

HFSH キットおよび HLH キットによる LH-RH 負荷 後の男子性腺機能不全患者における FSH, LH の測定

東北大学医学部薬剤部（部長：金久保好男助教授）

米 沢 健 三

東北大学医学部放射医学教室

中 村 護

東北大学医学部泌尿器科学教室

白 井 将 文, 松田 尚 太 郎

MEASUREMENT OF PLASMA FSH AND LH IN MALE GONADAL DYSFUNCTION WITH USE OF HFSH AND HLH RADIOIMMUNOASSAY KIT

Kenzo YONEZAWA

From Hospital Pharmacy, Tohoku University

(Director: Assistant Prof. Y. Kanakubo, Ph. D.)

Mamoru NAKAMURA

From the Department of Radiology, Tohoku University School of Medicine

Masafumi SHIRAI and Shotaro MATSUDA

From the Department of Urology, Tohoku University School of Medicine

HFSH and HLH radioimmunoassay kits were evaluated and the plasma FSH and LH in men with gonadal dysfunction were measured after LH-RH stimulations.

The measurement procedure with the kit is simple and it offers no problem. As to the precision, in FSH quality of the results was not always better than those obtained by other methods, while in LH they were well comparable with the latter. From this fact, it can be concluded that this method is adaptable enough for the routine determination of the hormones.

The values of plasma FSH and LH reached the highest in 20~60 minutes after LH-RH stimulations. Except in one case of hypogonadism, the response was rather poor in FSH, while in LH, the response increased remarkably. Correlation between the degree of increase of LH or FSH and the physiological condition of seminal fluid was not recognized specially because of a few number of cases.

We consider that LH-RH stimulation test is indispensable for examining the function of the hypothalamo-pituitary-gonadal system.

は じ め に

下垂体前葉より分泌される性腺刺激ホルモン (gonadotropin) の測定は、数年前までは生物学的測定法

(bioassay) によっていた。しかしこの方法は検体を多量に必要とするうえに感度も鈍いので、血液中の gonadotropin の測定にはほとんど使用できなかった。

ところで1959年 Yalow および Berson¹⁾が血液中の

insulin 測定にはじめて radioimmunoassay という方法を開発した。これは放射性物質で標識したホルモンと非標識ホルモンが競合して、ホルモン抗体に特異的に反応する事実に基づいた測定法であり、生物学的測定法に比べて特異性も感度もはるかにすぐれていることがわかった。その後この方法は他の蛋白ホルモン測定にも広く利用されるようになり、gonadotropin も radioimmunoassay で微量測定が可能となった。しかし gonadotropin の radioimmunoassay は特異性を確立することがむずかしいので、もっぱらホルモンの専門家によってのみ測定がおこなわれてきたが、最近ではこれらの問題もしたいに解決されキット化もおこなわれるようになり、だれにでも容易に測定が可能となった。

そこでわれわれは、follicle stimulating hormone (FSH) および luteinizing hormone (LH) 測定用キットを使用し、これらキットの精度を検討するとともに若干の男子性腺機能不全症患者に対して合成 luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH：第一製薬製) を負荷した場合の血漿 FSH および LH がどのように変化するかについても同時に検討を加えたのでそれらの成績について報告する。

測定法ならびに測定結果

I. HFSH キット

1. キットの構成と試薬の調製 (100検体用)

1) HFSH antiserum

希釈抗血清が 1.1 ml はいっており buffer II を 9.9 ml 加える。

2) HFSH standard

500 m IU/ml の原液を buffer III で順次希釈し適当な濃度の標準溶液を調製する。

3) HFSH-¹²⁵I

1~2 μ Ci/ml になっており buffer I を 10 ml 加える。

4) Anti rabbit γ globulin goat serum (第二抗体)

抗家兎グロブリンヤギ血清 1 ml がはいっており、buffer I を 10 ml 加える。

5) HCG (human chorionic gonadotropin)

20 IU/ml の溶液 11 ml がはいっている。

6) Buffer I (0.1 % BSA)

0.2% BSA を含む buffer が 10.5 ml はいっており、精製水 10.5 ml 加える。

7) Buffer II (0.1% BSA, 0.05 M EDTA)

0.1% BSA および 0.05 M EDTA を含む buffer が

11 ml はいっている。

8) Buffer III (1% BSA)

10% BSA を含む buffer が 7 ml はいっており、精製水 63 ml 加える。

2. 測定操作

1) 標準 HFSH 溶液または血漿 0.1 ml を試験管にとる。

2) HFSH-¹²⁵I 溶液 0.1 ml を加える。

3) HFSH 抗血清 0.1 ml を加える。

4) HCG を 0.1 ml (2 IU) 加える。

5) buffer III を 0.5 ml 加える。

6) 4°C で 4 日間放置する。

7) 第二抗体 0.1 ml 加える。

8) 4°C で 1 日間放置する。

9) 3000 rpm で 30 分間遠心分離後上清を除去する。

10) 試験管内壁を濾紙でふきとる。

11) ウェル型シンチレーションカウンタで各試験管の放射能を測定し、自然計数を引く。

12) HFSH ゼロサンプル (標準 HFSH 濃度ゼロ) の計数率に対する標準 HFSH または血漿の計数率比 (B/B_0) を計算する。

計数率比 (B/B_0)

$$= \frac{\text{標準 HFSH または血漿の計数率}}{\text{ゼロサンプルの平均計数率}}$$

ふつうパーセントで表わす。

13) 片対数グラフ用紙で標準 HFSH 濃度を横軸に対数でとり、標準 HFSH の計数率比を縦軸にプロットし標準曲線を作成する。

3. 標準曲線の作成

500 IU/ml の HFSH を含有する標準原液を buffer III で順次希釈し、500 以下 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 および 1.95 m IU/ml の標準溶液を調製し、ゼロサンプルおよび各標準溶液について triplicate により測定し平均計数率を求め計数率比 (B/B_0) を算出した。これをパーセントで片対数グラフにプロットし作成したのが Fig. 1 の HFSH 標準曲線

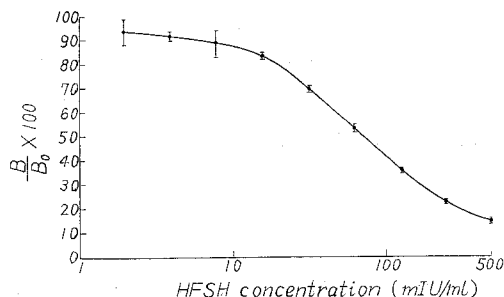


Fig. 1. HFSH standard curve.

である。

また Fig. 1 に示した標準曲線を直線化するため、計数率比を縦軸に logit scale でとり横軸に標準溶液濃度をそれぞれ対数でプロットしてみたところほぼ直線をえがくことがわかった。

4. 測定精度

同一の血漿サンプルについて測定した結果は Table 1 に示すごとくである。変動係数 coefficient of variation (C.V.) は20.5%と比較的大きいバラツキを示した。

Table 1. Precision studies of plasma FSH.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	Mean	S.D.	C.V.	Range
Plasma FSH (m IU/ml)	15.0	19.0	20.1	21.5	22.0	20.0	23.0	11.5	19.0	3.9	20.5	11.5

Table 2. Condition of semen.

case No.	condition of semen name and age	volume (ml)	sperm count ($\times 10^6$ /ml)	motility (%)	ratio of malformation (%)	chief complaint
1	R.M. 28	5.0	7	22	6	sterility
2	H.H. 19	—	—	—	—	hypogonadism
3	T.T. 25	8.7	4	12	18	sterility
4	K.O. 33	3.6	62	60	3	〃
5	K.S. 23	1.4	10	0	95	〃
6	Z.O. 36	3.3	107	47	6	〃

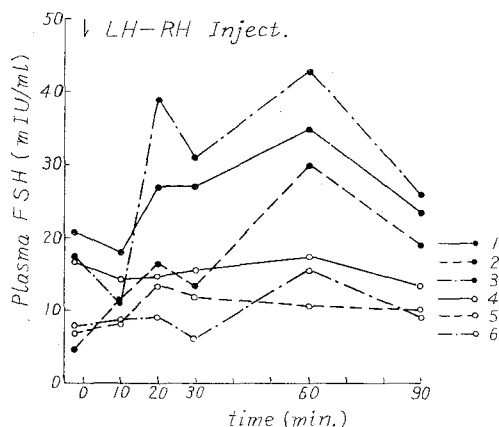


Fig. 2. Plasma levels of FSH after LH-RH intramuscular injection.

LH-RH 負荷後における FSH 値の変動を示したものである。basal level は4.8~21.0 m IU/ml であり、ピークは LH-RH 負荷後 20~60分に認められ 10.6~43.0 m IU/ml の範囲に分布している。また負荷前の値とピークを比較すると 1.1~6.3 倍であった。いっぽう hypogonadism においても他の症例に認められるとき response のパターンを示した。

5. 測定結果

対象患者は不妊を主訴として東北大学医学部泌尿器科不妊外来を訪れた患者のうちアトランダムに6名を抽出し血漿 FSH および LH の測定ならびに LH-RH 負荷試験をおこなった。これら症例の精液所見は Table 2 に示すごとくである。早朝空腹時まず LH-RH 筋注前に採血し、LH-RH 0.1 mg 筋注後それぞれ10, 20, 30, 60および90分後に採血し、遠心分離した血漿について FSH および LH を測定した。

Fig. 2 は症例1から6までの basal level および

II. HLH キット

1. キットの構成と試薬の調製 (100検体用)

1) HLH antiserum

希釈抗血清が 1.1 ml はいっており buffer II を 9.9 ml 加える。

2) HLH standard

500 m IU/ml の原液で HFSH 同様に標準溶液を調製する。

3) HLH-¹²⁵I

1~2 μ Ci/ml になっており buffer I を 10 ml 加える。

4) Anti rabbit γ globulin goat serum (第二抗体)

抗家兎 γ グロブリンヤギ血清 1 ml がはいっており、buffer I を 10 ml 加える。

5) buffer I, II および III については HFSH キットと同じである。

2. 測定操作

1) 標準 HLH 溶液または血漿 0.1 ml を試験管にとる。

2) HLH-¹²⁵I 溶液 0.1 ml を加える。

- 3) HLH 抗血清 0.1 ml を加える.
- 4) buffer III 0.6 ml を加える.
- 5) 4°C で 4 日間放置する.
- 6) 第二抗体 0.1 ml 加える.
- 7) 4°C で 1 日間放置する.

以下 HFSH キットの測定操作と同じである.

3. 標準曲線の作成

HFSH 標準原液と同じく 500 m IU/ml となっており, これを buffer III で希釈し HFSH の場合と同じ濃度の HLH 標準溶液を調製し, Fig. 3 に示す標準曲線を作成した.

いっぽう HFSH の場合と同様に計数率比を縦軸に logit scale でとり, 横軸に標準溶液濃度をそれぞれ対数でプロットしてみると Fig. 4 に示すごとく直線えがいた.

4. 測定精度

FSH 同様に同一血漿サンプルについて HLH キッ

トで測定し Table 3 に示す結果をえた. 変動係数は 15.2% で FSH の場合よりもバラツキは小さかった.

5. 測定結果

FSH を測定した血漿について同時に LH を測定した. その結果は Fig. 5 に示すごとくである. LH-RH 負荷前の LH basal level は 4.8~23.8 m IU/ml であり, LH-RH 負荷後 20~60 分にピークに達し, その

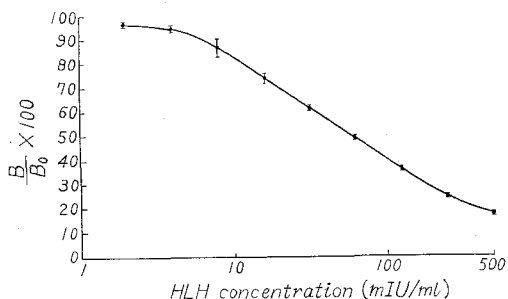


Fig. 3. HLH standard curve.

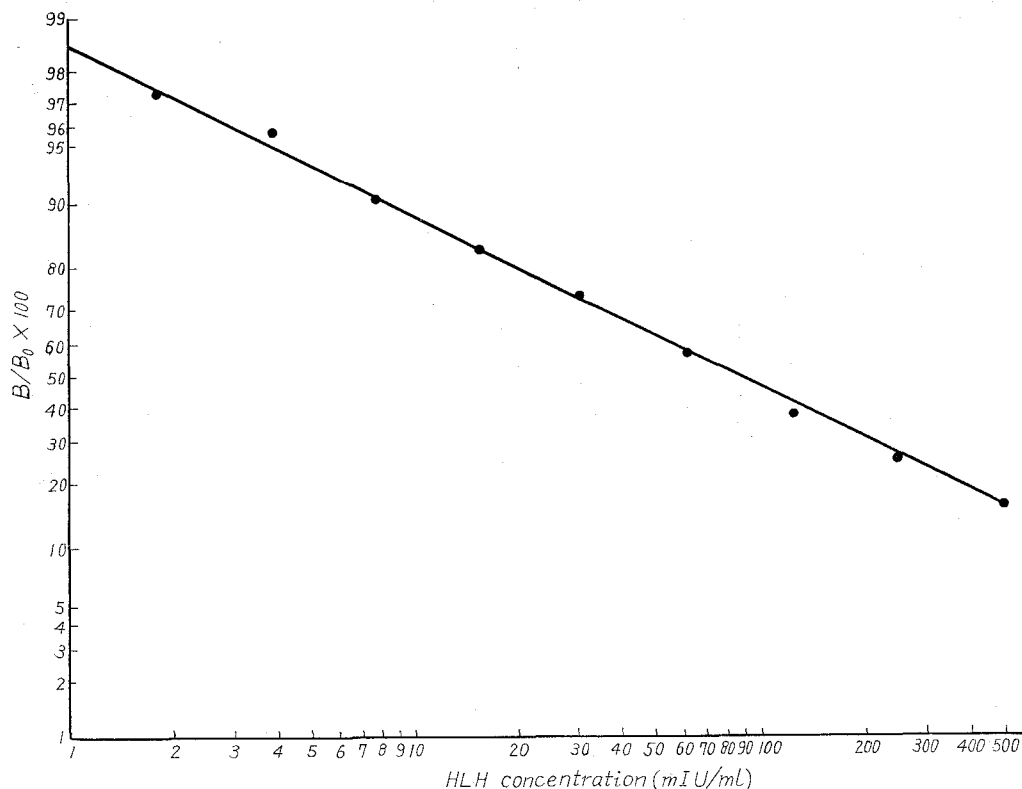


Fig. 4. Logit-log transformation of standard curve of HLH.

Table 3. Precision studies of plasma LH.

No.	1	2	3	4	5	6	7	Mean	S.D.	C.V.	Range
Plasma LH (m IU/ml)	62.0	81.5	68.0	70.0	59.0	51.0	59.0	64.4	9.8	15.2	30.5

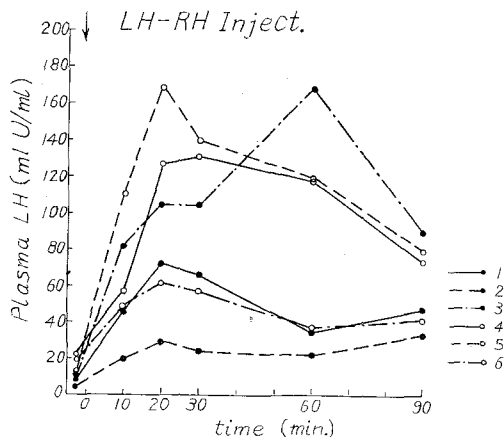


Fig. 5. Plasma levels of LH after LH-RH intramuscular injection.

値は 34.0~168.0 m IU/ml の範囲に分布していた。また basal level とピークの値を比較すると 3.1~16.0 倍である。いっぽう症例 2 の hypogonadism では、FSH の場合とことなり他の症例よりも LH-RH 負荷に対する response が低いことが認められた。

考 察

血漿中の FSH および LH の immunoassay をおこなうさいにはヒト下垂体性の純化 FSH, LH とそれそれぞれに対する抗体を得ることが理想的である。しかし本邦においては従来これら材料の入手はなかなか困難であった。

最近第一ラジオアイソトープ研究所より純化 HFSH と HLH および抗体を用いた二抗体法による radio-immunoassay キットを使用する機会を得、その測定法の実際について若干の検討を加えてみた。その結果、測定法そのものはきわめて簡単であり、とくに問題となるような点はないが、精度の点で LH 系に比して FSH 系が多少劣っていることがわかった。すなわち本キットに対するわれわれの検査では、LH 系の変動係数は 15.2% であったのに対し FSH 系では 20.5% とややバラツキが大きく、これらの値を諸家の成績と比較すると LH では Catt ら (1968)²⁾ の 13.0%、青野ら³⁾ の 13.0~14.1% とほぼ匹敵する高精度であるが、FSH 系で Faiman & Ryan (1967)⁴⁾ の 14.0%、青野らの 14.3~19.4% よりやや劣ることがわかった。しかし Marrian (1955)⁵⁾ は、steroid hormone assay のさいの変動係数は 10% 以下ならば理想的であるが、25% までは信頼できると述べており、本キットは日常検査としてのホルモン測定にはじゅうぶん使用できることがわかった。

ところで男性においては女性のように明瞭な性周期

が存在しないため、視床下部一下垂体一性腺系の相互関係が女性ほど明らかにされていない。しかし最近では血中の gonadotropin や testosterone の微量測定が可能になり、しだいにその関係が明らかになってきた。さらに 1971 年 Schally ら⁶⁾ により LH-RH が合成され、LH-RH は Kastin ら⁷⁾ によれば下垂体より LH を放出させるのみでなく FSH も同時に放出させる作用をもつことが明らかにされ、LH-RH が視床下部一下垂体一性腺系の機能を知るうえにきわめて有用な薬剤として脚光をあびるに至った。

そこでわれわれも男子性腺機能不全症患者に対して LH-RH を負荷した場合の血漿 FSH および LH を測定してみた。その結果血漿 LH は LH-RH 負荷により負荷後 20~60 分の間に前値に比して 3.1~16.0 倍と著明な増加を示した。いっぽう血漿 FSH も LH 同様負荷後 20~60 分間に前値に比して 1.1~6.3 倍の増加を示した。

しかしこれらの増加の程度と精液の状態との間には症例数が少ないせいかとくに相関性は認められなかった。今後これらの点についてさらに多くの症例について検討を加えてみたいと考えている。いずれにせよ LH-RH 負荷試験は将来視床下部一下垂体一性腺系の機能を知るうえに重要欠くべからざる検査法の一つとなることは間違いないと考えられる。

む す び

今回使用した HFSH および HLH キットの精度について述べれば、LH 系はきわめて精度が高いが FSH 系に多少のバラツキがみられたが、日常のホルモン検査にはじゅうぶん使用可能であることがわかった。いっぽう男子性腺機能不全患者に対して LH-RH 負荷試験をおこなったところ hypogonadism の 1 例を除いて著明な増加がみられた。また FSH も LH-RH 負荷により LH 同様の増加がみられたが、これらの増加の程度と精液の状態との間には症例数が少ないためかとくに相関性はみられなかった。

文 献

- 1) Yalow, R. S. & Berson, S. A.: J. Clin. Invest., **39**: 1157, 1960.
- 2) Catt, K. J., Niall, H. D., Tregear, G. W. & Burger, H. G.: J. Clin. Endocr., **28**: 121, 1968.
- 3) 青野敏博・南川淳之祐・河村憲一・谷沢修・倉智敬一: 日産婦誌, **24**: 821, 1972.
- 4) Faiman, C. & Ryan, R. J.: Clin. Endocr., **27**: 444, 1967.

- 5) Marrian, G. F. : In Proceedings of Third International Congress in Biochemistry, p. 205, Brussels, 1955.
- 6) Matsuo, H., Baba, Y., Nair, R. M. G., Arimura, A. & Schally, A. : Biophys. Res. Commun., **43** : 1334, 1971.
- 7) Kastin, A. J., Schally, A. V., Gual, C., Midgley, Jr. A. R., Miller III, M. C. & Cabeza, A. : J. Clin. Invest., **50** : 1551, 1971.

(1973年6月30日特別掲載受付)