

尿中下垂体性性腺刺激ホルモンの定量に関する研究

帝国臓器製薬 研究部 (新延信吉部長)
(指導 松島早苗主任研究員 西村隆一横大講師)
出 口 雅 三

Study on the Assay of Pituitary Gonadotropin in Human Urine

Masazo DEGUCHI

(Research Laboratory, Teikoku Hormone Mfg. Co., Ltd.)

Since the quantitative analysis of the pituitary gonadotropin in human urine revealed to be applicable for clinical diagnosis, various methods to measure urinary gonadotropin have been presented. However these methods have some faults in troublesome experimental manipulations, considerable loss in the process of extraction or toxicity of the final products.

The present study was performed to find a simple and reliable method for clinical use, and the following results were obtained.

1. Kaolin adsorption, because of its reliability and practicability, is a method of choice for extraction of gonadotropin from urine.

2. But, even in this method, there are some faults that procedure is rather complicated and the yield of gonadotropin is influenced to some extent by the quality of kaolin.

3. The process of extraction has become simple by use of crude kaolin. There is no substantial difference in extraction, be the kaolin crude or purified.

4. Synthetic weak alkaline ion exchanger resin which is of more uniform quality comparing to kaolin, are recommended for extraction.

5. Various methods for measuring activity of thus extracted gonadotropin were studied, and it was concluded that the best assay method for FSH, ICSH and total gonadotropin are respectively as follows : to weigh the increase of the ovarian weight of the intact immature mouse treated with HCG, to measure the enlargement of the prostate and seminal vesicles of the hypophysectomized immature rats, and to calculate the increase of the uterine weight of the intact mouse.

6. Prolactin in the urine was extracted by the alcohol precipitating method and assayed with pigeon's crop gland method.

It was observed that in the antiandrogenic therapy for the prostatic cancer, there might exist correlation between prolactin output and effectiveness of the treatment. More basic researches would be necessary in order to complete the method of quantitative analysis of prolactin.

目 次

I 緒論

II 尿中Gの分離法

i) 各種G抽出法の比較検討

ii) カオリン吸着法の改良

1) 採尿量及び使用尿量

2) 尿中Gの安定性

3) 吸着の条件

a) 吸着時の pH

b) カオリンの型状

- c) カオリンの品種
- 4) カオリンよりG溶出の条件
- 5) 溶出液よりGの沈澱
 - a) アルコール添加時の pH
 - b) アルコール添加時の液の pH
 - c) アルコールの添加量と収率
- 6) 混入する不純物
 - a) Endogeneous-E
 - b) Exogeneous-E
 - c) 乳汁分泌ホルモン
- 7) 小括
- iii) カオリン吸着法の手順
- iv) イオン交換樹脂吸着法
 - 1) G吸着時の pH
 - 2) イオン交換樹脂の必要量
 - 3) イオン交換樹脂よりGの溶出
 - 4) カオリン吸着法との比較
 - 5) イオン交換樹脂の前処理
 - 6) 小括
- Gの生物学的検定法
 - i) FSH, ICSH の定量
 - 1) マウス卵巢重量増加による方法
 - 2) 脳下垂体摘出雄ラットの前立腺、及び精囊重量による方法
 - 3) マウス卵巢の充血による方法
 - 4) 正常幼若雌ラットの副性器重量増加による方法
 - 5) 小括並びに考察
 - ii) Total G の定量
 - 1) マウス子宮重量法
 - 2) ラット卵巢重量法
 - 3) 兎の排卵による方法
 - 4) 小括
 - IV) 尿中 Prolactin の定量
 - V) 結論

I 緒 論

妊娠婦人尿中に大量の性腺刺激ホルモン（以下Gと略称する）が含有されることは、1927年¹⁾に既に報告されているが、1930年 Zondek²⁾が更年期後の婦人尿中にGを発見し、以後正常の男子及び女子の尿中にも少量ではあるがGが含有されることが認められるに至つた。その後の研究の結果、これ等のGは、妊婦尿中のGが胎盤を分泌源とするのに対して、脳下垂体より

分泌されるものであることがわかつた。尿中の脳下垂体性Gは量的に極めて僅少である為に最近に至る迄化学的、或いは生物学的面では見るべき研究の進展がなかつたが、脳下垂体はGを分泌し、性腺の発達と、これに伴う性ホルモンの分泌を促進する機能を持つ反面、性ホルモンにより脳下垂体のG分泌は調整を受けていることが明らかにされた。従つて例えば、睪丸を摘除した場合、脳下垂体は男性ホルモンによるG分泌の抑制が解かれるために大量のGを分泌するに至り、従つて尿中にGの過剰排泄が起る。性腺自体に起因する一次性性腺機能障害の場合にも同様に尿中に大量のGの排泄を見る場合が多い。これに反して脳下垂体機能の障害によりそのG分泌が減退し、二次的に性腺の機能不全を招来する場合は、尿中へのG排泄量は減少する。このように尿中のG量が、性腺及び脳下垂体の機能を反映することは、臨床家の注目を引き、基礎的研究に先行して臨床的応用の研究が進み、特に泌尿器科領域では、男子性腺機能不全症の正しい診断の為の一手段として、睪丸の組織学的所見、睪丸機能に由来する精液の検査、及び睪丸より分泌されるホルモン、及びその代謝産物の定量と並んで尿中Gの定量が広く試みられるようになった。しかし性腺のホルモン分泌、及び性ホルモンの脳下垂体G分泌調整の機構に関しては完全な解明が行なわれたわけではない。例えば男性ホルモンのG抑制作用が比較的弱いことから、男性に於てGの分泌調整に主役を演ずるのは男性ホルモンではなく、睪丸より分泌される発情ホルモンであろうと考えられ、その分泌源については、精細管上皮のSertoli 氏細胞であろうとする説^{3) 4) 5)}が有力であるが Maddock 等⁶⁾は Leydig 氏間質細胞説を提唱している。

又最近では各種ステロイドホルモンの臨床的使用が盛になり、その使用量も増大しているが、この場合脳下垂体の受ける影響も見のがすことのできない問題である。逆に性ホルモンの脳下垂体機能抑制効果、或いは抑制後の所謂ハネカエリ現象を積極的に利用しようとする種々の治療法も試みられている。これ等いずれの場

合に於ても尿中Gの測定は、脳下垂体のG分泌機能を推定するための主要な手段であり、その価値は大きく評価されなければならない。長田⁷⁾が初老期の性腺障害に於ける男性ホルモン治療の場合、使用すべき男性ホルモンの適正量を尿中Gの測定より決定したこともその一例である。このような趨勢を反映して極めて多数の尿中G測定法が考案され改良されて来たが、何れもいくつかの欠陥を持つている。特に尿中のG量が僅少であるために検定にあたって先ず尿中よりGを分離、精製することが必要であること、及びGが蛋白質ホルモンであるために、分離されたGの定量は生物学的定量法によらざるを得ない事は、臨床の利用に当ってこれ等操作の煩雑さが多いの障害を及ぼしている。著者は特にこの点に留意し、できる限り方法を簡略化することを主眼として各種の方法を比較検討し、一つの検定法を立案した。以下その手順を詳細に記述すると同時に結論に至る過程について報告する。

Ⅱ 尿中Gの分離法

尿中Gの定量法は、二つのステップに分離して考察することができる。第一は尿中よりGを分離、精製する段階であり、第二は分離されたGを測定する過程である。以上二つの過程については、それぞれ極めて多数の報告があるが、先ず分離、精製の方法としては最も古くから用いられている方法に、アルコール沈澱法がある。この方法は Zondek²⁾ が初めて尿中にGを発見した際に用いられ、その後多くの研究者⁸⁾⁹⁾ により種々改良が加えられたものであるが、その要点は弱酸性として沝過した尿に4倍前後のアルコールを添加し、Gを沈澱させる方法である。しかしこの方法では大量のアルコールを消費し、又アルコール不溶性の他の物質をも同時に大量に沈澱させるので得られるGは極めて不純であり、このため次の段階で生物学的試験を行うに当って毒性が強く、定量が不能となる場合を生ずる。Heller 等¹⁰⁾ はこの点に対してアルコールによる沈澱物を再び水に溶解して透析することにより、低分子の夾雑物を除去し毒性を減ずることができた。しかしこの方法による場合は、透析中に有効成分の損失するおそれがあり、松島¹¹⁾ は、この点を考慮した改良法を発表した。以上のような改良により、アルコール沈澱法の毒性に関する欠点は排除できたが、アルコ

ールの消費量については改善することができなかった。アルコールの代りにアセトンを用いても殆んど同様に処理を行うこともできるが¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、大量の溶媒を用いることに変わりはなく、大きな改良とはならなかった。アルコール法、或はアセトン法は安全確実である点でひとつの標準的方法であるとは考えられるが、大量の溶媒を消費することは、経済的 面でも routine な臨床的手段としては難点がある。そこでこれに代る種々の方法が考案され試みられている。即ちタンニン酸¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾ 又は タングステン酸¹⁷⁾¹⁸⁾ 等蛋白沈澱試薬によりGを沈澱分離する方法、安息香酸¹⁹⁾ カオリン²⁰⁾ ²¹⁾²²⁾²³⁾ 水酸化アルミニウム²⁴⁾ 等吸着剤を用いてGを吸着分離する方法、その他塩析による方法²⁵⁾ 限外沝過を用いる方法²⁶⁾²⁷⁾ 等である。これ等の優劣に関しては一定の見解がなく、例えばアルコール法を提唱する Heller 等¹⁰⁾ がタンニン酸法に比し、アルコール法が優れていると報告しているのに対して、タンニン酸法を推奨する Levin は全く逆の結果を発表している¹⁶⁾。そこで著者は先ずこれ等の諸方法について比較検討を行つた。この場合、比較の基準として次の4点を考えた。

(i) 操作が容易であり特殊な装置、専門的な化学的技術を必要としないこと。

(ii) Gの収量がよいこと。

(iv) 生物学的試験の障害となる毒性が除去できること。

(v) 費用がかからぬこと。

本研究は routine な臨床の利用を可能にすることを主眼としたので、(i)及び(v)の点に特に留意した。

i) 各種G抽出法の比較検討

先ず(i)項に関して考察した結果、限外沝過法は特殊な装置を必要とし、タンニン酸法、タングステン酸法による場合は共に抽出物が不純であり、毒性の点でそのままでは不適であるが、これを更に精製純化するためには煩雑な化学的操作を必要とし、これも(i)項の条件を充たさなかつた。又硫酸を用いる塩析法では、得られたGに硫酸が混入し、その除去のために透析が必要であり、又この間に液量が増加するので再びアルコール法、その他により濃縮を行う必要を生じ煩雑さを免れなかつた。以上の理由によりアルコール法、又はアセトン法に代り得る方法があるとすれば残る吸着剤を用いる諸方法以外には考えられなかつた。そこでこれらにつき、次に示す方法により(ii)項の収率比較を試みた。尚尿中よりのGの回収率を測定する場合、比較的大量、且既知量のGを尿に溶解し、この尿より各種の方法でGを抽出、測定し、予じめ加えたG量との

比較によつて報告²³⁾もあるが、著者はこのような方法による場合、G量は自然の状態に比し、高濃度であり、又一度分離、乾燥されたGが自然の場合と必ずしも同一の化学的性質であるか否かは問題であり、収率比較の方法として疑問が持たれたので、比較的確実にGを分離できると考えられるアルコール法を標準とし、これとの比較による間接的な方法により収率の比較を行つた。

a) 方法

試料は男子尿、婦人尿、更年期婦人尿を用い、夫々

を数等分して各々アルコール法、アセトン法、及び各種の吸着法によりGの抽出を行つた。アルコール法は、松島の方法¹¹⁾カオリン吸着法、水酸化アルミニウム吸着法、安息香酸吸着法は、夫々 Bradbury等²⁰⁾ Malburg 等²⁴⁾及び Katzman 等¹⁹⁾の方法に従つた。収率の比較は後述するマウス子宮重量法により各Gフラクションの効力を検定し最小有効量を原尿に換算して行つた。

b) 実験成績

収率比較の一例は、第1表に示す通りであるが、ア

第1表 収率比較の一例

抽出法 投与量cc (原尿換算量)	アルコール沈澱法			アセトン沈澱法			カオリン吸着法		
	子宮重量 _{mg}	判定	反 応 率	子宮重量 _{mg}	判定	反応率	子宮重量 _{mg}	判定	反応率
40							45	+	5/5
							41	+	
							51	+	
							47	+	
							40	+	
20	30	+	5/5	36	+	5/5	52	+	5/5
	29	+		26	+		33	+	
	20	+		23	+		56	+	
	26	+		51	+		36	+	
	30	+		27	+		29	+	
10	23	+	3/5	13	—	0/5	25	+	1/5
	20	+		12	—		17	—	
	32	+		18	—		17	—	
	11	—		12	—		11	—	
	18	—		13	—		13	—	
5	8	—	0/5	8	—	0/5	5	—	0/5
	7	—		12	—		7	—	
	8	—		7	—		7	—	
	8	—		10	—		8	—	
	7	—		8	—		6	—	
2, 5	10	—	0/5	7	—	0/5			
	6	—		7	—				
	6	—		9	—				
	8	—		10	—				
	9	—		9	—				
推 定 効 力 1 単 位 =	10cc			20cc			20cc		

試料は更年期後婦人尿

検定はマウス子宮重量法

判定は子宮重量が 20mg 以上となつた場合を+とし、単位の推定は一群の動物の50%以上が反応+を示す最小量を1単位とした。

第2表 各種抽出法の収率比較

実験番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
原料 方法		正常男子尿				去勢男子			正常婦人尿		更年期後婦人尿			
アルコール沈澱法		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	※ ₁	※ ₁
アセトン沈澱法		100									50	100		
カオリン吸着法	吸着剤※ ₂ A ₁	50							50		50			
	A ₂								25		50			
	B ₁	100				100						100		
	A ₃		100			50							100	
	B ₂			100			200							
水酸化アルミニウム 吸着法		25				50								
安息香酸 吸着法						25 以下							25 以下	

収率はアルコール法を100とした場合の他の方法の比較値

※₁ 透析を行わず

※₂ カオリンの製造メーカー及び製造ロットの別

アルコール沈澱法による収率を100とし、その他の方法の収率を一括して表示すれば第2表の如くなる。即ちカオリン法は、アルコール法に比して25%~100%の収率を示し、これに対して水酸化アルミニウム吸着法、安息香酸吸着法は夫々25%~50%、及び25%以下となつた。

c) 考察

カオリン吸着法の場合比較的低収率の例が初期の実験に多かつたことは、この方法に対する習熟の程度の問題もあると考えられる。水酸化アルミニウム吸着法は、カオリンが天然物であり、品質が一定しない欠点を考慮し、これを合成により作製し得る水酸化アルミニウムに置き換えた方法であるが、実験の結果はカオリンに比し、50%程度の収率しか得られなかつたのみならず水酸化アルミニウム法により得られるGは、カオリン法に比し、低純度であつた。カオリンの品質による収率の差については、後に詳細な実験を試

み、収率の悪い品種に遭遇する確率は極めて少ないことを認めた。

d) 小括

(1) 収率の点で最も安心して利用し得る方法は、アルコール法であるが、この方法には大量のアルコールを消費する欠点がある。

(2) アルコール法に代り得る方法としては、第一にカオリン吸着法をあげることができる。

ii) カオリン吸着法の改良

カオリン吸着法は元来 Scott 等²⁸⁾ が、妊婦尿中より胎盤性Gの分離法として発表したものであるが、Bradbury 等²⁹⁾により尿中の脳下垂体性Gの分離に利用され、好結果を見た方法である。Bradbury の報告は1947年であるが最近に至り急速な普及を見ると同時に多くの研究者により追試が行われ、Loraine 等²¹⁾ 及び Albert 等²³⁾ によつて改良法が発表されている。カオリン吸着法は、経費がかからないこと、比較的高純度

であり、従つて毒性の少ない抽出物が得られる利点があるが、反面操作が少々煩雑であり、又カオリンが天然物であることから、その品質が一定しないのではないかという惧れが持たれている。著者はこの二つの欠点に対応して種々の実験を試み一つの改良法に到達したのでその手順、及び改良の根拠について報告する。尚Gの定量は後述する如く生物学的方法によることとしたので、これを前提としてGの分離法について検討した。

(1) 採尿量及び使用尿量

尿中G量は1日尿に換算して表現されるのが普通であるので著者もこれに従つた。したがつて少なくとも全尿を採取してその容量を測定することが必要である。実際検定に使用する尿量は次に検定に使用する動物数と関連があり、多ければ多い程検定結果の信頼度は高くなるが、著者は実際上の諸条件を考慮して原則として1日尿全量を使用することとした。

(2) 尿中Gの安定性

Gは一種の蛋白質であり、酵素の分解作用により効力を失うから尿の腐敗を防止することは絶対に必要である。しかし腐敗しなくても長時間水に溶解した状態に放置すると、Gは変性を起し、同様に生物学的活性が失われる。この変性の速度は一般に温度の上昇と共に増大することが予想される。尿の室温、及び冷所に於ける保存時間とGの効力について実験を試みた結果は次の通りである。

〔方法〕 正常男子尿1ℓにつき5ccのトルオールを加えて防腐の処置を行つた後、約25°Cの室温、及び10°C以下の冷蔵庫内に尿を保存し、3日、1週間、2週間後に各々一部を取り出しカオリン吸着法によりGを抽出し、マウス子宮重量法により検定を行つた。その結果より単位容量当りの効力を、採尿直後のそれと比較した。

〔実験成績〕 第3表に示す結果が得られた。常温では3日後にすでに効力の低下が認められた。従つて尿の保存は冷蔵庫中に置かなければならないが、この場合も保存しうる限度は、1週間と考えられる。又たと

第3表 尿中Gの安定性

放置条件	直後	3日後	1週間後	2週間後
冷蔵庫10°C以下	1	1	1	1/2
室温 約25°C	1	1/2	1/4	

数値は直後の効力を1とした場合の各期間の効力

え効力の損失がなくても長期保存した尿は、汙過の際除去し難い沈澱を生ずる場合があり、その後の操作を甚だしく阻害する。

(3) 吸着の条件

a) 吸着時の pH

Gをカオリンに吸着する場合の尿のpHについてLoraineは極めて厳密な要求をしている。即ちpH 4.0で吸着率は最大であるが、これより上下することにより著るしく吸着率が低下し、例えばpH 4.5, pH 3.5では約60%, pH 5.0では50%になると報告している。これに対してAlbertはpH 3.5, pH 4.0, pH 4.5では差を認めず、pH 5.0以上のアルカリ性の場合に、はじめて収率の低下を認めている。この点について著者の追試の結果は次の如くなつた。

〔方法〕 正常男子尿6ℓ、及び去勢男子尿2.4ℓを夫々3等分しpH 3.5, pH 4.0, pH 4.5として汙過後Bradburyの方法に従い吸着、及び溶出を行い、得られたGフラクションの効力をマウス子宮重量法により推定して収率の比較を行つた。又カオリンを除去した後の尿中に残留するGをアセトン沈澱法により回収し、その効力を測定した。

〔実験成績〕 結果は第4表に示す通りでありpH 3.5, pH 4.0, pH 4.5で吸着を行つたいずれの場合もLoraineの報告する如き収率の差を見出さなかつた。又カオリン吸着後、尿に残るGはカオリンに吸着されたGの1/4~1/8以下であつた。以上の結果からG吸着時の尿のpHはそれ程厳密である事を必要とせず、従つてpHの測定は、メーターによらなくても、pH試験紙による程度で充分であると判定した。尚Albertは、Loraineの報告に対して「Loraineの実験は既知量のGを予め添加した尿を用いて居り、これは自然の状態より遙かに高濃度のGを含有する尿を用いていることになり、これが前記の結果を生じた原因であろう。」という批判を行つている。

b) カオリンの型状

Loraineは、N-塩酸で予め前処理し更にこれを充分水洗した後、水に懸濁したカオリンを用いている。この操作は非常に面倒であり、且長時間を必要とするので著者はこの点の簡易化を試みた。先ず懸濁液を予め大量に調整して置き必要量だけ小分けして使用することを考え、懸濁液の保存期間と、これを用いたときの収量の比較を去勢男子尿について行つた結果、第5表に示す如く殆んど収率に差を認めなかつた。そこで次には塩酸処理を行つたカオリンと、塩酸処理をしないカオリンの懸濁液との比較を試みたがこれも収率の

第4表 カオリン吸着法の検討

1. 吸着時の尿の pH と収率

実験番号			I			II		III		
尿			正常男子尿			正常男子尿		去勢男子尿		
吸着時の pH			3.5	4.0	4.5	4.0	4.5	3.5	4.0	4.5
カオリンに吸着される G	投与量 (原尿換算)	160cc	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4			
		80	4/4	1/4	3/4	3/4	4/4			
		40	0/4	0/4	0/4	2/4	1/4			
		20	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	4/4	4/4	4/4
		10						3/4	3/4	4/4
		5						0/4	0/4	1/4
		2.5						0/4	0/4	0/4
尿中に残る G	投与量 (原尿換算)	320	0/4	0/4	0/4	0/4				
		160	0/4	0/4	0/4	0/4				
		80	0/4	0/4			0/4	0/4	0/4	0/4
		40	0/4	0/4			0/4	0/4	0/4	0/4

第5表 カオリン吸着法の検討

2. カオリン懸濁液調製後の月数と G の収率

カオリン懸濁液の放置期間 投与量 (原尿換算)	新	4 カ月	6 カ月
40cc	4/4	4/4	4/4
20	4/4	3/4	4/4
10	1/4	1/4	0/4
5	0/4	0/4	0/4

去勢男子尿使用

差を見出さなかつた。更に一步を進め、カオリンを懸濁液とすることの必要性を見るために、カオリンを粉末のまま用いた場合と原法通り懸濁液とした場合との比較を行つた結果、第6表の如くやはり差を認めなかつた。即ちカオリンは無処理で、しかも粉末のまま用いることが可能であるとの結論に達した。尚カオリンを粉末のまま用いる実験は Albert,²³⁾ 小野田²⁹⁾ も行つて居りその結論は著者の結果と一致している。更に Albert はカオリンの必要量についても研究して居り、尿 1 l に対して最小 20 g のカオリンが必要である

第6表 カオリン吸着法の検討

3. 精製カオリンと無精製カオリンの収率比較

実験番号	投与量 (原尿換算)	精製カオリン懸濁液	無精製カオリン懸濁液	無精製カオリン粉末
I	40cc	4/4	3/4	4/4
	20	4/4	3/4	3/4
	10	1/4	2/4	1/4
	5	0/4	0/4	0/4
II	40	4/4	4/4	4/4
	20	4/4	4/4	2/4
	10	1/4	1/4	0/4
	5	0/4	1/4	0/4
III	40	4/4		4/4
	20	4/4		4/4
	10	1/4		2/4
	5	0/4		1/4

去勢男子尿使用

と報告しているが、この点については、著者は追求しなかつた。

c) カオリンの品種

過去3年間に於いて著者は5種類のカオリンを使用した。その都度アルコール法と比較検定を行い、その適否を判定した。既に第2表に示した如く、当初の実験では、アルコール法に比し、約25%の収率しか得られなかつた例があつたが、その後のカオリンは、いづれもアルコール法に比し、収率の差がなかつた。カオリンは、天然物であり品種により収率に差が生ずるのではないかということは、一つのカオリン法に対する危惧であるが、上記の結果は使用不適であるような品種にそれ程頻繁に遭遇するものではないことを示し、又カオリンの使用量は少量であるので新しい品種を用いる場合、その都度収率を検したとしてもそれ程大きな労力は必要としないと考えられる。

4) カオリンよりG溶出の条件

カオリンよりGを溶出する溶媒についてはカオリンのGの吸着の場合と同様 Loraine は厳密な pH 調整が必要であると力説している。即ち水酸化ナトリウム液を用いて pH 11.3 とした場合が収率最高であり、その前後ではいづれも収率が低下する。例えば pH 11.0 では、80%、pH 10.5 では50%、pH 10.0 では20%以下に、又 pH 12.0 では約30%であると報告している。著者は Bradbury 等の方法に従い、N-アンモニア水で抽出を行つていたので、Loraine のいう最適抽出溶媒である pH 11.3 の水酸化ナトリウム液との比較を試みた。

〔方法〕 正常男子尿3 l を2分し、カオリン吸着迄の操作は常法により行つた後、溶出を、一方は N-アンモニア水で、他方は pH 11.3 の水酸化ナトリウム液により得られたGフラクションの効力比較を行つた。

〔実験成績〕 第7表に示す如く、収率はむしろ N-アンモニア水の方が良好であつた。尚二つの方法によつて得られるGフラクションの重量の比較を行うと第7表の如くなり、N-アンモニア水による方が遙かに高純度のGが得られることが明らかになつた。N-アンモニア水によつた場合でも、尿が新鮮でなく、既に述べた如き濁りのある場合は、沈澱の重量が多く不純であつた。Loraine は、その方法により得られるGが不純であり、G含有量の少い尿を用いた場合、得られる抽出物が毒性のため、生物学的検定が不能となり、トリカルシウムフォスフェイトを用いる再精製が必要であると述べている³⁰⁾ これに対して著者はN

第7表 カオリン吸着法の検討

4. アンモニア水を用いる溶出と水酸化ナトリウム溶液を用いる溶出との収率比較

実験 番号	溶出に用いた溶媒の種類	収量 (mg/ℓ)	投与量 (原尿換算cc)			
			160	80	40	20
I	アンモニア	12	4/4	4/4	1/4	0/4
	水酸化ナトリウム	97.0	4/4	2/4	0/4	0/4
II	アンモニア	32	4/4	4/4	2/4	0/4
	水酸化ナトリウム	68.0	4/4	4/4	0/4	0/4

正常男子尿使用

-アンモニア水抽出によつた製品を用いて 何等生物学的検定に支障を感じていない。尚 N-アンモニア水の所定量をカオリンに加えた場合の pH の実測値は、11.5前後であり、Loraine の指摘する至適 pH に近い値を示し、アンモニアは弱アルカリである為幾分の濃度の差では、pH がそれ程動かないことを認めた。以上要するにN-アンモニア水により溶出を行つた場合、pH 11.3 の水酸化ナトリウム液による場合に比し収率に差がないのみならず、高純度のGが得られる点を考慮すると前者の方が、優れた溶出溶媒であると結論される。

5) 溶出液よりGの沈澱

a) アルコール添加時の pH

Bradbury は、カオリンよりGを N-アンモニア水で溶出した後、この溶出液を一度 pH 8.5 として遠心分離した後、更に pH 5.5 としてアルコールを加えてGを沈澱させている。先ず問題となるのは、pH 8.5 で一応止める必要の有無である。N-アンモニア溶出液が混濁していることは、前記の通りであるが、この混濁は溶出液の pH を酸性にするにしたがつて、分離し易くなり、その上限が大体 pH 8.5 である。一方混濁中には、カオリンの微粒子が混在することが明らかであり、Gの水溶液にアルコールを加えてGを沈澱させる為には液を酸性にする必要があるが、カオリンは、酸性ではGを吸着することも明らかである。そこで一挙に酸性とするとGが再びカオリンに吸着されるおそれがある。以上の点が Bradbury が一度 pH 8.5 で沈澱を除去した理論的根拠であると考えられるが、著者は簡易化を目的として敢て一挙に pH 5.5 として沈澱の除去を試みた。その結果、収率に影響を及ぼさ

ないことを認めた。又このとき生ずる沈澱を再び N-アンモニア水で溶出し、Bradbury の原法に従つて沈澱を行つたが、殆んど沈澱が得られなかつた。以上の結果から溶出液の pH は、一挙に pH 5.5 として沈澱を除去し、直ちにアルコールを加えることとした。

b) アルコール添加時の液の pH

中和した溶出液にアルコールを添加する場合、pH 試験紙を用いて pH の測定を行う限りに於いて、多少の変動は免かれないので pH の収量に及ぼす影響を次の方法により検した。

〔方法〕男子尿より G を常法により吸着及び溶出し、溶出液を数等分し、夫々を pH 4.0~6.0 の種々の pH として 4 倍のアルコールを添加し、一夜放置後沈澱を遠心分離して乾燥した。

〔実験成績〕 夫々の重量、及び効力は第 8 表の如くなつた。この結果よりアルコール添加時の pH もそれ程厳密であることを必要としないと判定された。

第 8 表 カオリン吸着法の検討

5. アルコール添加時の pH と収率

実験番号	I			II	
pH	4.0	5.0	6.0	4.5	5.5
収量 (mg/原尿 1 ℓ)	18.5	20.0	17.5	28.0	31.5
効力 (muu/原尿 1 ℓ)	16	16	16	8	16

正常男子尿使用

c) アルコールの添加量と収率

カオリン吸着法は、アルコール沈澱法に比し遙かに安い経費で G の分離を行うことができるが、尚尿 1 ℓ に対して約 300cc のアルコールを消費することになるので、できるだけアルコール量を節減する意味で添加するアルコールの量と収率との関係を見た。この為には次の如き実験を行つた。

〔方法〕 常法により G の吸着及び溶出を行い、溶出液の pH を 5.5 として遠心分離した後、その上澄液を 3 等分し、各々にアルコールを 2 倍、3 倍、及び 4 倍添加し、一夜冷蔵庫中に放置した。翌朝沈澱を遠心分離し、これを乾燥すると同時に、上澄液には更に夫々初めの液量の 2 倍、1 倍、及び 1 倍のアルコールを添加し、このとき生ずる沈澱も前回と同様に分離乾燥し秤量を行うと共に効力を測定した。

〔実験成績〕 以上の結果は、第 9 表の如くであり、アルコール 2 倍、及び 3 倍添加では、沈澱量が 4 倍の場合の約 70%、90% となつた。又効力は、2 倍の場合は 25% となつたが、3 倍の場合は、4 倍の場合と差を

第 9 表 カオリン吸着法の検討

6. アルコール添加量と収率

アルコール添加量		2 倍	3 倍	4 倍
収量 (mg/原尿 1 ℓ)		14	18	20
効力 (muu/原尿 1 ℓ)		4	16	16
上澄中に残る G 量	アルコール追加量	2 倍	1 倍	1 倍
	収量 (mg/原尿 1 ℓ)	6.9	2.7	1.5
	効力 (muu/原尿 1 ℓ)	10	2.5 以下	2.5 以下

認めず従つてアルコール 3 倍添加により G は殆んど完全に沈澱し、これ以上のアルコール添加によつて生ずる沈澱は無効物質であるとの結論に達した。この点は、アルコールの追加による沈澱が、2 倍より 4 倍の場合は有効であるのに対して、3 倍より 4 倍では無効であることによつても立証された。尚 4 倍の上澄に更にアルコールを追加しても殆んど沈澱を生じなかつた。もとよりこの沈澱は、無効であつた。以上要するに G を沈澱させる為に必要なアルコールの量は、3 倍以上ということになる。Bradbury 等は、この目的のために 4 倍量の 95% アルコールを用いているが、蛋白質の水溶液にアルコールを加えてこれを沈澱させる場合、主として問題となるのは添加後の最後の濃度である。従つて Bradbury 等が、95% アルコールを用いたことは特に大きな意味は考えられない。ただ使用後のアルコールを回収して用いる場合、100% 迄脱水するのに比して 95% に止めることは非常に容易であるので、この場合は意味があり、又これ以上低濃度のアルコールを用いると同じ最終濃度を得るためには非常に液量が増加するのでこの点からも 95% は適当な濃度と考えられる。尚 4 倍の 95% アルコールを加えた場合、添加後の濃度は 76% となる計算であり、著者の実験に於ける 3 倍量のアルコールを加えた場合に 75% となる点と大体一致し、G を沈澱させるために必要な最小限

のアルコール量と考えられる。Loraine 等、及び Albert 等は共にアルコールの代りにアセトンを用いている。但し Loraine の2倍量に対して、Albert は5倍量を用い、その間に大きな差がある。アセトンがアルコールと同様に用い得ることは先に述べたアセトン沈澱法が、アルコール沈澱法と同等の収量を示す点からも明らかであるが、この場合に於ける必要量については、追試を行わなかつた。

6) 混入する不純物

カオリン吸着法により得られるGフラクションは、他の方法による場合に比して比較的高純度ではあるが、これとても純粋なGではなく相当量の不純物を混入することは明らかである。既に述べた如く著者はGの定量を主としてマウス子宮重量法により行つていたのでGフラクション中に含有され、且この方法による定量に影響を与える可能性のある夾雑物について考察した。先ず考えられるのは、子宮に対して直接作用を有するエストロジェン（以下Eと称する）であるが、更にこれをEndogeneousなEと、ExogeneousなEとに分けて考えた。

a) Endogeneous-E; 尿中のEは、これを定量することが臨床的診断手段としてGの定量と共に屢々利用されるが、Butt 等²¹⁾は、カオリンによりGを吸着した後の尿をEの測定に利用し得るということを報告しているので、著者は本来の目的であるGフラクション中に混入するEの測定を行うと同時にG吸着後尿中に残るEの測定も同時に試みた。

〔方法〕 男子尿中にもEの排泄はあるが、その量が微量であるので、本実験には男子尿の他、E含量の多い卵胞期の婦人尿、及び妊娠婦人尿を用いた。Eの定量はG吸着前後の尿中Eは、Methylation法²²⁾により、又Gフラクション中のEは、塩酸で加水分解後、同様の方法で抽出を行つた後、共にHydroquinone Kober法²³⁾により比色定量を行つた。更に念のため、Gフラクション中の混入するEについては、次の方法による生物学的検定によつてもこれを確認した。即ちカオリン吸着法により卵胞期の婦人尿より抽出したGフラクションを2分し、一方はそのまま、他方は30分間100°Cの温浴上で加熱してGを無効化した後、共にマウス子宮重量法により定量を行つた。若しGフラクション中にEが存在し、これがマウスの子宮に反応する程度の量であればGを加熱無効化した後のGフラクションによつても反応を示す筈である。

〔実験成績〕 先ず化学的測定の結果では、第10表に示す如く、Gフラクション中に殆んどEを認めず、従つてこれを用いて子宮重量法によりGの定量を行つて

第10表 カオリン吸着法の検討

7. 尿中E*の化学的定量

フラクション	原 尿	G吸着後の尿	Gフラクション
尿			
男 子 尿	8.8γ/l 100%	8.8γ/l 100%	0.14γ/l 1.6%
卵 胞 期 婦 人 尿	72.0" 100%	69.0 " 95.8%	
妊 婦 尿	1140.0" 100%	1130.0" 99.1%	1.43 " 0.13%

* エストロジェン

も何等Eによる影響を考慮する必要がないという結論に達した。また生物学的検定の結果は、第11表の如くなり、加熱したGフラクションは、Gによる反応が認められる4倍量でも何等子宮の肥大を認めなかつた。以上二つの実験結果からGフラクション中には検定の障害となる程のEが混入しないことが実証された。

第11表 カオリン吸着法の検討

8. Gフラクション中に混在するEの生物学的検定

実験番号	投 与 量 (原尿換算)	Gフラクション	加 熱 Gフラクション
I	320cc		0/4
	160	4/4	0/4
	80	2/4	0/4
	40	0/4	0/4
	20	0/4	
II	640		0/2
	320	3/3	0/2
	160	3/3	0/2
	80	0/3	0/2
	40	0/3	

卵胞期の婦人尿使用

b) Exogeneous-E; 以上は Endogeneous なEの場合であるが、泌尿器科領域では大量の Exogeneous なEの尿中排泄が予想される場合がある。例えば前立腺癌の治療に於ては生理的量を遙かに超えたEが投与される。又この場合には、天然のEではなく合成発情物質が用いられることが多いので前

述の場合と別に考えなければならない。最近、再発性前立腺癌治療の対策を見出さんとして尿中Gの態度が論議されて居り、Albert²³⁾は卵胞ホルモン投与中の症例では投与ホルモンの影響を考慮して、G検定にはマウス子宮重量法は不適で必ずラット卵巢重量法を用うべきであると述べて居る。著者は合成発情物質の一種である、Hexestrol (ヘキスロン) (以下Hと称する)を投与した場合について実験した。先ず尿はH 1日当り 5mg を連日数週間投与後の患者の尿を用いた。若し 5mg のHがそのまま尿中に排泄されたとすれば恐らく 1日尿の 1/50000~1/100000 程度の微量の投与でマウスの子宮は反応するものと予想される。Hが尿中にどのような型で排泄されるかは明らかでないが、Eと同様、遊離型の他、グルクロン酸等との結合型としても排泄されるであろうと予想されるので、尿中よりHの分離は遊離型と結合型に分けて抽出を行つた。次に尿中にはフェノール性物質が多く、一般的なHの定量法はそのまま適用出来ず、又尿中Hの定量法として確定した方法がないので生物学的活性よりその排泄量を概算した。

〔方法〕弱酸性とした尿よりエーテルで遊離型Hを振盪抽出し、遊離型Hを抽出除去した尿を塩酸で加水分解後、同様にエーテルと振盪して結合型Hを抽出した。次に検定は、夫々を蒸発乾固した後、水に懸濁しマウス子宮重量法によつた。又Gフラクション中のHはEの場合と同様加熱してGを無効化した後、マウス子宮重量法によつた。

〔実験成績〕測定の結果は第12表に示す如く、遊離型、結合型共に原尿 40cc 相当量ではじめて有効となり、先に予想した著量のHは、尿には認められず、Hは生体内で何等かの型で不活性化された後、尿中に排泄されるのではないかと考えられた。次に本来の目的であるGフラクション中のHであるが、Eの場合と同様の方法で検定を行つた結果、第13表に示す如く、殆んどHの効力は認められなかつた。以上の結果は、Exogeneous なEもマウス子宮重量法によるGの検定の障害とならないことを示すものと考えられる。

c) 乳汁分泌ホルモン

尿中に乳汁分泌ホルモン (以下 LTH と称する) が排泄されることは、既に1935年 Lyons 等³⁴⁾により授乳中の婦人尿について報告されているが、最近 Coppedge 等³⁵⁾及び Bahn 等³⁶⁾は正常人の尿中にもこれを認めている。一方 Segaloff 等³⁷⁾は脳下垂体摘出雄ラットに於て、副性器に対する男性ホルモンの作用が、LTH により増強されることを報告している。雌動物の副性器に対しても LTH は何等かの影響を持

第12表 カオリン吸着法の検討

9. H* 投与患者の尿中Hの生物学的検定

実験番号	投与量 (原尿換算)	遊離型 H	結合型 H	H
I	10cc	0/4	0/4	
	5	0/4	0/4	
	2.5	0/4	0/4	
	1.25	0/4	0/4	
II	160cc	4/4	4/4	
	80	4/4	3/4	
	40	3/4	2/4	
	20	0/4	0/4	
	17			4/4
	0.57			4/4
	0.257			4/4
	0.1257			4/4

去勢後 H 1日 5mg 連日3週間投与患者の尿使用 * Hexestrol (ヘキスロン)

第13表 カオリン吸着法の検討

10. H* 投与患者の尿中Gの検定

実験番号	投与量 (原尿換算)	Gフラクション	加熱 Gフラクション
I	160cc	4/4	0/4
	80	4/4	0/4
	40	4/4	0/4
	20	1/4	0/4
II	320		0/2
	160	4/4	0/2
	80	4/4	0/2
	40	2/4	0/2
	20	0/4	

去勢後 H 1日 5mg 3週間連日投与患者の尿使用

* Hexestrol (ヘキスロン)

つのではないかと考えられる。しかし著者は 30iu の牛脳下垂体性 LTH を同時に投与したが、Gのマウス子宮重量に対する効果に影響を与えなかつた。最近

Loraine 等³⁸⁾もこの点について研究を行い、相当多量の LTH もマウス子宮重量法による G の検定に障害を与えないことを認めた。

7) 小括

1) 尿中 G は水溶液では不安定であり、尿の保存限度は、常温で 3 日間、冷蔵庫中で 1 週間程度である。

2) 吸着に用いるカオリンは、特に前処理を必要とせず粉末のままでも用いることが出来る。吸着時の尿の pH は 3.5~4.5 が適当である。又カオリンは天然物であるが品質の差による収率の変動はそれ程危惧すべきものでないことを認めた。

3) カオリンより G の溶出溶媒としては、水酸化ナトリウム溶液より N-アンモニア水の方が収率、純度の両面で優れている。

4) 溶出液より G を沈澱させる場合のアルコール添加量は 3 倍が適当でありそれ以上を必要としない。又このときの pH は 4.0~6.0 の間で収率に差を認めなかつた。

5) 得られる G フラクシオン中には、Endogenous-Estrogen 及び Exogeneous-Estrogen 共に混入せずマウス子宮重量法による定量の障害とはならなかつた。

iii) カオリン吸着法の手順

第14表 カオリン吸着法の検討

11. 尿中 G の抽出法

工 程	操 作 法
(1) 濾過 (2) 吸着	尿を酢酸で pH 4.0~4.5 として濾過し、濾液にその 1 l に対して 10 g のカオリンを加えて攪拌後、暫く冷蔵庫中に放置する。
(3) 洗浄 (4) 抽出	吸引濾過又は遠心分離して沈澱を集め、蒸留水で繰返し洗う。この沈澱に初め加えたカオリンの 5 倍量の N-NH ₄ OH 水を加えて約 5 分間、激しく振盪又は攪拌した後放置し 20~30 分後遠心分離して上澄液をとり沈澱は前回と同量の N-NH ₄ OH 水で洗浄、遠心分離、洗液は上澄液に合する。
(5) 沈澱	氷酢酸で pH 4.5~5.5 にする。生じた沈澱は遠心分離して除く、次に上澄液に 3 倍量のエタノールを加えて 1 夜冷蔵庫中に放置する。
(6) 乾燥 (検定)	遠心分離して沈澱を集めエタノール、エーテルで各々 2 回洗って減圧下乾燥する、又直ちに検定を行う場合は乾燥せず所要の生理食塩水に溶解する。

抽出過程に於ける諸点について以上の如き検討の結果、第 14 表に示す改良法に到達した。尚松島³⁹⁾は、既にカオリン吸着法の改良案について発表しているが、本法は上記の種々の検討の結果、更に改良を加えたものである。

iv) イオン交換樹脂吸着法

カオリン吸着法の一つの欠点である煩雑さは前項の諸改良によりある程度緩和され、又他の一つの欠点であるカオリンの品質による収率の変動も実際にはそれ程頻発するものではないと思われる実験結果が得られた。しかしカオリンはあく迄天然物であり、その品質に対する保証がない。(日本薬局方には規定はあるが吸着能に関する規格はない) 著者は収率の悪かつた当初のカオリンについて、吸着能をメチレンブラウンを吸着する能力により検討した(活性炭の吸着力について日本薬局方に規定されている方法) 結果、吸着能は、その他のカオリンと差を認めなかつた。G の収率の変動は、吸着力よりむしろ吸着された G の溶出の難易にあるのではないかと考えられるが、現在これを

第15表 尿中 G の抽出法

(Amberlite XE64 法)

工 程	操 作 法
(1) 採尿保存	所用の尿を集め 1 l につき 約 5 cc の トルオールを加え冷所に保存
(2) 濾過、吸着	酢酸で pH 3.5 として濾過、濾液にその 1 l にたいして 10 g の XE-64 を加え 1 時間攪拌後暫く冷蔵庫に放置
(3) 遠心分離 (吸引濾過) 洗 滌	上澄を傾斜して除いた後、遠心分離して沈澱を集め酢酸で pH 4.0~5.0 とした蒸留水で繰返し洗う
(4) 抽 出	沈澱に 10% の酢酸アンモニウムを含む 40% エタノール 10 倍量を加え、1 時間攪拌抽出した後、遠心分離して上澄をとり、沈澱は前回と同量の溶媒で洗滌後遠心分離洗滌液を上澄液に合する。
(5) 沈 澱	3 倍のアルコールを加えて 1 夜冷蔵庫中に放置
(6) 検液の調製	遠心分離して沈澱を集め所要の生理食塩水に溶解する。もしただちに検定を行わない場合は、アルコール、エーテルでのおのおの 2 回洗滌して減圧乾燥保存する。

予め検出する方法が得られていない。そこで天然物であるカオリンの代りに合成イオン交換樹脂を用いる方法を試みた。この方法は、Johnsen⁴⁰⁾が尿中Gの化学的研究のために大量の尿よりGを分離する目的で、天然イオン交換樹脂であるパームチッドを用いている点に基き、パームチッドと類似した性質を有する合成弱陽イオン交換樹脂である Ambrlite XE64 を用いた方法であり、松島⁴¹⁾はすでに妊婦尿より HCG の分離に用い好結果を得ている。その方法の概略は第15表に示す通りであり、大体カオリン吸着法と大同小異であるが、更に尿中Gの定量への利用のための諸条件について検討を行つた。

1) G吸着時の pH

〔方法〕 pH 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 として濾過した正常男子尿に夫々 1 ℓ 当り 10 g の XE64 を加え、約 1 時間攪拌後濾過して、G を吸着した樹脂を集めた。以下第15表の方法に従い G の溶出、及び沈澱を行つた。

〔実験成績〕 第16表の結果を得た。即ち pH 3.0,

第16表 イオン交換樹脂によるGの吸着

1. 尿の pH と収率

実験 番号	収量並びに 効力	pH						カオ リン 法
		3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	
I	収 量 (mg/原尿1ℓ)		77		39	7	3.5	36
	効 力 (muu/原尿1ℓ)		8		4	1>	1>	8
II	収 量 (mg/原尿1ℓ)		82		76			32
	効 力 (muu/原尿1ℓ)		8		8			8
III	収 量 (mg/原尿1ℓ)		68	72				40
	効 力 (muu/原尿1ℓ)		16	16				16
* IV	収 量 (mg/原尿1ℓ)	167	142					18
	効 力 (muu/原尿1ℓ)	6	6					6

* 実験IVは N-アンモニア水により溶出。

いずれも正常男子尿使用

3.5, 4.0 では重量、効力共に殆んど差が無かつたが、pH 4.5 以上のアルカリ性では、明らかな収量低下が認められた。以上の結果から、尿の pH は 4.0 以下の酸性であればよいという事になつた。

2) イオン交換樹脂の必要量

次に尿中のGを完全に吸着するために必要なイオン交換樹脂の必要量を決定するため次の如き実験を行つた。

〔方法〕 試料は正常男子尿、及び去勢男子尿を用い、尿を pH 3.5 として濾過した後、イオン交換樹脂を 1 ℓ に対し 10 g, 5 g, 2.5 g 加え前記の方法により G の吸着、及び溶出、沈澱を行い、得られた G フラクションの重量、及び効力を測定した。尚更に尿中に残留する G を定量するために、イオン交換樹脂を濾別した後の尿よりカオリン吸着法により G を回収し、その効力を検定した。

〔実験成績〕 第17表に示す如き結果が得られた。正常男子尿、去勢男子尿、いずれの場合に於ても、1 ℓ に対して 5 g の樹脂の使用により完全な G の吸着が行

第17表 イオン交換樹脂によるGの吸着

2. 使用する樹脂量と収率

実験 番号	樹脂量 (g/ℓ) 収量、効力	10.0	5.0	2.5	1.25
I (正常男子尿)	収 量 (mg/原尿1ℓ)	86	77	65	42
	効 力 (muu/原尿1ℓ)	8	8	4	1>
	尿中に残留 するGの効力	0	0	0	4
II (去勢男子尿)	収 量 (mg/原尿1ℓ)		52	58	38
	効 力 (muu/原尿1ℓ)		200	100	100
	尿中に残留 するGの効力		0	0	0

われた。しかし G 含有量の多い去勢男子尿に於ては、1 ℓ 当り 2.5 g 迄で G の吸着が完全であるのに対して、G 含有量の少ない正常男子尿の場合、1 ℓ 当り 2.5 g で少々収率の低下することは、G 量よりも他の因子による影響が大であるのではないかと考えられる。但し樹脂の必要量に関する実験は尚不充分であるので一応常法としてはカオリンと同様尿 1 ℓ に対して

10 g の樹脂を用いることとした。

3) イオン交換樹脂より G の溶出

HCG の場合好結果の得られた 10% 酢酸アンモニアを含む 40% アルコールを主として用いたが、同時に N-アンモニア水での溶出を試みた。結果は第 16 表に示す如くに N-アンモニア水によつても溶出はできるが、このときは遠心分離によつても、濾過でも澄明な溶出液が得られないために最終製品の純度が著しく低下した。10% の酢酸アンモニアを含む 40% アルコールを用いることにより、この点は改善され、且収率の低下は認められなかつた。又 10% の酢酸アンモニアで溶出を行つた後更に N-アンモニアで溶出しても、それ以上の G を得ることは出来なかつた。

4) カオリン吸着法との比較

尿の pH と収率との関係に関する実験過程で既に第 16 表に示した如くに、尿の pH を 3.0~4.0 としてイオン交換樹脂により G の吸着を行つた場合、カオリン吸着法、及びアルコール沈澱法との間に収率の差を見出さなかつた。又尿 1 l に対して 5 g 以上の樹脂を用いて吸着を行つた場合、尿中に残留する G を、カオリン吸着法により回収することが出来なかつたことは、イオン交換樹脂の G 吸着力が、カオリンに劣らないことを示すものと考えられる。但しイオン交換樹脂により得られる G フラクションは、カオリン法により得られるものに比し、重量的に少々大であり、純度が幾分劣ることが認められた。しかし生物学的検定上の支障となつた例は無かつた。

5) イオン交換樹脂の前処理

イオン交換樹脂は、使用前に強酸、強アルカリで交互に繰り返し洗浄し、最後に充分水洗した後使用するのが普通であるが、簡易化の観点から以上の実験は、すべて無処理の樹脂を用いた。しかし尿中 G の分離の目的には何等障害のないことは上記の諸結果から明らかである。

6) 小括

(1) イオン交換樹脂による G 吸着時の pH は、3.0~4.0 が収率よく pH 4.5 以上のアルカリ性になると収率の低下が認められた。

(2) 使用樹脂量について検討した結果、使用した原尿の種類で変動 (2.5 g~5 g) があつたが、カオリンと同様、尿 1 l に対して 10 g の樹脂を用いた。

(3) 樹脂より G の溶出は、10% 酢酸アンモニアを含む 40% アルコール溶液が、収率が良く、N-アンモニア水などに比し操作が容易でしかも高純度であつた。

(4) 使用する樹脂は、酸、アルカリなどの前処理を行わなくても、尿中 G の分離に何ら支障のないことを

認めた。

(5) カオリン吸着法との収率、及び純度の比較を行つた結果、本法は重量収量が少々多く、且つ純度が幾分劣ることが認められたが、生物学的検定上の支障とはならなかつた。

以上要約すれば、イオン交換樹脂 Amberlite XE 64 により G を吸着分離する方法は、カオリンの品質不均一に対応し、これに代り得る方法と考えられるが、現在尚実験例が少ないので更に追加実験中である。

II G の生物学的検定法

尿中 G の検定のための第一階程である尿中より G の分離については、前項に述べた如くであるが、続いて第二のステップである分離された G の定量法について研究を行つた。G の定量法には、化学的方法と生物学的的方法との二種があるが、化学的方法は、尿中 G に関する基礎的、化学的研究の現段階では困難なことであると考えられる。Crooke 等⁴⁰⁾によつて報告されたクロマトグラフィーによる方法も著者等の追試の結果では、生物学的の定量の結果と平行せず、予想される G 量との間にも著しく異なる値を示す場合があつたので、主として生物学的的方法について研究を進めた。なお G の定量を行う場合、目的により FSH、ICSH を個別に測定する必要がある場合と、両者の総体的な検定で目的が達せられる場合とがある。その目的により定量の手段も異なるが、臨床の利用に当つて、産婦人科領域では FSH、ICSH の量的関係が重大な関心事となることが多いのに比し、泌尿器科領域では、総体的な定量で満足される場合が多い。又前者は、後者に比し一般に方法が煩雑であるので臨床の利用を主眼とした本研究では、主として後者について研究を行つた。以下その結果について述べ、前者に関しては、2, 3 の実験例を挙げ利用の可能性について考察するに止める。

生物学的の定量法は、如何なる方法に従うにしても大なり小なり使用動物による制約を受け、随時行い得ない難点はあるが、化学的の定量の不可能な現段階では面倒でもこの方法によらざるを得ない。G の生物学的検定法は、もとよりその生物学的作用に基き、性腺に起る変化を利用することは云うまでもないが、使用動物の種類、性別、及び性器を利用するか、副性器を利用するかにより極めて多種の方法が考案され、発表されている。そのうち主なものだけでも、第 18 表に示す如きものがある。これらのうち尿中 G の定量という条件に適合し、比較的繁用されているものには、○印を附

第18表 Gの生物学的検定法の種類

FSH 及び ICSH の定量法	
FSH	ICSH
脳下垂体摘出雌ラットの 卵巣肥大を見る方法。	脳下垂体摘出雄ラッ ○ トの精嚢又は前立腺 重量増加による方法
HCG と同時に投与し ○ 幼若雌ラット又はマウ スの卵巣重量増加を見 る方法。	幼若雌ラット又はマ ○ ウスの卵巣の充血を 見る方法。
総 体 的 定 量 法	

- 幼若雌マウスの子宮重量増加による方法。
- 幼若雌ラットの卵巣重量増加による方法。
- 処女兎の排卵による方法。
- ガマ又はカエルの精子の排出を見る方法。

したものがある。

i) FSH, ICSH の定量

理想的には試験動物の脳下垂体より分泌されるGの影響を除くために脳下垂体を摘出した動物を用いる方法によるべきであるが、脳下垂体摘出は特殊な技術を必要とするのみならず、簡易に検定を行うことができないので、正常動物を用いる諸種の方法が研究されている。まず FSH の検定法として過剰の (20~40iu) 胎盤性G (HCG) と検体とを同時に投与して、マウスの卵巣重量増加を見る方法がある。その実験的根拠は、HCG の投与ではマウスの卵巣は、一定限度以上に重量を増さないが、これに FSH が附加されるとこの限度を超えて更に増加するのに対して、ICSH の附加ではこのような増加を示さないという点にある。次に ICSH については、マウス、又はラットの卵巣の充血を見る方法が一部の研究者により利用されているが、まだ一般的ではない。この方法はもとより卵巣充血が、ICSH の特異的反応であるという点に根拠を置いている。著者はこの他、幼若正常雄ラットの副性器重量増加による方法も試みた。これは脳下垂体摘出法が未発達の前、ICSH の概略の測定に用いられた方法である。

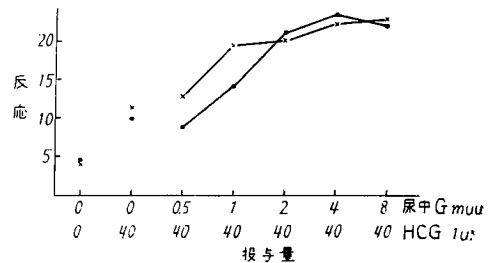
(1) マウス卵巣重量増加による方法⁴³⁾

〔方法〕 生後約20~25日、体重 6.5~8.5g の幼若雌マウスを用い、検体を総量 40iu の HCG と同時に1日2回3日間、計6回に分割投与し、第5日に解剖

して卵巣重量を測定した。

〔実験成績〕 結果は第1図に示す通りであるが去勢男子尿を用いた実験例に於て、1~2muu (マウス子宮重量単位、後述) で明らかな重量増加を示した。換言すればマウス子宮重量法に対して 1~1/2 の感度を有する反応と推定される。

第1図 マウス卵巣重量法 用量—反応曲線

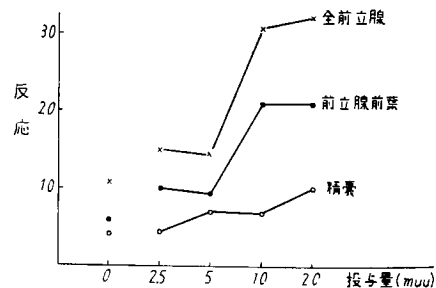


(2) 脳下垂体摘出雄ラットの副性器重量増加による方法⁴⁴⁾

〔方法〕 生後約1ヵ月、体重 40~50g のラットの脳下垂体を摘出し、摘出後3日より、1日1回、5日間検体を皮下に投与し、第6日に解剖して、前立腺、及び精嚢重量を測定した。

〔実験成績〕 結果は、第2図に示す如くなつた。即ち去勢男子尿を用いた実験例に於て大体 10muu で明らかな重量増加を示した。マウス子宮重量法に比し約 1/10 の感度を有する反応と推定される。

第2図 脳下垂体摘出ラット副性器重量法 用量—反応曲線



(3) マウス卵巣の充血による方法

〔方法〕 Lloyd 等⁴⁵⁾ の報告に従い体重 8~13g の雌マウスに検体を1回皮下注射し、注射後7時間目に、一酸化炭素で殺して解剖し、卵巣を観察した。

〔実験成績〕 Lloyd 等の云う充血反応は明らかに認めることはできたが、陰性の場合と陽性の場合との間は連続的に変化し、両者を判別する客観的標準が得難く、又少数例ではあるが反応の個体差がかなり大きい

様に感ぜられた。この点よりこの方法は定量的方法としては不適であると考えられた。

(4) 正常幼若雌ラットの副性器重量増加による方法⁴⁰⁾

〔方法〕投与の方法、解剖の方法は、いずれも脳下垂体摘出ラットの場合と同様に行つた。

〔実験成績〕予想に反して極めて感度が悪く去勢男子尿を用いた場合、40muu でも前立腺、精囊共に重量の増加を示さず、感度の点で尿中Gの定量法として不適に判定された。

(5) 小括並びに考察

前述の如く以上の諸方法について著者はまだ充分な検討を行つて居らず、断定しうる段階に至つてないが、次の如くに考える。FSH、ICSHの定量法としては、脳下垂体摘出動物を用いることが望ましいが、実際面では正常動物を用いる簡単な方法が要望され、この要求に応じてFSHの定量法として考察されたマウスの卵巣重量増加を用いる方法は、感度、精度共に実用化の可能性が強いが、ICSHの定量法であるマウスの卵巣充血反応は、客観点標準が得難い難点がある。又著者の試みた正常雄ラットを用いる方法は、著るしく感度が悪かつた。従つて現段階としての定量は脳下垂体摘出ラットを用いる方法によらざるをえない。Brown等⁴⁸⁾が、マウス子宮重量法によりTotal Gを、マウス卵巣重量法によりFSHの定量を行い、両者の関係よりFSHとICSHの関係を追求し敢えてICSHの定量を行つていないのは、この点に原因するものと考えられる。なおマウス卵巣重量増加によるFSHの定量法は、はじめSteelman等⁴⁷⁾によりラットを用いて行なわれた方法をマウスに応用したものであり、そのFSHに対する特異性については未だ充分な検討が行われていないように思われる。

ii) Total Gの定量法

Total Gの定量法としては、マウス子宮重量法が最も広く用いられているが^{5) 21) 24) 25) 40) 41) 41) 48)}、一部の研究者はラット卵巣重量法を用いている^{8) 10) 23) 49) 50)}。著者は、前者の方法をroutineに用いているのでこの方法についての詳細な研究結果を主として述べ、後者については2, 3の実験例を挙げるに止める。又その他非常に簡易に用い得る兎の排卵による方法⁵¹⁾ (Friedman法)も試みたのでその結果を併せ報告する。

(1) マウス子宮重量法

〔方法〕7.5~9.5gの幼若雌マウスに対し、生理食塩水に溶解した検体を背部の皮下に1日2回3日間注

射する。1日置いて第5日目にマウスをエーテルで麻酔して殺し、子宮をとり出し軽く濾紙で押えて表面の水分を拭い、トーションバランスで秤量する。個々の動物について子宮重量が20mg上となつた場合を陽性とした。

〔実験成績並びに考察〕マウス子宮重量増加を用いる検定法は多数の研究者により報告されているが、体重、生後日数等、使用動物に関する制限、投与回数その他投与法に関する規制は報告者により異なる。そこで著者は、著者自身の方法を中心とし検定のための諸条件を吟味すると共にその他の方法についての批判を試みた。

a) 動物の選定

体重の反応に及ぼす影響については、動物を体重により数群に分け、各群間の反応率を比較したが、第19表に示す如くに、その影響は予想外に少なかつた。従

第19表 体重と反応率

検体	I			II		
体重	7.5~8.5	8.5~9.5	9.5~10.5	6.5~7.5	7.5~10.5	
8	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4	
4	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	
2	2/4	1/4	1/4	0/4	0/4	
1	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	

つて前記の如く体重の許容範囲を7.5~9.5gと規定したが、実験には更に緩和することが可能と考えられる。動物の種を規定することは實際上困難が多いので著者は総べて動物商より購入した雑系を用いているが、実用上支障のない精度を示した。又第20表に示す如く、異なる動物商より購入した動物の間にも顕著な

第20表 マウスの飼育条件と反応率

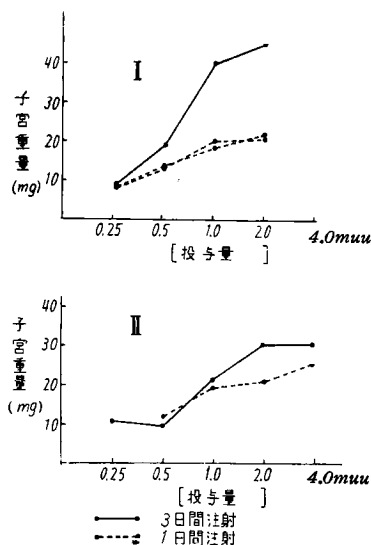
検体	I			II		
飼育条件	a	b	c	a	b	c
8	4/4	4/4	3/4	4/4	3/4	4/4
4	3/4	2/4	2/3	2/4	4/4	4/4
2	2/4	0/4	0/4	2/4	1/4	2/4
1	1/3	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4

反応の差を見出さなかった。生後日数も実際的には規定することが困難であるので、この点についての検討は行わなかった。

b) 注射の方法

Gの作用は一般に多数回に分割注射した方が同一量を1回に注射した場合に比して増大する。しかし反面注射回数の増加は労力の増大となることは云う迄もない。そこでこの両面への考慮からGの検定の場合の注射回数は、1日1～3回、注射日数は3～5日である場合が多い。又注射終了後反応が最大となる時間は大体24～72時間であるので、解剖の時期は24時間後又は48時間後に行われる例が大部分である。著者はかつてGの分離にアルコール法を用いた関係上、その毒性を考慮し、出来るだけ多数回に分割注射する目的で1日2回3日間、計6回とした。しかし、この方法は、感度その他総べての点で Klinefelter 等⁶²⁾の方法即ち3日間に5回注射する方法と全く差異が認められなかった。又著者は解剖を第5日に行っているがこれも Klinefelter 同様第4日に行つても反応に差がなかった。Levin等⁴⁹⁾は、1日1回3日間計3回の投与を行っているが、この場合は著者の方法に比し幾分感度の低下が認められた。なお著者は出来るだけ検定の労力を省き又結果の判明する時間を短縮する目的で1日2回、及び唯1回の注射を行い48時間後に解剖する方法を試みた所、第3図に示す結果が得られ、用量—反応曲線の傾斜の減少が認められ、この方法が利用出来れば著るしく検定は簡易化されるので更に追加実験

第3図 3日間注射と1日注射法の用量—反応曲線比較

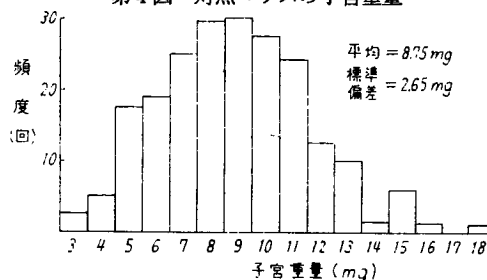


中である。次に1回の注射液量であるが、多ければ多い程注射液量の誤差は少なくなるが、マウスに注射出来る最大限は精々1ccである。そこで著者は0.4cc～0.2ccとした。なお注射液量の差は、反応に認むべき影響を与えなかった。

c) 反応の判定

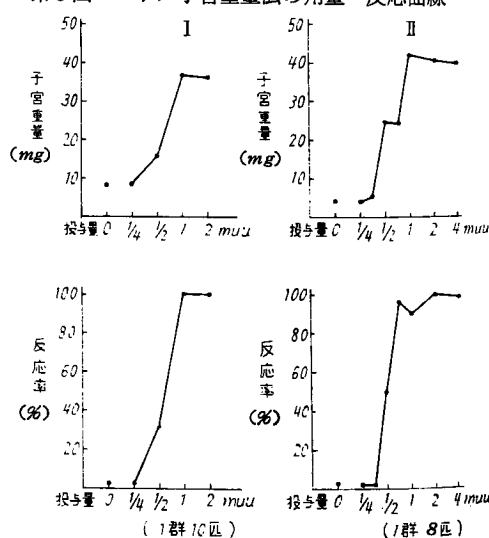
組織の重量変化により反応の判定を行う場合、对照動物の平均組織重量の50%, 100%, 或は200%を限度とし、それ以上となつた場合を陽性と判定するのが普通である。しかし、著者は、对照動物の平均値を考慮せず一律に20mg以上となつた場合を陽性とした。これは次の理由によるものである。第一に実際上一回の検定に用い得る对照動物の数には自ら限度があり、5匹前後が通常であるが、この平均を以て母平均と見做すことには大きな意味がない。第二に過去の検定例中より对照動物の子宮重量を集計し、平均、及び標準偏差を求めた結果第4図に示す如く夫々8.75mg及び

第4図 对照マウスの子宮重量



2.65mg となつた。又20mgを超えた例は1例もなかった。第三に用量—反応曲線を求めるとそのうちの2例を第5図に示す如く、子宮重量10mg以下より30

第5図 マウス子宮重量法の用量—反応曲線



mg 以上に至る間のカーブは極めて急峻であり、10 mg 以下に対応する投与量の4倍量ですでに30mg 以上に達し、20mg 前後の中間の数値を示す例は極めて少数であつた。以上の諸点から検定の都度対照を求めるより一律に20mg を限度と考える方がむしろ合理的であるのみならず、それだけ動物数の節減が可能であると考えられる。

d) 単位の表現

生物学的検定法には二つの方式がある。第一は比較法であり一定の標準物質を定め検定の都度標準品と検体とを同時に併行して検定し、検体の効力を標準品のそれとの比較によつて求める方法である。従つてこの場合検体の効力は標準品何mg に相当するかによつて表現される。第二の方式は、絶対法であり著者の方法がその1例であるが、検定の条件を詳細に規定し出来る限り厳密にその規定に従つて検定を行う方法である。この場合検体の効力は予め規定された反応を示すために要する最少量（通常は1群の動物中50%以上が規定の反応を示す最少量—これをED50 という—）を以て表現する。生物学的検定の条件はいかに厳密に規定しても、規定し難い因子がある。例えば同一Speciesの動物を用いてもこれを飼育する気候、風土が異なる場合、両者が同一条件であるとは云い難い、又生物の反応に季節的変動がある場合、その差を消去することは困難である。従つて測定値の普遍性を保証することが難しい。この点比較法による場合は、使用動物の感度に変動があれば標準品に対する反応も検体に対する反応も併行して変動する筈であり、前記の様な条件の変化を考慮する必要がある。この意味で比較法による測定値は普遍性があるといふ。尿中Gに於てもLoraine等⁵³⁾は、標準品を定め専ら比較法によつている。彼等は標準品として更年期後の婦人尿より得たGであるHMG-20Aを用いている。又その後1957年WHOはNational Institute for Medical Research (London)に国際標準品の準備を命じ、1958年国際標準品HMG-24を制定した。しかしこの標準品設定に対してJohnsen等⁵⁴⁾は、反対意見を發表している。彼等の論旨は「標準品を用い比較法によつて検定を行い得るためには、一つの絶対的な条件がある。それは標準品と検体とが生物学的に同じ性質のものであるということである。換言すれば標準品と検体とは純度は異なつても含有される有効物質が同一物であるか、生物学的に同一の作用を有するものであることが必要であり、この条件が充たされないときは、次の様な矛盾を生じ標準品を用いる意味が失なわれる。第一は、比較法を行うためには用量—反応曲線が併行することが

必要であるが、質的に異なる2つの有効物質では併行しない場合も生ずる。第二に、2つ以上の異なる検定法で検定を行つた場合、測定値の間に差を生ずることがある。しかるにHMG-20A、及びHMG-24は共に他の方法により分離したGとの間に明らかな質的差が認められる」ということである。尿中のGはFSH、ICSHの2作用を有し、その比率が一定せず、原料である尿の種類、或いは分離法により異なり、従つて生物学的作用が異なることが多くの研究者により報告されていることは既に述べた通りである。この意味に於て著者も国際標準品の設定については疑義を持つてゐる。更に著者は他の一つの理由により敢て標準品を用いなかつた。それは比較法により検定を行うには用量—反応曲線の直線部分を利用しなければならないが、マウス子宮重量法の用量—反応曲線は既に第5図に示した如く直線部分が極めて狭くこの間を利用することは相当の困難が予想され少なくとも予備試験により予め概略の効力を知る必要がある。このような実際の意味から敢て比較法によらず絶対法によつた。なお標準品により予め標準曲線を作製し、検体に対する反応量よりこれに相当する標準品の量を求め、この数値によつて検体の力価を表現している報告もあるが、この方法では検定条件に基づき推定の誤差を補正することは出来がたく、単に表現上の便宜のみで標準品を用いる意味は殆んどないと云つても過言ではない。

e) 精度

生物学的検定法についても批判することは、広範囲に且数多くの実験を反復した後でなければ難しいことであり、特に本検定法の如く臨床の利用を主眼し、使用動物の数を可能な限り節減した場合に於て精度を云々することは至難であるが、以下2、3の事項について考察する。

検定法の精度は、三つの要素よりなる。第一は偏倚である。これは前述した如く、同一検体を地理的、時間的に間隔を置いて反復検定した場合相互の間に生ずる測定値の差であり、検定条件の相異によつて生ずるものである。偏倚を補正する最も有効な手段として、標準品を設定し比較法によつて検定を行うことは既に述べた。しかし著者は標準品を用いず敢て絶対法によつた。その理由についても既述した。従つてこの方法に従つた場合、偏倚に関する補正を行わず、他の研究者の測定値を厳密に比較することは出来ない。しかし過去の諸報告と照応した結果、第21表に示す如く略々一致した値を得ている。又同一検体を時間的間隔を置いて反復検定の結果、第22表の如き測定値を得、季節的な変動は予想外に少ないものと推定された。精度

第21表 男子尿中のG排泄量

報告者*	単位 muu/day		
	最低	最高	平均
Katzman et al			28
Levin	10	25	
Heller et al	25	10	
Evans et al	6	20	
Catchpole	7	20	10
Werner	5	120	40
Klinefelter	7~13	53~105	13~26
著者	12	24	

* The Hormone II より

第22表 マウス子宮重量法の再現性

検体	I			II		
	1	2	3	1	2	3
16	3/4	4/4	4/4	4/4		
8	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
4	3/4	4/4	1/4	2/4	4/4	4/4
2	0/4	0/4	1/4	0/4	0/4	0/4
1	0/4	0/4	0/4		0/4	0/4

の第二の要素は、変動である。これは動物の個体差その他避け難い或いは不明の原因による測定値の変動である。この変動に基づき誤差は可能な限り検定の条件を厳密にすると共に、出来る限り多数の動物を使用することにより極限することが出来る。その精度を表現する尺度として λ が用いられる。Loraine 等²²⁾, Borth 等⁶⁵⁾, 及び Brown 等⁴³⁾は夫々 $\lambda=0.133$, $0.09\sim0.28$, 及び $0.070\sim0.132$ を得、共にマウス子宮重量法が高い精度の検定法であることを立証している。著者の検定法は比較法によらないので、 λ を用いて数的に精度を表現することは出来ないが、第5図の用量-反応曲線は相当高い精度の測定値が得られることを予想させる。なお第22表に於て反復測定値が極めてよく一致したことは、前述の季節的偏倚が少ないことを示すと同時に変動の小さいことも表している。最後にもう一つの精度の要素は特異性である。副性器である子宮の変化を利用する本法は、性ホルモンの影響を受ける可

能性が強いことは明かであるが既述の如くGの分離をカオリン吸着法による限りGフラクション中には性ホルモンの混入はなく、その影響を考慮する必要はないと考えられる。又障害の可能性のあるもう一つの因子 Prolactin が子宮重量に影響を与えないことも立証された。その他それ自身は生理作用を有しない不純物も間接的な影響を反応に与えているかも知れないが、過去の実験例中特に障害を認めなかつた。尿中Gの定量の如く試料に制約を受ける場合は感度もまた精度に間接的ではあるが影響を持つている。感度がよいことは必要に応じて多数の動物の使用が可能であるからである。各種検定法の感度については後述するがそれ等の比較値をマウス子宮重量法を100として表示すれば、第23表の如くなる。この数値より明らかな如くマ

第23表 生物学的検定法の感度比較

マウス子宮重量法	100
ラッテ子宮重量法	50~25
ラッテ卵巣重量法	20~10
家兔排卵法	5~25

ウス子宮重量法の感度は最も大である。なお著者は既述のように1群3匹の動物を使用しているが、これは1日の全尿を最も有効に使用するための一つの試案であり、要求する精度、及び状況に応じて動物数を加減し得ることは云う迄もない。

b) 検定法に対する実際面よりの考察

検定法は、前項の精度が要求される反面、実際的には出来る限り簡易に行い得ることが要望される。その要求は四項に分けて考察することが出来る。第一は検定に要する時間である。Gの検定に於ては充血反応、排卵観察、その他肉眼的所見に基く方法は、6時間~24時間で行いうる場合もあるが、この方法では判定が主観的になり易く、客観的標準の得られる組織の重量変化による方法は、72~96時間を必要とするのが通常である。この点マウス子宮重量法は特に長時間を要するとは考えられないが、前述の如く著者の試みでは1回注射後48時間後でも子宮重量の増加が認められ時間短縮の可能性も考えられる。第二は検定に要する労力であるが、これは略々時間と併行関係にあり、1回注射により検定が可能であれば著るしく労力は節減される。第三には経費である。この点ではマウスは、Gの検定に用いうる動物中最も低廉である。第四に検定に要する熟練の程度であるが、本法はおそらく生物学的検定法としては最も単純な方法であり、殆んど熟練を

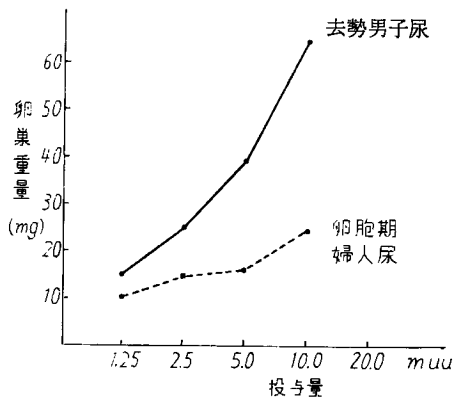
必要としないと考える。以上の諸点から考察しマウス子宮重量法は実際的にも極めて簡易に行いうる方法であると考える。

(2) ラット卵巢重量法

〔方法〕 体重40～50gの幼若雌ラットに1日1回5日間検体を皮下注射し、第6日にラットを殺して卵巢重量を、マウスの子宮と同様の方法により秤量する。検体は1回の投与液量が1ccとなるように希釈する。

〔実験成績〕 去勢男子尿及び卵胞期婦人尿を用いた実験の結果から、第6図に示す用量—反応曲線を得た。この結果よりラット卵巢重量法は、反応を数字

第6図 ラット卵巢重量法用量—反応曲線



的に表現し得る利点はあるが感度はマウス子宮重量法に比し 1/5～1/10 であると推定された。

(3) 兎の排卵による方法

〔方法〕 体重 2.5kg 前後の処女兎を1匹ずつ隔離して飼育し、検体を1回に耳静脈内に注射する。注射後約48時間目に動物を殺すことなく麻酔下に開腹し、卵巢をとり出し、排卵、及び出血点の有無を検し、いずれかが認められた場合を陽性と判定した。

〔実験成績〕 去勢男子尿を用いた数例の実験では、20～40muuの投与により反応が陽性となつた。従つてマウス子宮重量法に比し 1/10～1/20 の感度となり検定法は簡易であり、判定に要する時間も短縮し得る利点はあるが、G排泄量が多量であることが予想される場合の他は、一般的な利用には不適である。

(4) 小括

Total G の定量法としては、マウス子宮重量法は最も高感度であり、臨床の利用に適すると考えられるので、この方法について詳細な研究を行つた。その結果

1) 体重の反応に及ぼす影響は意外に少なく 6.5～10.5gの間で感度の差を認めなかつた。

2) 異なる動物商より購入したマウスの間にも感度の差を認めなかつた。

3) 注射回数減少は感度の低下を来とし、特に唯1回の注射では用量—反応曲線の傾斜も減少した。又注射液量の増減は反応に影響を及ぼさなかつた。

4) 投与量—反応曲線の観察、及び再現性に関する実験結果よりマウス子宮重量法は充分臨床的目的に適する精度を有するものと考えられる。

5) 対照動物の子宮重量に関する統計的観察の結果、反応の判定規準を子宮重量 20mg 以上を陽性とすることに定めた。又単位表現のためには、標準品を定め比較法によることは望ましいが現段階では理論的にも実際的にも標準品の設定、並びに利用は困難と考える。

その他実際上の諸観点よりの考察の結果からも Total G の定量法としてマウス子宮重量法は臨床の利用に最も適するものと考えられる。

IV 尿中 Prolactin の定量法

前立腺癌と Prolactin の関係

前立腺癌は男性ホルモン依存性癌 (Androgen dependent cancer) であるため、その治療法として、1941年 Huggins^{56) 57)} 一派に依り始められた抗男性ホルモン療法が専ら行われている。この治療により前立腺癌の95%は臨床症状の軽快がみられると Huggins が報告していることをみても抗男性ホルモン療法が如何に有力な治療法であるかが理解され得るのである。しかし、その後の研究によりこの有力な治療法にも尚解決されねばならない大きな問題があることが判明して来たのである。即ち前立腺癌は抗男性ホルモン療法によく反応するが、その殆ど全部が早晚再発し、この場合はホルモン療法に殆ど反応しなくなるという事実である。今日、前立腺癌に解決を迫られている最大の問題は、この抗男性ホルモン療法後の再発前立腺癌をどうするかと云うことである。これに対する一つの試みとして、外科的 (surgical) 及び薬物的 (medical) 副腎切除術が行われたが、その成績は予期に反した否定的のものであつた。そのため最近では脳下垂体ホルモンとの関連に注目し、この問題の解決の端緒を見出さんとの試みがなされているのである。

即ち Sommers⁵⁸⁾ は前立腺癌と脳下垂体ホルモンとの関連性を指摘している。又 Kennedy 等⁵⁹⁾ は、2例の前立腺癌に於て生長ホルモンの投与が疼痛の再発と、酸フォスファターゼ値の上昇を来とし、逆に脳下垂体切除術で再発性前立腺癌が一時的軽快を示すことを報告している。一方 Grayhack⁶⁰⁾、及び Scott⁶¹⁾

は、前立腺発育に Testosterone と Prolactin の協力作用を認めて居り、更に Scott は Prolactin を Testosterone 以外の前立腺刺激ホルモン (another prostate stimulating hormone) と称し、且前立腺癌の卵胞ホルモン療法的作用機序として、卵胞ホルモンは FSH 及び ICSH の分泌抑制に止まらず、下垂体よりの Prolactin の放出抑制、或いは放出された後の Prolactin の作用抑制が考えられると述べ、前立腺癌の発育拡大に Prolactin が重要な役割を演じていることを暗示して居るのである。

以上要するに再発性前立腺癌の治療、更に前立腺癌の発育因子の解明には、FSH 及び ICSH と共に Prolactin の態度を知ることが重要であり、そのため Prolactin の態度を知る一手段として尿中 Prolactin の臨床的定量法が強く要望されている現状である。

尿中 Prolactin は、Lyons 等⁸⁴⁾により始めて授乳中の婦人尿中に発見されたが、その後 Bahn 等⁸⁵⁾が鳩の嚔嚢を用いる極めて鋭敏な方法の利用により正常男女性の尿中にも認められるに至った。その他 Coppe-dge 等⁸⁶⁾、Hadfield 等⁸²⁾は夫々鳩の嚔嚢重量増加による方法及びマウスの乳腺の発育による方法によつて定量を行っている。しかしそれ等の定量値の間には相当な差がありこの点に関して Loraine⁶³⁾は尿中 Prolactin の定量は先ず方法の基礎的研究が急務であると述べている。

以上の観点に立つて著者は正常男子及び前立腺患者について尿中 Prolactin の定量を試みた。

1) 方法

Prolactin についても FSH、ICSH の場合と同様尿中よりの分離、及び抽出物の検定の二段階に分けて考察することが可能である。

1) 抽出法

尿中 Prolactin の抽出法についての研究は極めて少なく Klinfelter 等⁸²⁾の方法が一般に用いられている殆んど唯一の方法であるので私もこれに基き、その一部を改良して第24表の方法に従った。

2) 検定法

抽出物の生物学的検定法については多数の報告があるが、大別すれば鳩の嚔嚢を用いる方法と^{34) 64) 65) 66)}、ラット⁶⁷⁾、マウス⁶²⁾又は兎⁶⁸⁾の乳腺を用いる方法とである。鳩を用いる方法には更に嚔嚢の重量増加を指標とする方法⁶⁴⁾と肉眼的又は組織学的変化を観察する方法⁸⁴⁾とがあり又検体の注射を筋肉内に行う方法と局所に行う方法とがある。著者はこれら諸法の中から感度が最良であり、又方法が最も簡易である鳩に局所注射をし、嚔嚢の肉眼的所見による方法を採用した。但し

第24表 尿中 Prolactin の分離法

24時間尿

10%酢酸で pH 5.5 とし、1%の NaCl を溶解した後、純アルコールを4倍加え一夜放置

沈 澱

少量の蒸留水に溶解

セロファン袋に入れ 0.5% NaCl 溶液に対して 2日間透析後 (1日2回外液交換) 内液を遠心分離

上 澄

凍結乾燥

乾燥粉末

第25表 尿中 Prolactin の定量

検体	収 量 (mg/day)	検定法	投与量 (mg)	反応	測 定 (u/day)	G 値 (muu/day)
A	800	局 所	2 0.5	++ --	400	24
B	1204	局 所	5 1.25	++ +-	240	32
C	770	局 所	2 0.5	++ ++	1600以上	128以上
D (第一回)	644	局 所	2 1	++ ++	600以上	96以上
		筋 肉 内	64 16	-- --		
D (第二回)	840	局 所	1.6 0.4 0.1	++ ++ --	2000	
		筋 肉 内	32 8 4 1	-- -- -- --		

* A. 正常男子; B 前立腺癌患者経過良好; C.D. 前立腺癌患者経過不良

この方法には特異性に難点があるので同時に筋肉内注射による方法も併用した。即ち検体を 1cc の生理食塩水に溶解し 200 g~300 g の鳩の胸部皮内に又は胸筋内に 1 日 1 回 0.25cc 宛 4 日間注射し、第 5 日目に鳩を殺して嚔嚔を開き、肉眼的に観察して明らかな肥厚を認めた場合を陽性と判定した。

ii) 実験成績及び考察

正常男子、前立腺患者中 Estrogen 療法実施後経過良好な場合、及び不良の場合について夫々尿中 Prolactin の検定を行つた。結果は第 25 表の如くなり局所注射法によつた場合、前立腺癌の増悪と尿中 Prolactin 値の増加との間には何等かの関係があるかの如き結果を示した。しかし乍ら筋肉内注射によつた場合は排泄量の多い例はいずれも陰性となつた。哺乳類の脳下垂体より得られる Prolactin を筋肉内に注射した場合、局所注射法による最小有効量の約 10 倍量の投与により反応が陽性を示すのに対して上記の例では 40 倍以上の筋肉内注射によつても陽性を示さなかつた。この結果は尿中の Prolactin と脳下垂体より得られるそれとの本質的な差を示すものか、局所注射法の信頼度に関するものか即断することは出来ないが、いずれにしろ尿中 Prolactin の定量法に関して前記 Loraine の主張する如き考慮が必要であることを示すものであり、今後更に研究を継続する予定である。

V 結 論

1) 尿中より G を分離する多数の方法について、信頼性、経済性その他諸種の観点から比較研究した結果、臨床的方法としてカオリン吸着法が最適であることを認めた。

2) しかしカオリン吸着法にもなお操作が少々煩雑である、カオリンの品種が一定でないという二つの欠点を認めた。

3) 第一の欠点に対しては、カオリンを粉末のまま用いる等の改良により方法を簡易化することが出来た。

4) 第二の欠点に対しては、カオリンの代りに合成弱陽性イオン交換樹脂(Amberlite XE-64)を用いることにより解決の可能性を見出した。

5) 分離された G の定量法としては、FSH の定量には HCG と同時に投与してマウスの卵巣重量増加を見る方法、ICSH の定量には脳下垂体摘出雄ラットの副性器重量増加による方

法、又 Total G の定量にはマウス子宮重量法が適当であることを認めた。

6) 特にマウス子宮重量法は季節的変動が少く、測定値の再現性もあり、その信頼度は充分臨床的要求を満たし得るものと判定された。

7) カオリン吸着法による G フラクシオン中には生理的に排泄される Estrogen 及び治療上大量に投与された合成女性ホルモンのいずれも混入せず、マウス子宮重量法による G の定量の障害とならないことを認めた。

8) 尿中 Prolactin をアルコール沈澱法により分離し、嚔嚔嚔法により(局所注射法)定量した結果、前立腺癌患者に於ける抗男性ホルモン療法の治癒効果と尿中 Prolactin 量との間には相関関係がある如き結果が得られたが、定量法の欠陥が認められ、更に定量法の基礎的研究が必要であるという結論に達した。

本研究の遂行、及び発表の機会を与えられた帝國臓器製薬株式会社山口社長、懇切なる御指導を賜つた新延研究部長、松島主任研究員、西村横大講師、及び各種の御援助を戴いた中野渡亀夫、飯塚和雄、三木徳太郎、植松弘子の各位に深謝致します。また御多用中御校閲を辱うした原田横大教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Zondek, B., et al., : Klin. Wchnschr., 7 : 831, 1928.
- 2) Zondek, B. Klin. Wchnschr., 9 964, 1930.
- 3) Teilum, G. : J. Clin. Endocrin., 9 : 301, 1949.
- 4) Berthrong, M., et al. : Ibid., 9 : 579, 1949.
- 5) Howard, R. P., et al. Ibid., 10 : 121, 1950.
- 6) Maddock, W. O., et al. Ibid., 12 985, 1952.
- 7) 長田尚夫 : 日泌尿会誌, 51 : 483, 1960.
- 8) Frank, R. T. Endocrinol., 25 996, 1939.
- 9) Varney, R. F., et al. : Ibid., 30 399, 1942.
- 10) Heller, C. G., et al. : Ibid., 24 : 319, 1939.
- 11) 松島早苗・ホルモンと臨床, 3 : 915, 1955.

- 12) Frank, R. T., et al. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 32 : 1666, 1935.
- 13) 松島早苗 : 第4回日本内分泌学会東部々会総会, 1956.
- 14) Levin, L., et al. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 34 : 516, 1936.
- 15) Levin, L., et al. : Endocrinol., 28 : 378, 1941.
- 16) Friedman, M. H., et al. : Ibid., 21 : 489, 1937.
- 17) Katzman, P. A., et al. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 30 : 1188, 1933.
- 18) Katzman, P. A., et al. : Ibid., 31 : 188, 1933.
- 19) Katzman, P. A., et al. : J. Biol. Chem., 106 : 125, 1934.
- 20) Bradbury, J. T. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 71 : 228, 1949.
- 21) Loraine, J. A. : J. Endocrinol., 6 : 319, 1950.
- 22) Loraine, J. A. : Acta Endocrinol., 17 : 250, 1954.
- 23) Albert, A. : Recent Progr. Horm. Res., 12 : 227, 1956.
- 24) Malburg, R. F., et al., : J. Clin. Endocrin. & Metab., 14 : 666, 1954.
- 25) Jones, G. E. S., et al. : Endocrinol., 32 : 46, 1943.
- 26) Gorbman, A. : Endocrinol., 37 : 177, 1945.
- 27) van Giloe, H. A. : Acta Endocrinol., 21 : 19, 1956.
- 28) Scott, L. D. : Brit. J. Exp. Path., 21 : 320, 1940.
- 29) 小野田廉雄 : 日泌尿会誌, 49 : 981, 1958
- 30) Loraine, J. A., et al. : J. Clin. Endocrin. & Metab., 16 : 1180, 1956.
- 31) Butt, W. A. : J. Endocrin., 17 : 143, 1958.
- 32) 志田圭三・等 : ホルモンと臨床, 8 : 483, 1960.
- 33) 志田圭三・等 : ホルモンと臨床, 6 : 373, 1958.
- 34) Lyons, W. R., et al. : Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y., 32 : 1049, 1935.
- 35) Coppedge, R. L., et al. : J. Clin. Endocrin. & Metab., 11 : 465, 1951.
- 36) Bahn, R. C. : J. Clin. Endocrin. & Metab., 16 : 1337, 1956.
- 37) Segaloff, A., et al. : Endocrinol., 59 : 233, 1956.
- 38) Loraine, J. A., et al. : J. Endocrinol., 17 : 425, 1958.
- 39) 松島早苗・等 : 皮膚と泌尿, 20 : 225, 1958.
- 40) Johnsen, S. G. : Acta Endocrinol., 20 : 101, 1955.
- 41) 難波脩一・等 : 薬誌, 79 : 378, 1959.
- 42) Crooke, A. C., et al. : Lancet (6808), 379, 1954.
- 43) Brown, P. S. : J. Endocrinol., 13 : 59, 1955.
- 44) Greep, R. O., et al. : Endocrinol., 30 : 635, 1942.
- 45) Lloyd, C. W., et al. : J. Clin. Endocrin., 9 : 636, 1949.
- 46) Fevold, H. L. : Endocrinol., 24 : 435, 1939.
- 47) Steelman, S. L., et al. : Endocrinol., 53 : 604, 1953.
- 48) Levin, L., et al. : Endocrinol., 21 : 619, 1937.
- 49) McCullagh, D. R. et al. : Endocrinol., 27 : 525, 1940.
- 50) 徳山一郎 : 内分泌と代謝, 1 : (2), 47, 1958.
- 51) Friedman, M. H. : J. Pharmacol. Exptl. Therap., 45 : 7, 1932.
- 52) Klinefelter, H. F., et al. : Endocrinol., 3 : 529, 1943.
- 53) Loraine, J. A., et al. : J. Endocrinol., 53 : 1, 1955.
- 54) Johnsen, S. G., et al. : Acta Endocrinol., 32 : 497, 1959.
- 55) Borth, R., et al. : Acta Endocrinol., 31 : 192, 1959.
- 56) Huggins, C., and Hodges, C. V. : Cancer Research, 1 : 293, 1941.
- 57) Huggins, C. : Cancer Research, 17 : 467, 1957.
- 58) Sommers, S. C. : Cancer, 10 : 345, 1957.
- 59) Kennedy, B. J., et al. : Bull. Univ. Minn. Hosp. and Minn. Med. Found. 36

- :528, 1955.
- 60) Grayhack, J. T., et al. : Bull. Johns Hopkins Hosp., 96 : 154, 1955 (Acta Endocrinologica, 31: 241, 1957 より引用).
- 61) Scott, W. W. : J. Urol., 70 : 477, 1953.
- 62) Hadfield, G. : Lancet, 1 : 1058, 1957.
- 63) Loraine, J. A. : In Clinical Application of Hormone Assay, p. 133, London, E. & S. Livingstone.
- 64) Riddle, O., et al. : Am. J. Physiol., 105 : 191, 1933.
- 65) Lyons, W. R., et al. : Proc. Exper. Biol. & Med., 31 : 305, 1933.
- 66) McShan, W. H., et al. Ibid., 34 : 50, 1936.
- 67) Astwood, E. B. In Ciba Foundation Colloguia on Endocrinology, 5 : 74, 1953.
- 68) Bradley, T. R., et al. : J. Endocrinol., 14 : 28, 1956.