In spite of those changes of various enzyme activities and glycogen content both in liver and muscle of the rats with experimental thyroid disorders, in general, blood glucose level was maintained within normal level.

But by hydrocortisone administration to thyroxine treated rats, levels of FDPase and G-6-Pase activities in the rat liver elevated more significantly than those in thyroxine-treated rat, and consequently blood glucose level elevated markedly.

From the above mentioned results, it is suggested that blood glucose level and carbohydrate metabolism in thyroid disorders may be regulated by co-operation of various factors such as glucose utilization in peripheral tissue, glucose production of the liver and functions of adrenal and other endocrine organs.

Studies on the Clinical Application of TSH Bioassays

Yasuhisa TOKI

The 1st Department of Medicine, Osaka University Medical School

(Director : Professor Tsuneo Yoshida)

TSH bioassays were experimentally carried out in view of the possibility of their clinical application, both in vivo and in vitro.

The results were as follows :

1) In the method using ^{32}P uptake with the thyroid gland of chick, the best dose-response curves were obtained (with the mean λ of 0.44 and the sensitivity of 25mJSu.) by measuring the total thyroidal radioactivity 6 hours after the simultaneous intraperitoneal administration of TSH and ^{32}P .

2) In the method using the release of ^{131}I -labeled thyroid hormone after the administration of TSH in mouse, the precision of the dose-response curve was improved by the administration of TSH 24 hours after L-thyroxine and ^{131}I were injected. The mean λ value was 0.24, and the detectable range of TSH, 1~16mJSu.

3) In the method based on the release of inorganic radioiodine with bovine thyroid tissue slices in vitro, a positive correlation between the thyroidal ^{131}I uptake rate (U) in the uptake phase and the thyroidal accumulation rate [$U' (= 100 - \text{release rate})$] in the release phase was observed ; and using U'/U as a new index of this method, augmentation of the precision was obtained with a mean λ of 0.33, being better than that obtained by using the ^{131}I release rate. The detectable range of TSH was 0.1~10.0mJSu.

4) By the modified assay technique for TSH based on the release of ^{131}I with bovine thyroid tissue slices (in vitro) and the release of ^{131}I -labelled thyroid hormone in mouse (in vivo), correlation between the dose-response relation of Standard (Pig) and Human (Pituitary) TSH, and the assay value of hypophyseal TSH, measured by the two method, were investigated.

A approximate parallel relationship between the dose-response curve of standard and human TSH, and between the in vitro and in vivo TSH value per pituitary was observed.

TSH Bioassay の臨床応用に関する基礎的研究

大阪大学医学部第一内科 (主任 吉田常雄教授)

土 岐 泰 久

(昭和37年 2月22日受付)

緒 言

Loeb¹⁾ 及び Aron²⁾ が甲状腺機能を促進する物質として下垂体より甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌を指摘して以来, その物質の生物学的並びに化学的研究が行なわれてきたが, 今日尚その化学的構造が完全には明らかでなく, その測定には専ら生物学的検定法が用いられている. TSH の生物学的検定法には甲状腺の形態学的変化を指標とする方法³⁾⁴⁾⁵⁾を初めとして多くの報告が見られるが, この形態的变化による判定には主観的因子が介入し易い為, 迅速に実施出来, 且つ主観性の入り難い Bioassay として ¹³¹I 又は ³²P を利用する方法に就いて現今種々の検討が行なわれてはいる. しかし, 尚充分満足すべき方法はない.

周知の如く甲状腺疾患の病態生理及び TSH の分泌機構の解明には体液中の TSH 測定が必要欠くべからざるものとされ, その為には感度及び精度の勝れた測定方法を確立する必要がある. そこで私は現在実用上比較的可能性があると考えられる測定方法の内, in vivo のものとして初生雛甲状腺の ³²P 摂取能を指標とした方法及びマウスの血中 ¹³¹I 放出を指標とした方法を, 更に in vitro のものとして牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とした方法を選び, 夫々の Bioassay に就いて基礎的検討と改良を加え, 更にその臨床応用への可能性を検索せんが為, in vivo 及び in vitro の方法で標準 TSH と人 TSH との反応性の関係を追求め, 更に同一検体に就いて TSH 測定を行ない両者を比較検討した.

I 初生雛甲状腺の ³²P 摂取能を指標とした TSH Bioassay に関する検討

初生雛甲状腺の ³²P 摂取能を指標とせる TSH Bioassay は Crooke & Matthews⁶⁾, Lamberg⁷⁾ 等によつて始められ, 更に Greenspan⁸⁾ は TSH を心臓内に投与する改良法を発表した. 本 Bioassay の基礎的検討に関する報告⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾もみられるが, TSH と ³²P の投与方法と投与の時間的關係及び指標の選び方等に就いては, 尚問題点が多いので両者を比較して検討を行なつた.

1. 実験材料並びに方法

1) 検定動物

白色レグホン雄雛を30℃の恒温箱で飼育し, 孵化後第3～第4日目実験に供した.

2) ³²P

生食水0.5ml, 中に10～25μc, を含有せる様に調整し腹腔内に注射した.

3) 標準 TSH

Pretiron (Schering 社製) を生食水にて所要濃度に稀釈し, 腹腔内投与の場合は1ml., 心内投与の場合は0.1ml, を, この際又対照としては生食水のみを注射した.

4) ³²P 摂取率の測定

実験後断頭屠殺し, 両側甲状腺を剔出し, 周囲組織を剝離した後, 試料皿に入れ乾燥後その重量測定と Geiger-Müller Counter による放射能測定を行なつた. 更に胸腺及び血液の一部を採つて同様乾燥重量と放射能測定を行なつた. 尚この際のβ線自己吸収率は1%以下であつた.

2. 実験成績

1) TSH 反応性の指標

TSH 0.1 JSu. を腹腔内注射後 4 時間で ^{32}P 10 μc . 注射, 更に 2 時間後屠殺し, 両側甲状腺及び胸腺, 血液の一部をとり重量と放射能の測定を行なった. 甲状腺 ^{32}P 摂取率の指数として次の 4 者を選び夫々対照群に対する TSH 投与群の反応比率をみると第 1 図の如く, a) 甲状腺の全放射能では 2.14 倍, b) 甲状腺重量当りの放射能では 2.11 倍, c) 甲状腺重量当りの放射能/胸腺重量当りの放射能では 3.37 倍, b) 甲状腺重量当りの放射能/血液重量当りの放射能では 2.17 倍となった. 反応の個体差により分散をも考慮し最も簡単な甲状腺の全放射能を指数として採用する事にした.

第 1 図 TSH 反応性の指数

2) 甲状腺 ^{32}P 摂取の時間的推移

^{32}P 25 μc . 注射後, 甲状腺全放射能の時間的推移は第 2 図の如く, 略々 2 時間で最高に達した.

3) TSH 作用の時間的推移

TSH を腹腔内に 0.1 JSu., 又は心内に 0.05 JSu. 投与し, 一定時間後に ^{32}P を注射し, 更に 2 時間後甲状腺剔出を行なった. ^{32}P 摂取率が最高に達する時間及びその際の対照に対する比は第 3 図に示す如く, a) TSH の腹腔内投与後は 4 時間で 2.34 倍, b) TSH の心内投与後は 6 時間で 1.96 倍であった.

4) TSH 投与 2 時間後に ^{32}P を投与した場合の時間的推移

前述の ^{32}P 摂取率曲線と TSH 作用曲線の最高に達する時間を一致させる為に TSH を腹腔内に 0.1 JSu. 投与後 2 時間で ^{32}P を注射し, 以後甲状腺放射能の時間的推移をみると, 第 4 図の如く TSH 投与群と対照群との差が最大となるのは TSH 投与後 8 時間 (従つて ^{32}P 投与後 6 時間) でその比は 3.57 であった.

5) TSH と ^{32}P を同時投与した場合の時間的推移

TSH を腹腔内に 0.1 JSu., 又は心内に 0.05 JSu. 投与すると同時に ^{32}P を注射した場合の時間的推移は第 5 図の如く, 腹腔内投与心内投与共に注射後 6 時間で対照との差が最大となり, その比は前者では対照の 3.09 倍, 後者では 2.94 倍であった.

第 2 図 甲状腺 ^{32}P 摂取の時間的推移

第3図 TSH 作用の時間的推移

a) TSH 腹腔内投与

第3図 TSH 作用の時間的推移

b) TSH 心内投与

第4図 TSH 投与2時間後に³²Pを投与した場合の時間的推移 (TSH 腹腔内投与) 6) TSH, ³²P 同時投与6時間法による用量反応曲線

TSH と ³²P を同時に腹腔内又は心内に投与し、6時間後に甲状腺 ³²P 摂取率を測定する方法（同時投与6時間法）による用量反応曲線は第6図の如くで、感度をみると、腹腔内法、心内法共に 25 m JSu. 投与群以上で対照群と有意の差が認められた。又、精度指数λは腹腔内法では0.44, 心内法では0.54であった。

7) Thyroxine 投与難を用いた場合の用量反応曲線

内因性 TSH 分泌を抑制して投与 TSH に対し

第5図 TSH, ³²P 同時投与の時間的推移

a) TSH 腹腔内投与

第5図 TSH, ³²P 同時投与の時間的推移

b) TSH 心内投与

第6図 用量反応曲線

a) TSH 心内投与法

第6図 用量反応曲線

b) TSH 腹腔内投与法

る感度を高める目的で L-thyroxine 30 μ g. を 1 日 1 回 3 日間皮下注射した初生雛を用いた場合の前記心内同時投与 6 時間法での用量反応曲線は第 7 図の如く有意の差が認められるのは 25JSu. 以上であり又 λ は 0.45 であった。

3. 小 括

初生雛甲状腺の ^{32}P 摂取能を指標とした TSH Bioassay に就き検討した結果次の知見を得た。

- 1) TSH 反応性は分散及び手技の簡便さを考慮し、甲状腺の全放射能を指標とするのが最良であった。
- 2) 甲状腺の ^{32}P 摂取率は ^{32}P 投与後 2 時間で最大に達した。
- 3) TSH 作用は腹腔内投与後 4 時間、心内投与後 6 時間で最大に達した。
- 4) ^{32}P と TSH の投与時間の関係に就いては検定時間及び手技の点から考え、 ^{32}P , TSH 同時投与 6 時間後甲状腺の ^{32}P 摂取率を測定する方法が最も勝れていた。
- 5) 同時投与 6 時間法による感度は 25mJSu., 精度指数 λ は腹腔内法で 0.44, 心内法で 0.54 であった。

II マウスの血中 ^{131}I 放出を指標とした TSH Bioassay に関する検討

1958 年 McKenzie¹²⁾ は in vivo でマウスの血中 ^{131}I 放出が TSH により促進される事に基づく Bioassay を発表した³⁾、内因性 TSH 抑制の目的で投与する L-thyroxine と TSH 反応性との関係等に就いて検討を加え、更に本法の改良を企図し、以下の実験を行なった。

1. 実験材料並びに方法

1) 検定動物

阪大微研純系動物飼育所より入手せる ddO 系雌マウスで生後約 4 週を経た体重 14~16g のものを使用し、オリエンタル酵母固型飼料 MF のみで飼育した。又飼育並びに実験操作は常に 20~23°C の恒温室で行なった。

2) ^{131}I

生食水 0.5ml. 中に Carrier free Na^{131}I 10 μ c. 含有する様調整し、腹腔内に注射した。

3) L-thyroxine

生食水0.2ml, 中に L-thyroxine 10 μ g. を含有する様調整し頸部皮下に注射した.

4) 標準 TSH

Pretiron (Schering 社製) を生食水0.5ml, 中に所要濃度が含有する様調整し, 尾静脈より注入した.

5) 実験方法

前処置として ^{131}I 10 μ c. を投与し, 4時間後に L-thyroxine 10 μ g. を投与, 2回投与の場合は24時間後再び L-thyroxine 10 μ g. を注射した.

1~6日後マウスを軽いエーテル麻酔下におきツベルクリン注射器を内眼角から眼球に沿って後下方に刺入し, 血液 0.1ml, を採取, その放射能を well-type scintillation counter で測定した. TSH 反応性の算出には次式を用いた.

$$\frac{\text{TSH 投与後の血液0.1ml中の放射能 (cpm)}}{\text{TSH 投与前の血液0.1ml中の放射能 (cpm)}} \times 100$$

2. 実験成績

第8図 T_4 投与による血中 ^{131}I 放射能の経時的変化

1) L-thyroxine 投与による血中 ^{131}I 放射能の経時的変化

前処置として投与した L-thyroxine の内因性 TSH 分泌に対する抑制効果を血中 ^{131}I 放射能を指標としてみた所第8図の如く, L-thyroxine 1回投与では略々第5日迄抑制効果がみられ, 2回投与の場合は第6日迄抑制の持続をみた.

2) TSH 作用の時間的推移

TSH 4mJSu. 静注した場合の血中放射能の時間的推移をみると第9図の如く投与後2時間で最高に達したので, TSH 投与後2時間の血中 ^{131}I 放射能を測定する様にした.

第9図 TSH 作用の時間的推移 (4mJSu. 静注例)

3) L-thyroxine 投与後の TSH 投与時期とその TSH 反応性

第1日目に ^{131}I 及び L-thyroxine 1 回投与の前処置をし、第2日目から第4日目迄の各時期に於て夫々 TSH 4mJSu. 投与した3群のマウスに就て、夫々の TSH 反応性を比較してみると前処置からの経過日数が少ない程 TSH 投与による血中放射能の増加率が大で、第2日目に TSH を投与した場合、TSH 反応性が最も大であつた。

4) 前処置後の各測定定期時に於ける検量曲線の比較

前述の成績に基づき前処置後の各測定定期時に於ける夫々の用量反応曲線に就て、その精度を比較し、第10図及び第1表の如き結果が得られた。即ち、前処置後の TSH 投与時期が早い程検量曲線の回帰係数 (b) は大となるが、それに伴い各用量に於ける反応度の分散も大となる傾向がある。然し後者よりも前者の方がその増加度大なる為、結局精度指数としては勝れた結果となつた。

第1表 Assay Date による精度の比較

Assay date	Assay 数	Dose 数	標準偏差 の平均値	回帰係数(b) の平均値	λ	
					平均値	Range
第2日	3	5	66.5	271.4	0.24	0.17~0.29
第3日	5	2~5	53.7	168.9	0.31	0.21~0.38
第4日	4	3~5	39.5	119.5	0.35	0.20~0.46
第5日	3	2~4	57.8	140.2	0.43	0.26~0.58

3. 小 括

ddO 系マウスを用いその血中 ^{131}I 放出を指標とせる TSH Bioassay に就いて検討した結果次の知見を得た。1) 前処置として投与した L-thyroxine による内因性 TSH の抑制効果は1回投与では第4~第5日目、2回投与では第4~第6日目に最大を示した。2) TSH 反応性の最大に達するのは TSH 投与後2時間であつた。3) 前処置後の TSH 投与を第2日目に行なつた場合精度は最も良好で、測定可能範囲は 1~16mJSu. であつた。

Ⅲ 牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とした TSH Bioassay に関する検討

Bakke et al.¹³⁾ は in vitro で牛甲状腺切片の ^{131}I 放出率が medium に加えられた TSH で抑制される事を報告し、その機序を利用した TSH 測定法への検討も種々試みられているが¹⁴⁾¹⁵⁾、尚その機序には不明の点が多いので特にこの点に検討を加え、併せて本法の改良を企図して以下の実験を行なつた。

第10図 Assay Date による Dose Response Curve の比較

1. 実験材料並びに方法

1) 牛甲状腺切片の作製

屠殺後新鮮な牝牛甲状腺を約4℃の Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.35~7.40) 中にてその中央部より free hand で厚さ約0.5mmの薄片を作製し、濾紙で水分を拭い取り Torsion balance で70~80mgの切片とした。

2) Medium

pH. 7.35~7.40 の Krebs-Ringer Phosphate buffer (KRP) に Carrier として沃度濃度が 10 μ g/dl. なる如く KI を添加し、又切片の摂取 ^{131}I の有機化阻止の目的で mercazole (中外製薬製) を 1 mg/dl. なる如く加えた。放射性ヨードの添加量は 0.2 μ c/ml. とした。又標準 TSH は pretiron (Schering 社製) を KRP で所要濃度に希釈して使用した。尚 TSH は Release phase の medium のみに添加した。

3) 実験方法

切片と medium を入れた30~40個の容器を同時に振盪し得る Warburg 装置で温度38℃、振盪回数毎分60回転、open で incubate した。

a) Uptake phase: 切片を ^{131}I 含有 medium 3ml. 中で1時間 incubate した。

b) Release phase: Uptake phase 後切片の水分を濾紙で拭い取り、次で ^{131}I 非含有 medium を200ml. ずつ入れた3個のビーカー中で約1秒間ずつ順次に洗滌した後、更に濾紙で水分を除去して、TSH 含有 medium (^{131}I 含有せず) 3 ml. 中に移し、4時間 incubate した後、切片を 10% NaOH に溶解し、その放射能と Release phase 後の medium 1ml. 中の放射能及び Uptake phase 前の medium 1ml. 中の放射能を well-type scintillation counter で計測した。尚本実験に於ける放射能の回収率は 100.4~102.9% であった。又切片は同一実験に於ては同一の牛甲状腺組織より作製し、一点に5~6個の切片を充当した。

2. 実験成績

1) TSH 反応性の指標

Uptake phase に於ける切片の ^{131}I 濃縮能 (U) 及び Release phase に於ける切片の ^{131}I 放出率 (R) は次式により算出される。

$$U = \frac{T+M'}{M} \times 100 \quad R = \frac{M'}{T+M'} \times 100$$

但し、T: Release phase 後の甲状腺切片の放射能。

M: Uptake phase 前の medium 3ml. 中の放射能。

M': Release phase 後の medium 3ml. 中の放射能。

Bakke 等⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ は本法に於ける TSH 反応性の指標として R を採用しているが、私は Release phase に於ける切片の ^{131}I (蓄積) 保持能 ($U' = 100 - R$) と U の関係を検べた所 第11図の如く両者の間には正の相関関係が認められた。従つて私は切片による差を可及的僅少にする為最初の ^{131}I 濃縮能をも考慮に入れた新しい Parameter U'/U を TSH 反応性の指標とし次式により算出した。

$$U = \frac{T+M'}{M} \times 100$$

$$U' = 100 - R = \frac{T}{T+M'} \times 100$$

$$\therefore U'/U = \frac{T \cdot M}{(T+M')^2}$$

第11図 Parameter U, U' の関係

2) U/U 及び R を指標とした場合の検量曲線の比較

R を指標とした場合第12図a) の如く精度が著明に低いと思われる 検量曲線 に就いて U/U を指標として採用すると第12図b) の如く精度の勝れた検量曲線が得られた。

第12図 Parameter の採り方による検量曲線の比較 第12図 Parameter の採り方による検量曲線の比較

3. 小 括

牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とした TSH Bioassay の Parameter に関する検討を行ない次の知見を得た。1) 個々の切片の Uptake phase に於ける ^{131}I 濃縮能 (U) と Release phase に於ける ^{131}I (蓄積) 保持能 (U') との間には正の相関関係が認められた。2) 従つて TSH 反応性の指標として U'/U を採用し、従来の ^{131}I 放出率 (R) を指標とするよりも精度の改善が得られた。3) 本改良法による確実な測定可能範囲は $10^{-2} \sim 10^{-4} \text{JSu.}$ であった。

IV in Vitro 及び in Vivo の測定による人並びに豚 TSH 反応性の比較

TSH Bioassay の臨床応用に際しては標準 TSH と人 TSH の反応性の比較並びに同一検体を2種以上の方法によつて測定し、比較検討を行なう事が必要である。そこで人下垂体よりの TSH 抽出液に就いて私の改良した in vitro 及び in vivo の2方法でこの点を検討した。

1. 実験材料並びに方法

1) 被検材料

Autopsy によつて得た人下垂体より TSH 抽出を行ない、その稀釈液を使用した。即ち 4°C の氷室内で人下垂体の被膜を除去し、乳鉢内で 3% NaCl 溶液と共に磨碎して後遠沈し、その上澄を生食水で稀釈し実験に供した。尚一部はこの 2% NaCl 溶液によつて得た TSH 抽出液を更に Bates et al.¹⁴⁾ の方法に準じ Aceton 分画を行ないその粗人 TSH を先ず DEAE-C (Diethylaminoethyl Cellulose) Column によつて TSH 分画を精製し脱塩して後、これを更に CM-C (Carboxymethyl Cellulose) Column で精製したものを実験に供した。

2) Bioassay

Bioassay には in vitro の方法として牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とした改良法を、in vivo の方法としてマウスの血中 ^{131}I 放出を指標とした改良法を用い、実験条件を可及的同一にする為、上記下垂体の抽出液 (一部はそれを更に精製したもの) に就いて同一日に同時測定を行なつた。

2. 実験成績

1) 豚 TSH と人 TSH の反応性の関係

a) 人 TSH (5 個の下垂体よりの抽出液を pool したもの) を DEAE-C 及び CM-C により分離精製したものと標準 TSH である豚 TSH 製剤 (Pretiron) の両者に就き in vitro の Bioassay を試みた所両者の用量反応曲線は第13図 a) の如く略々平行関係を示した。

b) 3 個の人下垂体より 2% NaCl 溶液で抽出し pool した人 TSH と豚 TSH とに就いて in vivo の Bioassay を試みた所第13図 b) の如く夫々の用量反応曲線は略々平行関係を示した。

第13図 豚 TSH と人 TSH の反応性の関係

a) in vitro の Bioassay

第13図 豚 TSH と人 TSH の反応性の関係

b) in vivo の Bioassay

第2表 in vitro 並びに in vivo の Bioassay
による人下垂体の TSH 活性比較
(JSu./Pituitary)

Bioassay 下垂体番号	in vitro	in vivo
1	1.25	1.1
2	1.25	1.6
3	12.8	6.6
4	13.2	16.0
5	22.8	25.6

2) in vitro 及び in vivo の測定法による人下垂体の TSH 活性比較

5 個の人下垂体より夫々 2% NaCl 溶液で抽出せる TSH 液に就いて in vitro と in vivo の Bioassay を同時に行つた結果、第2表の如く両方法での測定値の間には略々平行関係がみられた。

3. 小 括

人下垂体より抽出せる人 TSH に就いて牛甲

状腺切片のヨード代謝を指標とする in vitro の改良法とマウスの血中 ^{125}I 放出を指標とする in vivo の改良法とを比較検討し、次の知見を得た。

1) in vitro 及び in vivo の Bioassay に標準 TSH として用いる豚 TSH と人 TSH の反応性には略々平行性が見出された。

2) 人下垂体の TSH 抽出液に就いて in vitro 及び in vivo の両方法で TSH 活性を測定したが、両測定値の間には殆ど差異が見られなかつた。

V. 総括並びに考按

初生雛甲状腺の ^{32}P 摂取能の指数として最初 Crooke 等⁶⁾は甲状腺重量当放射能を採用し、Lamberg⁷⁾は対照臓器として胸腺の放射能に対する比を採用したが、Greenspan⁸⁾は指数として甲状腺の全放射能、甲状腺重量当放射能及び血液放射能に対する比の3者に就き検討した結果、甲状腺の全放射能を指標とする

のが最良であると述べている。私の成績に於ても対照群に対する TSH 投与群の比率が最大であるのは〔甲状腺重量当放射能/胸腺重量当放射能〕を指標とする場合であつたが、分散が著明に大となつた。そこで他の指数の内、比率は略々同じであるが分散少なく且つ最も簡便な甲状腺全放射能を指数として採用した。

^{32}P を腹腔内に注射した際の甲状腺摂取率の時間的推移は Crooke⁶⁾ の成績と略々一致した。TSH 作用が最大に達する時間に就いては腹腔内投与の場合 4～6 時間⁶⁾、皮下投与の場合は 8 時間⁷⁾、心内投与の場合 8 時間¹¹⁾等と報告されているが、私の成績では腹腔内 4 時間、心内投与 6 時間であり (第 3 図)、諸家の報告との差異は使用 TSH 量、雛の種類等により生じ得るものと思われる。 ^{32}P と TSH の投与時間の関係に就いては TSH 投与後 4 時間で ^{32}P 投与、更に 2 時間後に甲状腺剔出を行なう法⁶⁾、TSH 投与後 7 時間で ^{32}P 投与、更に 1 時間後に甲状腺剔出を行なう法⁷⁾¹¹⁾、TSH・ ^{32}P を同時に投与して後 6 時間で甲状腺剔出を行なう法⁹⁾等が報告されている。然し、私の成績によると① TSH 腹腔内投与 2 時間後又は心内投与 4 時間後に ^{32}P 投与、更に 2 時間後甲状腺剔出を行なつた場合 (第 3 図) ② ^{32}P 摂取と TSH 作用の最大に達する時間を一致させる為に TSH 腹腔内投与後 2 時間で ^{32}P 投与、更に 6 時間後に甲状腺剔出を行なつた場合 (第 5 図) ③ 或いは TSH の腹腔内又は心内投与と同時に ^{32}P を投与した場合 (第 5 図) に於て対照に対する比率と分散を比較すると②が最も良く次で③、①の順となつた。

然し Bioassay は手技が簡便にして且つ検定時間の短い程良い為此を考慮すれば、③の TSH, ^{32}P 同時投与 6 時間法が最も勝れているといえる¹⁷⁾。TSH 投与法に就いて Greenspan⁸⁾ は心内投与の方が腹腔内又は皮下投与よりも勝れているとしたが、私の成績によると精度及び感度の点では大差が認められなかつた。更に心内投与は手技が困難にして且つ投与する検体容量が腹腔内の場合より少ないという欠点があり生物学的検定法の諸条件¹⁸⁾を勘案すると両者の優劣は早急に断じ難い。

又、甲状腺ホルモンを投与して、内因性 TSH 分泌を抑制する事により TSH Bioassay の感度を高めようとする試みも数多く為されているが¹²⁾¹⁹⁾、私の成績では L-thyroxine 前処置により分散は少なくなるが TSH に対する反応性は低下した。この一因として大量の L-thyroxine 処置により外因性 TSH 効果が減弱するという報告²⁰⁾²¹⁾も考慮し得る。従つて前処置しない場合に比し感度、精度共に改善される結果は得られなかつた。

次に in vivo での ^{131}I -labelled thyroid hormone の血中放出に基づく TSH Bioassay に就いては Adams and Purves (海狐)²²⁾²³⁾を初めとして Gilliland and Strudwick (雛)²⁴⁾及び Bates and Cornfield (雛)²⁵⁾等により種々の方法が報告されているが、1958 年 McKenzie¹²⁾の発表せるマウスの血中 ^{131}I 放出を指標とする方法はこれらの内最も勝れているとされている。内因性 TSH 分泌抑制の目的で行なう L-thyroxine 投与の前処置後 TSH を投与する迄の期間に就いては McKenzie¹²⁾ 及び山崎²⁶⁾²⁷⁾、鎮目²⁸⁾等は第 4～第 6 日目としているが、私の成績からもマウスの内因性 TSH 分泌の抑制が最大に達するのは第 4～第 6 日目であつたから理論的にはこの期間に測定を行なうのが適当と考えられる。然し私の成績では前処置後の時期が早い程精度が勝れ、第 2 日目に TSH 投与を行なつた場合の精度が最も優秀であつた²⁹⁾。この原因としては 1) L-thyroxine による内因性 TSH の抑制効果が充分効いているよりも適度に弱く効いている時の方が外因性 TSH の反応性が大となる可能性 2) 投与した ^{131}I によつてマウスの甲状腺が多少損傷される為 ^{131}I 投与後の期日が短い程損傷程度は少なく、従つて甲状腺の活性が高いので TSH に対する反応性が大となる可能性の 2 つが考えられる。

然し、投与 ^{131}I は $10\mu\text{c}$. であり Goldberg, Chaikoff³⁰⁾³¹⁾等によるこの程度の ^{131}I では甲状腺及び下垂体が損傷されないと報告されており、又第 8 図からみても分る様に L-thyroxine の抑制効果の無くなる第 6 日目頃より血中 ^{131}I 放射能が漸次再び上昇する事から考えて 2) の可能性は少ない。一方、大量の thyroxine により外因性 TSH の反応性は減弱するという報告²⁰⁾²¹⁾が見られ、又私の成績からも前述した如く初生雛甲状腺の ^{32}P 摂取能を指標とした場合 L-thyroxine 投与により TSH 作用がかえつて低下した事からも 1) の可能性が大である。私の改良せる方法による精度指数 λ は 0.17～0.29、感度は 1mJSu . で McKenzie¹²⁾の報告せる感度より稍々劣つていたがこれは検体動物種の差によるものと考えられる。

次に *in vitro* で牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とする方法の原理に就いて明確な解釈はなされていないが永田¹⁵⁾も指摘している如く TSH が甲状腺切片のヨード保持能をたかめる為、Release phase に於ける ^{131}I の medium への放出率 (R) が抑制されるものとみられ、従つて Release phase に於ける切片のヨード保持能 (U) は $100-R$ で表わされる。然るに、同一実験に於て同一牛甲状腺より作製した切片でもその ^{131}I 保持能は Uptake phase (U) でも Release phase (U') でも可成りの変動が見られ、これは恐らく個々の切片作製を必ずしも均一にする事が出来ない為と思われる。従つて Release phase で TSH 効果をみる場合にも各切片間に於けるヨード濃縮能の変動を可及的に避けるのが望ましい。今 TSH を加えないで Uptake phase でのヨード濃縮能 (U) と Release phase でのそれ (U') をみると両者の相関々係が見られたので各切片間の変動を出来るだけ少なくする parameter として U'/U を採用するのが合理的と考えられる。事実、前述の成績の如く ^{131}I 放出率を指標とすると一見精度が非常に低いと思われる場合でも U'/U を指標とすると精度の著しく改善される例が得られた。又本法の測定可能範囲は $10^{-2} \sim 10^{-5} \text{JSu}$ とする報告¹⁸⁾²⁹⁾が多いが私の成績ではこの範囲が毎常測定可能とはいひ難く確実な測定可能範囲は $10^{-2} \sim 10^{-4} \text{JSu}$ であつた。

以上、*in vitro* 及び *in vivo* の3方法に就いて私の実験成績を吟味し乍ら考察を加えたが、a) 牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とする方法、b) マウスの血中 ^{131}I 放出を指標とする方法、並びに c) 初生雛甲状腺の ^{32}P 摂取能を指標とする方法の内そのいずれが優秀であるかを Segaloff 等¹⁸⁾³³⁾³⁴⁾の提唱する Bioassay の条件の個々に就いて私の成績から比較検討してみる。

- 1) 感度の点では a) が最も優り、次で b) c) の順となる。
- 2) 精度及び再現性の点に関しては諸家の報告¹⁵⁾²⁶⁾及び私の経験³⁵⁾からも b) が最も優り、次で a) c) の順となる。
- 3) 経済的及び迅速な点では a) が最も有利であり、簡便性の点では3者いずれとも判定し難い。

従つて初生雛甲状腺の ^{32}P 摂取能を指標とする方法では人血中 TSH 活性測定等の臨床応用は困難であろう。次に Bioassay の臨床応用に際してはその標準 TSH と人 TSH との反応性に平行性の存する事が不可欠の条件であるが私の検討せる成績では両者の用量反応曲線に平行性が見出され、*in vitro* 及び *in vivo* の両法共に臨床応用の可能なる事が示唆された。然しこれは Bates et al.¹⁶⁾の報告とは相違した結果であるが、彼のは牛 TSH と人 TSH との反応性に就いて検討したもので、且つ Bioassay も私のそれとは異なる為とも思われる。又、人下垂体の TSH 活性を *in vitro* と *in vivo* の両法で同時測定した結果両測定値の間には略々平行関係が認められた。

尚人下垂体中の TSH 含量に就いては Bakke et al.³⁶⁾³⁸⁾³⁹⁾の牛甲状腺切片の重量法による報告並びに Wilhelmi²⁷⁾の白色レグホンの甲状腺 ^{32}P 摂取率法による報告とは少々異なるがこれは抽出法や Bioassay の相違する為とも考えられる。

以上の観点から牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とする *in vitro* の方法及びマウスの血中 ^{131}I 放出を指標とする *in vivo* の方法共に臨床応用には可能であるが微量な TSH 測定には前者が適し、他の臨床応用面例えば異常 TSH 等の検索には後者が有用である事が明らかとなつた。

結 論

in vivo と *in vitro* の TSH Bioassay に就き基礎的研究を行ない臨床応用への可能性を検討し、以下の如き結果を得た。

- 1) 初生雛甲状腺の ^{32}P 摂取能を指標とする方法は TSH と ^{32}P の腹腔内同時投与6時間後甲状腺の全放射能を測定する方法が最も優れ、精度指数 λ は 0.44、感度は 25mJSu であつた。
- 2) マウスの血中 ^{131}I 放出を指標とする方法は前処置の翌日 TSH 測定を行なう事により精度の改善を認め、 λ は 0.24、測定可能範囲は $1 \sim 16 \text{mJSu}$ であつた。
- 3) 牛甲状腺切片のヨード代謝を指標とする方法は新しい Parameter U'/U を TSH 反応性の指標とす

る事により精度の改善を認め、 λ は0.33, 測定可能範囲は 0.1~10mJSu. であった.

4) 人下垂体の TSH 抽出液に就いて in vitro と in vivo の方法で比較検討した結果, 人 TSH と標準 TSH との反応性は略々平行を示し, 又両方法の測定値の間にも平行関係が認められた.

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った吉田教授に深く感謝し, 又種々御鞭撻, 御指導を戴いた和田助教授, 熊原, 岩坪, 宮井博士及び実験に御協力頂いた阪上学士に心から感謝します. 又, Pretiron を提供下さった日独薬品に深謝します.

(本論文の要旨は第34回日本内分泌学会の一般講演²⁹⁾並びに宿題シンポジウム⁴⁰⁾の席上発表した.)

文 献

- 1) Loeb, L. Basett, R.B. & Friednan, H. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 26 : 860, (1929). 2) Aron, M. : C.R. Soc. Biol., 102 : 682, (1929).
- 3) De Robertis, E.D. : J. Clin. Endocrinol., 8 : 956, (1948).
- 4) D'Angelo, S.A. & Gordon, A.S. : Endocrinol., 46 : 39, (1950). 5) Tala, P. : Endocrinol., 53 : 474, (1953).
- 6) Crooke, A.C. & Matthews, J.D. : Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, 5 : 25, (1953).
- 7) Lamberg, B.A. : Acta Med. Scandinav. Suppl. 279, (1953). 8) Greenspan, F.S., Kriss, J.P., Moses, L.E. & Lew, W. : Endocrinol., 58 : 767, (1956).
- 9) 鎮目和夫, 入江 実, 飯野史郎 : 最新医学, 12 : 23, (1957).
- 10) 置塩郁三, 井上 康, 植田安雄 : 日本内分泌学会雑誌, 33 : 126, (1957).
- 11) 脇坂行一, 河野 剛, 山田光雄, 伊藤憲一, 野平信哉, 小林 功, 平井拓造 : 最新医学 13 : 1362, (1958).
- 12) McKenzie, J.M. : Endocrinol., 63 : 372, (1958).
- 13) Bakke, J.L. & Lawrence, N. : Endocrinol., 58 : 531, (1956).
- 14) 小倉 一 : 日本内科学会雑誌, 48 : 1045, (1959).
- 15) 永田 格 : 日本内分泌学会雑誌, 35 : 1267, (1960).
- 16) Bates, R.W. & Condliffe, P.G. : Recent Prog. Hormone Research, 16 : 309, (1960).
- 17) 宮井 潔, 千頭 隆, 岩坪治雄, 熊原雄一, 松尾美泰 : 日本内分泌学会雑誌, 33 : 126, (1957).
- 18) Segaloff, A. : Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, 5 : 1, (1953).
- 19) Gilliland, I.C. & Strudwick, J.L. : Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, 5 : 25, (1953).
- 20) Galli-Mainini, C. : Endocrinol., 29 : 674, (1941).
- 21) Cortell, R. & Rawson, R.W. : Endocrinol., 35 : 488, (1944).
- 22) Adams, D.D. & Purves, H.D. : Proc. Univ. Otago Med. Sch., 31 : 38, (1953).
- 23) Adams, D.D. & Purves, H.D. : Endocrinol., 57 : 17, (1955).
- 24) Gilliland, I.C. & Strudwick, J.L. : Clin. Sci., 12 : 265, (1953).
- 25) Bates, R.W. & Cornfield, J. : Endocrinol., 60 : 225, (1957).
- 26) 山崎鋭一 : 総合医学, 17 : 571, (1960).
- 27) E. Yamazaki, A. Noguchi, S.Sato & D.W. Slingerland : J. Clin. Endocr. & Metab., 21 : 1127, (1961).
- 28) 鎮目和夫 : 日本内分泌学会雑誌, 37 : 325, (1961).
- 29) 土岐泰久, 阪上 明, 宮井 潔, 吉田常雄 : 日本内分泌学会雑誌, 37 : 104, (1961).
- 30) Goldberg, R.C. & Chaikoff, I.L. : Endocrinol., 46 : 91, 1950.
- 31) Goldberg, R.C., Chaikoff, I.L., Lindsay, S. & Feller, D.D. : Endocrinol., 46 : 72, (1950).
- 32) 辻昇三 : 日本内分泌学会雑誌, 37 : 315, (1961).
- 33) Albert, A. : Ann. New York Acad. Sc., 50 : 466, (1949).
- 34) Lamberg, B.A. : Acta Endocrinol., 18 : 405, (1955).
- 35) 土岐泰久, 宮井 潔, 隠岐和之, 中原司朗, 上小沢道弘, 松尾美泰 : 日本内分泌学会雑誌, 36 : 250, (1960).
- 36) Bakke, J.L. & Lawrence, N.L. : J. Chin. Endocrinol. & Metab., 19 : 35, (1959).
- 37) Wilhelmi, A.E. : Ciba Foundation Colloquia on Endocrinology, 13 : 25, (1960).
- 38) Bakke, J.L. & Lawrence, N. : Endocrinology Society Meeting, June. 9-11, (1960).
- 39) Bakke, J.L., Knudtson, K., Lawrence, N. & Needham, G. : Endocrine Society Meeting, June 9-11, (1960).
- 40) 吉田常雄, 熊原雄一 : 日本内分泌学会雑誌, 37 : 340, (1961).