.02	0.13	1.1	n. d.
	7	n. d.	0.11±0.04	0.25	0.7	11
	10	0.03±0.01	0.24±0.09	0.56	0.7	n. d.
early puberty	11	1.24±0.12	2.91±0.32*	2.7	1.0	17
	11	0.13±0.03	3.14±0.16*	2.2	0.8	10
	11	2.77±0.26	5.68±0.4*	2.4	1.0	28
mid-puberty	13	1.93±0.1	6.69±0.84*	4.87	0.7	—
	14	3.47±0.2	5.39±0.5*	1.9	1.5	181

Values given are mean±SE.

* : p<0.01

5) 覚醒時及び睡眠中の LH 平均値

覚醒時と睡眠中の LH 平均値を比較すると、思春期成熟の進行とは無関係に、9例全例において覚醒時よりも睡眠中の LH 平均値が増加しており、early puberty 以降では統計学的有意差($p < 0.01$)を認めた(Table 2)。

6) 血中 testosterone 基礎値

血中 testosterone 基礎値は、思春期 stage の進行と共に漸増する傾向にあり、prepuberty では4例中3例が測定感度の5ng/dl以下であるのに対し、early puberty では10-28ng/dlとなり、midpuberty では更に急激な増加を示し181ng/dlとなっていた。

以上の結果から、LH 分泌は測定感度の良い測定系で分析検討すると、思春期前においても一定レベルで分泌されているのではなく、0.5mIU/ml 以下の小さな amplitude で、pulse 状に分泌されている事が明らかであり、それは特に夜間睡眠時において顕著であった。そして、このpulse 状分泌は、思春期に近づくに連れて次第に増大し、思春期発来時には pulse amplitude が2.0mIU/ml 以上となった。従来の RIA では、この思春期性の大きな LH pulse の出現を待たなければ LH の pulse 状分泌を検出できなかった為に、LH 分泌は思春期になって始めて pulse 状分泌となり、それが思春期発来の指標であると過って判断されたものと考えられた。またこの思春期性の大きな pulse は testosterone の増加を伴い、これによって二次性徴の発現がもたらされるものと考えられた。

考 察

今回の我々の検討の結果、思春期前の小児においても LH の分泌は、low amplitude ながら pulse 状に行われていることが明かであった。

今回の検討に我々の用いた IFMA の測定限界は0.02mIU/ml であり、従来の RIA (WHO 2nd IRP-HMG を標準品とし、2つの polyclonal 抗体を用いた)よりも遙かに良い感度を示していた。また、その変動係数は測定限界付近の0.02-0.10mIU/ml のプール血清においてもわずか6.4%と測定上の誤差も少なく、信頼性の高い測定系であった。こうした測定系の感度の高さが、特に思春期前小児の微少な LH pulse の検出に有用であったことは言うまでもない。

ところで、この pulse amplitude の成長にともなう変化を見ると、Table 2に示すごとく、思春期発来時まで漸増して行き、思春期発来時にはさらに急激な増大が認められた。prepuberty の中で最も大きな pulse amplitude を示した10才の例でも0.56mIU/ml であるのに対し、early puberty の中では最も小さな amplitude を示したのもでも2.2mIU/ml と、10才の例の約4倍近い増大が認められた。そして、この急激な LH pulse amplitude の増大と共に、覚醒時及び睡眠時の LH 平均値も思春期発来時には急激な増大を示していた。

この LH の pulse 状分泌は視床下部からの GnRH 分泌を反映する⁶⁾ものであり、その LH pulse amplitude は GnRH pulse の amplitude と非常に良い相関性を示す¹⁶⁾事が、実験的検討によって明らかになっている。つまり、下垂体の GnRH に対する反応性を考慮する必要性があるが、この LH pulse amplitude は視床下部から分泌される GnRH pulse amplitude を示すものと言える。このことから、成長に伴う LH pulse amplitude の増大は、視床下部 GnRH neurone よりの GnRH 分泌量の増大を示唆するものであり、LH pulse amplitude の検討は、視床下部-下垂体系の成熟度を判定する指標となる可能性が示唆される。

ところで、この睡眠中の LH pulse の各分泌エピソードは、NREM 睡眠-REM 睡眠のサイクルと関連していることが知られている。Weitzman ら²⁷⁾の報告によると、LH pulse は NREM 睡眠の時に始まり、REM 睡眠の間か或いはその前後に終っており、睡眠と gonadotropin 分泌に共通な神経性機序の存在を示唆するものである。さらに、この NREM-REM 睡眠のサイクルは夜間睡眠時勃起現象 (NPT) と関連しており、NPT の発生頻度及び持続時間は、REM 睡眠と良く同期する事が報告されている^{8),18)}。NREM 睡眠中の LH pulse はそれに引続く testosterone の上昇を伴うため、その中枢性作用が REM 睡眠期の NPT を生じる可能性もある^{12),13)}。勃起の中枢性機序については、未だに不明な点が多いが、睡眠と gonadotropin 分泌及び NPT がこの様に関連性を持ちながら機能している事は非常に興味深い現象である。

LH pulse amplitude は成長に伴い漸次増大して行く一方で、夜間睡眠中の LH pulse frequency については思春期の進行に伴う明らかな変動は認められなかった (Table 2)。思春期の発来に伴う LH pulse frequency 変動に関しては、我々と同様に存在しないとする報告²¹⁾の他に、増加する^{10),28)}、減少する²⁵⁾と相反する研究が報告されている。こうした異論が生じる理由としては測定系の感度の違いや、LH pulse の判定基準の違いによる可能性もある。LH 測定値の低い小児においては LH pulse の判定基準がこのような研究では特に重要な問題であり、今後この基準の統一化が求められるところである。今回の我々の検討では入眠後の採血間隔が20分であることも影響している可能性がある。Crowley⁷⁾らは、5分間隔で採血した結果を15分間隔或いは20分間隔で評価すると、有意の LH pulse を見落す可能性があり、5分ないし10分間隔での採血が必要だとしている。この点については、今後更に詳細に検討する予定である。

思春期の発来機序は、視床下部の性ステロイドに対する感受性の低下 (所謂 gonadostat による抑制の解除) から始まるとする Grumbach らの仮説⁹⁾が支持されてきた。しかし、最近では思春期発来機序に関し新しい考え方、即ち GnRH neurone 自身の活性化²⁶⁾、或いは性ステロイドとは無関係に機能している視床下部 GnRH neurone に対する抑制機序の解除²²⁾という推論も為されている。

今後更に基礎的或いは臨床的な検討が進み、GnRH pulse generator の活性化機序を明らかにすることが思春期発来機序の解明につながると考えられている。

結 語

prepuberty 4例、early puberty 3例及び midpuberty 2例の計9例において、夜間睡眠時における LH 分泌パターンの変化を Pharmacia 社製 Delfia kit[®] を用いて検討した。

- 1) LH の分泌様式は prepuberty から midpuberty までの全例において pulse 状分泌であった。
- 2) 思春期前における LH pulse amplitude は、約0.5mIU/ml 以下と小さかったが、成長に伴って漸増して行き、そして思春期発来時には急激に増大し、2.0mIU/ml 以上となった。またこの思春期性 LH pulse の増加は、血中 testosterone 基礎値の増加を伴っていた。
- 3) LH の pulse frequency は加齢に伴う増加傾向を示さなかった。

以上の結果から、LH の分泌様式は思春期前より既に pulse 状分泌であり、その amplitude の増大とそれに伴う testosterone の増加が、思春期発来の上で重要な役割を果たすと考えられた。また、LH pulse amplitude は視床下部-下垂体機能の成熟度を示す指標となる可能性も示唆された。

文 献

- 1) Apter, D., Cacciato, B., Althman, H. and Stenman, H.: Serum luteinizing hormone concentrations increase 100-fold in females from 7 years of age to adulthood, as measured by time resolved immunofluorometric assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 68: 53-57, 1989.
- 2) Boyer, R., Finkelstein, S., Roffwarg, H., Kapen, S., Weitzman, E. and Hellman, L.: Synchronization of augmented luteinizing hormone secretion with sleep during puberty. *N. Engl. J. Med.*, 287: 582-586, 1972.
- 3) Boyer, R., Perlow, M., Hellman, L., Kapen, S. and Weitzman, E.: Twenty-four hour pattern of luteinizing hormone secretion in normal men with sleep stage recording. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 35: 73-81, 1972.
- 4) Boyer, R., Rosenfeld, R.S., Kapen, S., Finkelstein, J.W., Weitzman, E. and Hellman, L.: Human puberty: simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *J. Clin. Invest.*, 54: 609-617, 1974.
- 5) Chipman, J.J., More, R.J., Marks, J.F., Fevre, M., Segel, T., Ramsey, J. and Boyer, R.M.: Interrelationship of plasma and urinary gonadotropins: correlation for 24 hours, for sleep/wake periods, and for 3 hours after luteinizing hormone-releasing hormone stimulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 225-230, 1981.
- 6) Clarke, I.J. and Cummins, J.T.: The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone(GnRH) and luteinizing hormone(LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology*, 111: 1737-1739, 1982.
- 7) Crowley, W.F.: Physiological approaches to the study of GnRH in the human. In: *Integrative neuroendocrinology: molecular, cellular and clinical aspects*, Karger, Basel, 1987. 202-211,
- 8) Fisher, C., Gross, J. and Zuch, J.: Cycle of penile erection synchronous with dreaming(REM) sleep. *Arch. general psych*, 12: 29-45, 1965.
- 9) Grumbach, M.M.: Hypothalamic-pituitary regulation of puberty in man: Evidence and concepts derived from clinical research. In: *Control of the onset of puberty*, John Wiley & Sons, New York, 1974, 115-166.
- 10) Jakacki, R.I., Kelch, R.P., Saunderson, R.E., Lloyd, J.S., Hopwood, N.J. and Marshall, J.C.: Pulsatile secretion of luteinizing hormone in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 453-458, 1982.
- 11) Johanson, A.: Fluctuations of gonadotropin levels in children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 39: 154-159, 1974.
- 12) Judd, H.L., Parker, D.C., Rakoff, J.S., Hopper, B.R. and Yen, S.S.C.: Elucidation of mechanism(s) of nocturnal rise of testosterone in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38: 134-141, 1974.
- 13) Judd, H.L., Parker, D.C., Siler, T.M. and Yen, S.S.C.: The nocturnal rise of plasma testosterone in pubertal boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 38: 710-713, 1974.
- 14) Judd, H.L., Parker, D.C. and Yen, S.S.C.: Sleep-wake patterns of LH and testosterone release in prepubertal boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44: 865-869, 1977.
- 15) Judd, H.L.: Biorhythms of gonadotropins and testicular hormone secretion. In: *Endocrine rhythms*, Raven Press, New York, 1979, 299-324.
- 16) Levine, J.E., Pau, K.F., Ramirez, V.D. and

- Jackson, G.L.: Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology*, 111: 1449-1455, 1982.
- 17) Marshall, W.A. and Tanner, J.M.: Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Archives of Disease in Childhood*, 45: 13-23, 1970.
- 18) 森田雄介: ヒトの REM 睡眠時の生理機能変化に関する研究, 四国医誌, 31 巻 1 号: 138-148, 1975.
- 19) Ojeda, S.R., Andrew, W.W., Advis, J.P. and White, S.S.: Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Reviews*, 1: 228-257, 1980.
- 20) Parker, D.C., Judd, H.L., Rossman, L.G. and Yen, S.C.C.: Pubertal sleep-wake patterns of episodic LH, FSH and testosterone release in twin boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 40: 1099-1109, 1975.
- 21) Penny, R., Olambiwonnu, N.O. and Frasier, S.D.: Episodic fluctuation of serum gonadotropins in pre- and post-pubertal girls and boys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 45: 307-311, 1977.
- 22) Plant, T.M.: The effects of neonatal orchidectomy on the developmental pattern of gonadotropin secretion in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology*, 106: 1451-1454, 1980.
- 23) Reber, R.W. and Yen, S.S.C.: Endocrine rhythms in gonadotropins and ovarian steroids and relevance to reproductive processes. In: *Endocrine rhythms*. Raven Press, New York, 1979, 259-298.
- 24) Reiter, E.O., Beitins, I.Z., Ostrea, T. and Gutai, J.P.: Bioassayable luteinizing hormone during childhood and adolescence and in patients with delayed pubertal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54: 155-161, 1982.
- 25) Ross, J.L., Loriaux, D.L. and Culter, G.B.: Developmental changes in neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in gonadal dysgenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 288-293, 1983.
- 26) Ruf, K.B. and Sharpe, M.S.: The relevance of animal models of puberty in humans. In: *Clinical neuroendocrinology*, Raven Press, New York, 1979, 239-245.
- 27) Weitzman, E.D., Boyer, R.M., Kapen, S. and Hellman, L.: The relationship of sleep and sleep stages to neuroendocrine secretion and biological rhythms in man. *Rec. Proc. Horm. Res.*, 31: 399-446, 1975.
- 28) Wennink, J.M.B., Delemarre-van de Wall, H.A., Kessel, H.V., Mulder, G.H., Foster, J.P. and Schoemaker, J.: Luteinizing hormone secretion patterns in boys at the onset of puberty measured using a highly sensitive immunoradiometric assay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 67: 924-928, 1988.
- 29) Winter, J.S.D. and Faiman, C.: Pituitary-gonadal relations in male children and adolescence. *Pediatr. Res.*, 6: 126-135, 1972.
- 30) Winters, S.J. and Troen, P.: Episodic luteinizing hormone (LH) secretion and the response of LH and follicle-stimulating hormone to LH-releasing hormone in aged men: evidence for coexistent primary testicular insufficiency and an impairment in gonadotropin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 55: 560-565, 1982.

特掲 (受付日: '90. 3. 28)

(採択日: '90. 5. 23)