

乳腺腫瘍中の性ホルモン測定法について

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導 青柳安誠教授）

三 原 丞 治

（原稿受付 昭和34年8月10日）

A CONTRIBUTION TO THE CHEMICAL ASSAY METHOD OF SEXUAL HORMONES IN THE BREAST TISSUE

by

JOJI MIHARA

From the 2nd Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. YASUMASA AOYAGI)

It is presumed that mammary gland has the relationship with many kinds of hormones, especially sexual hormones; therefore, sexual hormones will play the important rôle in causing of breast tumor.

Since Moszkowicz (1927) gave the term of mastopathy to the diseases of mammary gland which had many histological types likely to be caused by the sexual hormone imbalance, many studies on the relationship between sexual hormones and mammary tumor have been made.

But in many studies, indirect chemical analysis of breast tissue such as measuring of sexual hormones in urine and blood was preceded, and few direct chemical analysis of the breast tissue was reported.

Recently KIER (1952) has reported that in the tissue of mastopathy the ratio of benzenoid steroids to the $\alpha\beta$ unsaturated 3-ketosteroids is higher than in normal tissue, and consequently it is relative hyperestrogenismus. In our results of chemical analysis of the breast tissue by KIER's method, differences between the tissue of mastopathy and normal tissue were unremarkable. In KIER's method, there was no purifying process of the tissue extract.

For the purpose of the measuring of sexual hormones in small tissue of breast, KIER's method was improved by the fact which benzenoid steroids were adsorbed by ion exchange resin, Amberlite IRA 400 (OH form).

Then the adsorption of steroid hormones to many kinds of ion exchange resin was studied. As ion exchange resin, Amberlite IR 120, Dowex 3 and Amberlite IRA 400 were used, and each of them was packed into 0.5cm diameter glass tube in 5cm high. Amberlite IR 120 was converted to H form by 2N-HCl; and Dowex 3 and Amberlite IRA 400, to OH form by 2N-NaOH, each with the perfect conditioning preceded. Then washed out by distilled water until eluted solution showed PH7, 70% alcohol was passed and everything was set up. When 70% alcohol solution of ben-

zenoid steroids (cstradiol, estriol and estrone) and $\alpha\beta$ unsaturated 3-ketosteroids (testosterone propionate, desoxycorticosterone, and progesterone) passed through these columns, benzenoid steroids were adsorbed only by Amberlite IRA 400 (OH form) and $\alpha\beta$ unsaturated 3-ketosteroids were not adsorbed by all kinds of ion exchange resin.

The ultraviolet absorption curve of 70% alcohol solution of the breast tissue extract was measured by KIER's method. Then 70% alcohol solution of the extract was passed through Amberlite IR 120 (I), Dowex 3 (II), and Amberlite IRA 400 (III) in order. And then ultraviolet absorption spectrum was determined to the solution after passing each column. The quantity of benzenoid steroids was measured by the difference of absorbancy between after passing I-and II-column and after passing I-, II and III-column at 280 $m\mu$ wave. At 240 $m\mu$ wave, absorbancy will show quantity of 3-ketosteroids after passing I, II-and III-column.

It is considered that some unpurified matters which were extracted by KIER's method were removed by this method.

By this method, 4 cases of normal, 19 cases of mastopathy, 10 cases of mammary cancer and 2 cases of gynecomasty were investigated. The results by this method and KIER's method are as follows:-

1) In the normal cases, average value of the ratio of benzenoid steroids and 3-ketosteroids (E/A) was 2.46 in our method and was little low in comparing with 3.74 in KIER's method.

2) In the 19 cases of mastopathy, average E/A value was 5.11 in our method and 3.60 in KIER's method, but in 4 cases E/A value was lower than in normal case.

3) In the 10 cases of mammary cancer, average E/A value in our method was 3.87 and was not differed from 3.77 in KIER's method. But the value was lower than average E/A value in the cases of mastopathy.

From these results, the average E/A value in mastopathy was relatively high and it was considered to be relative hyperestrogenismus. But when the more detail studies were performed, in mastopathy normal E/A value cases were found, and this fact will resemble to the result of study of estrogen/ 17 KS in urine by Iseda and Nishiya in our clinic. And in mammary cancer average E/A value did not increase like in mastopathy cases, this fact was fit to the result of measuring of hormones in urine.

4) In the 2 cases of gynecomasty, E/A value of one case was 3.25 and the other case showed 1.74.

目 次

緒 言

第1章 乳腺腫瘍中の性ホルモン測定法及びその検討

I. 材料採取

II. 抽出法

III. Kier の測定法

IV. 分画法

1. estrogen の chromatography 法

2. androgen の chromatography 法

3. 分画法の検討

V. われわれの改良した測定法

1. benzenoid steroid 及び 3-keto steroid の紫外外部吸収スペクトル

2. イオン交換樹脂吸着法

第2章 測定成績

I. Kier の測定法に準じて行つた測定成績

II. われわれの改良した方法による測定成績

1. 正常例

緒 言

乳腺が各種ホルモンと関係があり、その内特に性ホルモンの役割が重要な地位を占めており、従つて乳腺腫瘍の際にも、性ホルモンが重要な役割を演じているであろうことは容易に想像されるところである。

Schinzinger (1889) は乳癌に対して卵巣剔除が有効であろうと示唆し、Beatson, Lett (1896) らが乳癌の治療に卵巣剔除を行つて以来、多数の報告があり、ある程度の効果が確認されている事から考えても、性ホルモンと乳腺腫瘍が密接な関係を有することは疑問の余地がない。

Moszkowicz (1927) が Mastopathie の病名のもとに組織学的に40数種の名称を有する乳腺疾患群を性ホルモン系の失調に起因する乳腺の変化であるとみなし統一しようとして以来、性ホルモンと乳腺腫瘍との関係について研究が盛となつた。

正常乳腺は思春期、妊娠時及び月経閉止後において著しい変化をとげ、又月経間期によつても多少の変化がある事が認められており、これらは卵巣や副腎のみならず、脳下垂体を初めとし甲状腺、胸腺、胎盤等種々の内分泌腺が関与して estrogen と androgen が適当なバランスを保っているものと解される。

われわれも乳腺腫瘍患者において性ホルモンのバランスを追及しているのであるが、現在まで多くの研究が尿中に排泄されるホルモンの代謝終産物の測定により、間接的に性ホルモンの状態をうかがわんとし、直接乳腺組織中の性ホルモンを測定した報告は少ない。

Geschickter, Lewis, Hartman (1941) らは乳腺線維腺腫の組織中に卵胞ホルモンが多い事を指摘し、最近では Kier (1952) が、マストパチーにおいて benzenoid steroid に対する $\alpha\beta$ 不飽和 3-keto-steroid の比の高い事より、相対的 estrogen 過剰の状態にあると報告し、わが国においてもこの方法に準じて測定し、ほぼ同様な結果を得た報告がある。

近時 chromatography 法等の操作により、少量の試料で極めて微量のホルモン定量が可能となりつゝあるが、その操作によつてもなお困難な問題があり、乳

2. マストパチー患者

3. 乳癌患者

4. ギネコマストー患者

総括及び考察

結 論

腺組織中の性ホルモンについては未だ確実な測定成績は報告されていない。

われわれは benzenoid steroid がイオン交換樹脂 Amberlite IRA 400 (OH型) に吸着される事実を知り、これを用いて Kier の測定法を更に改良し極めて少量の試料で性ホルモンの状態をうかがおうと努力したのである。

第1章 乳腺腫瘍中の性ホルモン

測定法及びその検討

性ホルモン測定には、生物学的測定法と、化学的測定法があるが、生物学的測定法には幾多の利点があるとはいえ、なお操作が煩雑な上に、判定にも主観が入ることを防ぎえないので、われわれは幾分でも誤差を少なくする意味で化学的測定法を採用した。

I 材料採取

乳腺組織 1~2gm, を剔出後直ちに dry ice で氷結し、薄切して凍結乾燥機で凍結乾燥し、更にこれを粉碎して抽出を行つた。

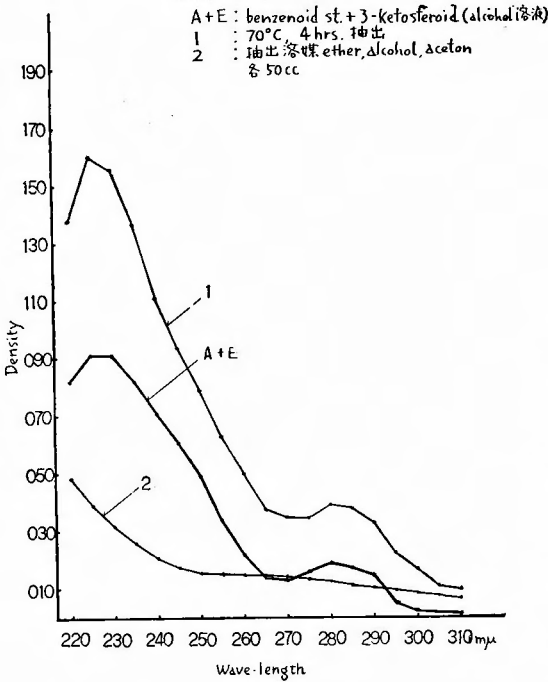
II 抽出法

組織中のホルモン抽出は尿中、血中よりの抽出に比べて容易ではない。通常 estrogen は組織のホモジネートをエーテルで抽出し、水性部分と分つている。Samuels (1949) は組織中の testosterone 及び関連 steroid の抽出に組織を肉ひき器にかけ enzyme の分解と蛋白凝固を兼ね、20分間冷却器をつけたコルベン中で煮沸し、エーテルで抽出している。Axelrod, Zaffaroni (1954) は組織中の corticoid の抽出に透析 (Dialysis) を用いている。

われわれは Kier の方法にならい、乾燥組織の粉碎したものを Soxhlet 抽出器でエーテル、アルコール、アセトン各 50cc の混合溶媒で 70 C. 4 hrs 抽出を行つた。そしてこの抽出条件で steroid hormone は破壊されずに抽出される事を確認した (第1図)。

マストパチーは組織学的に乳管の多いもの間質の多いもの等種々であり、各例について抽出に差はあるものと思われるが、estrogen/androgen の比を求めるためにはこの抽出法で十分であろう。

第1図 抽出条件による紫外部吸収
曲線の変化



III Kier の測定法

Kier は前記抽出法によつて得た抽出物を乾固し、そのアルコール溶液について紫外部吸収スペクトルを測定し、250m μ における吸光度をもつて α 9 不飽和3-ketosteroid (以下 3-ketosteroid) の量となし、280m μ における吸光度をもつてbenzenoid steroidの量とし、その比を求めたのである。

Kier 法は抽出物について化学的操作その他によつてbenzenoid steroidと3-ketosteroidの分離を行う事なく、紫外部吸収スペクトルにおいて両steroidが有する最大吸収の波長差によつて測定しようとした点、操作は極めて簡単であり、又われわれの求めるものが両steroidの絶対量よりも、むしろestrogen/androgenの比であるので、臨床的に容易に用いる方法であるが、Kierも指摘している様に抽出物中の不純物の混在が大きな問題として残り、Kierはこれに対して不純物はすべての乳腺において等量に含まれると仮定せざるを得なかつたのである。

IV 分画法

近時 chromatography 法の導入によつて、steroid hormone の分画、単離は長足の進歩をとげ、生体組織に就ても胎盤抽出物よりの estrogen, progesterone

の分離定量、その他組織中の androgen, corticosteroid の分離定量について多くの報告があるが、われわれが乳腺について求める各性ホルモンの量はなお微量で、その絶対値の測定は極めて困難である。

1. estrogen の chromatography 法

chromatography には paper 型と column 型とがあり、paper 型として Zaffaroni(1949), Heftmann(1950) は steroid を hydrazone として n-butanol 等で展開し、Bush(1952), Zaffaroni(1951) は steroid をそのまゝ propylenglycol-toluene 系で展開している。

column 型は Stimmel(1944) の alumina を固定相とし、methanol-benzene を移動相とする adsorption chromatography が最もよく用いられ、Stern 及び Swyer(1952), Braunsberg(1952), Bitman 及び Sykes(1953), Bauld(1955) Marrian(1955, 1957) らは celite を使用して partition column chromatography を行い Nye(1951) は mealorub rubber column を使用した。

胎盤組織中の estrogen の分離測定には以上の種々の方法を用いた Mitchell, Davies(1954) の詳細な報告がある。

2. androgen の chromatography 法

Samuels(1949) は alumina column を用い、pentane, CHCl₃ を移動相として組織中の testosterone 及び関連 steroid を測定し、更に West(1951) は Samuels 法を用い、遊離型 steroid のみならず、結合型 steroid をも測定している。

ketosteroid の paper partition chromatography は Zaffaroni(1949) が ketosteroid を Girard T 試薬により hydrazone となし、これを水-butanol で展開し、更に Burton(1951), Kochakian(1952), Savard(1953), Rubin(1953)らによる種々の system による分離がある。又 McKinley(1955) は ketosteroid の hydrazone を paper electrophoresis で分離している。

3. 各分画法の検討

われわれが種々のホルモンの分画、単離してこれを確認する場合、これらの結晶をうるか、又 paper chromatography における Rf により同定しなくてはならない。抽出物について paper chromatography により分離する場合、満足すべき結果をうるためには column chromatography 等により可成り試料の精製を必要とする。

われわれが Zaffaroni 法により estrogen の分離を toluene-propylenglycol 系で行い、37°C、下降法で Rf: estrone 0.45, estradiol 0.15, estrone 0, でよい結果を得、ketosteroid については McKinley の方法で ketosteroid を Girard T 試薬で hydrazone とし、東洋濾紙 No. 50 に塗布し、0.05 M 硼砂緩衝液で 200V, 0.5mA/cm の電流を通じ 18~20 hrs electrophoresis を行い progesterone の泳動距離を 1.00 とすると desoxycorticosterone 0.81, testosterone 0.75, estrone 0.50 で満足すべき分離をしえた。しかしわれわれが乳腺組織抽出物について行う場合、不純物のためその分離定量は必ずしも容易ではない。

column chromatography においても試料がやゝ多い場合、あるいは精密な定量分析を目的とする場合には適するが、臨床上に用いる方法としては煩雑でしかも再現性が得がたい。又採取する乳腺組織の量も限定されるので steroid の単離、同定は更に困難となる。

V. われわれの改良した方法

以上各方法を検討したが、われわれは臨床上用いる比較的簡便な方法として Kier の方法の利点を生かした改良法を案出した。

1. Benzenoid Steroid 及び 3-Ketosteroid の紫外外部吸収スペクトル

Kier は estrogen 作用を有する物質群を benzenoid steroid とし、androgen 作用を有する物質群を $\alpha\beta$ 不飽和 3-ketosteroid として分つた。

しかし benzenoid steroid がすべて estrogenic substance ではなく、又 3-ketosteroid がすべて androgenic substance ではない。後述する通り 3-ketosteroid としてとりあげた progesterone は estrogen に対して拮抗作用、抗腫瘍性を示すことがあり、又共同作用も示すのである。desoxycorticosterone は estrogen の腫瘍発生作用に対しては拮抗性があり、又 estrogen の黄体化作用にも拮抗性があるといわれている。しかし多くの chemocorticoid は 3-ketosteroid であるが、ホルモン作用が認められているものは僅かである。

ところで estrogen 及び androgen の化学的定量法からみると、これらを大きく分つには、紫外外部吸収スペクトルにおける benzenoid steroid と 3-ketosteroid の最大吸収の波長差により、測定するのが最も簡便であり、又それらのホルモン作用より分つためには、生物学的測定法に頼る他ないのであるから、一つ

の指標として benzenoid steroid, 3-ketosteroid をそれぞれ estrogen, androgen 作用を有する物質群と見なしたのである。

benzenoid steroid はその A 環に phenol 基を有するので 280m μ に peak を有する吸収曲線を示し、3-ketosteroid は A 環に $\alpha\beta$ 不飽和 ketone 基を有し、240m μ に peak を有する吸収曲線を示す。benzenoid steroid として estradiol, estriol, estrone の各標準結晶をとりそのエタノール溶液について紫外外部吸収スペクトルを Beckman 型 spectrophotometer で測定し、280m μ においてそれらの吸光度は 12.5 γ ~125 γ 迄 Beer の法則に従つて直線関係を示し、3者の Extinction には多少の差がある (第2図, 第3図, 第4図)。

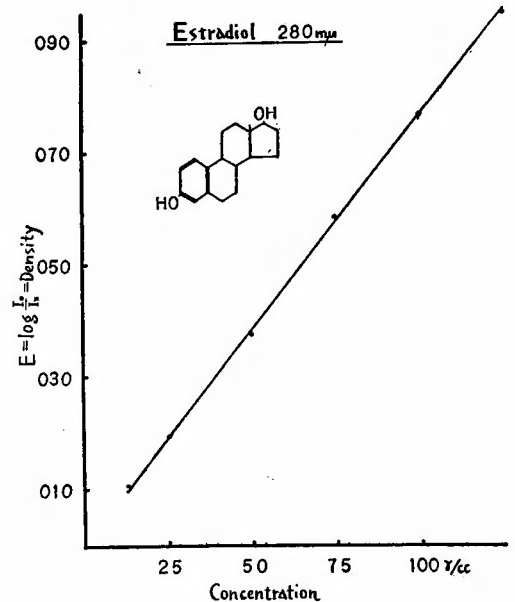
3-ketosteroid として testosterone propionate, desoxycorticosterone, progesterone の各標準結晶のエタノール溶液における吸収スペクトルを測定して 240m μ でその吸光度は 0.5~25 γ の濃度範囲で直線関係を示し、又 3者の Extinction には多少の差がある (第5図, 第6図, 第7図)。

また benzenoid steroid 及び 3-ketosteroid を種々の割合に混合したものの紫外外部吸収曲線は第8図及び第9図に示す通りである。

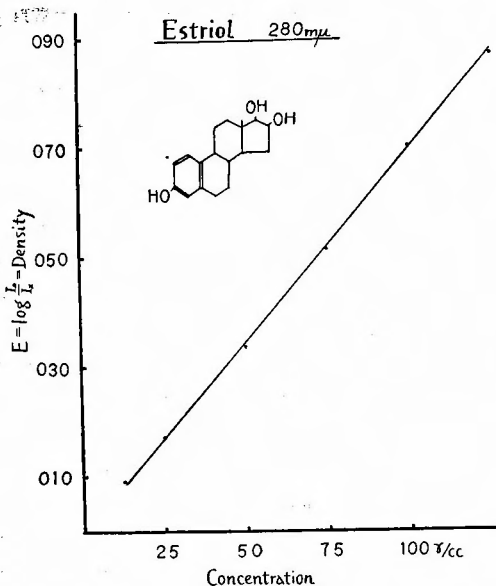
2. イオン交換樹脂吸着法

われわれは先ず乳腺組織中の steroid hormone を

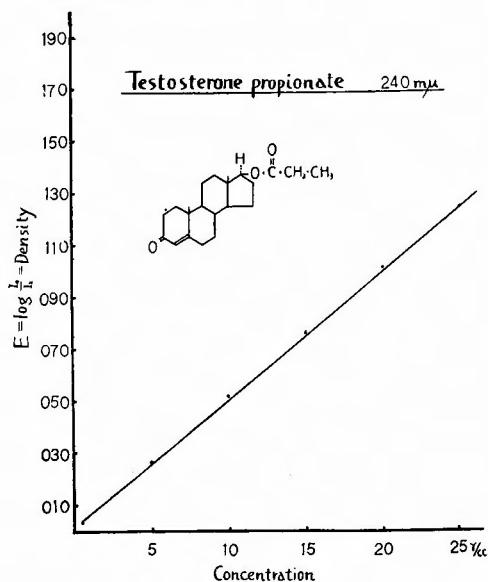
第 2 図



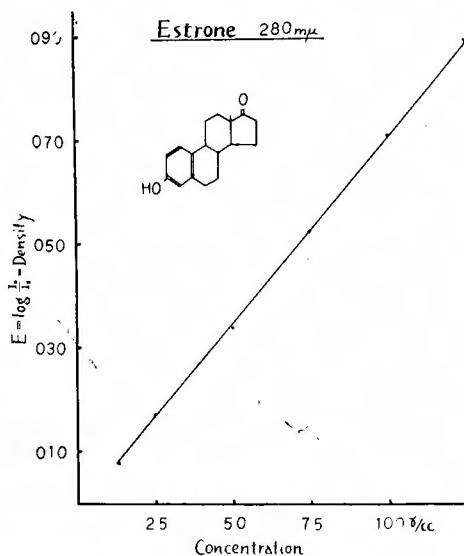
第 3 図



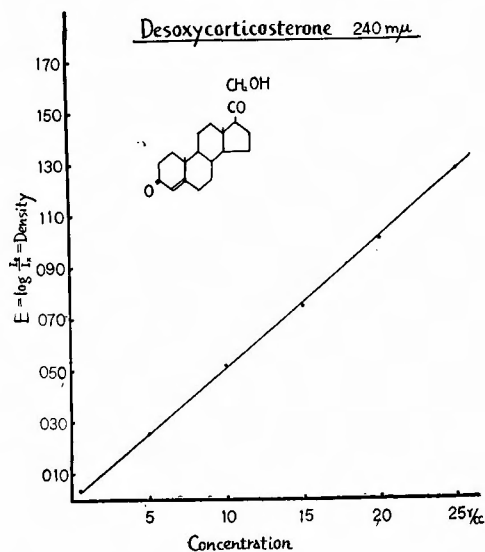
第 5 図



第 4 図



第 6 図

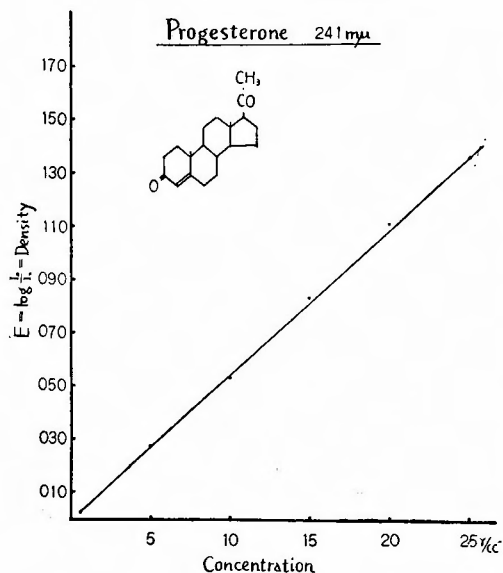


benzenoid steroid と 3-ketosteroid とに分離することを企て、イオン交換樹脂吸着法を考案した。

estrogenは他のsteroid hormoneと異なり steroid A環が benzol 核をなし、従つて C₃-OH が phenol 性であるため、弱酸の性質を有し、水酸化アルカリに溶ける。酸性は estrone→estriol→estradiol の順に強く水に難溶である。一方 androgenは水に不溶で希

酸、希アルカリに安定であり、また androstaneを基本骨格とした中性物質である。従来より estrogenと中性 steroid の化学的分離に際しては、estrogenは pH 8~11 の弱アルカリ溶液に最もよく溶解する“強フェノール分画”と、0.1~1 N・NaOH に溶解する“フェノール分画”との性質の差を利用して初めに弱アルカリで、ついで比較的強アルカリ液で抽出分離を

第 7 図



行なっている。

われわれはこの分離に、イオン交換樹脂を用いる事を考えたのである。

イオン交換樹脂クロマトグラフィーは近時有機化合物、特に生化学的重要物質の分離に広汎に應用されて

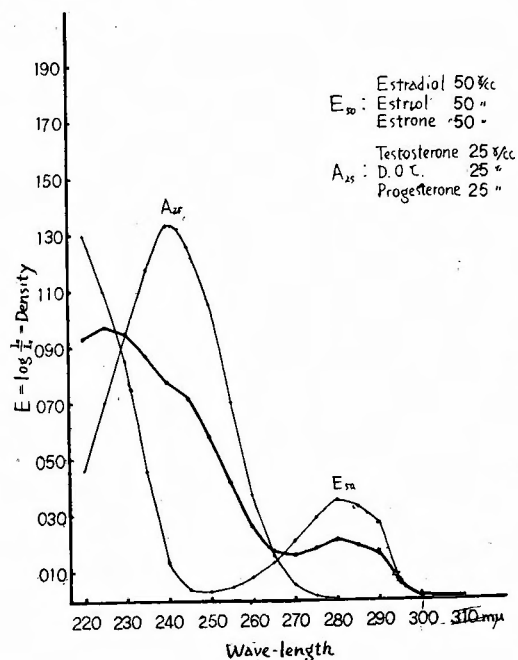
いる。即ちアミノ酸、ペプチッド、蛋白質、糖及びその誘導体、核酸構成物質（プリン及びピリジン塩基、ヌクレオシッド及びヌクレオチッド）、有機酸、ビタミン、抗生物質、アルデヒド及びケトン、アルカロイド、其の他の物質の分離精製に用いられ、極めて有効な手段となりつゝある。

これらの物質は、その溶液において陽イオン又は陰イオンとして解離したものを、イオン交換樹脂に吸着せしめ溶離展開によつて分離し、あるいは種々な型の樹脂の組合せによる置換展開法 (displacement development) による分離、又溶解剤のpHを徐々に變えて溶出する溶出分析法 (elutional analysis)、前端分析法 (frontal analysis)、又樹脂に吸着されない物質の不純物除去にも應用され、更に芳香族化合物の非イオン性吸着 (Weiss, 1950) による分離等の報告がある。

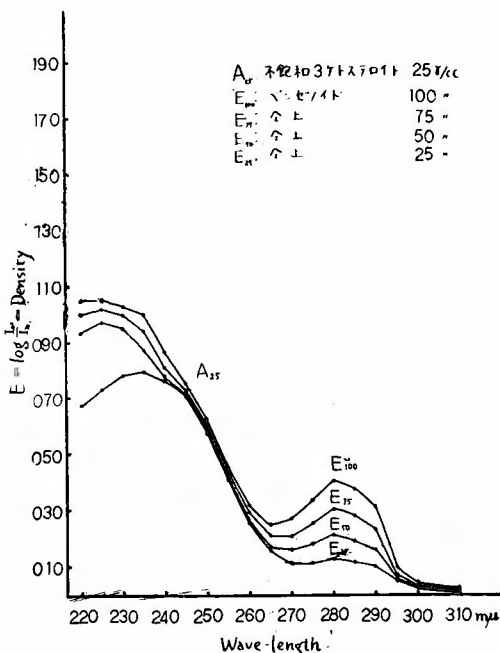
ホルモンの分離、精製には蛋白ホルモン（ゴナドトロピン、ACTH）について種々の報告があるが、ステロイドホルモンにおいては関 (1958) の非イオン性吸着による estrogen の分画定量法の報告があるに過ぎない。

われわれは estrogen が強塩基性アニオン交換樹脂 Amberlite IRA 400 (OH型) に吸着される事実を知

第 8 図



第 9 図



つたので、更に他のイオン交換樹脂に対するステロイドホルモンの態度を検討した。

イオン交換樹脂は強酸性カチオン交換樹脂として Amberlite IR 120, 弱塩基性アニオン交換樹脂として Dowex 3, 強塩基性アニオン交換樹脂として Amberlite IRA 400 を使用した。

各樹脂は約 100 mesh 程度の粒子に揃え、2N・HCl, 蒸溜水, 2N・NaOH で 2 回洗い、所謂 conditioning を行う。次に下端にガラスウールをつめた内径 0.5cm のガラス柱に各樹脂をつめ高さ 5cm とする。Amberlite IR 120 のカラムは 2N・HCl 30cc を流し H 型に、Dowex 3 のカラムは 2N・NaOH 30cc で OH 型に Amberlite IRA 400 のカラムも同じく 2N・NaOH 30cc で OH 型にする。次に煮沸して CO₂ を除いた蒸溜水を各カラムに流し、ブローム、チモール・ブルー試験級で流出液が pH 7 になるまで充分洗う。

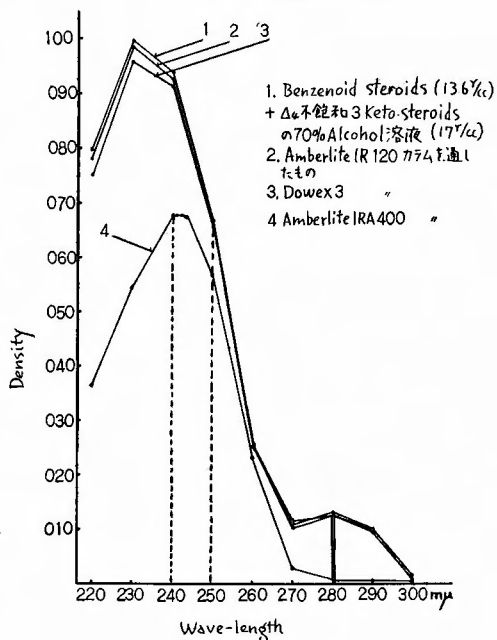
更に各カラムに 70% アルコール 5cc を流しカラム中の水を 70% アルコールで置換する。この間樹脂に気泡が附着しないよう注意し、附着した場合は back washing を行う。

benzenoid steroid として estradiol, estriol, estrone, 3-ketosteroid として testosterone propionate, desoxycorticosterone, progesterone の標準結晶をとり、70% アルコール溶液をつくり、この溶液を各カラムに 2cc 宛流す。この際の流速は約 30 drops/sec とする。次いで更に同溶液 2cc を流し、流出液を採取して 50°C 以下で減圧乾固し、そのアルコール溶液の紫外吸収曲線と、カラムを通さないものの同曲線とを比較した (第10図)。

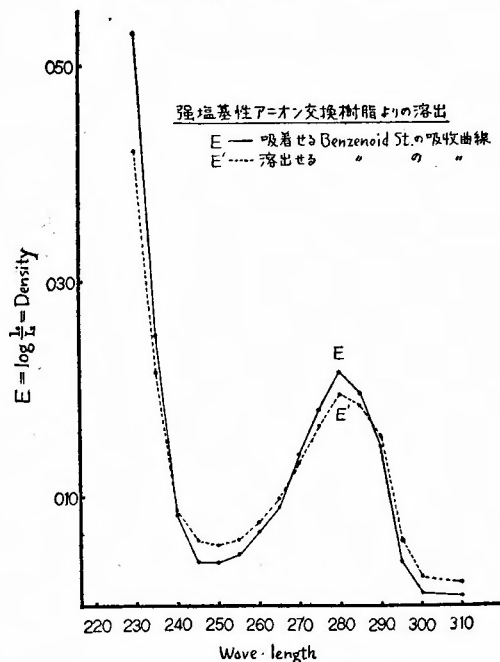
Amberlite IR 120, Dowex 3 のカラムを通したものの吸収曲線は、通さないものと殆ど変わらず、各ステロイドは全く吸着されないものと考えてよい。Amberlite IRA 400 のカラムを通したものの吸収曲線は 280m μ における benzenoid steroid の吸収極大が全く消失し、240m μ における 3-ketosteroid の吸収極大のみが残るのである。この事は benzenoid steroid が Amberlite IR 120 (H 型), Dowex 3 (OH 型) には吸着されず、Amberlite IRA 400 (OH 型) には吸着され、3-ketosteroid はすべての樹脂に吸着されない事を示している。

吸着された Amberlite IRA 400 (OH 型) のカラムより benzenoid steroid の溶離は次に示す通りに行つた。このカラムに 70% アルコール 40cc を流し、吸着されなかつた 3-ketosteroid をすべて流出させ、

第 10 図



第 11 図



次にカラム中の 70% アルコールを蒸溜水 20cc を流して水に置換。溶出は benzenoid steroid が水に難溶であるので、HCl を流すのみでは溶出されない事が予

想されるが、事実 1N・HCl 10cc, ついで蒸溜水100cc を流したが、この中には benzenoid steroid は殆どなく、次のアルコール 20cc×4 に溶出される (第11図)。

この場合 1N・HCl-アルコールを一気に流せば操作は簡単になるが、特級 HCl を用いても HCl 中の不純物のため紫外外部吸収曲線にみだれがみられる事があるので使用しなかつた。以上の溶出による benzenoid steroid の回収率は、紫外外部吸収による定量では10~125% で $90 \pm 2\%$ であり、数%以下の微量では溶出及び硫酸螢光による定量にお検討すべき点がある。

以上の操作は比較的簡単で、しかも操作中の不純物の混入その他による紫外外部吸収曲線のくづれが殆どなく、この事は更に次にわれわれが考案した方法の有力な条件となる。即ち乳腺組織抽出物について Amberlite IR 120(I) のカラム、ついで Dowex 3(II) のカラムを通し、これらによつて或程度の不純物を除き、ついで Amberlite IRA 400(III) のカラムを通して benzenoid steroid を吸着し、I, II のカラムを通したものの紫外外部吸収曲線で 280m μ における吸光度と、III のカラムを通したものの同じ波長における吸光度との差をもつて benzenoid steroid の量とし、III のカラムを通したものの 240m μ における吸光度をもつて 3-ketosteroid の量とすれば、Kier の方法における不純物の問題はある程度解消出来て、より合理的であると云つてよい (第1表)。事実われわれの方法で I, II のカラムを通した場合の吸光度の変化は、マストバチー各例についてみても決して同程度のものではなく、各例によつて差異があるのは、これら樹脂に吸着される物質、即ち不純物に差がある事を示している。

われわれの方法においても Amberlite IRA 400 に吸着される物質は benzenoid steroid に限らず、他の弱酸性物質等を含むことは当然考えられ、又240m μ における吸光度も benzenoid steroid による影響は消失するが、3-ketosteroid のみによるものではない。しかし局所麻酔で乳腺剔出を行つた場合の麻酔剤 (ペルカミン)、その他薬剤による影響は全く除去しうる。

第2章 測定成績

上述のような検討結果にもとづきわれわれの改良した測定法と Kier の測定法とを同時に行つてその成績を比較した。

対照となるべき健康婦人の乳腺は殆ど入手不能であるので、止むを得ず胸囲結核、心臓疾患等厳密な意味

第 1 表

Kier (1952) の方法

乳腺組織 1~2g
低温乾燥→粉碎
↓
抽出 Alcohol
Aceton
Ether
↓
乾固
↓
Alcohol 溶液
Beckman DU 型分光光度計
近紫外外部吸収スペクトル
250m μ →不飽和 Keto-steroids
280m μ →Benzenoid-steroids

著者の改良した方法

乳腺組織1~2g
凍結乾燥→粉碎
Alcohol
Aceton
Ether
↓
乾固
↓
70% Alcohol 溶 (20cc)
↓
石油 Ether 10cc×3 洗
1. Alcohol 層 2cc
↓
2. Amberlite IR 120 (H型) カラム
↓
3. Dowex 3 (OH型) カラム
↓
4. Amberlite IRA 400 (OH型) カラム
↓
240m μ における吸光度
↓
280m μ (3-4) の吸光度
↓
Benzenoid-steroids

で正常例といいうるか少しく疑問であるが、肉眼的、組織学的に正常乳腺像を示したものを対照とした。

I Kier の測定法に準じて行なつた測定成績

正常例3例、マストバチー5例、乳癌5例について見ると第2表に示す通りである。

benzenoid steroid 対 3-ketosteroid の比を仮りに E/A とすると、正常例で 19 j. 胸囲結核の E/A は 1.85 と低値を示したが、46 j. 胸囲結核では 3.97 とマストバチーにおけると同様な高値を示している。他の 1 例 54j. 熱性膿瘍では 2.87 でやゝ低値を示し、これだけ

第 2 表

Kier の測定法による			Mg/Gm 乾燥重量		
患 者	年 令	病 名	Benzenoid	3-keto	比(E/A)
1	19	Pericost. tbc.	3.13	1.69	1.85
2	46	〃	5.75	1.45	3.97
3	54	Abscess	5.28	1.83	2.87
		平 均			2.89
4	44	Mastopathy	3.92	1.27	3.09
5	39	〃	1.82	0.53	3.43
6	38	〃	6.04	1.24	4.88
7	38	〃	2.87	0.74	3.89
8	40	〃	1.91	0.65	2.93
		平 均			3.44
9	31	Cancer	2.58	0.84	3.07
10	56	〃	4.50	1.44	3.12
11	65	〃	4.18	1.05	3.98
12	60	〃	3.57	1.10	3.25
13	39	〃	2.58	0.67	3.83
		平 均			3.45

の例数では結論は出せないが、決して一様な値を示していない。

マストパチー5例の E/A の平均値は3.44乳癌5例の E/A の平均値は3.45で両者殆んどその差がなく高い値を示している。

一方 Kier の報告ではマストパチーの E/A の平均値は正常例のその2倍以上の値を示しているのである。

II. われわれの改良した測定法による測定成績

われわれの改良した測定法と Kier の測定法を併わせ行つた。

正常例4例、マストパチー19例、乳癌10例の測定成績は表に示す通りである。

1. 正常例 (第3表, 第12図)

対照となるべき正常例が僅か4例でその平均をとる

のもいささか冒険であるが、その E/A の平均値は、2.46 で Kier の測定法による平均値3.74に比し相当低値を示している。

2. マストパチー患者 (第4表, 第13図)

マストパチー19例においてはわれわれの測定法による E/A の平均値は5.11と高い値を示し、Kier の測定法による3.60に比し著しい差を示している。又われわれの測定法による各例の E/A は第14図に示すようにその分布の中が大きく、Kier の測定法によるものは分布の中が小さい。しかしマストパチーにおいても、その内4例は E/A の値が正常例の E/A の平均値以下であつた。

3. 乳癌患者 (第5表, 第15図)

乳癌10例においてはその E/A の平均値は3.87で Kier の測定法によつて得た平均値3.77に比べて殆ど

第 3 表

正 常 例			γ/Gm 乾燥重量			
患 者	年 令	病 名	Benzenoid	3-Keto	比(E/A)	Kier による比
1	25	Mitral stenosis	37.7	47.7	0.79	3.68
2	15	Heart disease	52.8	45.8	1.15	3.41
3	48	Pericostal tbc.	250.0	84.0	2.98	4.71
4	34	Mitral stenosis	303.9	61.5	4.94	3.19
		平 均			2.46	3.74

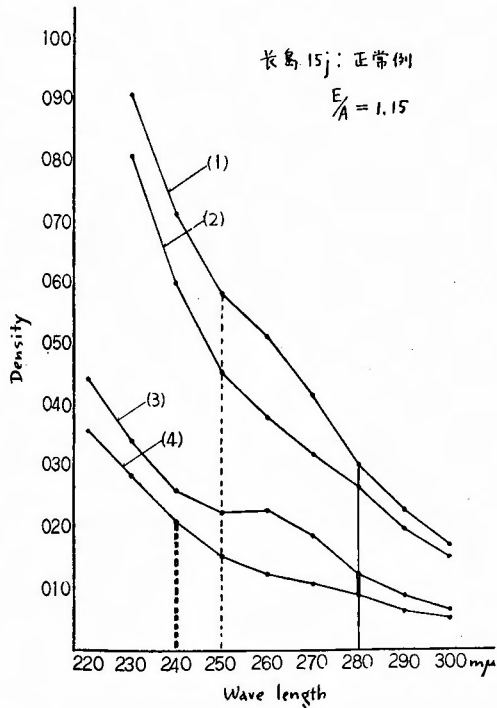
第 4 表

マストパチー

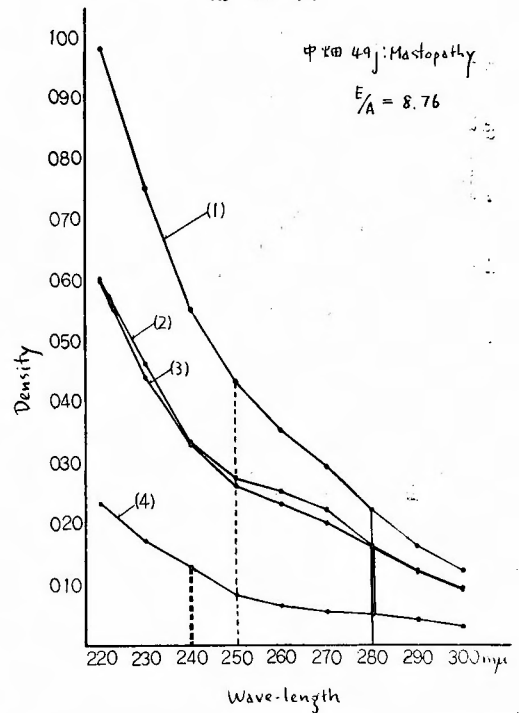
γ/Gm 乾燥重量

患 者	年 令	病 名	Benzenoid	3-Keto	比 (E/A)	Kierによる 比
1	46	Mastopathy	870.0	74.0	11.75	4.05
2	46	〃	450.0	55.1	8.16	3.88
3	32	〃	602.7	66.1	9.12	4.19
4	49	〃	429.2	49.0	8.76	3.41
5	43	〃	997.2	146.4	6.81	4.35
6	39	〃	240.0	37.3	6.44	4.06
7	44	〃	875.0	140.0	6.25	3.20
8	40	〃	1104.6	202.3	5.46	4.48
9	46	〃	759.85	175.0	4.34	2.80
10	26	〃	708.75	175.0	4.05	3.81
11	29	〃	466.96	122.2	3.82	3.00
12	36	〃	1380.0	371.0	3.72	3.33
13	43	〃	1950.0	540.2	3.61	3.47
14	38	〃	1325.0	372.2	3.56	3.32
15	27	〃	900.0	257.1	3.50	3.83
16	40	〃	337.05	144.7	2.33	3.71
17	31	Fibroadenoma	912.5	402.0	2.27	3.21
18	44	Mastopathy	6358.7	305.6	2.09	3.23
19	37	〃	458.5	402.2	1.14	3.09
平 均					5.11	3.60

第 12 図



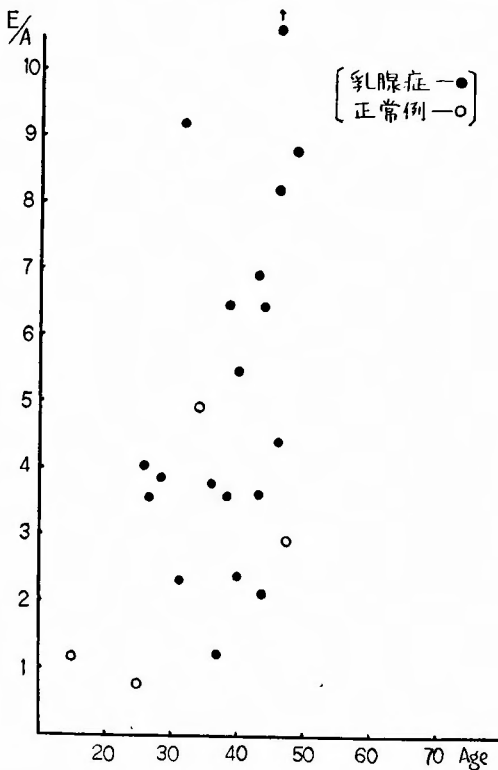
第 13 図



第 5 表

乳 癌			γ /Gm 乾燥重量			
患 者	年 令	病 名	Benzenoid	3-Keto	(比E/A)	Kierによる 比
1	50	Cancer	1227.3	195.1	6.29	3.80
2	54	"	2343.8	393.9	5.95	4.61
3	76	"	1331.3	277.9	4.79	3.84
4	35	"	664.3	156.3	4.25	3.39
5	59	"	234.0	85.1	2.75	3.66
6	30	"	171.1	81.9	2.09	3.41
7	56	"	1591.3	824.5	1.93	4.03
8	40	"	152.2	45.6	3.34	3.41
9	41	"	420.0	84.0	5.00	2.94
10	64	"	286.0	126.0	2.27	4.61
平 均					3.87	3.77

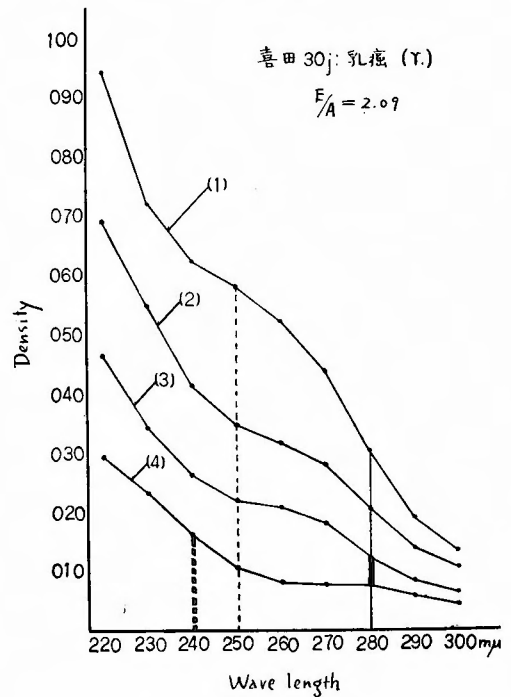
第 14 図



その差はないが、マストバチーの E/A の平均値 5.11 に比較すると低い値を示している。

又乳癌の各例の E/A もマストバチー程ではないが、Kier の測定法によるものよりも分布の中が大きくなっている (第16図)。

第 15 図



次に乳癌患者における健常部の乳腺 4 例についてみると E/A の平均値は 2.50 で、乳癌の E/A の平均値 3.87 に比べて低い値を示しているが、各例についてみると 2 例は乳癌の E/A の平均値と殆ど変わらず、他の 2 例が低い値を示している (第 6 表)。

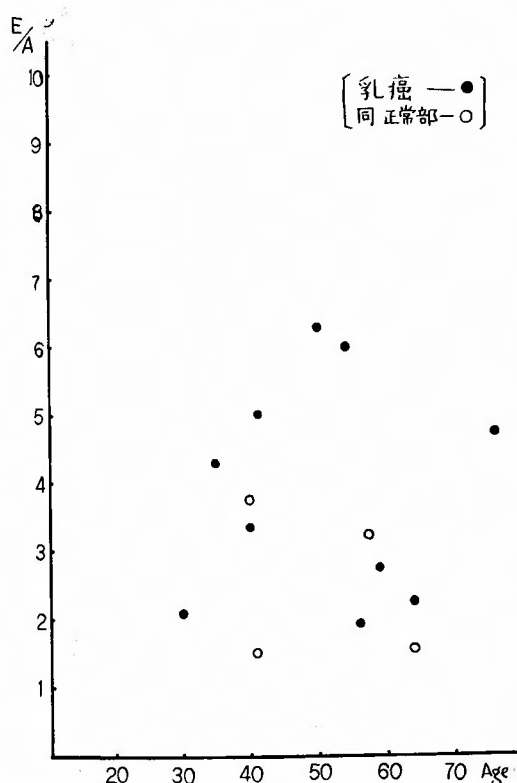
4. ギネコマスチー患者

第 1 例 23 J, 真性半陰陽では E/A は 3.25 で高い値を示している。

第 6 表

乳 癌 健 常 部			γ/Gm 乾燥重量			
患 者	年 令	病 名	Benrenoid	3-Keto	比 (E/A)	Kier による 比
8	40		320.0	86.0	3.72	3.25
9	41		84.0	54.2	1.55	3.07
10	64		106.0	70.0	1.51	3.12
11	57		251.5	78.3	3.21	3.07
		平 均			2.50	3.13

第 16 図



第2例20 J, Gynecomastie mit micropenisでは E/A の値は1.74と正常範囲の値を示している。

次に他の組織については、これは乳腺の場合と比較することは出来ないが、われわれの測定法を用いて測定したところ、乳癌患者の大胸筋において E/A の値が 2.0, 2.3 と同じ程度で低値を示しているのである。

第3章 総括及び考察

乳腺腫瘍成立が脳下垂体-性腺系ホルモンのアンバランスにより、乳腺中の末梢細乳管のような性ホルモンの感受性の高い乳管が異常に反応し、これらが繰返

されて腫瘍性変化を起すのであろうという事は、動物実験の結果又は乳腺腫瘍患者の尿中性ホルモンの測定等によつて、ある程度裏付けられているのである。

しかし乳腺組織中の性ホルモンの状態についての報告はまことに少ない。

臨床的に尿は採取が容易であり、又連続測定も可能で、月経との関係も逐日的に知りうるのであるが、尿中性ホルモンは体内の性ホルモンの代謝終産物であり、更にこれらの分画を行つても決して組織中のホルモンの状態をそのまま示しているものではない。

而も組織中の性ホルモン測定は微量でその絶対値を求める事は極めて困難であり、又尿の場合のように連続測定によつて性周期による変動も殆ど検査し得ないのである。

Kier の測定法は比較的簡便で臨床上用いうる方法であるが、われわれがこの方法の抽出、測定について全条件を検討した上での測定結果は、Kier の報告とは必ずしも一致せず、健常者、マストバチー患者との間に Kier が示したほどの差は認められなかつた。そこでわれわれはこの方法の利点を捨てる事なく、先づ benzenoid steroid と 3-ketosteroid を分離する事を考え、イオン交換樹脂を使用してこれらを分離しうる事を発見した。この方法は従来のアルカリによる化学的分離に比べて非常に優れている事は両操作を行つたものについて紫外部吸収曲線を比較した場合に明瞭である。

benzenoid steroid が Amberlite IRA 400 (OH 型) に吸着される事実から、更に他のイオン交換樹脂に対する steroid hormone の態度を検索し、Amberlite IR 120 (H 型)、Dowex 3 (OH 型) の樹脂には pH 7 で両 steroid 共に吸着されない事を確認した。Kier は組織中の全 steroid を抽出するため抽出溶媒として、エーテル、アルコール、アセトンを用いた。これは抽出溶媒にエーテルのみを用いた場合に比べると、アルコールを無水にしても不純物も含めて比較的 hydrophilic な物質もある程度同時に抽出されると考

えてよい。事実われわれが組織を生のも、で抽出した場合、抽出物中の不純物ははるかに増大する。現在われわれは組織中の遊離型 steroid のみを対象としており、乾燥組織より前記3溶媒にて抽出した場合でも、Amberlite IR 120 (H型), Dowex 3 (OH型) に吸着される物質即ち不純物と考えられるものは全例において決して等量ではない(第12図, 第13図, 第15図)。

以上の検討の結果より、われわれが臨床的に用いる方法として、Kier の測定法によつて benzenoid steroid の量とした 280m μ における吸光度の内から3つの樹脂のカラムを通す事により出来得る限り不純物による吸収を除こうとしたのである。これは 3-keto steroid についても同様であつて、その不純物の量はわれわれの測定法によつて得た benzenoid steroid 及び 3-ketosteroid の量の2倍から数倍に達するものが多かつたのである。

近時クロマトグラフィー法の導入により数多くの steroid hormone が分画分離せられつゝあるとはいえ、われわれが採取し、ホルモン含有量を知りたいと思う組織の量はなお少量で、その定量は容易ではない。そこで Kier の述べた不純物はすべての乳腺に等量に含まれるという仮定は、われわれの行なつたイオン交換樹脂吸着法による抽出物の精製の上で適用すればより合理的であると考えるのである。

測定成績についてみると、正常例は例数が少ないとはいえ、Kier の測定法による E/A の平均値はマストバチーのそれに比べ差が少ないのにも拘わらず、われわれの測定法によつたものはあきらかに低値を示し、マストバチーにおいては高値となり、相対的 estrogen 過剰の状態にあるといふのである。併し詳細に各例について検討すると、E/A の比が正常範囲のものもあり、これは伊勢田、西谷らが尿中の estrogen/17KS について報告した成績とよく似た傾向を認めるのである。又乳癌においては E/A の平均値がマストバチー患者程増加は認められず、この点も尿中性ホルモン測定値の成績と軌を一にしているのである。

結 論

1. Kier の測定法を検討し、不純物の問題になお改良の余地がある事を認めた。

2. クロマトグラフィー法を paper 型と column 型について検討し、乳腺組織抽出物についてこれらを用いた場合、困難な問題が多かつた。

3. イオン交換樹脂に対する steroid hormone の

態度を検討し、benzenoid steroid は Amberlite IR 120(H型), Dowex 3 (OH型) には pH 7 で吸着されず、Amberlite IRA 400 (OH型) に吸着され、3-ketosteroid はすべての樹脂に吸着されない事を認めた。

4. イオン交換樹脂吸着法を応用して極めて少量の試料で組織中の性ホルモンの状態をうかがう方法を考案した。

5. 健常乳腺、マストバチー、乳癌、ギネコマスチーの乳腺において、われわれの改良した測定法と、Kier の測定法を同時に行ひ比較検討し、マストバチーにおいては正常例に比べて相対的 estrogen 過剰な状態にあるものが多かつたが、数例は正常範囲にあつた。

乳癌においては E/A の比がマストバチー程増加は認められず、これらの成績は尿中性ホルモン測定成績とよく似た傾向を認めたのである。

本研究に際し終始教示を賜つた増田強三講師に深謝する。

REFERENCES

- 1) Axelrod L.R. and Zaffaroni A.: The Extraction of Corticosteroids from blood and tissues by Dialysis. Archives of Biochem. and Biophysics, **50**, 347, 1954
- 2) Axelrod, L.R.: The quantitative separation of Estrogens by Paper Partition Chromatography. J. Biol. Chem., **201**, 59, 1953
- 3) Bauld, W.S.: Separation of Oestrogens in Urinary Extracts by Partition Chromatography. Biochem. J. **59**, 294, 1955
- 4) Beatson, G.I.: On the Treatment of Inoperable Cases of Carcinoma of the Mamma. Lancet, **2**, 104, 162, 1896
- 5) Bergström, S. and Hansson, G.: Use of Amberlite IRC-50 for the Purification of Adrenaline and Histamin. Acta Physiol. Scand., **22**, 87, 1951
- 6) Bitman, J. and J. F. Sykes.: Chromatographic Separation of Estrone, Estradiol, and Estrinol. Science, **117**, 356, 1953
- 7) Braunsberg, H., Stern, M.I. and Swyer, G.I.M.: The Separation of Estrone, Estradiol, and Estrinol by Partition Chromatography. J. Endocrinol., **11**, 189, 1954
- 8) Burton R.B., Zaffaroni A., Keutmann E. H.: Paper Chromatography of Steroids. J. Biol. Chem., **188**, 763, 1951

- 9) Bush I.E.: Methods of Paper Chromatography of Steroids Applicable to the Study of Steroids in Mammalian blood and Tissues. *Biochem. J.*, **50**, 370, 1952
- 10) Carol, J. et al.: The Preparation of β -dihydroequilin. *J. Biol. Chem.*, **185**, 267, 1950
- 11) Diezfalnsy E. and Lindkrist P.: Isolation and Estimation of free Estrogens in Human Placentas. *Acta Endocrinol.*, **22**, 203, 1956
- 12) Dixon, H. B. F., Moore, S., Stack-Dunne, M. P., Young, F. G.: Chromatography of Adrenotropic Hormone on Ion-exchange Columns. *Nature*, **168**, 1044, 1951
- 13) Friedgood, H. B.: The Identification and Quantitative Micro-determination of Estrogens by Ultraviolet Absorption Spectrophotometry. *J. Biol. Chem.*, **174**, 523, 1948
- 14) Geschickter C.F.: Disease of the Breast. 2nd Ed. Lippincott, Philadelphia, 1948
- 15) Geschickter, C.F.: Estrogenic mammary cancer in the Rat. *Radiology*, **33**, 439, 1939
- 16) Geschickter, C. F.: Breast Pathology in Relation to Endocrine Disorders. The *Cyclopedia of Medicine*. Philadelphia. 1939, F.A. Davis Co. p. 543
- 17) Haneda, Y.: Experimental Studies on the Relationship between the Mammary Tumors and the Anterior Lobe of the Pituitary Gland. *Arch. Jap. Chir.*, **28**, 721, 1959
- 18) Heftmann, E.: Identification of Estrogens by Paper Chromatography. *Science*, **111**, 571, 1950
- 19) 日置陸奥夫: 尿中 Estrogen 測定法, ホルモン化学定検査法, **152**, 1956
- 20) Iseda, Y.: Endocrinological Studies on Neoplastic Disease of the Breast in the Light of the Excretion of Urinary 17 Ketosteroids. *Arch. Jap. Chir.*, **25**, 443, 1956
- 21) Katzman, P. A. et al: The Preparation of Chorionic Gonadotropin by Chromatographic Adsorption. *J.B.C.*, **148**, 501, 1943
- 22) Kier, L.C. et al: Endocrine Relationships in Benign Lesion of the Breast. *Ann. Surg.*, **135**, 6, 1952
- 23) Kochakian, C.: Paper Chromatography of C_{19} Steroids. *J. Biol. Chem.*, **199**, 607, 1952
- 24) Koshi T.: Experimental Studies on the Histogenesis of Mammary Tumors and Sexual Hormones. *Archiv. Jap. Chir.*, **27**, 323, 1958
- 25) Leading Articles: Hormone Treatment of Breast Cancer. *Brit. Med. J.*, **4871**, 1137, 1954
- 26) Lederer, E, Lederer, M.: *Chromatography*, 1957
- 27) Lewis, D. and Geschickter, C.F.: Gynecomastia, Virginal Hypertrophy and Fibroadenoma of the Breast. *Ann. Surg.*, **100**, 779, 1934
- 28) Lewis D. and Geschickter, C. F.: The Relation of Chronic Cystic Mastitis to Carcinoma of Breast. *Surg. Gynec. and Obst.*, **66**, 300, 1938
- 29) Li, C.H., Ash, L., Popkoff, H.: Purification of Adrenocorticotrophic Peptides by Carrier Displacement Chromatography. *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1923, 1952
- 30) Marrian, G.F. et al: The Isolation of a Ketonic Dihydroxy Kober Chromogen from the Urine of Pregnant Women. *Biochem. J.*, **65**, 12, 1957
- 31) 増田強三: 乳癌, マストパチーの形態発生, 外科研究の進歩 7 集, 31, 1958
- 32) 強田強三: 乳腺腫瘍の形態発生と内分泌, 臨床外科, **12**, 885, 1957
- 33) 増田強三: 乳腺腫瘍と性ホルモン, 日本臨床, **14**, 1522, 1956
- 34) 増田強三: Mastopathie 内分泌のつどい, 8 集 346, 1956
- 35) 増田強三: 乳腺腫瘍と卵巣, 副腎皮質の関係, 癌の臨床, **2**, 459, 1956
- 36) 増田強三: マストパチーと性ホルモン, 診療, **6**, 891, 1953
- 37) McKinley W. D.: Paper Electrophoresis of Steroid Derivatives. *Science*, **121**, 139, 1955
- 38) Mitchell, F.L. and R.E. Davies: The Isolation and Estimation of the Steroid Oestrogens in Placental Tissue. *Biochem. J.*, **56**, 690, 1954
- 39) Moszkowicz, L.: Sexualzyklus, Mastopathie und Geschwulstwachstum der Mamma. *Arch. f. Klin. Chir.*, **144**, 138, 1927
- 40) Moszkowicz, L.: Mastopathie der mannlichen Brustdruse. *Arch. f. Klin. Chir.*, **148**, 553, 1927
- 41) Nishiya, K.: Endocrinological Studies on Neoplastic Disease of the Breast in the light of the Excretion of Urinary Estrogens. *Arch. Jap. Chir.*, **26**, 249, 1957

- 42) Nyc, J.E. et al: Chromatographic Separation of Estrone, Estradiol, and Estriol. *Prcc. Soc. Ex. Biol. Med.*, **77**, 466, 1951
- 43) Pearlman W.H. and Cerceo E.: The Isolation of C₂₁ Steroids from Human Placenta. *J. Biol. Chem.*, **194**, 807, 1952
- 44) Pearlman W.H. and Cerceo E.: The Estimation of Saturated and Unsaturated Ketonic Compounds in Placental Extracts. *J. Biol. Chem.*, **203**, 127, 1953
- 45) Pearlman W.H. and Cerceo E.: The Isolation of Progesterone from Human Placenta. *J. Biol. Chem.*, **198**, 79, 1952
- 46) Pincus G.: *Prog. Hormone. Rec.*, No. **9**, 22, 1954
- 47) Pullinger B.D.: Cystic Disease of the Breast (Human and Experimental). *Lancet*, **6477**, 567, 1947
- 48) Roberts S. and Szego C.M.: Biochemistry of the Steroid Hormones. *Annual R. of Bioch.*, **24**, 543, 1955
- 49) Rubin, B.L.: A Method for the Quantitative Analysis of 17-Ketosteroid Mixtures. *J. Biol. Chem.*, **203**, 629, 1953
- 50) Samuels L.T. and Reich H.: The Chemistry and Metabolism of the Steroids. *Annual Review of Biochem.*, **21**, 129, 1952
- 51) Samuels, L.T.: Determination of Testosterone and Related Steroids in Tissue Extracts. *J. Biol. Chem.*, **168**, 471, 1949
- 52) Samuelson, O.: Ion Exchangers in Analytical Chemistry. 1953
- 53) Savard, K.: Paper Partition Chromatography of C₁₉- and C₂₁ Keto Steroids. *J. Biol. Chem.*, **202**, 457, 1953
- 54) 沢田彰: 乳腺腫瘍の内分泌学的研究, 日, 外, 会誌, **56**, 1233, 1955
- 55) Schinzinger, A.: Ueber Carzinoma Mammar. *Zentral bl.*, **16**, 55, 1889
- 56) Seki T.: Chromatographic Separation of Estriol, Estrone, and Estradiol-17 β . *Nature*, **181**, 768, 1958
- 57) Selye, H.: *Textbook of Endocrinology*. Acta Endocrinol., Inc. Montreal, 1949
- 58) Stern, M.I. and G.I.M. Swyer: Separation of Urinary Estrogens by Micropartition Chromatography. *Nature*, **169**, 796, 1952
- 59) Stimmel, B.F.: A Quantitative Study of the Adsorption of Estrone, Estriol, and α -Estradiol on a Chromatographic-column. *J. Biol. Chem.*, **153**, 327, 1944
- 60) Stimmel, B.F.: The Fractionation and Photometric Estimation of the Estrogens in Human Pregnancy Urine. *J. Biol. Chem.*, **162**, 99, 1946
- 61) Takuma, K.: Histological Studies on the Relation of the Adrenal Glands and Ovaries to the Neoplastic Diseases of the Breast. *Arch. Jap. Chir.*, **27**, 650, 1958
- 62) Taylor H.C.: The Relation of Chronic Mastitis to Certain Hormones of the Ovary and Pituitary and to Coincident Gynecological Lesions. *Sur. Gynec. and Obst.*, **62**, 3, 1936
- 63) Taylor, H.C.: The Endocrine Aspects of Chronic Mastitis. *Surg. Gynec. and Obst.*, **74**, 2A, 1942
- 64) 徳山英太郎: 乳腺腫瘍組織中の性ホルモンの変化, 日内分泌会誌, **31**, 170, 1955
- 65) Weiss, D. E.: A Novel method of using Ion-exchange Resins. *Nature*, **166**, 66, 1950
- 66) West C.D.: The Metabolism of Intravenous Testosterone by Experimental Animals. *Endocrinology*, **49**, 467, 1951
- 67) White, W., Pierce, N.: Studies on Pituitary Adrenocorticotropin III. Differentiation of Three Active Types on XE-97 Resin. *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 245, 1953
- 68) Zaffaroni A., Burton R.B., and Keutmann E.H.: The Application of Paper partition Chromatography to Steroid Analysis. *J. Biol. Chem.*, **177**, 109, 1949