

尿中ゴナドトロピンの測定法について

京都大学医学部外科学教室第2講座 (指導 青柳安誠教授)

辻 秀 哉

〔原稿受付 昭和33年 月 日〕

A CONTRIBUTION TO THE ASSAY METHOD OF THE GONADOTROPIC SUBSTANCES IN HUMAN URINE

by

HIDEYA TSUII

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

Since the discovery of gonadotropic substances in the urine of nonpregnant women by ZONDEK et al. in 1930, many reports on the clinical use of these substances have been accumulated, but among the current routine assay methods, none is available as a simple, sensitive and accurate method, and this is chiefly because of the fact that there is no reliable international standard preparations of these substances.

Pituitary gonadotropin was estimated in our laboratory, as a chain of quantitative investigations of various hormones excreted in the urine of patients with mammary neoplastic diseases, to find out any abnormality of the endocrinological circumstances.

Since a cyclic excretion of gonadotropin during the menstrual period should be expected in adult woman, any sign of abnormality of this hormone is to be appreciated from data of its continuous estimation, and the present report is concerned with some current assay methods, whether they would be valid procedures for these purposes or not.

In order to concentrate the urinary gonadotropin, kaolin and florisil adsorption methods were employed, and for the assay methods of urinary extracts, the uterine weight method of intact immature female mouse and the chemical procedure which was to fractionated crude extract into two fractions of GA and GB, using column chromatography as described by CROOKE and BUTT (1953), were both employed.

(1) The kaolin procedure as described by BRADBURY et al. (1949) was researched, using the kaolin powder produced at ISHIZU SEIYAKU Co. Ltd.

The optimal pH of urine for the adsorption is considered to be from 3.0 to 5.5. when viewed from the standpoint of mouse uterine weight, GA and GB.

The time necessary for agitation of urine after adding kaolin suspension was

found to be over 10 minutes to get the complete adsorption of gonadotropin.

(2) FLORISIL (Floridin Co. Ltd.), a synthetic magnesium silicate was experimented as an adsorbing agent, and it was proved to be a simpler and more rapid procedure than the kaolin method.

(3) Uterine weight method was researched, using immature female mice of SH strain supplied by KITASHIRAKAWA MAUS IDENKENKYUSHO. The gonadotropin extracts obtained from human urine were usually administered to the mice five times during a period of 48 hours with intervals of over 9 hours, and they were killed with coal gas 72 hours after the first injection.

The difference between uterine increases in weight which were caused by administration of urinary extracts was tested about mice of various ages, and it was ascertained that the mice under 30 days of age showed no significant difference between uterine weight increases, while the mice over 33 days of age showed sensitive uterine responses. From this fact, the mice over 33 days of age are thought to be inadequate for the assay of gonadotropin.

Using immature female mice of 21 days old, individual divergences of the uterine weights after administering the gonadotropin, extracted from urine of normally menstruating women were examined in one experiment. The mean uterine weight was 17.5 mg. within the range from 12 mg. to 26 mg. The standard deviation γ was 4.3 and the mean error m was 1.3.

The dose-response curve for urinary gonadotropins of normally menstruating women of follicular and luteal phases and postmenopausal women were constructed and it was found that almost linear relationships exist between the log dose and the uterine weight, and no essential difference between these three curves could be found. The curves are considered to be able to use for the clinical estimation of female sexual cycles. In one case of a normally menstruating woman, urinary gonadotropin values were estimated during a menstrual cycle, employing these curves.

(4) The chemical assay method using a system of adsorption chromatography as described by Crooke and Butt was further investigated.

In one experiment, successive fractions of 2.5 ml. of eluate have been examined by orcinol reaction for hexoses. When these reactions were performed with the eluates of the column of tricalcium phosphate prepared by the method as described by SWINGLE and TISSELIUS and hyflosupercel using crude extracts of normal urine specimen, GA fraction showed relatively low concentration as compared with GB fraction. On the contrary, using the column of hyflosupercel only, the first eluate obtained by 0.002 M disodium hydrogen phosphate showed higher concentration than the second eluate obtained by 0.02 M of trisodium hydrogen phosphate. These results show that the column of hyflosupercel has poorer fractionating activity than that of tricalcium phosphate and hyflosupercel.

Orcinol reaction and anthrone reaction were investigated using glucose as standard, and anthrone reaction revealed to be more sensitive than orcinol reaction and this reaction was able to be utilized for the hexoses of GA and GB solution.

(5) Some clinical data of normal and abnormal excretion rate of gonadotropin

during menstrual cycles are as follows: Normal women excrete 4~12 m.u.u./day of gonadotropin during follicular and luteal phases and 12~48 m.u.u./day in the ovulatory period. Normal excretion curves during menstrual cycles have usually one peak about two weeks before the onset of the next menstruation, and one or more peaks during the luteal phase. The excretion value of normal adult male is 4~8 m. u. u./day.

The relationship between the mouse uterine weight method and chemical procedure was investigated. GA curves had some reference to that of uterine method but GB curves were always unstable. From this fact GB fraction is supposed to be contaminated with other glycoproteins.

Some pathologic excretion values such as the patients with parasellar teratoma, craniopharyngioma, eosinophile hypophyseal adenoma, acromikry, acromikroid, adiposogenital syndrome, seminoma, Simmonds's syndromes, anorexia nervosa, Basedow's disease and hyperthyroidism were described.

目 次

緒 言

第1章 尿中ゴナドトロピンの抽出法及び検定法について

第1節 抽出法

第2節 検定法

第3節 抽出法の検討

1. カオリン吸着法

a) カオリン吸着時の攪拌時間について

b) カオリン吸着法のGTP回収率

2. フロリザール吸着法について

第4節 検定法の検討

1. 幼若雌マウス子宮重量法の検討

a) GTP 投与マウスの生後日数による反応

子宮重量の差異

b) GTP 投与によるマウス 子宮重量増加の 個体差について

c) GTC 投与量と子宮重量との 相関々係に つて

2. クロマトグラフィー分画GA, GBについて

第2章 測定成績

1. 健常婦人月経周期間の連続測定

2. 異常月経婦人の連続測定

3. 各種内分泌疾患々者の尿中 GTP

第3章 考 察

結 論

緒 言

ゴナドトロピン（以下 GTP と略記）はそれが分泌される組織によって、下垂体性 GTP と絨毛性 GTP とに大別され、下垂体性 GTP は更に卵胞刺激ホルモン（FSH）、間質刺激ホルモン（ICSH又は LH）及び黄体持続ホルモン（LTH又は Prolactin）に分類されている。

健常な婦人尿中に下垂体性 GTP が排泄されていることは Zondek et al.(1930)が初めて動物検定で確認し、以来その測定法及び測定成績に関しては多数の報告が行われて来たのであるが、FSH、ICSH の国際標準単位が決定されていない現状では、尿中に於ける各

分屑の分離測定はその確認が困難であり、報告者によつてその成績も一定していない状態である。

われわれは乳腺腫瘍患者に於いて性腺に関するホルモンのバランスを追求しているのであるが、その一環として尿中に於ける下垂体性 GTP の測定を行つた。成熟婦人に於いては性周期と共に GTP の尿中排泄が変動することは当然予想されることであり、連続的に測定することによつて初めてその異常が論じ得られるものとするのである。われわれはこの目的に沿うてまず測定法の検討を行つたが、GTP の各分屑の分離測定を連続的に行うことは困難であるから全 GTP として測定した。そして又 Crooke & Butt (1953) がクロマトグラフィー操作によつて分離したゴナドトロピ

ンA(GA), ゴナドトロピン B(GB) についての検討も併せて行つたのである。

第1章 尿中 GTP の抽出法及び検定法について

Zondek et al. (1945) が絨毛性 GTP 製剤を用いた実験によると、体内循環 GTP の約 5~10% が尿中に排泄されるといわれている。下垂体性 GTP についてのこの種の実験は未だ見られていないのであるが、尿中に排泄されるのは通常微量であるから測定に先立つて行われる抽出法が適当なものでなければならないのである。従つてその測定法は抽出法と検定法の2段階に分けられるべきものである。

第1節 抽出法

Zondek et al. (1929) がアルコール沈澱法を記載してから、Katzman(1932), Levin et al. (1937), Klinefelter et al. (1934), Bradbury et al. (1949) 等が抽出法の改良を行つている。その何れも GTP がエタノール、アセトン或いはエーテルによつて、変性を起すことなく沈澱する水溶性蛋白質である事実を応用している。そこでわれわれは Bradbury et al. (1949) の記載したカオリン吸着法を検討し、更に次の如く改良して応用したのである。

カオリン懸濁液：石津製薬カオリンを1規定塩酸で洗滌後、水洗を充分行つて、pH 5.0 で 20% 懸濁液として保存する。

- 1) 被検尿 (通常48時間尿の半量) を氷酢酸で pH 4.5 とし濾紙で濾過。
- 2) 上記のカオリン懸濁液を尿量の 5% の割合に添加して20分攪拌。
- 3) 氷室に静置、沈澱完了後、上清を棄却。
- 4) 沈澱したカオリンに pH 5.0 の酢酸水を尿量の2倍量加えて再浮遊させ静置、之を2回繰り返しカオリンの洗滌を行う。
- 5) 遠沈によつてカオリンを集め、之に1規定アムモニア水を尿原量の 5% の割合に添加 (pH 11.4) し、充分攪拌後時々振盪しつつ20分後に遠沈、上清を採取。この操作を2回繰りかえして GTP を抽出。
- 6) 上清アムモニア抽出液を酢酸で pH 8.5 (氷槽内で行う) にし、遠沈によつて生じた沈澱を除去。
- 7) 上清を更に pH 5.5 とし、氷槽内で冷却、攪拌しながら95%エタノールを4倍量加え24時間氷室に保存。

8) 生じた沈澱物を遠沈によつて集め、

9) 沈澱物に5.0 ccエーテルを加え再浮遊させ遠沈、

10) 沈澱物は粗GTPである。

11) 化学的検定を行う場合には可及的不純物を除去するために更に1.0 ccの蒸留水に溶解し、不純物を遠沈除去し、これに5倍量のアセトンを加え再沈澱させる。沈澱物は塩化カルシウム乾燥器中で保存。

第2節 検定法

GTP の検定法は、生物学的検定法と化学的検定法に大別されるが、生物学的検定法では一般に齧歯類が検定用に用いられ、幼若か或は下垂体を除去するかして、その動物自身の GTP の影響を除き、之に被検体を投与してその性腺及び副性腺の反応を計量的に観るものであり、化学的検定法は粗 GTP をクロマトグラフ操作で更に精製し、その構成成分について呈色反応により比色定量を行うものである。

われわれは生物学的検定法として、幼若雌マウス子宮重量法を用い、この結果と化学的測定法によつての測定値と比較しその相互の関聯性を検討した。

1) 幼若雌マウス子宮重量増加法。

生後20~25日、体重10mg以下の近親系マウス (SH系：北白川マウス遺伝研究所) を用いた。この生後日数に於ける未処置雌マウス10匹の平均子宮重量は5.2 ± 1.3mgであつた。

被検体の調製：24時間尿からカオリン吸着法で得た粗GTPをメスピベットを用いて4.0 ccの生理的食塩水に溶解し、不溶物を遠沈除去して、上清を2.0 ccづつの2つに分け、一方の2.0 cc からまず1.0 cc と0.5 cc を採り残つた0.5 cc を更に稀釈して3.0 cc とし、これから再び1.0 cc と0.5 cc を採り、残りは棄てる。即ちこれら4個の溶液は24時間尿抽出物の $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{24}$, $\frac{1}{48}$ となるわけである。注射に便利なものとするために0.5 cc の2個には更に0.5 cc づつ生理的食塩水を加えて1.0 cc とする。そして残つている他の2.0 cc の液も同様に分割、稀釈することによつて同一稀釈量各2個づつとなしこれをそれぞれ2匹の動物に投与してその反応子宮の重量平均値をとり動物の個体差による誤差を可及的少なくするのである。

注射方法：上記8個の溶液と、対照としての2個の生理的食塩水とをそれぞれ10匹の幼若雌マウスに5回に亘つて分割注射。即ち被検液1.0 cc から0.2 cc、づつ1日2回9時間以上の間隔をおいて2日間、更に3日目に1回と皮下注射を行つて合計1.0 cc の注射を完了

した後、最終回注射後24時間目、即ち注射開始後72時間目に石炭ガスで屠殺し子宮を計量する。

計量法：子宮は頸部に於いて切り、卵巣及び子宮附属器を除去し縦切開を行つて内容液を濾紙で吸い取つた後直ちにトーザンバランスで計量する。

判定：同一稀釈量の被検液を投与した2匹のマウスの平均子宮重量が、生理的食塩水のみを注射した対照動物の平均子宮重量に比較して100%の増加を来したことを以つて陽性反応とし、陽性を示した最小投与量と、陰性を示した最大投与量を以てそのGTP量を現示した。例えば24時間尿抽出粗GTPの稀釈溶液4個を投与したマウスのうち、高濃度の2個、即ち $\frac{1}{4}$ と $\frac{1}{8}$ の被検体に対して陽性反応を示し、 $\frac{1}{2}$ と $\frac{1}{48}$ の被検体に対して陰性反応であつた場合、その24時間尿中には少なくとも8マウス子宮単位(muu)以上、24マウス子宮単位以下のGTPを含んでいると判定するわけである。

(2) 化学的測定法

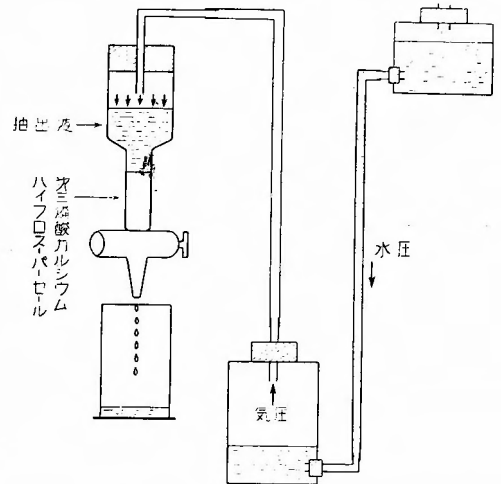
カオリン吸着法で得たものを更にアセトン処理を施した粗GTP (Crude Gonadotropin) を第三磷酸カルシウム吸着柱によつて分画に分ける。

吸着剤である第三磷酸カルシウムの調製法は Swingle & Tiselius の方法によつた。即ち400ccの蒸留水に90gmの純蔗糖を溶解し、これに生石灰15 gmを加えて30分間振盪すると大部分の生石灰は溶解するが、これを濾紙を用いて濾過し、不溶生石灰を除去し、濾液を水槽で冷却する。この濾液に攪拌を行いながら濃磷酸約10ccを徐々に1時間に亘つて滴下し、pH 9.5とする。濃磷酸を滴下するにつれて白い雲絮状の沈殿物が生ずるが、磷酸添加を終つてから更に1時間攪拌を行なう。この沈殿物が第三磷酸カルシウムである。之を大量の蒸留水で洗滌し、蔗糖を洗い去る。通常5 l. づゝ約10回洗滌すれば糖反応は殆んど消失する。これはGTP分画に対する糖反応に支障を来さないために行うものである。かくして洗滌を完了すれば、これを1 l. の蒸留水に懸濁して保存し、用に臨んで使用する。

吸着柱の作製：第三磷酸カルシウム懸濁液10ccとハイフろスーパーセル2.0 gmとを混合し、暫時静置し粗大な粒子を沈殿させた後第1図に示すような高さ10 cm直径1.0 cmの吸着管に4 cm Hgの加圧のもとで充填する。

吸着柱上端の水が吸入され終ると、更に約3 kgの圧力で吸着柱を密にし高さ6.0 cmとし、0.9%食塩水15ccを流し吸着柱の活性化を行なう。

第 1 図



クロマトグラフィー操作：粗GTPを0.002M 第二磷酸ソーダ液1.0 ccに溶解、不溶物を遠沈除去した上清を吸着柱に流す。この液が吸入されると直ちに0.002 M第二磷酸ソーダ溶液15cc.を添加し4 cm Hgの加圧のもとに抽出を行なう。これで得た抽出物をゴナドトロピンA (GA) とする。0.002 M第二磷酸ソーダ液の抽出が完了したら直ちに0.02 M第三磷酸ソーダ液15cc.を加え、同じ加圧で更に抽出を行なうのである。これによつて得た抽出物をゴナドトロピン B (GB) と名付ける。これらのGA, GB 各分画について、その遊離アミノ基に対してはニンヒドリン反応を、六炭糖に対してはオルシノール反応或いはアンスロン反応を用いて比色定量を行うのであるが、これらの比色定量法は次の通りである。

ニンヒドリン反応：被検液1.0ccに0.05%アスコルビン酸溶液0.2cc., ピリジン0.5cc. 1%ニンヒドリン溶液0.2cc.を加え、沸騰浴25分後流水で冷却し、分光々度計(島津QB50型)を用い波長570 mμで比色する。標準にはグリシンを用いた。

オルシノール反応：被検液1.0ccに1.6%のオルシノールを含有した30%硫酸液1.0cc.を加え、更に80v/v%硫酸3.0cc.を加えた後80°C (±0.5°) 30分間温浴、その後流水で冷却し、波長520 mμで比色。葡萄糖を標準とした。

アンスロン反応：被検液1.0ccに0.2%アンスロンを含有した95%硫酸溶液3.0 ccを加え100°C沸騰浴10分間、その後流水で冷却し波長620 mμで比色。葡萄糖を

標準とした。

以上は測定操作の概要であるが従来の測定法の詳細を検討し、不備な点或いは煩雑な点について改良を行ったのである。

第3節 各種抽出法の検討。

1. カオリン吸着法

この方法による操作中に GTP の回収率に影響する要素はいろいろ考えられるが、われわれはカオリンの性状、カオリン吸着時の尿 pH、尿にカオリンを添加後の攪拌時間、GTP 吸着後のカオリン洗滌液の有する pH 等について検討した。

われわれが用いたカオリン（石津製薬製品）の GTP を吸着するに至適 pH を求める実験を 1 回行つたがマウス子宮重量法、GA、GBの結果から pH 3.0~pH 5.0 の範囲で良好な結果を示しており、これは Bradbury et al. の成績と一致した。

攪拌時間：尿にカオリンを添加した後、攪拌して GTP の吸着を完成させるに要する時間の検討を行なつた。閉経期の婦人尿 1200 cc から 200 cc づつ 6 個とり、カオリン添加後、それぞれ 3, 5, 10, 20, 40, 60 分づつ攪拌し、各々から得た抽出物の GTP をマウス子宮重量 (U. wt.) 卵巣重量 (O. wt.) によつて比較した成績は第 1 表の如くであつた。即ち 10 分以上攪拌を行なつたものでは良好な GTP 回収が行われていると考えられる。この結果からわれわれは爾後の実験に際しては 20 分間の攪拌を以つて必要且つ充分な攪拌時間とした。

第 1 表 カオリン添加後尿攪拌時間と GTP 回収量

時 間 (分)	U. wt. (mg)	O. wt. (mg)
3分	8	7
5分	19	7
10分	36	15
20分	30	8
40分	34	9
60分	46	10

洗滌液の pH：尿の毒性を除去するための吸着カオリン洗滌液の pH は 1 回の実験で酢酸酸性 pH 5.5 の溶液によるのが GTP の回収率が最良好で且つ動物実験に於いて毒性を示さなかつた。

回収率：われわれの用いた石津製薬カオリンの GTP 回収率を検討するために次のような実験を行つた。即ち閉経期の婦人尿 1000 cc からカオリン吸着法によつ

第 2 表 カオリン吸着法の GTP 回収率試験
No. 1

原 尿 量	対 照	再 抽 出 物
300	+	+
100	+	-
50	+	-
25	-	-

No. 2

シナホリン	対 照	再 抽 出 物
5 Ru	+	+
3 Ru	+	-
1 Ru	+	-
0.5 Ru	±	-

て粗 GTP を分離し、之を 2 等分して一方を対照とし、他方を再び 500 cc の蒸留水に溶かし、再度カオリン吸着法の操作を行なつて、両者と動物検定によつて比較した。これらはそれぞれ原尿 500 cc からの抽出物であるから、これを 300, 100, 50, 25. cc の原尿量に相当するように分割し、それぞれをマウスに注射してその子宮重量を測定したのである。この成績は第 2 表 No. 1 の如くである。これによると、対照では 50 cc で初めて陽性反応を示し、再抽出物では 300 cc で初めて陽性反応を示している。即ち回収率は約 $\frac{1}{6}$ である。又協力性 GTP 製剤シナホリン（帝國臓器）〔絨毛性 GTP 9:下垂体性 GTP 1〕を用いて半量を対照に、半量をカオリン吸着操作を行つて回収率を検討した結果は、第 2 表 No. 2 の如くであり 5 R.u. よりの再抽出物が対照のほぼ 1 R.u. に相当し、回収率は約 $\frac{1}{6}$ と考えられた。即ち以上の結果からカオリン法の回収率は約 $\frac{1}{6}$ から $\frac{1}{6}$ とみなしてよろしいものであろう。

製品による回収率の差を丸石製品と石津製品を用いて比較したが前者製品は低い回収率を示した。

又アルコール沈澱法 (Klinefelter et al. 1943) とカオリン法の回収率を比較した実験ではアルコール法が高い収量を示している。

カオリン法の回収率が $\frac{1}{6}$ から $\frac{1}{6}$ の範囲を示しているのは抽出操作自身の回収率が動揺するのではなく、その検定法の欠陥によるものであると考えられる。又アルコール法よりも低い回収率を示しているが Bradbury も述べているようにカオリン法はアルコール法に比較して 10 分の 1 にアルコールが節約出来るのでわれ

われもカオリン法を用いたのである。

2. 合成吸着剤フロリザール抽出法.

GTP の吸着剤としてカオリンのほかにタンニン酸 (Levin et al. 1937), パームチット (Taubert et al. 1956), 水酸化アルミニウム (Malburg et al. 1954), その他 Adsormon (Jungeck 1956)等が報告されているが、いずれも回収率が低いことや、毒性除去が困難であり、或いは吸着力が強過ぎて抽出操作が煩雑である等の理由で、現在カオリン法が最も広く用いられているようである。一方に於いてカオリンは天然産物であり珪酸アルミナを主成分としているが夾雑物が多く含まれているから、Malburg et al も指摘している通りその製品によつて吸着能力に差がある。このことはわれわれも亦丸石製薬製品と石津製薬製品とを用いて比較した実験によつて立証した。そのためこの欠点を補うべきものとして Florisil (Floridin Co. Ltd.) を尿中 GTP の吸着剤として用いたのである。フロリザールは合成珪酸マグネシウムであつて、われわれが用いた 60~100 メッシュの粉末は吸着柱にも応用出来る可能性を示した。

抽出法

1. 酢酸々性尿 (pH 4.5) を濾過
2. 尿量に 1 % の割合にフロリザール末を加え攪拌 20 分間。
3. 約 10 分間静置すればフロリザール末は沈澱を完了するから上清を棄却。
4. 酢酸々性液 pH 5.5 の液でフロリザールを洗滌、之を 2 回繰りかえす。
5. 遠沈、上清棄却後 1N アムモニア水を原尿量の 5 % の割合に加えて振盪し 10 分後に上清を採取、之を 2 回繰りかえす。
6. 上清を集め氷酢酸で pH 8.5 とすれば沈澱が生じるが之を遠沈除去
7. 上清を pH 5.0 とし 95 % アルコールを 4 倍量徐々

に加える。

8. 一昼夜氷室に静置沈澱を集める。

9. 沈澱をエーテルに再浮遊させ再び遠沈。

10. 沈澱物を塩化カルシウムデシケーター中で乾燥
このものはマウス子宮重量法によつて GTP 作用を現わした。

フロリザール吸着柱法：フロリザール 2.0 gm を内径 0.7 cm の吸着管に充填し、酢酸々性尿 (pH 4.5) を流し、吸着をおこさせた後、蒸溜水 100 cc で吸着柱の洗滌を行ない、その後 1N アムモニア水 20 cc を以つて抽出をおこなつたが、尿色を帯びた褐色帯がアムモニア水の展開につれて下方に移動し 1N アムモニア水 10 cc で褐色帯の溶出が終る。この抽出液を酢酸で pH 5.5 とし、4 倍量の 95 % エタノールで沈澱させ、更にエーテルで再沈澱させた後、乾燥した物質は、幼若雌マウス子宮重量法によつて GTP 作用を認めた。ただこの際、塩類を多量に含んだ塩基性の強い尿では酢酸を加えることによつて気泡を生じ更にフロリザール末と接触することで気泡発生が強化されるのでこのため尿の流出速度が遅延するのである。このことは吸着能に影響を与えらると思われる。気泡発生阻止については今後解決すべき問題である。

以上の実験でフロリザールは尿中 GTP の吸着剤として有効な物質であることが判明したので、このものの吸着時の尿の至適 pH, 回収率, 吸着柱による分割の検討を行なつた。

フロリザール吸着の至適 pH ;

フロリザール末による GTP 吸着の至適 pH を攪拌法により、マウス子宮重量法で検討した成績は、第 3 表の如く pH 3.0 から pH 6.0 の範囲で子宮重量は増加し、良好な GTP 吸着を認めた。

回収量の比較：カオリン法、フロリザール粉末攪拌法、フロリザール吸着柱法を用いた場合の GTP 回収量の比較をマウス子宮重量法によつて行つた。第 4 表

第 3 表 尿 pH の変化によるフロリザール吸着力の差異

実験番号	フロリザール吸着時尿 pH						対照マウス 子宮重量 (mg)
	3.0	4.4	5.0	6.0	6.8	8.0	
I		16		37	13	10	5
II	30	54	16	20		7	5
III		7		10	5	7	6
IV	19	17	15	6		6	6

数字は幼若雌マウス子宮重量

第4表 吸着剤, 吸着方法によるGTP回収率の比較

実験番号	マウス子宮重量 (mg)			
	1	2	3	4
カオリン懸濁液	48	23	25	7
フロリヂール粉末	52	40	22	9
フロリヂール吸着柱	32	17	15	5

はその実験成績を示したものであるが, 各種の尿 (閉経期, 健常婦人, 乳腺腫瘍患者) からの尿200 ccづつを用いて4回行つた結果からみると, フロリヂール粉末攪拌法を用いた場合に, 子宮重量が常に最高値を示しており, カオリン法フロリヂール吸着柱法の順であつた。後述するように重量値の多い程 GTP 量は多いと考えられるから, フロリヂール粉末を用いた攪拌法が最高収量を示すものと考えられる。

フロリヂール吸着柱の分割: フロリヂール柱に尿を流して吸着をおこさせ, これを1Nアムモニア水で溶出し, この溶出液を2.0 cc づつ連続的に分割採集した10ヶの分割について, その1.0 cc を動物検定による子宮重量及び卵巣重量を残りの1.0 cc を化学的検定法によるGA, GBについて観察した成績は, 第5表に示す通りである。即ち子宮重量とGBは第3の分割 (6.0cc目の分割) で最高値を示し, GAは第5分割10.0 cc目の分割で最高値を示した。又1Nアムモニア水12 cc 以上の溶出液ではGTPの作用は認めないので10 cc で抽出は完了したものと考えられる。又GTPの移動はほぼ尿色と共に行われる。

フロリヂール抽出法による測定例;

34才健常婦人48時間尿のうち, その $\frac{1}{6}$ (即ち8時間尿相当量) からフロリヂール攪拌法でGTPを抽出し, これの半量づつ (即ち4時間尿分の抽出物) を2匹の幼若雌マウスに投与して, 平均子宮重量を観た。この測定を月経周期間に亘つて行い, その重量値を表に示すと第6表のようになり, 試みにこの重量値を以つて曲線を描くと第2図のように次回月経前17日と6日目に子宮重量の著明な増加を認める。個々の点は4時間尿抽出物に反応した子宮重量値であり従つてこの曲線はGTP排泄曲線とは云えないが, 後述する子宮重量増加法の曲線と類似していることは興味のあることである。

以上の結果からフロリヂール法は有効な尿中GTP抽出法である。カオリンよりも粒子が粗大であるために沈澱時間が非常に短縮され, 操作全体が簡易化されることは腐敗変性を起し易い蛋白ホルモンであるGTPにとつては優れた方法であると云える。

第4節 検討法の検討

1. 幼若マウス子宮重量法の検討

第2図



第5表 フロリヂール吸着柱の連続的分割採取によるGTPの消長

分割番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
尿色	+	++	+++	+++	++	++	++	+	+	±
濁濁	-	+	+++	+++	+	-	-	-	-	-
pH	6	6	9.6	11	11.4	11.4	11.4	11.6	11.6	11.6
U. wt.	4	5	22	12	7	6	6	4	6	4
O. wt.	4	6	6	6	5	5	5	5	7	4
GA	0	4	12	24	29	0	0	0	0	0
GB	0	15	25	20	11	0	0	0	0	0

第6表 フロリヂール吸着法による抽出GTP投与時の幼若雌マウス子宮重量

次回月経前日数	21	19	17	15	13	11	9	7	5	3	1
幼若雌マウス子宮重量 (mg)	32	10	52	31	8	18	24	29	62	34	33

第7表 GTP 投与時のマウス年令差に依る子宮重量の変動

実験番号	生 後 日 数						
	21	24	27	30	33	35	
1	16	22	7	14	42	51	子宮重量 mg
2	20	19	25	23	28	30	
平均	18	20.5	16	18.5	35.5	40.5	

a) GTP 投与マウスの生後日数による反応子宮重量の差異について。

GTP の生物学的測定に当つて幼若動物を用いるのは、動物自身の下垂体からの GTP 分泌を無視出来ることを前提としているのであるが、マウスは生後35日では成熟すると云われているので、その前後に下垂体からの GTP 分泌が始まっていると考えられる。生後21日～23日の未処置幼若雌マウス10匹の平均子宮重量は5.2mg. (±1.3) であつた(前述)が、生後日数と子宮の感受性を検討する為、次の実験を行つた。即ち生後21日、24日、27日、30日、33日、35日のマウス2匹づつに同一尿より抽出した GTP を等量づつ3日間に亘り注射し、注射開始後72時間目にその子宮重量を計量した。第7表はその成績を示したものであり、21

日から30日迄のマウスでは平均子宮重量に大差が認められず、生後33日、35日のものでは前者のものより増加を示した。この関係をグラフに描くと第3図の如くなり、33日以後のものは未成熟マウスと考えられない。われわれの用いたマウスは通常23日以前のものであり、又これ等の体重は全て8～10mgであつた。

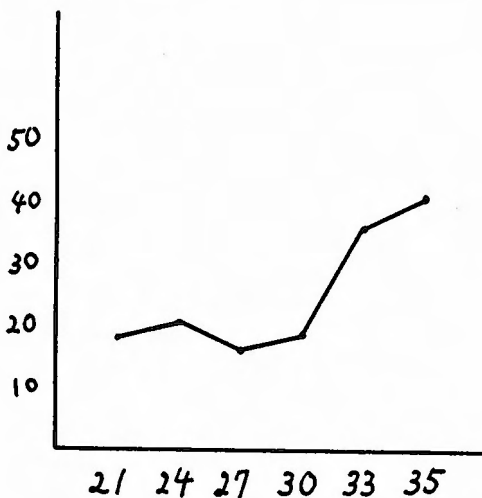
b) GTP に対する反応子宮重量のマウス個体差について。

健常婦人尿 4 l. から抽出した下垂体性GTPを11に等分し、これを生後21日の均一系雌マウスに3日間3回に注射し、注射開始後72時間でその子宮重量を計量し、重量の差を見た。この実験でのマウス子宮重量は最高26mg 最低12mg であり、平均17.5mgであつた。又標準偏差 γ は4.3、平均誤差 m は1.3であつた。子宮重量17.5mgはGTP 陽性反応であり、この程度に反応した子宮重量は8.5mgの誤差を考えねばならない。

c) GTP投与量と子宮重量の相関関係

前述の方法では1回の測定によつて増加、正常、或は減少の判別が出来るにとどまり、的確な排泄量を知り得ない。それで投与 GTP 量と反応子宮重量の間に何等かの関係があれば、この関係を利用して子宮重量から GTP 量を推定する事が可能である。そこでわれわれは20～40才の健常と考えられる婦人尿 3.6l からカオリン吸着法で粗GTPを抽出し、Brown et al (1955)の方法でGTPの精製を行つてこれをマウスに投与し、その子宮重量の用量反応率曲線の作成を試みた。即ち粗 GTP を pH 8.5 の磷酸緩衝液に再浮遊させ、不溶物を遠沈除去後、第三磷酸カルシウム浮遊液を原尿量 100cc に対し、1.0 cc の割合に加えて5分間攪拌遠沈し、その上清 (Butt & Crooke のGAに相当) を、原尿量の 60cc, 360cc, 600cc に相当する量をそれぞれ各3ヶ

第3図 GTP投与時のマウス年令差に依る子宮重量の変動



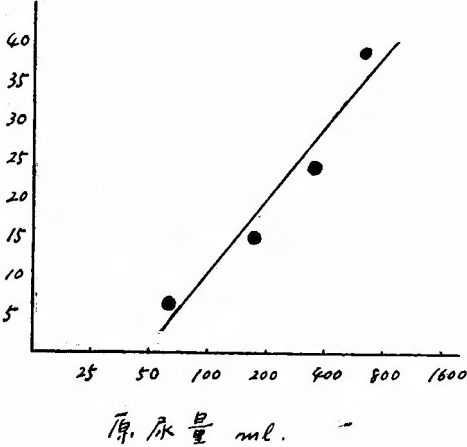
第8表 生後21日雌マウスに正常婦人尿 4l. より抽出した GTP を等分に分割投与した際の子宮重量差

マウス番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	平均
子宮重量 mg	19	17	13	12	19	16	13	17	25	16	26	17.5

第9表 24才～40才正常婦人尿中ゴナドトロピンに反応マウス子宮重量

原 尿 量 cc	平均子宮重量 mg
60	7
180	15
360	24
600	38

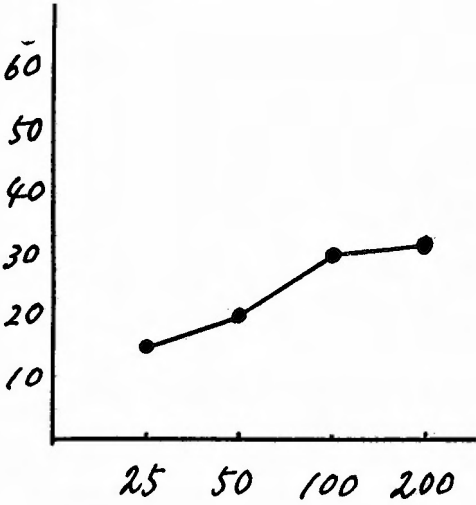
第4図 24才～40才正常婦人尿中ゴナドトロピン投与量反応率曲線



第10表 閉経期婦人尿尿量反応子宮重量

尿 量 cc	子 宮 重 量 mg			平 均
	I	II	III	
25	13	16	16	15
50	19	18	24	20.3
100	37	23	29	29.8
200	36	26	33	31.8

第5図 標準閉経期尿量-反応率曲線



第11表 卵胞期婦人尿尿量反応子宮重量

尿 量	子 宮 重 量 (mg)								平 均
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
25	4	3	5	4	5	4			4.4
50	6	4	8	12	4	5			6.4
100	17	10	19	37	9	25	11	19	18.4
200	23		20	43	16	53	18	36	29.8
400			24	50	23	61	29	31	36.6
800			63	46	58	69	72		61.6

第12表 黄体期婦人尿尿量反応子宮重量

尿 量	子 宮 重 量 (mg)							平 均
	I	II	III	IV	V	VI	VII	
25	5		4		5			4.9
50	6		5		5			5.2
100	11	24	18	13	28	16	19	18.5
200	27	31	26	28	42	20	25	28.4
400	44	43	28	33	61	31	46	40.9
800		67		64	73	33	52	57.8

づつに分け、それぞれをSH系生後21~23日の幼若雌マウスに5回、48時間に亘り分割注射し、注射開始後72時間目にその子宮重量を計量した。同一投与量に対する3匹のマウスの平均子宮重量は第9表の如くそれぞれ7mg, 15mg, 24mg, 38mgであり、原尿量の対数値に対する子宮重量の関係は第4図のようにほぼ直線的であつた。

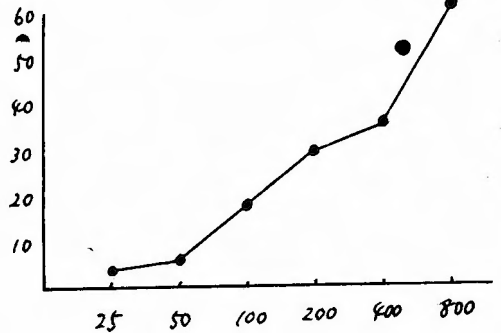
同様の実験を閉経期婦人5名、健常卵胞期婦人15名及び健常黄体期婦人15名から得たそれぞれの尿5L, 10L及び10Lについて行つた成績は第10表、第11表、第12表の如くである。即ち同一投与量に反応した平均子宮重量は原尿量の対数値に対し、第5図、第6図、第7図のようにほぼ直線的に増加した。即ちこれ等4ケの用量反応率曲線（第5. 第6. 第7図）の増加率は多少異つてゐるが、成熟婦人卵胞期と黄体期のGTPには子宮重量法に於ては本質的な相異は認められない。

これらの標準曲線を用いて逆に24時間尿抽出物中のGTP量を推定することは可能であると考えるのである。第8図は22才健常婦人について本法を用い、月経周期間連続測定を行つた結果の曲線であり、第9図はマストバチー患者4例の、第10図は成熟期に於ける乳癌患者3例の測定成績である。これらの結果をみると、ほぼ排卵期に相当してGTPの増加がみられ、又月経前期に増加がみられる場合もある。そしてこれはGTP排泄曲線と考えられ臨床的に充分利用出来るものである。

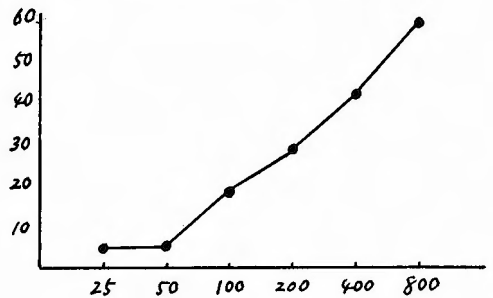
2 クロマトグラフィー分画GA, GBについて

粗GTPからGA, GB分画を得るクロマトグラフィーの検討を行うために、次の実験を行つた。即ち健常婦人尿から得た粗GTPを、第三磷酸カルシウムハイフロスーパーセル系吸着柱で吸着させ、0.002 M 第二磷酸ソーダ液15.0cc次いで0.02 M 第三磷酸ソーダ液15.0 ccで抽出、この抽出液を2.5 cc づつ12本の試験管に分割採集して、その各々についてオルシノール反応及びニンヒドリン反応で呈色し、その吸光度をもつて曲線を描くと第11図のようになる。この結果からみるとGA分画、GB分画、共に抽出を完了するためにはそれぞれ

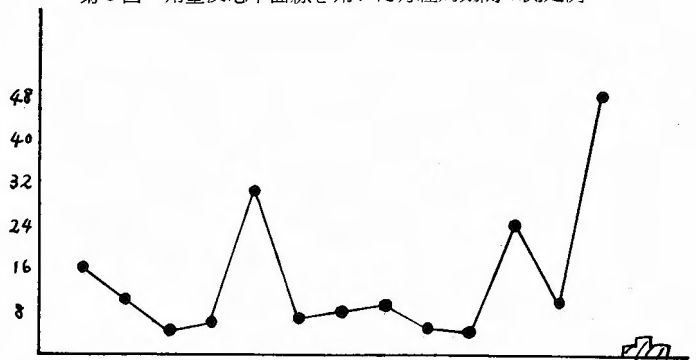
第6図 標準卵胞期尿 用量-反応率曲線



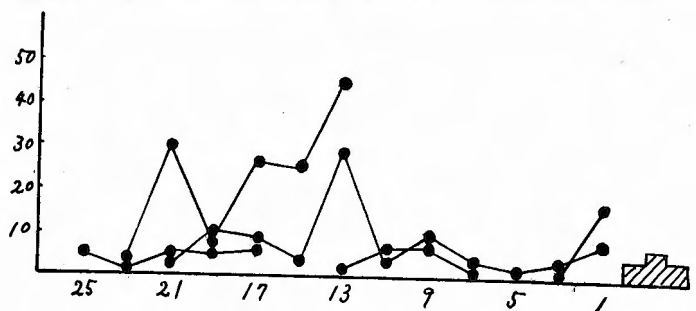
第7図 標準黄体期尿 用量-反応率曲線



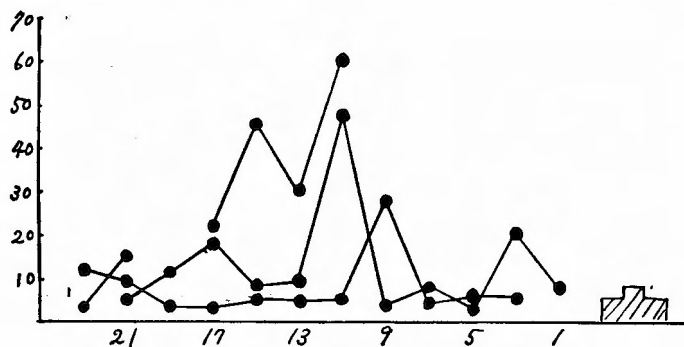
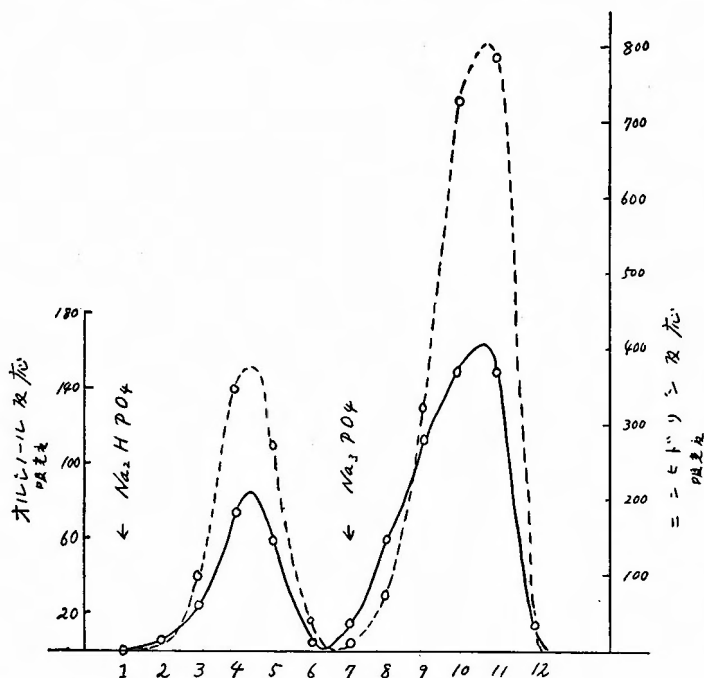
第8図 用量反応率曲線を用いた月経周期間の測定例



第9図 マストバチー患者4例の尿中GTP(用量反応率曲線による)



第10図 若年者乳癌者3例の尿中GTP (用量反応率曲線による)

第11図 第3 磷酸カルシウム } 吸着柱分画(2.5cc)
ハイフろスーパースセル }

の抽出液15ccを必要とすることがわかり、又ヘキソーズ、遊離アミノ酸共にGAよりもGBに多く含まれる結果を示した。

この実験と同一の尿を用いて得た粗 GTP をハイフろスーパースセルのみを用いた吸着柱(梶原他)によつて同様に分割採集したものをオルシノール反応で呈色させ吸光度のグラフを描いた。第12図はその成績である。この場合GB分割に相当するものはGA相当物質に比べてヘキソーズ量は非常に少量であつて、Crooke 等のGA, GB と同一物とは考えられない。

吸着柱の作製に當つて、吸着剤の充填を $3.0\text{kg}/\text{cm}^2$ の加圧のもとに作つた場合 (Swingle et al 1950) と 4.0cm 水銀柱 ($54\text{mg}/\text{cm}^2$) の加圧による充填の場合に得たGA, GB 値に差は認めなかつた。

オルシノール反応とアンスロン反応：われわれはGA, GBの糖反応としてアンスロン反応をも用いたが、葡萄糖を標準として両反応を行なつた吸光度曲線は第13図の如くであり、アンスロン反応が敏感に発色する結果を得た。

第2章 測定成績

上述のような検討結果にもとづいて、従来から行われている幼若雌マウス子宮重量法、われわれの作成した用量反応率の標準曲線を用いる測定法及び Crooke 等の GA, GB を用いて、健常婦人異常月経婦人について測定を行つた。特に現在わが国で充分な検討が行なわれることなく広く利用されているGA, GBの化学的測定法による結果とマウス子宮重量法の結果とを連続的に比較観察し、化学的測定法が意義のある方法であるかどうかを検討したのである。それはGA, GBの化学的純粋単一性の確証がない現在、従来の動物検定による成績のうらづけがなければならぬと考えるからである。

① 又各種内分泌疾患患者の GTP 排

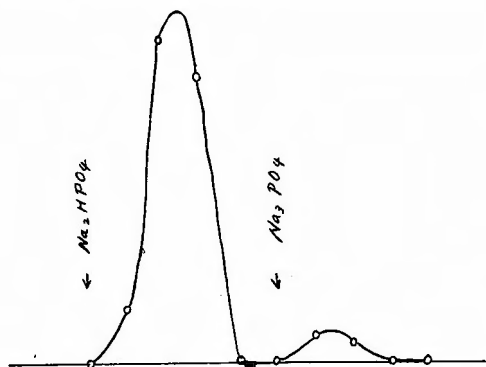
泄量の測定を行なつたので、それら疾患と下垂体機能との関連性について考察を加えながら記述する。

a) 健常婦人の尿中 GTP 排泄値

1) 34才既婚婦人

月経終了時から次回月経開始までを連続測定した成績は第14図の通りである。これは従来から行なわれている幼若雌マウス子宮重量法によつたものである。卵胞期には $4\text{muu}/24\text{hr}$ の低値を示し、排卵前2か日から増加を始め、排卵日と思われる日に $24\sim 48\text{muu}/24\text{hr}$ のピーク値を示した後、黄体期に移行し、この

第12図 ハイフロスーパーセル吸着柱分画(3.0cc) 使用尿量 1000cc



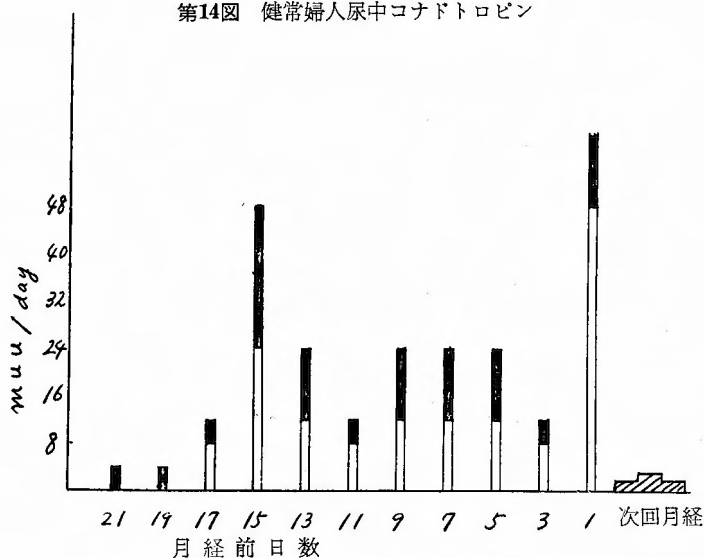
期間中は12~24muu/24hr.の比較的増加を続けた後、月経前日に再び48muu/24hr.以上のピーク値を示している。

2) 22才未婚健常婦人

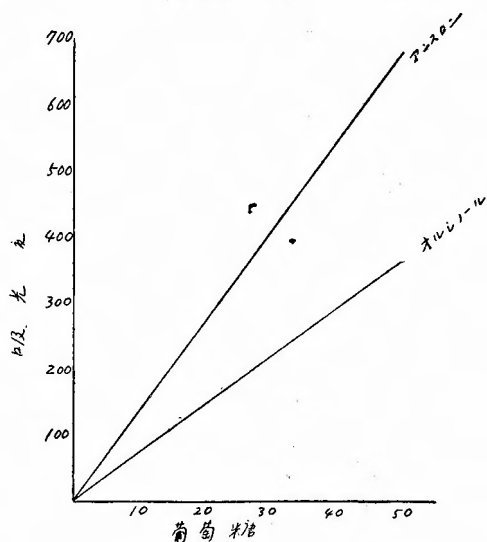
この成績は第15図に示す通りである。

卵胞期には4~8muu/24hr.を持続し、排卵期と考えられる時期(次回月経前14日)に24~48muu/24hr.を、黄体期に再び4~8muu/24hr.又は4muu/24hr.以下に下降し、月経前4日に8~12muu/24hr.とやや増加した値を示した後、再び下降して月経に移行した。この例では同一尿100ccから化学的測定法によつてGA, GBをオルシノール反応を用いて測定した。GAは動物検定の排卵期と同日にピーク値を示し、又その4日後に再び増加し、更に月経前4日から増加を示している。

第14図 健常婦人尿中ゴナドトロピン



第13図 アンスロン } 吸光反曲線
オルシノール }



ピーク値以外の1日量は200~500γでピーク値には600~1200γの値を示している。GB値もほぼ同様の値を示したがピーク値のづれがみられ、曲線全体の性格としてはGA曲線の方が、動物検定の結果とより類似することが認められた。

3) 25才未婚健常婦人(第16図)

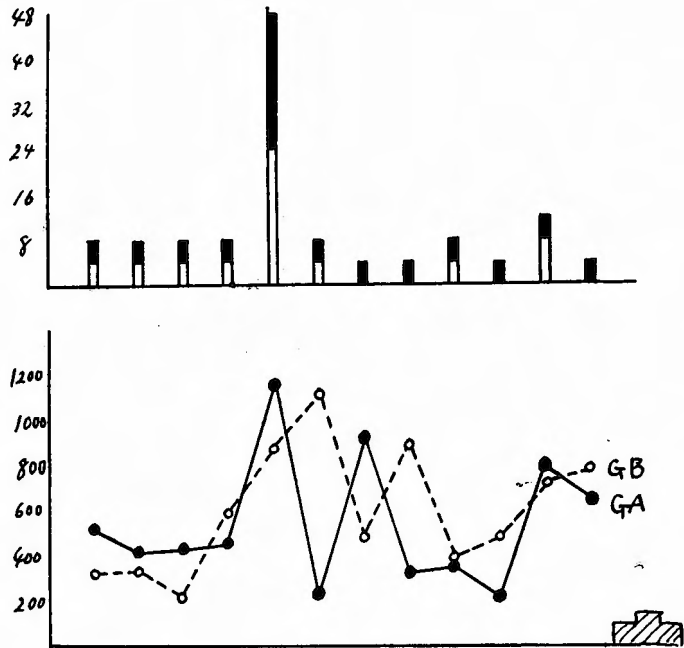
この例の子宮重量単位は用量反応率曲線応用例(前掲第8図と同例)であるがGA曲線と子宮重量単位による曲線とは可成りの並行関係が認められるがGA値は一般に低値であるのに反してGB値は高い値を続け、曲線の性格も不規律である。GBは電気泳動上で巾の広いスポットを示し他の糖蛋白の混入が想像されるが、本例の測定値からもGBの単一性は疑われるのである。

4) 27才既婚健常婦人(第17図)

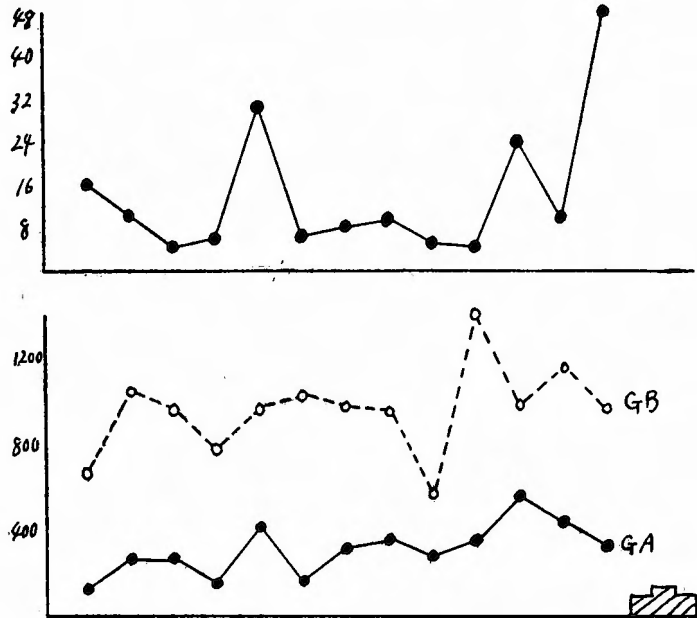
本例に於いてもGA値は動物検定値とほぼ並行しているがGB値は不規則で且つ一般にGA値よりも高値を示した。

以上4例の健常例の測定結果を総合すると、動物検定では卵胞期には4~12muu/24hr. 排卵期には24~48muu/24hr. 黄体期の排泄量は比較的不規則であるが一般に4~24muu/24hr.と月経前期に異常に高い排泄

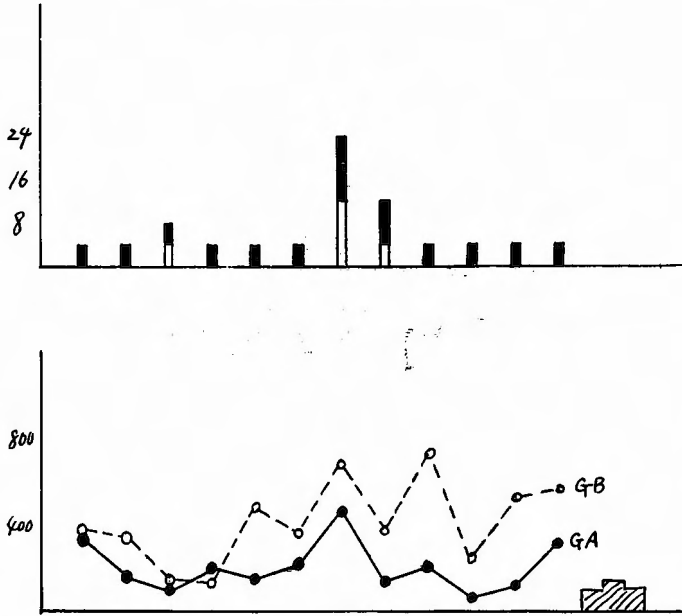
第15図 健常婦人(22才)



第16図 健常婦人(25才)



第17図 健康婦人 (27才既婚)

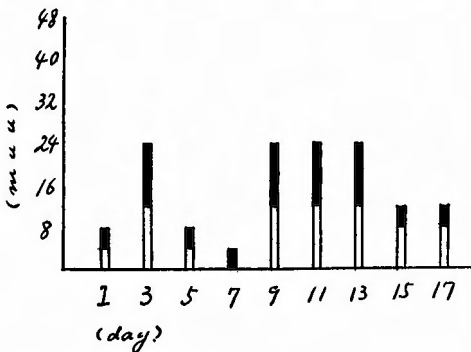


値(48muu/24hr 以上)を示すことが多い。化学的検定の結果はGAは曲線の性格は動物検定の結果と可成りの並行関係がみられるが、その排泄値には個人によって変動がみられる。GAのピーク値以外の排泄値は凡そ100~500y/24hr.である。ピーク値では400~1200y/24hr.の中がみとめられる。GB値はGA値よりも更に個人差が甚しく、その差異の原因が他の糖蛋白の混入によるものと考えられる。

b) 異常月経婦人の尿中GTP排泄量の消長

1) 26才授乳期婦人(無月経)

第18図 授乳期婦人尿中ゴナドトロピン (26才)

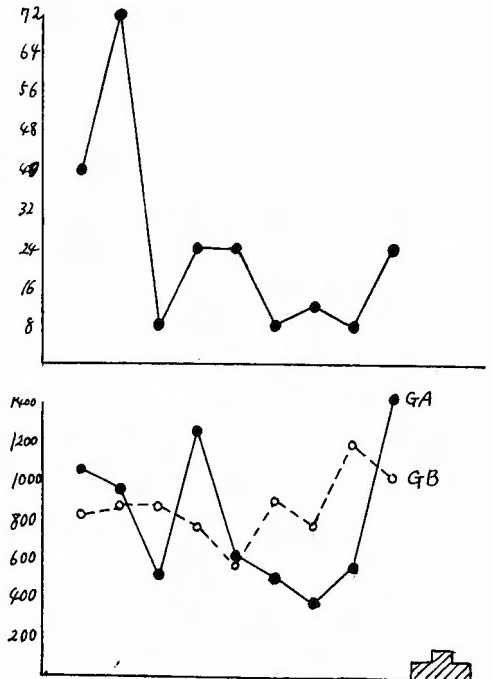


第18図のような排泄値を示した。

この例は正常分娩後3ヵ月目で月経はみられず、乳

汁分泌は正常である。GTP排泄値は4~8muu/24hr. 或は12~24muu/24hr. を変動しているが、健康婦人に比較して一般に高値を示し、又排卵期にみられるよ

第19図 人工流産後11日よりのゴナドトロピン



第 13 表 各種内分泌疾患々者尿中 GTP

病 名	年 令	性 別	症 状	muu	GA
旁トルコ鞍奇型腫	10	M	早 熟	24~48	
下垂体柄部腫瘍	8	F	早 熟	24~48	
下 垂 体 腺 腫	21	M	末端肥大	4 以下	234
末 端 萎 小 症	35	F	月経不順 侏儒	48	
末端萎小類似症	36	F	不妊 月経不順	3 以下	200
生殖器萎縮性肥胖症	22	M	肥胖 萎小陰茎 萎縮辜丸	3	
セミノーム	23	M	辜丸腫瘍	4 以下	
シモンズ氏症候群	20	M	消瘦 胃腸障害	4~8	
同 上	21	F	消瘦 無月経	4 以下	161
同 上	21	F	消瘦 無月経, 胃障害	2 以下	63
同 上	19	F	無月経 消瘦	2 以下	280
同 上	20	F	削 瘦	4 以下	
神神経性食思欠乏症	24	M	胃腸症状	4~8	
同 上	22	F	胃腸症状 消瘦	3 以下	
同 上	21	F	胃腸症状 消瘦	12	348
バセドウ氏病	31	F	眼球突出 心悸亢進 月経不順	464	
甲状腺機能亢進症	31	F	甲状腺腫 月経正常	575	
				4 以下	170

うなピーク値は示さなかつた。

2. 人工流産後の婦人 (第19図)

人工流産手術後11日より次回月経迄の GTP 排泄値を測定した。絨毛性 GTP は既に消失していると考えられるが、排卵を予想される時期に 72muu/24hr. の高値を示している。GA, GB値は共に全く不規則な曲線を描いている。本例では蛋白尿の確認は行われなかつたが恐らく妊娠期に於ける腎機能の変化のため GTP 以外の蛋白の多量の排泄にGB値のみならず GA 値も影響をうけたのではないかと想像される。

c) 各種内分泌疾患々者の尿中 GTP 排泄値は第13表に示した通りである。

1) 早熟を主症状とした脳腫瘍患者 2 例共に GTP 排泄量は増加しており、このうち 1 例は生物学的検定によつて幼若雌マウス卵巣に多数の出血性卵胞を認め、GTP は絨毛性のものと考えられたが、死後病理解剖により肺に絨毛上皮腫の転移巣が認められ、脳には松果体の奇形腫があつた。他の 1 例は Craniopharyngiomaであつた。

2) 末端肥大症を伴う脳下垂体腫瘍については、初期には Hypergonadotropism を示し、晩期には Hypogonadotropismを示すと云われ、GTP排泄値は必ずしも診断的価値を示さないと考えられている。本例は手術によつて好酸性細胞腺腫であることが判明し、Thorn氏テストで前葉副腎系の機能失調を認めら

れている。尿中 GTP 値は低下していた。前葉からのホルモン分泌の相互関係については、未だ定説をみないが、生長ホルモン分泌増加に対する代償的 GTP 分泌低下は起り得ると考えられる。

3) 松浦が報告した末端萎小症例について測定したが、本例では月経周期に著しい不順があつて排卵時期が不明である。併し 2 回の測定によつて相反する結果 (48muu/24hr. 及び 3muu以下/24hr.) をみている。これは恐らく測定時の周期差による結果であろう。少くとも中枢に於ける GTP 分泌支配の失調が推定せられると共に末端肥大症と同様、主役を演ずるものは生長ホルモンである。

4) 生殖器萎縮性肥胖症。本症の成因については視床下部下垂体系の障碍と考えられているが、本例では GTP の低下があり、二次的な下垂体機能低下を否定し得ない。

5) セミノーム。精細胞性辜丸腫瘍におけるGTPは絨毛性と下垂体性に分けて考えねばならないが、前者の場合は腫瘍組織中に Syneytium Cells の存在が考えられ、後者の場合に於ける GTP 排泄量の変化は、性ホルモン分泌異常による二次的な GTP 排泄異常と考えられる。この例の場合は絨毛性 GTP の存在は考えられず下垂体性 GTP の排泄量は正常であつた。

6) Simmonds 氏病と神経性食思欠乏症の臨床的

鑑別は困難であつて、Lichtwitz の云うように単に Simmonds 氏症候群、或は Jores の云う下垂体機能失調と云うべき統一した概念に含まるべきであろうか。Grollman は 17-KS 値により、又最近 Bliss & Migeon は GTP 排泄値によつて鑑別しようとしている。私の 8 測定例では 1 例を除き、概して GTP の低値を認めているが、これは必ずしも下垂体の器質的変化と断ずるよりも、機能的失調によるものと推定され、臨床的所見と同様 GTP による両疾患の鑑別は困難と考えられる。

7) Basedow 氏病と甲状腺機能亢進症、GTP と甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌細胞については尚確定していないが、更年期性の Basedow 氏病の場合、GTP と TSH の因果関係は比較的明かに理解される。即ち卵巢機能の低下により GTP の増加と共にこれに同調して TSH も増加して来て、以て特徴的な眼球突出を来すものと考えられる。臨床 Basedow 氏病を規定する眼球突出が TSH の増加によつて起ることは今日ほぼ確定した説である。これに対し、眼球突出を欠く甲状腺機能亢進症の場合は、甲状腺自身に機能亢進があり、Thyroxin の過剰分泌が TSH 分泌を抑制すると共に GTP 分泌をも抑制したものと考える。

第 3 章 考 察

下垂体性 GTP に FSH, ICSH が存在することは Zoudek et al. (1930) が初めて報告したのであるが、Li et al. (1940), Greep et al. (1942) 等はそれぞれ別個に羊、豚の下垂体から FSH, ICSH の分離に成功したのである。ところが報告されたこれら各ホルモンの物理化学的性質は、動物の種類によつて可成りの相異がみられ、これは不純物の存在を示唆するものである。その後も蛋白分解酵素 (Li et al. 1955), イオン交換樹脂 (McShan et al. 1955) 等の新しい操作を用いて、これらの純粋抽出や、その作用本態の究明がなされている。

人間の下垂体組織の GTP について、その生物学的作用を観た報告は少なく、Bahn et al. (1953) が死直後の人下垂体の GTP 作用と尿中の GTP 作用の比較を行なつてに過ぎない。一方臨床的に体内 GTP の消長をみるためにはやはり尿がもつとも利用し難いものであるが、上述のように下垂体組織から FSH, ICSH の分離及び標準化が完成されていない現状に於いて、

尿中からこれらの分離測定を行なうことは困難である。McArthur (1952) Lloyd et al. (1949), Bro-

wn (1956), Walter (1957) 等は尿中から ICSH の分離測定を生物学的に行つた報告をしているが、相対的な測定に過ぎないようである。

一般に臨床的検査に於いてはその目的に応じ、正確、簡便、迅速等の要素が考慮されねばならないのであるが、尿中下垂体性 GTP 検査法をこの点からみると、全要素を満足出来る方法は現在のところみあたらない。Loraine et al. (1956) は HMG 20 (Human Menopausal Gonadotrophin. Organon Ltd. Co.) を標準とし、男性尿、女性卵胞期、女性黄体期尿より抽出した GTP を幼若下垂体摘出雄ラット前立腺重量増加法及び幼若雌マウス子宮重量法を用いて比較した結果、各々の尿抽出物に質的な GTP 作用の相異を認めなかつたと報告した。又 McArthur (1952) は下垂体摘出雄ラットの前立腺の重量増加は投与量に比例して増加すると報告しており、Albert (1956) は幼若雌ラットの卵巢重量が投与 GTP 量の対数に比例する事を以つて GTP の測定に利用している。

われわれは標準物質を得ることが出来なかつたので、われわれの実験条件のもとで尿中から GTP の抽出を行い、幼若雌マウス子宮重量増加の標準曲線を作製したのであるが、動物検定の限界内では非常に簡便な方法であつて、連続測定を行うに当つて充分利用出来る方法であることを認めたのである。又これらの曲線の性格から健康婦人の卵胞期、黄体期及び閉経期婦人の尿に排泄される GTP は同じ性質のものであると考えるのである。

第三磷酸カルシウム吸着柱を用いて GA, GB の分画に分けた Crooke & Butt の方法は、尿中 GTP 化学的測定の最初の試みである。われわれはこの測定法の信頼性を観るために幼若雌マウス子宮重量法と比較した。フロリザール吸着柱を用いた分画分析の結果をみると GA, GB 共に GTP を或る程度表現しているものと考えられる。しかしながら性周期間の測定成績をみると GA とマウス子宮重量法とは或る程度の並行関係がみられるが GB では殆んど認められなかつた。又 GA, GB をそれぞれ幼若雌マウスに投与した場合両者共に同程度の子宮重量がみとめられ、電気泳動的に GA は単一なスポットを示したのに対し GB は巾の広い泳動像がみられた。これらの事を総合すると第三磷酸カルシウムハイフろスーパーセル系吸着柱の GTP の各分画を分離する能力に欠けるとあると考えざるを得ない。Butt (1956) は GA の化学的分析を行つて、これが豚、羊の下垂体より分離した FSH, ICSH より

も多量のヘキソーズ、ヘキソザミンを含んでいることを指摘し、GA にも不純物が含まれていることを示唆している。ただGA とマウス子宮重量法との関連性はわれわれもみとめたことであり、臨床的応用価値はあるものと考えているのである。この意味に於いてわれわれはCrooke等の最初の報告のようにGAがFSHであり、GBがICSHであると云うことよりも、GTPをCrooke等の操作によつて分けたGA、GB分画として以後の測定に於いて健康婦人と罹患婦人との間の差異を検討したのである。

結 論

- 1) カオリン吸着法によるゴナドトロピンの抽出法を検討して、尿がpH 3.0~5.5が吸着に至適pHであること、及び吸着時間は10分で充分であることを確めた。
- 2) 合成吸着剤フロリザールは尿中GTPの吸着剤としてカオリンよりも簡便且つ高い回収率を示す事を

認めた。

3) マウス子宮重量法の検討を行い、生後30日以前のマウスはGTP検討用の未成熟マウスとして用い得る事、又生後同一日数のマウスに同量のGTPを授与した場合に相当の個体差のある事を認めた。GTP授与量、反応子宮重量の相関々係を追求し、授与量の対数と子宮重量間にほぼ直線関係があり、これを測定に用い得ることを証明した。

4) マウス子宮重量法による測定値とGA、GB値を性周期間連続的に平行測定し、前記動物検定値とGAとはやや相関々係がみられるが、GB値に於いてはみられない事が判つた。

5) 第三燐酸カルシウムハイフろスーパースセル吸着柱によるGA、GBとハイフろスーパースセルのみの吸着柱による分画は同一物でないことを指摘した。

6) 健康婦人、異常月経婦人、各種内分泌疾患々者について尿中GTPの測定を行った。

本論文の要旨の一部は第30回日本内分泌学会総会に於いて発表した。

稿を終るに臨み、終始御懇切な御教示を賜つた教室増田強三講師に謹んで深く感謝致します。事に臨み適切な御忠告を戴いた衛生学教室藤原正典助教授並びに未成熟雌マウスを連続的に供給して頂いた北白川遺伝研究所星野安谷氏に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Albert, A.: Human Urinary Gonadotropin. Recent Progress in Hormone Research **XII**, 1956.
- 2) 足高善雄, 他: 性腺刺激ホルモン, 日本内分泌学会雑誌, **32**, 689, 1956.
- 3) Bahn, R. C. et al.: Gonadotropin of the pituitary Gland and Urine of Adult Human Male Proc. Soc. Exp. Biol. & Med **82**, 777, 1953.
- 4) Bahn, R. C. et al.: Gonadotropins of the Pituitary of Postmenopausal Women. Endocrinol. **53**, 455, 1953.
- 5) Bliss, E. L. et al.: Endocrinology of Anorexia Nervosa. J. Clin. Endocrinol. & Metab. **17**, 766, 1957.
- 6) Bradbury, J. T. et al.: Adsorption of Urinary Gonadotropins on Kaolin. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **71**, 17144, 1949.
- 7) Brown, J. B. et al.: The Extraction of Gonadotropins from Urine for Bioassay.
- 8) Brown, P. R.: The Assay of Gonadotropin from Urine of non Pregnant Human Subjects. J. Endocrinol., **13**, 59, 1955.
- 9) Brown, P. S.: The Biological Activity of Gonadotropin (GA) from the Urine of Non-Pregnant Women. J. Endocrinol., **13**, 178, 1956.
- 10) Brown, P. S.

:Follicle-Stimulating and Interstitial Cell-Stimulating Hormones in the Urine of Women with Amenorrhoe. J. Endocrinol., **14**, 129, 1956.

- 11) Butt, W. R. et al.: Chromatography of Urinary Gonadotropins. Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology. **5**, 44, 1953.
- 12) Butt, W. R.: Studies on Urinary Gonadotropins after Fractionation by Tricalcium Phosphate. J. Endocrinol., **13**: 167, 1956.
- 13) Crooke, A. C. et al.: Chemical Assay of Gonadotropin in Urine. Lancet, **8**, 379, 1954.
- 14) Crooke, A. C. et al.: Further Observations on the Chromatography of urinary Gonadotropins. Proc. Roy. Soc. Med. **45**, 805, 1952.
- 15) Diezfalsy, E. et al.: Sources of Error in Clinical Bioassay of Serum Chorionic Gonadotrophin. J. Clin. Endocrinol. & Metab. **15**, 424, 1955.
- 16) Emanuel, E. W.: Endocrine Activity in Anorexia Nervosa. J. Clin. Endocrinol. & Metab., **16**, 1956.
- 17) Green, J. A.: Hormone Secretion by the Immature Mouse Ovary after Gonadotropic Stimulation. Endocrinol., **56**, 621, 1955.
- 18) Greep, R. O. et al.: Gonadotropins of the Swine Pituitary. I. Various Biological Effect of Puri-

- fied Thylakentrine (ESH) and Pure Metaken-trine (ICSH). *Endocrinol.*, **30**, 635, 1942. 19) Grollman: *Essentials of Endocrinology*, 2nd Edition 1947. 20) Heller, C. G. et al.: Gonadotropic Hormone, Clinical Application of Extraction Methods for Assay Purpose. *Endocrinol.*, **24**, 319, 1939. 21) Ingram, J. et al.: Gonadotropin in Human Urine. *Nature (Lond.)* **173**, 86, 1954. 22) 伊藤四十二, 他: 性腺刺激ホルモンの生物学的検定法, 内分泌のつどい, 第5集 219. 23) Jungck, E. C. et al.: Use of Adsor-mon (Aluminium Silicate) for Concentration of Pituitary Gonadotropic Hormons from Urine. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* **16**, 940, 1956. 24) 梶原和人: 尿中ゴナドトロピンの化学的測定法ならびにその臨床的意義, 第四回日本内分泌学会東部会 62, 1956. 25) Klinefelter, H. F. et al.: Experience with a Quantitative Test for Normal or Decreased Amount of Follicle Stimulating Hormone in the Urine in Endocrinologic Diagnosis. *J. Clin. Endocrinol.*, **3**, 59, 1943. 26) 小林隆: 尿中ゴナドトロピンの抽出法, 内分泌のつどい, 第3集, **3**, 779, 1953. 27) Leatham, Q. H., et al.: Gonadotropic Action of Normal Male Urine Extract on Ovaries of Normal and Hypophysectomized Immature Rats and of Immature Mice. *Endocrinol.*, **29**, 8, 1941. 28) Levin, L. et al.: The Quantitative Assay of Follicle Stimulating Substances. *Endocrinol.*, **21**, 619, 1937. 29) Li, C. H.: *Chemistry of Gonadotropin. Vitamins and Hormones*, **VII**, 223, 1949. 30) Lichtwitz.: *Pathologie der Ftnktionen und Regulationen*. 1936. 31) Lloyd, C. W. et al.: Estimation of Urinary Gonadotropin of the Non-Pregnant Human by the Mouse Uterine Weight and Ovarian Hyperemia Responses. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* **9**, 636, 1949. 32) Loraine, J. A. et al.: The Assay of Urinary Gonadotropins from Men and from Normally Menstruating Women in Terms of Human Menopausal Gonadotropin (HMG). *J. Endocrinol.*, **13**, Proc. ii, 1955. 33) Loraine, J. A. et al.: Further Observations on the Estimation of Urinary Gonadotropins in Non-Pregnant Human Subjects. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.* **16**, 1180, 1956. 34) Malburg, R. F., et al.: Aluminium Hydroxide as an Adsorbent Agent for Urinary Gonadotropins. 35) 松島早苗: 尿中ゴナドトロピンの定量, ホと臨床, **3**, 915, 1955. 36) 松島早苗: 性腺刺激ホルモンの抽出法, ホと臨床, **2**, 955, 1954. 37) 松浦篤実: 間脳下垂体系に於ける内分泌の諸問題, 最新医学, **8**, 1128, 1953. 38) 松浦篤実: 脳下垂体甲状腺系の臨床に於ける二, 三の問題, 治療, **36**, 2, 1954. 39) 松浦篤実, 他: 末端萎小症 (Akromicrie) の1例, 北野病院紀要, **3**, 42, 1957. 40) McArthur, J. W.: The Identification of Pituitary Interstitial Cell Stimulating Hormone in Human Urine. *Endocrinol.*, **50**, 304, 1952. 41) McArthur, J. W.: The Bioassay of Pituitary Interstitial Cell Stimulating Hormone (ICSH) in Human Urine. Preliminary Report. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, 34th. Annual Meeting, 1952. 42) McShan, W. H. et al.: Gonadotropic Activity of Granule Fractions Obtained from Anterior Pituitary Glands of Castrated Rats. *Endocrinol.*, **50**, 294, 1952. 43) McShan, W. H. et al.: Further Purification and Biologic Action of Follicle Stimulating Hormone from Sheep Pituitary Gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.* **88**, 2, 1955. 44) Moore, S. et al.: Photometric Ninhydrin Method for Use in Chromatography of Aminoacid. *J. Biol. Chem.* **176**, 367, 1948. 45) 本橋賢二, 他: Kaolin 吸着-Mouse 子宮重量法による尿中ゴナドトロピンの測定, 日本内分泌学会雑誌, **31**, 640, 1956. 46) Neal, L. M. et al.: A Routine Bioassay Procedure for Gonadotropic Extracts. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **14**, 739, 1954. 47) 西川光夫: 内分泌機能の年令的推移. 最新医学, **10**, 167, 1955. 48) 西村隆一: 青春早発症. ホと臨床, **4**, 4, 1956. 49) Rimington, C.: Seromucoid and the Bound Carbon Hydrate of the Serum Protein. *Biochem. J.*, **34**, 931, 1940. 50) Sohval, A. R. et al.: Effect of Surgical Procedures on Urinary Gonadotropin Excretion. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **12**, 1053, 1952. 51) Steelman, S. L. et al.: Assay of the FSH based on the Augmentation with Human Chorionic Gonadotropin. *Endocrinol.*, **53**, 694, 1953. 52) Stran, H. M. et al.: Some Properties of Human Urinary Gonadotropins as Elaborated by Filter Paper Electrophoresis. *Bull. Johns Hopkins Hospital*, **95**, 162, 1954. 53) Swingle, S. M. et al.: Tricalcium Phosphate as an Adsorbent in the Chromatography of Proteins. *Biochem. J.*, **48**, 171, 1951. 54) 竹脇潔: 生殖腺刺激ホルモン. 内分泌叢書, **13**, 1954. 55) Taubert, M. et al.: Chromatographische Gonadotrophin-Gewinnung. *Klin. Wschr.*, **34**, 84, 1956. 56) Tuller, E. F. et al.: Determination of Protein-bound Carbon Hydrates by Anthone Reaction. Effect of Tryptophan. *Analytical Chem.*, **26**, 875, 1954. 57) Van Dyke, H. B. et al.: Follicle Stimulating Hormone of the Anterior Pituitary of the Sheep and Hog. *Endocrinol.*, **46**, 563, 1950. 58) Varney, R. F. et al.: A Method for the Assay of the Gonadotropin Content of Normal

Human Urine. *Endocrinol.*, **30**, 399, 1942. 59) Walter, K. : Quantitative Differences in Gonadotrophic Extracts from Urine of Postmenopausal Women. *J. Endocrinol.*, **15**, 119, 1957.

60) Zondek, B. : Weitere Untersuchungen Zur Darstellung. Biologie und Klinik des Hypophysenvorderlappen-hormons (Prolan). *Ztbl. Gynäk.*,

53, 834, 1929. 61) Zondek, B. : Über die Hormone des Hypophysenvorderlappens. *Klin. Wschr.*, **9**, 245, 1930. **9**, 393, 1930. **9**, 679, 1930. **9**, 1207, 1930.

62) Zondek, B. et al. : The Mechanism or Action and Metabolism of Gonadotropic Hormones in the Organism *Vitamins and Hormones*. **III**, 297, 1945.