

49. 人成長ホルモンの Radio Immuno Assay に関する検討

対馬敏夫 入江 実 鎮目和夫 中尾喜久
(東京大学中尾内科)

われわれは人成長ホルモンの radio immuno assay において、数年来 paperchromatoelectrophoresis 法を使用してきたが、手技が煩雑であり、時に free と bound の分離が不良の場合もある。今回はとくに ^{125}I -HGH を利用した double antibody 法につき検討した。assay system は diluent 0.4ml (0.5% BSA を含む pH 8.6 veronal buffer)。サンプル 0.1ml。第1抗体としてはモルモットで作製した抗ヒト成長ホルモン血清を適当に希釈し 0.1ml, ^{125}I -HGH 0.1ml (0.2~0.5m μg)、これに carrier として 100 倍に希釈した正常モルモット血清 0.1ml を加え 4°C で 72 時間 incubate した後、家兔で作製した抗モルモット γ -globulin 血清 $\frac{1}{2}$ 希釈のもの 0.1ml を加えさらに 24 時間 incubate し、3,000 回転、30 分で遠沈、上清をすて、沈渣を count し、bound % を算出した。

遠沈後の上清に再び第2抗体を加えても生ずる沈澱の count は 1% 以下であり、また上清の paperchromatoclectrophoresis による検討でも、free と bound はほぼ完全に分離していると考えられる。この方法による minimum detectable dose は 0.1~0.5m $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、sensitivity, reproducibility の点でも満足すべき結果をえることができた。同一サンプルを double antibody 法と paperchromatoc法の両者で測定した結果もほぼ一致する。

Double antibody 法は手技が簡単であり、また多数のサンプルを処理できる点有利である、さらに ^{125}I -HGH は半減期が長いために十分な予備実験が可能であり、長期間の使用ができるため今後使用すべきものと考えられる。

*

50. TSH の Radioimmunoassay に関する研究

宮井 潔 小川定男

福地 稔 岡田義昭
(大阪大学阿部内科)

岩坪治雄
(大阪府立成人病センター)

熊原雄一
(中央臨床検査部)

近年 ^{131}I 標識ホルモンとそのホルモンに対する抗血清

とを用いて各種ホルモンの radioimmunoassay が試みられている。

TSH に関してわれわれは、粗人 TSH を抗原としてえた抗血清と、精製人 TSH (69i.u./mg) を標識用および標準用として TSH radioimmunoassay を試み、本法の基礎的検討および臨床応用を行なった。Hunter & Greenwood らの方法で標識した ^{131}I -TSH (400mc/mg) 0.4m μg を用い、最小感度 1m μg 、測定可能域 1~30m μg の標準曲線を得た。本法による duplicate の測定値誤差は $\pm 15\%$ 以内である。標識 TSH または incubate が異なる場合の再現性は $\pm 30\%$ 以内であった。なお血清に標準 TSH を添加したさいの回収率は 81~121% であった。

本法を用い健常人 (19~36才) 14例、汎下垂体機能低下症 2例、甲状腺機能亢進症 4例、原発性甲状腺機能低下症 8例の血中 TSH 値を測定すると、汎下垂体機能低下症ではほとんど感度以下であるに対し、原発性甲状腺機能低下症では高値を示した。

次に本法による immunoassay 値と、McKenzie 法による bioassay 値を比較した。すなわち原発性甲状腺機能低下症において、甲状腺ホルモン投与により TSH が著減すること、また T_3 75 μg 筋注後、血中 TSH が 3 時間で急速に減少し、4 日後に原値に復することが immunoassay で示された、同様の変動は bioassay でも確められた。

この際、immunoassay 値と bioassay 値との間には正相関 ($r=0.84$ $p>0.01$) がみられたが、絶対値では前者の方が高値を示した。そこで本法の特異性について検討すると、ACTH, FSH ではほとんど影響がないが、HCG によって影響が認められた。事実閉経期婦人で高値を示すものがあるので、本法の実用化上留意すべきである。

*

51. ^{14}C および ^{3}H 標識男性ホルモンによる男性ホルモンの分泌と代謝に関する研究

辰巳 学 山田重樹 大迫文麿

平盛勝彦 河野 剛 深瀬政市
(京都大学深瀬内科)

^{14}C および ^{3}H 標識男性ホルモンを用いて男性ホルモンの分泌と代謝に関する研究した。

dehydroepiandrosterone (DHA) および dehydroepiandrosterone sulfate (DHA-S) の一日分泌量、生産量、相互転換率を前回と同じ Vande Wiele らの方法で正常老人 2 例、癌腫と思われる副腎皮質腫瘍の 34 才女子 1 例、

卵巣の Leydig cell tumor の 27 才女子 1 例につき追加測定した。

正常男子老人 3 例の DHA の一日分泌量の平均は $2.6 \pm 0.9 \text{ mg/day}$ で正常成人男子 4 例のそれに比し 2% の危険率において有意の低値を示した。副腎皮質腫瘍の症例では DHA および DHAS の一日分泌量はそれぞれ 44.4 mg/day , 14.5 mg/day で正常女子 4 例の平均に比しかなりの高値を示した。卵巣腫瘍の症例では DHA の一日分泌量は 90.9 mg/day で正常女子 4 例の平均に比し著しい高値を示した。本症例については前回発表した同じ方法により testosterone の urinary production rate を測定し $1,970 \text{ mg/day}$ という非常に著しい高値をえた。本症例は顕著な男性化症状を呈しこれは卵巣の Leydig cell tumor よりきわめて大量の testosterone が分泌されていたためと考えられる。

一方 DHA-S の血漿中濃度、metabolic clearance rate (MCR) および blood production rate (BPR) を Conrad らの方法および Tait らの解析式を用いて正常人につき算出測定した。正常男子 5 例の血漿濃度の平均は $206.0 \pm 37.6 \text{ kg}/100\text{ml}$ で正常女子 3 例のそれは $254.0 \pm 34.0 \text{ kg}/100\text{ml}$ であった。正常男子 3 例の MCR の平均は $1.69 \pm 0.40 \text{ L/day}$ で BPR のそれは $3.62 \pm 0.86 \text{ mg/day}$ であった。以上のように今回測定した DHA-S の BPR の平均はさきに教室で測定した Urinary Production Rate と一致した傾向を認め、また DHA-S の血漿中濃度の平均も Conrad らの値とほぼ一致した値をえたが MCR は Gurgeide らの値より低値でありなお症例を追加して検討中である。

*

VI. 代謝

52. 胚胎の Autoradiography

林 基之 岩城 章 間壁さよ子 平川 舜
(東邦大学産婦人科)

哺乳類卵の代謝研究法として autoradiography は重要な方法であって、 ^3H -thymidine, ^{35}S -methionine その他数種の isotope を使用した業績が報告されているが、その大部分は卵胞卵に関するものであって受精卵については稀である。その理由として受精卵の組織切片を作製することが技術的にむずかしいためと考えられる、われわれは Moog 等が家兎胚に行なった切開、伸展法を応用し、簡単に明瞭な autoradiograph を得ることができた。

〔実験方法〕 4~7 日の家兎胚を $0.1 \sim 50 \mu\text{c}/\text{ml}$ の ^3H -thymidine 含有の培養液中で 1 時間培養し、無水メタノールで固定後、Moog の処理法を施し花卉状に切開伸展する。サクラ NR-M2 で dipping 法を行ない、感光時間は 1 週間前後である。

〔実験成績〕 ① $0.1 \mu\text{c}/\text{ml}$ の ^3H -thymidine 量で trophoblast 細胞に明瞭な取りこみが観察できるが、 $0.25 \sim 0.5 \mu\text{c}/\text{ml}$ が最適と思われる、しかしわゆる collapse を起した胚には uptake されない。

② 4~9 日までの胚令による labeling index にはほとんど差を認められなかった。

③ 生食中で 1 時間培養すると collapse の状態となりま

ったく取りこまれない。しかし、Hanks, Eagle, YLE, TCM 199, TCM 199 + 30% 仔牛血清で培養例の LI はそれ 66, 74, 76, 81, 80% である。

④ 血清添加 TCM 199 および Eagle 中で培養し 3 時間にごとに LI を検討すると 18 時間までは両者に差を認めないが、その後 Eagle 使用時には LI が減少し 30 時間では 0 になる。しかし血清添加 TCM 199 で培養例では 70~80% を示しどんどん変化しなかった。

⑤ 桑実胚と異なり胚が medium 中の物質を積極的に利用することが実証された。

*

53. 細胞回転における G_1 , S および G_2 時間の直接測定法

土屋 純 佐川尚夫 前川 正
(群馬大学第 2 内科)

細胞の増殖サイクルの各期の時間は主として ^3H -thymidine (^3H -TdT) を用いた autoradiography で解析され、種々の分析法が考案されている。中でも mitosis chase method は広く用いられた方法である。しかし 2 種以上の細胞よりなる細胞系では autoradiogram の上で核分裂像を区別することはむずかしく、かつまた単一細胞系でも構成細胞各期の時間のバラツキが多い場合は、S 時間の測定は正確とはいいがたい。G₂ 時間の測定は通常