— 昭和63年度島村賞受賞講演論文 —

インヒビンの微量測定法の開発とその応用

長谷川 喜 久

(群馬大学医学部 371 群馬県前橋市昭和町 3-39-22)

I はじめに

下垂体細胞に出現する去勢細胞を抑制する性腺由来の水溶性の物質が発見され、1932年、McCullagh によってインヒビンと命名された。その後約半世紀の間、生殖生理学の内分泌学の研究は、下垂体ホルモンと性ステロイドホルモンが主要なテーマとなり、インヒビンの役割は殆んど顧みられなかった。一方、1971年に LHRH の構造が明らかにされ、その LHRH が LH と FSH の双方の分泌を促進することが明らかとなり、下垂体からのゴナドトロピン (GTH) の分泌は LHRH (又は GnRH) の放出刺激と性ステロイドホルモンの修飾作用により支配されていると考えられた(一元説)。しかしながら種々の生殖現象下における黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌動態が詳細に検討されるにつれ、LHRH-ステロイドで GTH の分泌調節機構を説明することは不可能となった。

さらに、種々の実験的解析から LH と FSH を支配する中枢機構に差があることが示唆され、再び FSH-RF の存在の可能性を次の 2 点から検討した。

(1) LHRH が FSH と LH の双方の分泌刺激の唯一のファクターであるとすれば、生体内の LHRH の作用を LHRH の抗体で中和すれば、LH と FSH の分泌量は基礎レベルに抑制されるはずである。この仮説を証明するために LHRH の抗体を作成し、ラットの性周期で GTH の顕著な変化の見られる時期に投与した¹⁾。LH-FSH サージの前に LHRH の抗体を投与すると FSH と LH のサージは完全に抑制された。しかしながら GTH のサージ後に LHRH の抗体を投与した場合には、LH のみ測定感度以下に抑制されたが、発情期の早朝に見られる FSH の第 2 のピーク (いわゆる FSH のセカンド

サージ)は抑制されなかった。これらのことは少なくとも LHRH が関与しない FSH の分泌調節機構の存在を示唆するものであった。

(2) LHRH 以外に中枢性の FSH の分泌をコントロールする因子があるならば化学的に同定することができるはずだ。この化学的証明(1)の生理学的証明に比べ非常にむずかしい命題であった。LHRH は 16 万頭余りのブタの視床下部からわずか 800 μ g しか取れなかった。FSH-RF があるとしても、LHRH よりも含量が少ないことが予想された。約 28 万頭のブタ視床下部を 3 年余りの間に集め FSH-RF の精製に日夜努力したが結局その化学構造の決定までに至らなかった。しかし努力は決して無にはならなかったこの間の精製およびバイオアッセイ技術の進歩が次の研究ステップに貢献した。哺乳類の LHRH と鳥類の LHRH の違いを発見しさらに鳥類の LHRH 以外の GTH の放出因子 (GnRH- II) の構造を決定した³⁾。この GnRH II は魚類にも存在することが明らかにされているが、哺乳類にも存在するか否かは現在のところ明らかではない。FSH-RF の研究を必死に行ったにもかかわらずゴールに近づくこともできなかった。

FSH の分泌の刺激は単に放出因子だけではなく抑制因子からの解除によっても説明される。それぞれの性ステロイドを検討したが有望な候補者はなかった。そこで注目を集めたのがインヒビンであった。インヒビンはその古い歴史を持っているが、殆んどその研究上の地位を得ていない新参者であった。生殖生理学の多くの大家達はその存在を信じなかった。1984 年のインヒビンのシンポジウムで Dr. Sairam は、インヒビンの実体を盲人の触る象にたとえた。私共もその象の像を探ることにした。

II インヒビンのバイオアッセイ

向下垂体性に作用する生理活性物質のアッセイ法は大別すると二種類ある。その一つは *in vivo* 測定法でありもう一方は *in vitro* 測定法である²⁾。前者は適当な動物、例えばラットに検体を投与し、一定時間後に採血して下

Production and Function of Inhibin and Its Related Peptide. Yoshihisa HASEGAWA, Department of Obstetrics and Gynecology, Gunma University School of Medicine, 3-9-22 Showa Cho, Maebashi 371, Japan

垂体ホルモンを測定し、ホルモン値の増減をもってその生理活性物質を同定する方法である。インヒビンの研究の初期には、下垂体ホルモン放出ホルモンの場合と同様にこの方法が用いられた。しかしながら、*in vivo* 法は、実験に供する動物の生理的状态に大きく左右されかつバラツキが大きい。最大の欠点は測定感度が著しく悪いことである。従って多くの試みがあったにもかかわらず、*in vivo* 法によるインヒビンの測定は成功しなかった。

一方、*in vitro* 測定法として用いられる下垂体の incubation 法と perfusion 法は下垂体ホルモンの放出因子の測定にはかなり有効な方法であったが、インヒビンの測定法としてはあまり適さなかった。それは、インヒビンの作用が発現するのに多くの時間を要するため、限られた incubation 時間内に FSH の抑制効果が見られないためである。そこで私共は、インヒビンの bioassay 法として下垂体細胞培養法を用いた。

下垂体細胞培養に供するラットは、幼若雌、成熟雄あるいは成熟雌など研究者により様々であるが、インヒビンの測定法には成熟の雌ラットが適していることを確めた。下垂体の組織を 1 ケ 1 ケの細胞に分散するために酵素を用いる。デスパーゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼやトリプシンを用いるが、トリプシン法が、得られる細胞の数、細胞の activity や簡便さから最も有効であった。後に述べるように、インヒビンの精製のためにこの下垂体培養法を用いたが、数百回の測定を行うためには、常に安定し、簡便であり再現性の良い bioassay 法が必須であった。下垂体中の FSH の含量は LH に比べ極めて少なく、かつ細胞分散中に殆ど FSH は放出されてしまい、細胞中の FSH は枯渇してしまう。そのために LHRH の刺激に対しても極めて反応量が少ない。インヒビンの測定は FSH の分泌の抑制で行うため、FSH の放出量によってインヒビンの測定の良否が決定される。そこで FSH の基礎放出量を高めることがインヒビン測定法の critical point となった。種々のメディウムや血清類を比較検討した結果明らかになったことは、人の臍帯血清 (HCS) が FSH の基礎放出量を高めることであった。Fig. 1 から明らかなように HCS は FSH の基礎放出量を増やすだけではなく細胞内の FSH 含量をも増加させた。このことは、HCS は FSH の生合成を促進することを示している。後で述べるようにインヒビンは FSH の生合成を抑制する結果、FSH の分泌を抑制するのであり、HCS はインヒビンとは逆の作用を持っていることになる。Fig. 1 から明らかなように HCS は FSH の基礎放出量を増やすだけではなく細胞内の FSH

Fig. 1. Effects of human cord serum (HCS) on dose response curves of inhibin produced by suppressions of FSH secretion into media and intracellular FSH content in pituitary cells.

含量をも増加させた。このことは、HCS は FSH の生合成を促進することを示している。後で述べるようにインヒビンは FSH の生合成を抑制する結果、FSH の分泌を抑制するのであり、HCS はインヒビンとは逆の作用を持っていることになる。Fig. 1 から明らかなようにメディウム中と細胞内 FSH の抑制曲線は RIA のスタンダードと同様にシグモイド状の曲線を示した。従ってこれらの値を Log-Logit 変換すると直線となりインヒビンアッセイのスタンダードとして充分に用いることができる (Fig. 2)。また血中や組織の抽出液中のインヒビンを測定する際は細胞内 FSH の減少法によるインヒビンアッセイが有効であるが、私共の HCS を用いた下垂体細胞培養法は最も良い方法であると思われる。

現在、インヒビンの RIA 法が確立されているが、種による構造上の異いや、同種においても分子種の異なるインヒビンが存在することから RIA だけによる測定にはまだ問題がある。従って常にバイオアッセイ法を基に RIA の信頼性を確認する必要がある。

Fig. 2. Suppression curves for inhibin preparations in the *in vitro* bioassay system. The curves were linearized. a; pFF 32 K inhibin, b; partially purified inhibin obtained from Sephacryl S200 gel filtration (Miyamoto *et al.* 1985), c; partially purified pFF inhibin obtained from Matrex gel Red A, d; pFF, e; bFF 32 K inhibin, f; bFF, g; hFF, h; rat ovarian extracts. Each point is the mean for quadruplicate determinations. From Hasegawa *et al.* (7).

Ⅲ インヒビンの精製とその特性(4, 5, 6, 10, 19)

In vitro の下垂体細胞の培養によるインヒビンの測定法により初めて微量のインヒビンの測定が可能となり、卵胞液や卵巣静脈血中のインヒビンの活性の報告も見られた。しかしながら、末梢血中レベルのインヒビンの測定は不可能であり、まだ多くの問題が残されていた。そこで私共は先ずインヒビンの精製を研究の第一目標に掲げた。当時既に雄の精漿由来のインヒビンの構造は発表されておりインヒビンの研究も一段落したと見られていた。しかしながら、1984年カナダのモンテペロで行なわれた「Gonadal Proteins and Peptides and Their Biological Significance」のシンポジウムに参加し、多くのインヒビン研究者と直に接し、研究の現状を知ることができた。de Jong らは、種々のアフィニティクロマトを駆使し、牛卵胞液から100倍以上精製したインヒビンを得ており、オーストラリアのRobertson らは1000倍以上に精製した牛インヒビンを得ていた。インヒビンの精製に逆相のHPLCが用いられたのはこの頃からであった。上記のグループ以外に米国のソーク研究所のGullemineのグループとValeのグループが、インヒビンの研究に

多額の研究費を得ていることを聞いた。

一方、そのSymposiumの主催者であったSairamのグループから出された精漿中のインヒビンについて疑問を持つ研究者が少なくなかった。従ってインヒビンの精製のレースは正に混戦のさなかであった。

我々は群馬県玉村にある屠場でわずか10日余りの間に2万個のブタ卵巣を集め13リットルの豚卵胞液を集めた。この時に我々のゴールも目前に見えていた。なぜならば、インヒビンの測定法と精製の戦術は決定していたからである。卵胞液を生理実験に用いる時は必ずチャコール処理をするがなるべく無駄なステップを省くためにこの装作は採用しなかった。また精製の段階でインヒビン活性を測定する必要がある。アッセイ用のサンプルは長期に恒り培養中の下垂体細胞とincubateされる。そのため従来、脱塩のための透析やゲルロカさらに凍結乾燥がバイオアッセイのための前処理として必要であった。しかしながら、この装作によりインヒビンの活性は悉く失われてしまう。従って脱塩装作なしでサンプルをアッセイすることにした。下垂体細胞にトキシックのリン酸バッファーは使わず、Tris-HCl系のバッファーを精製に用いた。蛋白質の変性剤としては、高濃度の水酢酸や塩酸グアニジンを用いず、細胞毒性の少ない尿素を用いた。

このように精製過程のインヒビン活性を直接にスクリーニングするためには先ず初めインヒビン活性を濃縮する必要があった。そのために Matrex gel Red A と Phenyl Sepharose を用いた。溶出に高濃度の urea を含んだバッファーを用いたのでインヒビンの回収率は非常に良かった。これ以後の精製ステップは、8M urea と非イオン性のデタージェントの CHAPS を含むバッファー系を用いて精製した。これ以降のインヒビンの精製は、既に述べてるように^{(4), (5)}, Sephacryl S200 を用いたゲルろ過法と DEAE-Sepharose CL6B を用いたイオン交換クロマトグラフィー法により行なった。ゲルろ過法によりインヒビンの活性分画は大きく3つに分けられた。これは後述するようにインヒビンには分子量の異なる数種類の分子種があることに依る。またイオン交換クロマトでさらに2, 3の分画に分離されるが、これはインヒビンが糖蛋白質であることに依ると考えられる。最終的には32K Da. の分子量のインヒビンが逆相の HPLC によって精製された。インヒビンは分子量や等電点などに多様性がありながら、最終 yield 10% 以上でブタのインヒビンを精製することに成功した。還元条件下の SDS 電気泳動により32K Da. インヒビンは20K の α サブユニットと13K の β サブユニットからなるヘテロダイマーの蛋白質であることが明らかとなった。 α 鎖と β 鎖を分離した後に気相のシークエンサーで N 端から30残基以上のアミノ酸配列が明らかとなった。インヒビンの化学構造の全容を明らかにするためには、遺伝子工学の手法を用いて塩基配列から推定するしか道は残されていなかった (Mason ら Nature 318, 659, 1985)。

インヒビンの α サブユニットと β サブユニットのアミノ酸の部分配列に基づいたオリゴヌクレオチドをプローブとして用い α 鎖と β 鎖の cDNA クローンが単離された。cDNA から推定された α 鎖の前駆体は364残基から成りその C 端の134残基が α 鎖であった。 β 鎖には A タイプと B タイプがありそれぞれの前駆体は424と407残基から成り、それらの C 端の116残基と115残基がそれぞれ β A と β B サブユニットであった。動物種間のインヒビンの相同性は非常に高く現在まで、ブタ、ウシ、ヒト、ラットとヒツジのアミノ酸配列が明らかにされているが、 α 鎖は80%以上の相同性があり β A 鎖は殆んど同じであった。 β A と β B 鎖の相同性は63%であった。

インヒビンの精製と構造決定が発表された後まもなく培養した下垂体細胞から FSH を分泌を促進する物質がブタ卵胞液中から、Ling らおよび Vale らのグループによって(1986)発見された。その化学構造が決まり驚くべ

きことが判った。その FSH 分泌の促進因子はインヒビンの β A 鎖同志あるいは β A と β B 鎖が s-s 結合した β サブユニットのホモダイマーであった。それぞれのサブユニットの構成に由来し、アクチビン A とアクチビン AB と呼ばれている。これらのアクチビンの構造はやはりホモダイマーである TGF β と非常に似ていることから成長因子様の作用を持っていることが考えられる。

さらに驚くべきことに Eto らによって(1987)ヒト単球性白血病細胞 THP-1 の培養液中より分離精製された、マウスフレンド白血病細胞の分化誘導因子 (EDF) の化学構造がアクチビン A と全く同じであった。この EDF は遺伝子工学の手法により大量に作られており、私共もその EDF を利用できる機会を得た。そこでインヒビンの作用と比較するために EDF をアクチビン A として今後の実験に用いた。

IV インヒビンの RIA 系の開発 (7, 11, 13, 18)

前述のように、インヒビンの測定法として *in vitro* のバイオアッセイ法が確立されたが、血中や組織中などのインヒビンを測定するために、さらに簡便で精度の良い測定法が必要となってくる。我々は、ブタとウシの卵胞液中からそれぞれ32K Da. のインヒビンの純化することに成功したのでそれらを用いてブタとウシのインヒビンの homologous RIA 系とラット、ヒトと山羊の heterologous RIA 系を開発した。各動物のインヒビンの RIA 系の概要を表1に示した。32 K Da のブタのインヒビンを雄のニワトリに免疫し、ウシのインヒビンを去勢雄ウサギに免疫した。これらの抗体を用いてブタとウシのインヒビンの RIA を確立する場合いくつかの問題点があった。それは、インヒビンに多様性があるところに起因する。つまり精製の過程でも述べたように多くの分子量の異なるインヒビンが存在する。そこでまず、標識抗原にどの分子量のインヒビンを用いるか、またスタンダードとしてどのインヒビンが最も適当か検討されなければならない。標識抗原は、第一に純品でなければならない。従ってブタにおいては32K Da. のインヒビンが含量も多く純化しやすく標識抗原に適していた。ウシの卵胞液中に最も多く含まれているインヒビンは55K Da であったが、それはプレカーサーであり、プロセッシングを受ける可能性があったので、やはりブタと同様に32K Da. のインヒビンを標識抗原に用いた。32K Da. のインヒビンを標識抗原として設定したブタとウシのインヒビンの RIA 系は、32K Da. のインヒビンのみでなく大分子型のインヒビンも認識した。しかしながら、ブタの大分子

Table 1. Characteristics of porcine, rat, bovine, human and Shiba-goat RIA systems.

	Pig	Rat	Cow	Human	Shibagoat
Antigen for immunization	32K PI	32K PI	BI after immuno-affinity	BI after immuno-affinity	BI after immuno-affinity
Antibody (dilution used)	CA 710 (1×10^4)	CA 710 (1×10^4)	RD 926 (2.5×10^4)	TNDH-1 (50×10^4)	TNDH-1 (50×10^4)
Tracer	32K PI	32K PI	32K BI	32K BI	32K BI
Castrated serum in standard (μ l)	100	100	200	100	100
Binding rate of tracer (%)	26	25	31	29	32
Standard	PI after Sephacryl S 200	PI after Sephacryl S 200	BI after immuno-affinity	hFF	gFF
Slope (Log-Logit)	-1.17	-1.00	-0.88	-0.88	-0.71
Sensitivity (/tube)	eq. 32 KPI	eq. 32 KPI	eq. 32 KBI		
Minimum detectable dose	0.03 ng	0.06 ng	0.01 ng	13 nl	0.8 nl
ED ₅₀	0.64 ng	1.36 ng	0.22 ng	230 nl	17 nl
Coefficient of variation (%)					
intra-assay	7.7	4.5	6.3	6.1	6.7
inter-assay	13.2	8.7	5.6	6.7	7.5

PI; purified porcine inhibin, BI; purified bovine inhibin, hFF; human follicular fluid, gFF; follicular fluid.

型のインヒビンの抑制曲線は32K Daのインヒビンの抑制曲線と平行しなかった。一方、ウシのRIA系では、大量の大分子型のインヒビンの抑制曲線は32K Daのインヒビンのそれに平行した。

インヒビンのRIA系に用いる標準品は必ずしも純品である必要はない。ブタとウシの純化したインヒビンはヨード化用に必須であり、大量に入手することは難しい。また非常に吸着性が強く、生物活性を失いやすい。従って標準品としては、大量に入手でき、生物活性と免疫活性が安定である試料が良い。ブタのインヒビンのRIA系では分子種により標準曲線が異なったが、32K Daの成分が主成分であり、血中に分泌されるインヒビンのタイプは32K Daであると考えられたので、Sephacryl S200 chromatography で分離して得られた32K Daのインヒビン試料を標準品として用いた。このサンプルは8M 尿素、0.2M NaCl、0.05% CHAPSを含んだ50mM Tris-HClバッファーに溶解され、-80℃中に保存されており非常に安定であった。この標準品の生物活性は純化したブタインヒビンのその5%であった。WHOから配布されているブタインヒビンのInternational Standardの生物活性は約1%である。一方、ウシのインヒビンのRIA系におけるインヒビンの標準曲

線の傾きはいずれの分子種においても32K Daのインヒビンのスロープと一致していた。そこで、ウシインヒビンのモノクローナル抗体を用いて immunoaffinity chromatography によって精製したインヒビンサンプルを標準品として用いた。この試料の生物活性は純化したウシインヒビンのその20%であった。

一方、ラット、ヒトとヤギのインヒビンの純化は未だ成功していないが、幸いなことに、ブタのインヒビンの抗体がラットのインヒビンと交差し、またウシのインヒビンの抗体がヒトとヤギのインヒビンと交差することを利用してそれぞれのインヒビンのRIA系を設定した。ラットの卵巣抽出液中のインヒビンの標準曲線のスロープはブタのスタンダードと平行したので、ブタの標準品をラットのインヒビンのRIA系の標準品として用いた。ヒトと山羊の卵胞液のインヒビンによって示めされた標準曲線のスロープは牛のインヒビンの標準品のそれと平行しなかったため、それぞれの卵胞液を標準品として用いた。このように heterologous なRIA系を設定する場合は、homologous なRIA系を用いる時に比較して充分な吟味をする必要がある。第一に、用いる抗体が測定する種のインヒビン活性を中和するか。第二に抗体が多様なインヒビンの分子種を認識するか。第三にインヒビ

Fig. 3. Stimulation of granulosa cell inhibin, estradiol and progesterone production (mean±S.D.) by FSH and LH. Granulosa cells ($2 \times 10^4/0.2\text{ml}$) were cultured for 3 days in the presence of 500 ng/ml testosterone with increasing concentrations of FSH (●) or LH (○). Basal production in each case is indicated by the bar marked C. Panel D: Effects of testosterone on FSH-stimulated inhibin production from granulosa cells (mean±S.D.). Granulosa cells were cultured for 3 days with either an increasing dose of FSH alone (○) or FSH in the presence of 500 ng/ml of testosterone (●). Basal inhibin production is indicated by the bar marked C. From Suzuki *et al.* (9).

ンの生物活性を有しない物質を認識しないか。第四に生物活性に比較しに免疫活性、つまり交差率がどのくらいか。第五に測定する試料の抑制曲線が平行するか。等を精密にチェックする必要がある。これらの条件を満たさない heterologous RIA 系は用いることができない。従来は第五番目の点について主に検討されてきたが、インヒビンのように非常に複雑なホルモンの RIA の確立には

Fig. 4. Stimulation of FSH-primed granulosa cell inhibin production (mean±S.D.) by FSH and LH. Granulosa cells ($2 \times 10^4/0.2\text{ml}$) were cultured in the presence of 20 ng/ml FSH for 2 days followed by treatment with increasing concentrations of FSH (●) or LH (○) for an additional 3 days. Basal inhibin production is indicated by the bar marked C. From Suzuki *et al.* (9).

極めて不十分である。

V インヒビンの産生

インヒビンの RIA 系が確立されたことによりインヒビンの産生とその分泌動態を追跡することが可能となった。そこで、ラットと豚の卵巣より得た顆粒膜細胞 (G 細胞) とラットのセルトリー細胞からのインヒビン分泌について検討した。幼若ラットに合成エストロゲン剤であるジエチルスチールベステロール (DES) を投与すると未分化の G 細胞が増殖する。この G 細胞を取り出し培養した。GTH を添加すると Fig. 3 に示すようにラットの G 細胞は FSH にのみ反応し、インヒビンとエストロジオール (E_2) を用量反応的に分泌した。また高濃度の FSH によりプロジェステロンの分泌も促進された。しかしながら、LH の添加によっては、いずれのホルモンの分泌も促進されなかった。しかしながら、あらかじめ 20 ng/ml の濃度の FSH を含むメディウムで前培養した G 細胞に GTH を用量反応的に作用させるとインヒビンの産生の状態は一変した (Fig. 4)。これは、FSH の前処理により LH リセプターが誘導され、そのリセプターを介して LH のインヒビン産生作用が高進するためと考えられる。一方、FSH の前処理により分化した G 細胞の FSH リセプターは、後述するように、減少し、FSH によるインヒビンの産生は減少した。従ってインヒビンの産生は第一義的には FSH により刺激されることは明らかであるが、その応答側の G 細胞の生理的状态にも大きく影響されることが明らかとなった。またこのような GTH のインヒビン産生は、cAMP 系を

介していることが示唆された。つまり表2に示すように dbcAMP, コレラ毒素やホルスコリンのように cAMP 系を賦活する物質によりインヒビンの産生は促進された。またインヒビンの産生と共に E_2 の分泌が高まることからインヒビンと E_2 の産生は共通の調節機構の下にあると考えられる。さらにインヒビンの産生は種々の生理活性物質により調節されていることが明らかとなった。FSH により刺激されるインヒビンの産生は、テストステロンやハイドロコチゾンによりさらに促進され (Fig. 5), インヒビンやソマトメジン C によってインヒビンの基礎放出量は増加された。一方, FSH による G

Table 2. Inhibin and estradiol production by FSH and reagents related to cAMP

	Inhibin (ng/ml)	Estradiol (ng/ml)
Control	12±1.0	0.3±0.03
FSH (25ng/ml)	45±3.0	130 ± 7.0
dbcAMP (0.3mg/ml)	48±4.8	16 ± 3.2
Cholera toxin (125µg/ml)	46±4.6	11 ± 1.1
Forskolin (20µg/ml)	48±0.8	20 ± 4.0

Fig. 5. Effects of hydrocortisone on FSH-stimulated granulosa cell inhibin, estradiol and progesterone production (mean±S.D.). Granulosa cells were cultured for 3 days in the presence of 500 ng/ml testosterone and either increasing doses of FSH alone (○) or FSH in the presence of 4 ng/ml hydrocortisone (●). Basal production in each case is indicated by the bar marked C. From Suzuki *et al.* (9).

細胞の分化や LH リセプターの誘導を抑制する物質である EGF, TPA や LHRH 類縁体は FSH によるインヒビン産生を抑制する (Fig. 6). 特に TPA の抑制作用は強く図 6A に示すように FSH のインヒビン産生は抑制するばかりではなく, インヒビンの基礎放出量まで下げた。これらの生理活性物質は, インヒビンと同様に FSH による E_2 分泌促進作用を示した。このようにインヒビンの産生は, E_2 と共通の調節作用を受けていると共に, 種々の生理活性物質により異なった修飾作用を受けていることが明らかにされた。

VI インヒビンの作用機構

1) 下垂体に対する作用 (8, 12)

FSH を抑制する物質が性腺に存在することが明らかにされて以来粗製のインヒビン物質を用いて下垂体に対する作用機序に関する研究が為されてきた。しかしながらその結果が正しくインヒビンの作用を反映しているの

Fig. 6. Effects if EGF, TPA, and GnRH agonist on FSH-stimulated granulosa cell inhibin, estradiol and progesterone productions (mean±S.D.). Granulosa cells were cultured for 3 days in the presence of 500 ng/ml testosterone with increasing doses of FSH alone (□) or FSH in the presence of 10 ng/ml EGF (●) or 1 ng/ml TPA (○) or 10 ng/ml GnRH agonist (▲). Bars indicate production of each hormone in the presence of 10 ng/ml GnRH (GnRH), 1 ng/ml TPA (TPA), and 10 ng/ml EGF (EGF). Basal production of each hormone is indicated by the bar marked C. From Suzuki *et al.* (9).

Fig. 7. Effects of inhibin on basal FSH and LH secretion and on FSH and LH intracellular content. The values are expressed as the mean $\pm$ S.D. of quadruplicate determinations. From Fukuda *et al.* (8).

か常に疑問視された。例えば、ステロイドを除いた卵胞液のインヒビン標品を培養した下垂体細胞に作用させると FSH の基礎放出は抑制されたが LH は抑制されず、LHRH 刺激による FSH と LH の放出は、インヒビンにより抑制された。この GTH に対する卵胞液の抑制作用の乖離現象に真にインヒビンだけではなく、LH を抑制する別の物質の存在が考えられた。

私共は、純化したインヒビンを手に得ることができ、この疑問に答えることが可能となった。既に述べたラット下垂体細胞の培養系を用いて検討した。インヒビンは先に述べたように FSH の生合成系の抑制に関与していることが示唆されたので一般的な蛋白質合成阻害剤のサイクロヘキシミドの作用と比較検討した。Fig. 7 に示すようにインヒビンを 3 日間下垂体細胞に作用させると、自然に放出される FSH の分泌量と細胞中に存在する FSH 含量は共に減少し、この結果はインヒビンにより FSH の全体量、つまり生合成が抑制されることが明らかとなった。しかしながら、LH の基礎放出量と細胞内含量には変化は見られなかった。またサイクロヘキシミドによってもインヒビンと全く同様の FSH の抑制パターンが見られたが、LH の放出と細胞内含量には殆んど影響を与えなかった。

一方、LHRH により下垂体細胞を刺激すると大量の

LH と FSH が放出される。この GTH の放出は純化されたインヒビンにより、FSH だけでなく LH も抑制された。Fig. 8 から明らかなように FSH に対するインヒビンの作用は、基礎放出の場合と同様に、FSH の合成を抑制することによって考えられるが、LH の場合は、メディウム中の LH 放出がインヒビンに抑制されるが、細胞内含量は逆に増加した。このことは、LHRH に刺激された LH の放出に対するインヒビンの作用は、単に生合成の抑制によって起るとは考えにくい。Fig. 9 から明らかなように、protein kinase C アクチベーターである TPA により GTH の放出は LHRH の刺激の場合と同程度まで上昇する。この TPA による LH の増加も明らかにインヒビンによって抑制された。従って LHRH によって放出される LH に対するインヒビンの抑制効果は、LH の生合成過程ではなく、protein kinase C 系を介する LHRH の作用過程に作用すると考えられた。このようにインヒビンは FSH と LH の双方の分泌過程を制御しているがその作用メカニズムに違いがあることが示された。

一方、インヒビンの β A サブユニットの二量体であるアクチビン A は、Fig. 10 に示すように、培養した下垂体細胞に作用し、FSH の分泌を特異的に分泌した。さらに細胞中の FSH 含量も、高濃度のアクチビン A に

Fig. 8. Response of FSH and LH secretion by pituitary cells in culture to a 6 h incubation with 3.0 ng/ml of LH-RH and increasing concentrations of inhibin. The cells had been preincubated for 72 h in identical concentrations of inhibin. FSH and LH intracellular content after the 6 h incubation are also shown. The values are expressed as the mean $\pm$ S.D. of quadruplicate determinations. From Fukuda *et al.* (8).

より増加したが、LH の分泌に対しては何の効果も見られなかった。このような、アクチビン A の効果は、インヒビンの作用と全く逆である。アクチビン A の下垂体細胞への作用機序は現在明らかではないが、その構造は TGF- β に類似しており、成長因子様の作用を持っているものと考えられる。アクチビン A の FSH 分泌促進作用は限定された条件下でのみ見られる。つまり、前述のように下垂体細胞の培養メディウムに HCS を加えるとアクチビンの効果は全く見られなくなる。これは、FSH の合成を刺激するに十分な factor が存在するためである。また、インヒビンとアクチビンの作用力価を比較すると、Fig. 11 に示すように FSH の分泌調節に対してインヒビンの方が極めて強い作用があることがわかる。さらに、充分量のアクチビン A をラットの末梢血中に投与しても FSH の上昇は見られなかった。従ってアクチビンが卵巣から分泌され内分泌学的に下垂体に作用するとは考えるには無理がある。しかしながら、アクチビンが視床下部で作られ下垂体に作用するという可能性の存在はまだ残っている。

2) 性腺における作用 (15, 16, 18)

性腺で作られているインヒビンやアクチビンが性ステ

ロイドや他の生理活性物質のように性腺内で局所的に作用している可能性がある。特にアクチビンは成長因子様の構造を持っており、バラクリンあるいはオートクリン作用を持つことが予想された。先に述べた G 細胞培養系を用いて E₂, P₄ とインヒビンの産生と FSH と LH のリセプターの発現を指標としてアクチビンの局所作用を調べた。第一にアクチビンは、G 細胞に働きインヒビンの産生を促進した (Fig. 12)。第 2 にアクチビンは、Fig. 13 に示すように未分化の G 細胞の FSH リセプターを誘導した。さらに FSH の共存なしで E₂ の産生を促進し、P₄ の分泌を抑制した。第 3 に FSH により発現する LH リセプターの数をもさらに増加し P₄ の産生を促進した (Fig. 14)。また、FSH により G 細胞のアクチビンのリセプターが顕著に増加することから、アクチビンは卵巣における FSH や LH の作用機序を修飾し、性ステロイドの分泌調節に関与していることが示唆された。しかしながら、先に述べたように多くの指標を用いてインヒビンの卵巣内での局所作用を調べたが確かな証拠を掴むことはできなかった。このように共通の構造を持つインヒビンとアクチビンは、卵巣においても全く異なる作用を持っていることが示唆された。このことは、

Fig. 9. Response of FSH and LH secretion by pituitary cells in culture to a 6 h incubation with 10.0 nM of TPA and increasing concentrations of inhibin. The cells had been preincubated for 72 h in identical concentrations of inhibin. The effects of cholera toxin (10.0 µg/ml), dibutyryl cyclic AMP (1.0 mM) and A 23187 (1.0 mM) on FSH and LH secretion are also shown. The values are expressed as the mean±S.D. of quadruplicate determinations. From Fukuda *et al.* (8).

G細胞のアクチビンリセプターとインヒビンリセプターが異なることから明らかである。

VII 性周期中における末梢血中インヒビンの変動 (11,13,14,19,20)

これまでの多くの実験により性腺で産生分泌されたインヒビンは、血中を流れ下垂体に達し FSH あるいは LH の分泌を抑制することが示唆された。しかしインヒ

ビンのホルモンとしての古典的な定義を満たすためには、血中を介して下垂体に達していることを証明しなければならない。また、インヒビンが下垂体からの FSH の分泌を抑制する大きさは、インヒビンの血中濃度に依存すると考えられる。従って卵胞発育に最も深く関係している FSH を支配するインヒビンの血中の変動を明らかにすることは種により決定されている排卵数の決定機構に肉迫するものと考えられる。種々の動物の性周期中の

Fig. 10. Effects of activin A on basal FSH and LH secretion and on the FSH intracellular contents *in vitro*.

Fig. 12. Effect of Activin A on inhibin production by rat granulosa cells. Granulosa cells (1×10^5 cells/well) obtained from DES-treated rats were cultured for 72 h with increasing concentrations of Activin A (1–100 ng/ml). Histogram represents the basal level in the absence of Activin A. The results are the mean $\pm$ S.D. for four wells. From Sugino *et al.* (15).

Fig. 11. Dose response curves of inhibin with (○) and without (●) activin A (200 ng/ml), and dose response curves of activin A with (△) and without (▲) inhibin (10 ng/ml).

Fig. 13. Effects of FSH (○) and Activin A (●) on the number of FSH binding sites in granulosa cells. From Hasegawa *et al.* (17).

Fig. 14. Effect of Activin A on FSH-induced LH receptor expression (A) and progesterone production (B) by rat granulosa cells. Granulosa cells (1×10^5 cells/well) obtained from DES-treated rats were cultured for 72 h with increasing concentrations of FSH plus varying amounts of Activin A (○; 0 ng/ml, ●; 10 ng/ml, ■; 30 ng/ml, ▲; 100 ng/ml). The results are the mean $\pm$ S.D. for four wells. From Sugino *et al.* (15).

GTH の分泌パターンを比較した場合、大局から見ると、LH の分泌パターンはいずれの種においても一定している。つまり排卵前に LHRH の刺激による一過性の大きなピークを示す。しかしながら FSH の分泌パターンは千差万別で種により異なる。この複雑な FSH の分泌パターンが果してインヒビリンによる FSH の抑制作用によるかどうか種々の動物の性周期について検討した。血中のインヒビリンは先に述べたように、ブタとウシのインヒビリンの RIA 系を用いて測定した。各動物の RIA 系の概要は表 1 に示した。

1) ブタ (Fig. 15)

ブタの性周期中の LH と FSH の分泌動態は他の種と比較し極立った差を示す。LH は排卵 2 日前に排卵性の LH サージがある他に卵胞期と黄体期に一過性の放出を見せる。一方、FSH は、排卵前の LH サージ期に殆んどサージらしき分泌動態を示さない。黄体期の終期に FSH は高い値を示し卵胞期に徐々に減少する。この FSH の減少はインヒビリンの増加に全く一致しており、インヒビリンのネガティブフィードバックの結果と考えら

れる。さらに LH サージにより排卵が誘起され血中のインヒビリンは急速に下る。このインヒビリンの減少に伴い血中 FSH は増加した。黄体期においてもインヒビリンの変動が繰り返えされたが、それに伴う FSH の振幅は排卵期ほど大きくなかった。

2) ラット (Fig. 16)

性周期中のラットの GTH の変動について多くの報告があり、排卵前の LH サージと同時に起る LHRH 依存性の FSH の第 1 のピークとその後の LH の分泌を伴わない FSH 単独の第 2 のピークが認められている。私共はさらに小さいながらも FSH の第 3 のピークを、インヒビリンの分泌動態の解析から明らかにすることができた。Fig. 16C から明らかのように、LH のサージ期には下垂体の LH 含量は顕著に減少し、サージ終了後にゆっくりと回復した。一方、FSH の第 1 ピークは LH と同様の変化を示したが、それに続く第 2 ピーク時には大量の FSH が分泌されているにもかかわらず下垂体中の FSH 含量は増加した。これは、LH サージと FSH の第 1 ピークは LHRH の刺激による下垂体からの放出の結果であり FSH の第 2 ピークは前者とは異なる機構により調節されていることを示している。果せるかな血中のインヒビリン濃度は LH-FSH サージ後急速に下り FSH の第 2 ピーク時に底値を示した。このことは FSH の第 2 のピークは、FSH の抑制物質であるインヒビリンの減少と全く一致しており、FSH とインヒビリンの逆相関が *in vivo* において証明された。減少したインヒビリン濃度は速やかに回復すると共に FSH の濃度は下った。さらに驚くべきことに一度回復したインヒビリン濃度は急速に減少した。この変化に伴い小さいながらもはっきりした FSH の第 3 のピークが出現した。従来この FSH の第 3 ピークは全く注目されなかったがインヒビリンの変動と共に考察すると非常に大きな意味があると思われる。先ず、この FSH のピークがはっきりしたインヒビリンの減少に伴っていることから何かはっきりした生理学意味の存在を示唆する。その一つは第 3 の FSH のピークの後に一過性の E_2 のピークが出現したが、この E_2 の分泌促進は FSH の第 3 のピークに依ることが想像される。さらに重要な点は、インヒビリンの減少の程度は FSH の第 2 のピーク時と同じ程度であるにもかかわらず FSH の第 3 のピークは非常に小さくかつ下垂体中の FSH 含量のはっきりした上昇は見られなかった。このことはある生理的条件下では FSH の分泌はインヒビリンの分泌と逆相関を示すが、別の条件下ではこの FSH-インヒビリンの関係が成り立たないということを示すものである。従って

Fig. 15. Concentrations of LH, FSH, inhibin, 17β-estradiol and progesterone in plasma throughout the consecutive estrous cycles of a sow (NO. 20). From Hasegawa *et al.* (11).

このFSHの第3のピークの成立機序を明らかにすることにより、FSHの分泌に関する調節機構はさらに解明されると考える。

3) ウシ (Fig. 17)

ウシの性周期中における血中FSHの分泌動態に関してかなりの報告が見られるが一致した見解は得られていない。これはウシのFSHのRIA系の不完全さによると考えられる。私共は米国農務省のBolt博士より提供

されたウシのFSHのRIA系を用いて血中のFSHを測定した。Fig. 17に示すように、黄体期に比較的高いレベルを示したFSH濃度は卵胞期になると徐々に減少した。LHサージと共にFSHの第1のピークがありその後小さいながらもはっきりしたFSHの第2のピークが見られた。これらのFSHの分泌動態は血中インヒビン濃度の変化に深く関係していた。つまり黄体期から卵胞期にかけてのインヒビンの増加によりFSHは抑制され、

Fig. 16. (A) Changes in serum (○) and ovarian inhibin (●) during the 4 day oestrous cycle. (B) Changes in FSH in serum (○) and the pituitary (●) during 4 day oestrous cycle. (C) Changes in serum (○) and pituitary LH (●) during the 4 day oestrous cycle. Each variable was measured at 3 h intervals. P: pro-oestrus, E: oestrus, M: metoestrus D: dioestrus. From Hasegawa *et al.* (20).

LH サージ後に排卵が誘起され血中のインヒビンが一過性に減少し、小さいFSHの第2のピークが出現するものと考えられる。ウシにおけるインヒビンの分泌動態とFSHの逆相関はラットやブタのようにはっきりしなかったが、これは排卵性の卵胞の発育が1ヶであることに依るのかもしれない。インヒビンの分泌動態で特徴的なことは、FSHの第2のピーク後にインヒビンが最も高

Fig. 17. Mean plasma concentrations (mean $\pm$ S.E.M.) of LH, FSH, and inhibin during estrous cycle of the cows (N=6). Time of LH surge designated as day 0. From Hasegawa *et al.* (18).

い値を示すことである。これはラットのFSHの第2のピークの後のインヒビンの放出に似ている。さらに黄体期初期にインヒビンの波状の分泌があり徐々に減少した。黄体期のインヒビンの振幅はブタにおいても見られたが、ブタの場合と異なりこのインヒビンの分泌は E_2 の分泌を伴っていた。このことは、黄体期におけるウシの卵胞の発達と退行を示唆するものである。

4) シバヤギ (Fig. 18)

P_4 を埋め込んで性周期を同期化したシバヤギを用いた。LHサージは P_4 を除いた後3日目に出現した。FSHは性周期中を通じて多くの変動を示した。 P_4 を除去することにより E_2 の分泌に見られるように卵胞が発育する。その発育卵胞からのインヒビンの分泌は徐々に高まり、発情期に頂値に達した。このインヒビンの分泌

Fig. 18. Mean plasma concentrations (mean±S.E.M.) of FSH, inhibin, estradiol-17 β and progesterone during estrous cycle of six Shiba-goats. Time of gonadotropin surge designated as day 0. From Hasegawa *et al.* (18).

の亢進に伴い卵胞期から発情期にかけて FSH の濃度は急速に減少した。LH サージと同時に FSH の第一のピークが見られた。その後インヒビンの濃度が急速に減少し FSH の第二のピークが出現した。シバヤギにおいてもインヒビンの変動により誘導される FSH の第二のピークのあることが明らかにされた。シバヤギの性周期で最も特徴的なことは、黄体期における FSH とインヒビンの変動である。FSH の第二ピーク時に減少したインヒビン濃度は速やかに回復する。それに伴い FSH の濃度が減少する。この両者の分泌動態の逆相関は黄体期に 3 回繰り返えされた。このような明確なインヒビンと FSH の逆のパターンは他の種の黄体期では見られなかった。この FSH の変動がインヒビンによって調節されていることが次の結果から明らかとなった。

Fig. 19. Mean plasma concentrations (mean±S.E.M.) of LH, FSH, inhibin, estradiol-17 β and progesterone during menstrual cycle of six women. Day of LH peak designated as day 0. From Hasegawa *et al.* (18).

去勢シバヤギに P₄ と E₂ を投与することにより人工的に発情を招くことができる。この人工発情を誘起するホルモンの処理により自然発情と同じ LH の分泌動態を再現することができた。このことは性周期中の LH の分泌は内因性の LHRH による刺激と性ホルモンの調節によって支配されていることがわかる。一方、FSH の自然の性周期における変動は性ホルモン処理によっては再現できなかった。去勢によって亢進した FSH の濃度は性ステロイドの処理によって殆んど下らず、LH サージと共に FSH の第一ピークが出現しただけで、卵胞期や黄体期の FSH の波状の変動は見られなかった。

5) ヒト (Fig. 19)

正常な月経周期を持つ 6 人の婦人から 1 日 1 回採血し GTH と性ステロイドとインヒビン濃度を測定した。Fig. 19 に示すように、LH と FSH は人に特徴的な正常なパターンを示していた。一方、インヒビン濃度の変動は今まで述べた動物のそれとは全く異なっていた。人の

月経周期で次回に排卵する首席卵胞は黄体期の終り、つまりメンスの時に決定される。同じ単一排卵動物である牛の排卵卵胞が決定されるのが排卵の4, 5日前であることと比較すると非常に早い時期に人の排卵卵胞は決定される。その首席卵胞は卵胞期初期に見られるFSHの放出により刺激され発育する。それに従って血中のインヒビン濃度は排卵期まで上昇した。このインヒビンの上昇に伴い血中のFSH濃度は徐々に減少した。LHサージと共にFSHの第一のピークが出現し排卵が起る。その結果インヒビンの一時的な下降を見た。その後黄体期に入りインヒビンの大量の放出が長期に亘り続いた。そのためにFSHの分泌は黄体期の間抑制され続けた。一方LHは、黄体から分泌される P_4 と E_2 により同様にネガティブフィードバックを受け低値を維持した。黄体期に見られるFSHの抑制は黄体から分泌される性ホルモンの抑制効果によると考えられていた。しかしながら、性ステロイドによりFSHの分泌がそれ程抑制される事実は全く未解決のまま残されていた。しかしながら、この黄体期のGTHの分泌の調節にインヒビンが大きく関与していることが明らかとなった。このように黄体期に卵巣から大量のインヒビンが放出されることによりヒトの性周期のGTH分泌パターンは他の哺乳動物と大きく異なった。LH-FSHのサージ後に第2のFSHのピークは見られずまた黄体期でのFSHの波状の振幅も見られなかった。このような黄体期でのインヒビンの分泌起源は黄体であることを明らかにした。手術時に採取した卵巣から黄体を取り出し抽出し、その抽出液のインヒビン活性をバイオアッセイ法とRIAで測定した。その結果、ヒトのインヒビンのスタンダードと良く一致したインヒビン活性を認めた。屠場から採取した牛の黄体を調べたがヒトのようなインヒビン活性を認めることはできなかった。それでは何如ヒトの黄体だけがインヒビンを分泌するのであろうか？一つの可能性としては、ヒトの黄体細胞は他の哺乳動物のそれに比べ未分化であるのかもしれない。なぜならば、ヒトの黄体期に大量に分泌される E_2 の起源は黄体である。他の哺乳類には見られないことである。ヒトの黄体期のインヒビンは黄体細胞から分泌されている。黄体細胞はLHによって刺激を受けインヒビンの産生を促進しているので、下垂体のFSHと卵巣のインヒビンとの間のフィードバック機構が成り立たなくなる。従って黄体期の継続する間FSHは抑制され、卵胞の発育は停止した状態になる。黄体期が終了するとインヒビンの抑制からFSHは開放され卵胞の発育が開始する。

Ⅷ おわりに

インヒビンの化学構造が決定され、インヒビンの微量測定法が可能となった。その結果、性腺でのインヒビンの産生、分泌、血中動態と標的器官での作用機序が明らかにされたことによりインヒビンのホルモンとしての地位は確固としたものとなった。ホルモンとしての生体のホメオスタシスあるいはリズムの調節という観点から見ると、インヒビンは他の生殖ホルモンと同様時々刻々とした生殖機能の変化をコントロールするものと考えられる。本稿では雌の性腺のインヒビンについて述べたが、雄においても、その成長過程や性成熟に伴いインヒビンの様相は変化する。最近、男性においても男性ホルモンと共にインヒビンの日内変動が存在することが明らかになった。このことはインヒビンは雄の性機能の日内変動を反映していることを示唆するものである。一方、種々の動物のホルモン動態とインヒビンの関連を見た時にその種に特徴的なパターンから逸脱した個体が折々見られた。これらの個体は一見正常に見えても明らかに機能的には病態を示すものである。従ってインヒビンの測定により临床上、より高度の診断法が確立されるものと考えられる。インヒビンを産生する性腺は内分泌器官としての役割の他に胚偶子の産生器官でもある。性腺のhormonogenesisとfolliculogenesisの間に深い関連のあることは内分泌学的に明らかであるが、さらに、インヒビンあるいはアクチビンのintraovarian regulatorとしてのOogenesisに対する作用が示唆される。胎盤中にインヒビンが存在すること、妊娠期間中の血中のインヒビンレベルは高値を保っていることから、妊娠の維持と胚発生に何らかの作用があるものと考えられる。

下垂体からのFSHの分泌を調節する因子として採り当てたインヒビンは、その目的は十分に果しながらも、その役割は増々広がることとなった。その行く着く所は予想もつかない状態である。

謝辞

本研究に対し名誉ある島村賞を受賞できましたことは望外の喜びであります。家畜繁殖学会と推薦の労をとっていただいた東北大学教授正木淳二先生に感謝致します。本研究は群馬大学五十嵐正雄教授・宮本薫博士・他多くの産婦人科教室員、宮崎医科大学松尾寿之教授・寒川賢治博士、農工大学笹本修司教授・田谷一善助教授・森裕司助教授、鹿児島大学後藤和文博士、家衛試岩村祥吉博士、理研杉野弘博士・中村隆範博士と味の素中央研究所江藤譲博士・柴井博四郎博士との共同研究として行なっ

たものである。

References

- Hasegawa Y, Miyamoto K, Yazaki C, and Igarashi M. Regulation of the second surge of follicle-stimulating hormone; effects of antiluteinizing hormone-releasing hormone serum and pentobarbital. *Endocrinology* 109, 130–135, 1981.
- Yazaki C, Hasegawa Y, Miyamoto K, Minegishi T, Yazaki K, and Igarashi M. *In vivo* and *in vitro* bioassays for porcine ovarian inhibin and its partial purification. *Asia-Oceania J. Obstet. & Gynaecol.* 8: 317–325, 1982.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, and Matsuo H. Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin-releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3874–3878, 1984.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, and Matsuo H. Isolation of porcine follicular inhibin of 32K daltons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 396–403, 1985.
- Fukuda M, Miyamoto K, Hasegawa Y, Nomura M, Igarashi M, Kangawa K, and Matsuo H. Isolation of bovine follicular inhibin of about 32 kDa. *Mol. Cell. Endocrinol.* 44: 55–60, 1986.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M and Igarashi M. Demonstration of high molecular weight forms of inhibin in bovine follicular fluid (bFF) by using monoclonal antibodies to bFF 32K inhibin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136: 1103–1109, 1986.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Fukuda M, Takahashi Y, and Igarashi M. Immunological study of ovarian inhibin. *Endocrinol. Japan.* 33: 645–654, 1986.
- Fukuda M, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y, and Igarashi M. Action mechanism of inhibin *in vitro*: Cycloheximide mimics inhibin actions on pituitary cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 51: 41–50, 1987.
- Suzuki T, Miyamoto K, Hasegawa Y, Abe Y, Ui M, and Igarashi M. Regulation of inhibin production by rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 54: 185–195, 1987.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, Igarashi M, Kangawa K, and Matsuo H. Isolation and characterization of porcine and bovine follicular fluid inhibins. *In: Inhibin-Non-Steroidal Regulation of Follicle Stimulating Hormone Secretion* (H. G. Burger, D. M. de Kretser, J. K. Findlay, & M. Igarashi, Eds.) pp. 47–59, Raven Press, New York, NY, 1987.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Igarashi M, Yanaka T, Sasaki K, and Iwamura S. Changes in serum concentrations of inhibin during the estrous cycle of the rat, pig and cow. *In: Inhibin-Non-Steroidal Regulation of Follicle Stimulating Hormone Secretion* (H. G. Burger, D. M. de Kretser, J. K. Findlay, & M. Igarashi, Eds.) pp. 119–124, Raven Press, New York, NY, 1987.
- Fukuda M, Miyamoto K, Hasegawa Y, and Igarashi M. Studies of the action mechanism of inhibin *in vitro*. *In: Inhibin-Non-Steroidal Regulation of Follicle Stimulating Hormone Secretion* (H. G. Burger, D. M. de Kretser, J. K. Findlay, & M. Igarashi, Eds.) pp. 267–280, Raven Press, New York, NY, 1987.
- Hasegawa Y. Immunology of inhibin—Development of radioimmunoassay and changes in serum concentrations of inhibin—. *Japan. J. Anim. Reprod.* 33: 40–53, 1987. (in Japanese).
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Iwamura S, and Igarashi M. Changes in serum concentration of inhibin in cyclic pigs. *J. Endocrinol.* 118: 211–219, 1988.
- Sugino H, Nakamura T, Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Igarashi M, Eto Y, Shibai H, and Titani K. Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 281–288, 1988.
- Sugino H, Nakamura T, Hasegawa Y, Miyamoto K, Igarashi M, Eto Y, Shibai H, and Titani K. Identification of a specific receptor for erythroid differentiation factor on follicular granulosa cell. *J. Biol. Chem.* 263: 15249–15252, 1988.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, and Igarashi M. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 668–674, 1988.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, and Igarashi M. Changes in serum concentrations of inhibin in mammals. *In: Non-Steroidal Factors: Physiological Roles and Possibilities in Contraceptive Development* (G. D. Hodgen Z. Rosenwaks & J. M. Spieler Eds.) pp. 91–109, The Jones Institute Press, 1988.
- Miyamoto K, Hasegawa Y, Fukuda M, and Igarashi M. Structure and function of inhibin and its related peptides. *In: Non-Steroidal Factors: Physiological Roles and Possibilities in Contraceptive Development* (G. D. Hodgen Z. Rosenwaks & J. M. Spieler Eds.) pp. 56–73, The Jones Institute Press, 1988.
- Hasegawa Y, Miyamoto K, and Igarashi M. Changes in serum concentrations of immunoreactive inhibin during the oestrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.* in press, 1988.