

血球凝集反応を利用した免疫学的 gonadotropin 測定法 による男子性機能不全患者の尿中 LH の測定

東北大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 宍戸仙太郎教授)

松 田 尚 太 郎*

白 井 将 文**

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線医学教室 (主任: 星野文彦教授)

中 村 護**

APPLICATION OF RAPID, SENSITIVE HAEMAGGLUTINATION TEST FOR ESTIMATION OF URINARY LUTEINIZING HORMONE IN CASES OF MALE SEXUAL DYSFUNCTION

Shōtaro MATSUDA, Masafumi SHIRAI, Kenzo YONEZAWA†

and Mamoru NAKAMURA††

*From the Department of Urology, Department of Radiology†† and Hospital
Pharmacy†, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan*

Higonavis is a reagent available for determining urinary HCG and LH levels through haemagglutination. Easy to handle, Higonavis is useful with its levels of sensitivity, 5-8 mIU/ml for HCG (NIH preparation A) and 12.5-20 mIU/ml for LH (2nd IRP-HMG), nearly equivalent to those in radioimmunoassay. In a series of controlled experiments, we conducted comparative evaluations between levels of urinary LH and those of plasma LH respectively determined with Higonavis and radioimmunoassay on a simultaneous basis in 14 patients of male sexual dysfunction. In half of them, the effects of luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) loading on such levels were studied to identify the physiological significance of changes in the values of urinary LH and plasma LH.

Both results with Higonavis and radioimmunoassay fairly agreed with each other, suggesting the assay with Higonavis is an effective alternative to radioimmunoassay. The present comparative evaluations of urinary LH with Higonavis and plasma LH with radioimmunoassay following LH-RH loading showed a deviation in phase, in which the peak value appeared in plasma LH ahead of urinary LH. When this natural phase deviation due to the usually slower response in urinary LH than in plasma LH is reasonably adjusted, the two curves may turn out fairly paralleled to each other, indicating the available substitution of the assay with Higonavis for radioimmunoassay in LH-RH tests. Our repeated tests on the same samples have well supported the reproducibility of the assay.

* 研究生 ** 講師

緒 言

Radioimmunoassay (RIA) は方法論的にはきわめて信頼性の高いすぐれた方法であり、現在ではほとんどのホルモンがこの方法で測定可能となった。しかしこの測定法は radioisotope を使用する関係上どこでも簡単にできるというわけにはいかないので routine の検査法としては難点がある。一方、従来からおこなわれている免疫学的測定法、すなわち免疫学的妊娠反応は感度の点で問題が多く、微量のホルモンの測定には利用できなかった。そこで RIA に代わるものとして、RIA と同程度の感度を有し、しかも簡便で迅速かつ経済的な検査法の開発が望まれていた。そこに最近これらの条件をほぼ満足させる尿中の微量な LH あるいは HCG の測定用キット、すなわち血球凝集反応を利用した免疫学的 gonadotropin 測定法として Higonavis (HGV) が開発された。そこでわれわれはこれを用いて当科不妊外来を訪れた男性性機能不全患者の尿中 LH を測定すると同時に RIA による血中 LH の測定、さらに一部症例に対して LH-releasing hormone (LH-RH) を負荷、尿中、血中 LH を測定しその相関性などについて検討を加えてみ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対象

HGV の原理

HGV は HCG 抗体を感作した赤血球を用いる試験管内血球凝集反応にもとづく尿中 HCG および LH の検出定量用試薬である。試験管内にて抗 HCG 抗体感作赤血球と HCG あるいは LH を含む尿を混合すると血球表面の抗体が反応し、また免疫学的な交叉反応によって LH が反応し血球凝集反応が起こる。その結果、管底に沈降輪はみられずいわゆる smooth mat 状に血球が沈降する。以上は陽性反応であり、検体に HCG あるいは LH が含まれていない場合、または本試験の感度以下の微量の場合は血球はそのまま沈降して沈降輪を形成する。これが陰性反応である。

HGV の構成

1) 抗 HCG 抗体感作赤血球：抗 HCG 抗体を感作した赤血球を凍結乾燥したもので、丸底アンプルになっておりそのまま反応試験管として用いる。

2) 感作赤血球浮遊用緩衝液：1ml 中にリン酸二水素カリウム(無水) 13.6 mg, リン酸一水素ナトリウム(無水) 7.1 mg, 塩化ナトリウム 4.5 mg を含有する pH 6.4 の緩衝液 (PBS) で 1) の赤血球凍結乾燥体を浮遊するのに使用する。

3) 被検尿希釈用牛血清アルブミン (BSA)：BSA

を凍結乾燥したもので使用時に蒸留水 20 ml に溶解し被検尿を希釈するのに使用する。

測定手技、判定基準ならびに感度

1) BSA のバイアルに蒸留水 20 ml を加え溶解し希釈液を調製する。

2) 感作赤血球のアンプルに浮遊用緩衝液 0.4 ml を加え攪拌し感作赤血球の浮遊液をつくる。

3) 被検尿をフィルター付の濾過管を用いて濾過する。

4) 1) の被検尿希釈液を用いて濾過尿の希釈列を作る。

5) 感作赤血球浮遊液を攪拌し再浮遊させる。

6) 感作赤血球浮遊液に希釈尿を 0.1 ml 加え攪拌する。

7) 2 時間後判定する。

判定基準はアンプル管底の沈降リング形成の有無により判定する。つまり、リング形成を陰性とし、無形成を陽性とする。

感度は Lot により多少差があり、HCG (NIH preparation A, without urine) で 5-8 mIU/ml, LH (HMG-2nd-IRP) で 12.5-20 mIU/ml である (Lot ごとに感度は明示されている)。

本検査法の再現性

本キットの再現性を調べるために 1 検体について同時に 5 回測定してみたがすべてが同値を示した。

測定対象

測定対象は Table 1 のごとく最近東北大学医学部泌尿科男子不妊外来を訪れた 14 例の患者であり、これら 14 例のうち 10 例は不妊を主訴としており、他の 4 例は症例 5 の 12 歳の性器發育不全患者、症例 6 の 18 歳の辜丸絨毛上皮腫患者、症例 7 の 61 歳の impotence 患者、そして症例 14 の 18 歳の女性化乳房の患者である。不妊を主訴とした 10 例の患者のうち 4 例 (症例 1, 8, 9, 10) は精子数が $55 \sim 80 \times 10^6/\text{ml}$ で、精子運動率は 52~70% であり、1 例 (症例 4) は精子数が $17 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率が 44% のかなり高度の乏精子症であり、残る 5 例 (症例 2, 3, 11, 12, 13) はいずれも無精子症であり、そのうち症例 3 は性染色体構成 XXY/47 の Klinefelter 症候群である。これら 14 例に対して早朝空腹時採尿し尿中 LH を HGV により測定すると同時に採血も施行し血中 LH を 2 抗体法による RIA¹⁾ で測定比較してみた。また一部の症例 (症例 8~14) に対しては採尿、採血に引き続き LH-RH 負荷試験を施行した。すなわち採尿、採血後 LH-RH 0.1 mg を筋注投与したのち 30 分、60 分、90 分、120 分にそれぞれ採尿、採血して尿中および血中の LH の変動

Table 1. 測定対象

症例番号	年齢	主 訴	精 液 所 見		そ の 他
			精子数 (/ml)	運動率 (%)	
1	31	不 妊	55×10^6	69	Klinefelter 症候群 (XXY/47)
2	29	"	0	0	
3	28	"	0	0	
4	29	"	17×10^6	44	
5	12	性器発育不全			睾丸絨毛上皮腫
6	18	睾丸腫瘍			
7	61	インポテンツ			
8	30	不 妊	80×10^6	52	
9	26	"	59×10^6	54	
10	32	"	55×10^6	70	
11	29	"	0	0	
12	22	"	0	0	
13	28	"	0	0	
14	18	女性化乳房			

を測定した。

結 果

Fig. 1 は症例1より7までの尿中および血中の測定結果を比較したものであるが、症例6を除いた6例はいずれも尿中 LH のほうが血中 LH よりやや高目に出たがそれぞれがかなり近い値を示すことがわかった。一方、Fig. 2 は LH-RH 負荷をおこなった症例(症例8~14)の尿中、血中 LH の変動を示したものである。まず LH-RH 負荷前の尿中 LH 値をみると症例8~10の精子数 $55 \sim 80 \times 10^6/\text{ml}$ の症例では25~50 mIU/ml、症例11~14の無精子症、女性化乳房症例

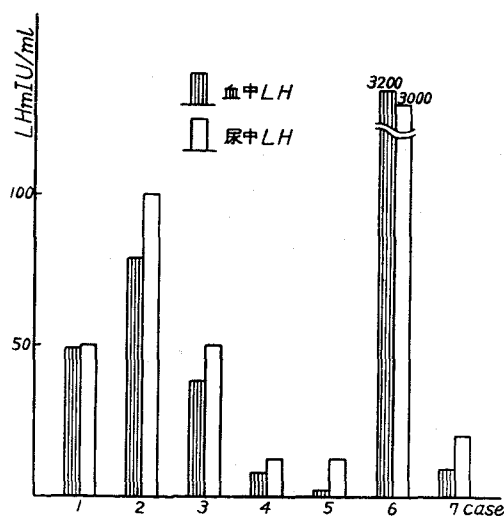


Fig. 1. 血中および尿中の LH 値の比較

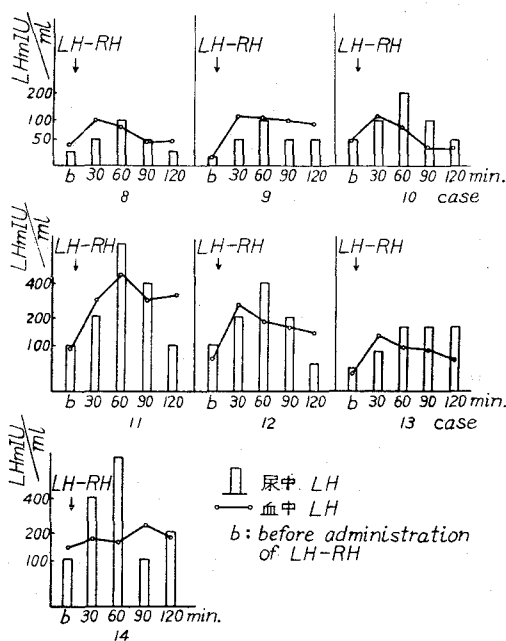


Fig. 2. LH-RH 負荷時における血中、尿中 LH の変動

では 100 mIU/ml 以上であった。また LH-RH 負荷に対する response をみると症例13を除いて peak は60分にみられ、無精子症、女性化乳房症例において高い増加率を示した。一方、血中 LH の peak は症例11、14以外は30分において認められ尿中 LH との間には phase のずれが認められた。

考 察

Higonavis は血球凝集反応を利用し尿中の HCG, LH を測定する試薬で操作はきわめて簡単であり HCG で 5-8 mIU/ml, LH で 12.5-20 mIU/ml と従来の妊娠反応の 200 倍の感度を有し RIA と同程度の検出感度を有するものである。まず HGV の信頼性と再現性についてみると水野ら (1973)²⁾ は任意の尿について HGV と同時に RIA により尿中 LH を測定した結果両者の値はきわめてよく一致していたと述べており、本測定法は尿という生体材料についても信頼性がきわめて高いと述べている。また水野らはその再現性についても検討しているがきわめて良好であったと述べている。さらに東條ら (1973)³⁾ も同様の成績を得ており HGV は RIA にじゅうぶん代行しうるものであると述べている。われわれも任意の尿について RIA と HGV で同時に測定して両者の値を比較してみたが多少のばらつきはあるがそれぞれかなり近い値を示した。このばらつきがみられたのは、蓄尿でない随意尿を用いる場合には測定誤差が大きくなること、さらに希釈列を作るにあたり倍数希釈法を用いたため高値になるほど rough な数値となったこと、また本検査法の感度が 12.5-20.0 mIU/ml であるのでそれ以下の値はすべて 12.5-20.0 mIU/ml で示されるため RIA の場合より多少高めに出るということ等がその理由としてあげられ、24時間尿の一部を使用すること、さらに直接希釈法も利用すればさらに正確な数値が得られたものと思われる。また、下垂体の機能を知るためには一回の採尿による尿中 LH の測定でなく LH-RH 負荷試験などをおこなう必要がある。そこでわれわれは、性機能不全患者における下垂体機能を知る目的で LH-RH を負荷して尿中 LH の変動を測定すると同時に血中 LH の変動を測定してみたが phase のずれ、すなわち LH-RH 負荷により血中 LH がまず peak に達し、その後に尿中 LH が peak に達することがわかった。尿中値が血中値より時間的に遅れるのは当

然であり、この phase のずれを考慮に入れると両曲線はきわめてパラレルな変動を示し LH-RH 負荷試験が RIA によらず HGV による尿中 LH の測定によってもじゅうぶんおこなえることがわかった。このことに対して八神ら (1973)⁴⁾ も LH-RH 負荷試験をおこなうにあたり尿中 LH を測定することにより血中 LH の変動がよく推察されると述べている。われわれの測定した症例においては、すべてが LH-RH によく反応したが、このことよりこれら症例の下垂体にはとくに異常がなく睾丸そのものに問題があることが推察された。さらに無精子症患者の LH が正常人のそれよりすべて高めであったという結果は negative feedback のためかとも考えられたが日内変動のためとも考えられるので、これらの点についてはさらに症例を重ねて検討しなければならない問題と考えている。

結 語

現在ホルモンの測定には RIA が最も広く応用されており信頼性のきわめて高い方法であるが放射能汚染が問題となっている現在 RIA にかわる方法として HGV は放射能汚染の心配がなくだれにでもでき、しかも RIA と同程度の感度で尿中 HCG, LH を測定できるようになったことはきわめて注目すべきことであり、今後臨床的にも広く利用できるものと思われる。

稿を終るに臨みご懇篤なるご指導とご校閲を賜った恩師 矢野仙太郎教授に心より感謝いたします。なお、本論文の要旨は第18回日本不妊学会総会において発表した。最後に HGV を提供いただいた持田製薬株式会社に感謝いたします。

文 献

- 1) 米沢健三・ほか：泌尿紀要，19：611，1973.
- 2) 水野正彦・ほか：産と婦，40：1651，1973.
- 3) 東條伸平・ほか：ホと臨，21：1179，1973.
- 4) 八神喜昭・ほか：ホと臨，21：1275，1973.

(1974年2月18日迅速掲載受付)