Studies on the Extragonadal Estrogens

Saburo ONO

Department of Obstetrics & Gynecology, Kobe Medical College
(Director : Prof. Yasuo UEDA)

Variation of output of urinary estrogens before and after oophorectomy or adrenalectomy, or both, in patients with uterine cancer, recurrent or metastatic breast cancer, have been observed by using modified Ittrich's chemical method of estimation. Concurrently, the following have also been investigated:

1. The effects of administration of ACTH, PMS, HCG, corticoids and synthesized gestagen (norethindrone), on the excretion of estrone, estradiol-17 β , and estriol in urine.
2. The problems of estrogen metabolism in human liver, in patients with breast cancer, after castration, right adrenalectomy and anastomosis of the left adrenal vein with renal vein, and of secretion of estrogens from the ovaries in postmenopausal women after adrenalectomy.
3. The effects of subtotal adrenalectomy against Cushing's disease on the symptoms and estrogen milieu.

The following results have been obtained:

- 1) It was found that there is an abrupt decrease in the output of urinary estrogens soon after oophorectomy, and that the recovery of urinary estrogen level noted after a while, and stabilized due mainly to recovered estriol value. As a result of a decrease in estradiol-estrone fractions and relative increase in estriol fraction, higher quotient of ET/EO+ED was observed after oophorectomy.
- 2) Marked increase in the output of urinary estrogens, particularly of estriol fraction was observed when ACTH was administered to castrated women with intact adrenals. No apparent response to the administration of gonadotropin after oophorectomy was obtained.
- 3) Marked decrease in the output of urinary estrogens, particularly of estriol fraction when prednisolone and dexamethasone was administered to castrated women.
- 4) Decrease in amount of estriol in urine when small doses of norethindrone were administered to castrated women.

Increase in the output of urinary estrogens, mostly of estrone fraction, followed by an increase in estradiol fraction when large doses of norethindrone were administered to castrated women or castrated combined with adrenalectomy.

It is assumed that this is due to extraglandular conversion of 19 norsteroids, particularly to estrone first and then estradiol-17 β .

5) Further reduction in the output of urinary estrogens (mean value, $3.7\mu\text{g/day}$) have been observed and no response was seen with ACTH after oophorectomy and adrenalectomy.

6) On the other hand, a slight increase in the output of urinary estrogens has been observed when ACTH was administered to castrated women with right adrenalectomy and anastomosis of the left adrenal vein with renal vein. This is probably due to a gradual process of the estrogen molecule disintegration in human liver and an overflow-phenomenon beyond its capacity.

7) There was a maintenance of excretion of small amounts of estrogens in urine. Still secreted from the ovaries in postmenopausal women after adrenalectomy.

((pp. 678~697))

性腺外エストロゲンに就いての研究

神戸医科大学産婦人科教室 (主任 植田教授)

小 野 三 郎

(昭和38年5月2日受付)

第一章 緒 言

Estrogen の作用を性機能に直接関与する reproductive action と、全身的な代謝機能の調節に関与する metabolic action とに大別すると、卵巢性の estrogen は性現象の遂行に第一義的な役割を演ずる事から reproductive estrogen と呼ばれて居るが、性腺外の estrogen (extragonadal estrogen) は主として生体の代謝機構の円滑な運営に必要な estrogen であると言う考え方から、此れを basic or metabolic estrogen と呼んで居る。

所で副腎皮質が性腺外 estrogen の主な生成の場であろうとの考え方は Callow¹⁾ (1940), Beall²⁾ (1940) 等の実験的研究以来、可成り古くから注目されて居たが、此の重要性が臨床内分泌学的な立場より認識される様に成つたのは、Huggins, Bergenstal³⁾ (1951) の末期乳癌に対する副腎外科の輝かしい治療成績以後の事であり、此の報告以来、性腺外 estrogen の動態を解明する事が要望されて来た、しかし、当時は此の方面の研究に大きな障壁が残されて居た。其れは測定技術の問題であつた。言う迄もなく、微量の estrogen を正確に測定するには、高度の抽出率と chromogen の除去化を具備して居なければならない。しかるに、近年に至つて、steroids 測定技術の進歩の結果、いくつかの此の様な条件をほぼ満足する方法が報ぜられる様に成つた。そこで、著者は此等の中、Itrich^{4)~7)} の測定法を取りあげ、其の精製、分割操作を一部改変し可成り正確性を期する事が可能であると考えられたので、以下、本測定法に依つて性腺外 estrogen の諸問題に就いて検討を加える事とした。

第二章 測定方法並びに其の検討

著者の行つた測定方法は Itrich が報告した測定法 (1958) を基とし、此れに Salokangas, Bulbrook が検討した Purification Step (1960) を加味した変法である。此の測定法の大要を Table 1, 2, 3 に示す。

第一項

1) 加水分解: 24時間尿 (1日尿量の少ないもの、即ち、尿不純物の濃度が高いもの程、estrogen の回収率が低下するので、1.5l 以下の場合は水を加えて1.5l とする) から100mlの尿を採取し、此れに15mlの conc. HCl を加え沸騰中の water-bath で100°C 1時間加熱水解した。

2) 抽出及び精製: 水解が完了すると、此れを冷却した後、ethyl ether 50ml を用いて分液ロートで激しく振盪し2回抽出した。次いで、此の ether 層を40mlの carbonate buffer solution (pH 10.5, 8% NaHCO₃ 溶液に20% NaOH 溶液を加えPH10.5に調製する) と30mlの 8% NaHCO₃ 溶液で各々洗滌した。最後に蒸溜水20mlで洗い、水層を除き、上層の ether 層を蒸溜乾固させる。以上の洗滌操作は主に acid fraction 及び不純物の除去を目的としたものである。次いで phenol fraction の抽出操作に移るが、上記の乾固物に10mlの benzene を加え加温溶解させ、冷却した後10mlの petrolether を加え混和し、予め estrogen を十分に溶解させて置く。此の溶液を分液ロートに移し、此のものに 1% NaOH 溶液 9mlを加え、充分振盪した後、下層の水溶液層を分離抽出し、此の操作を2回繰り返す。此の様にアルカリ溶液に依つて有機溶媒から estrogen を抽出する際に Brown⁹⁾ は estriol を予め水で抽出し、estrone-estradiol 分割を分離して居るが、著者は此の段階で2部分に分ける事なく、最後の chromatography で3分割に分け、操作の煩雑さを避ける事とした。次いで、此の 1%NaOH 抽出液に9grの Na₂CO₃・10H₂O を加え、充分振盪溶解した後、此のものに2mlの conc. HCl を添加し、再び20mlの ethylether を加えて振盪すると estrogen

```

graph TD
    A[100 ml. of 24hr. urine] --> B[15ml. of conc. HCl added, heated in water-bath at 100°C for 1 hour  
the specimens filtrated]
    B --> C[the urine extracted twice with 50ml. of ethylether]
    C --> D[ether extract]
    C --> E[urine discarded]
    D --> F[→washed with 40ml. of carbonate buffer solution  
(pH 10.5)]
    F --> G[discard.]
    D --> H[→washed with 30ml. of 8% NaHCO3]
    H --> I[discard.]
    D --> J[→washed with 20ml. of dist. water]
    J --> K[discard.]
    D --> L[ether evaporated and its residue dissolved in 10ml. of benzene and 10ml. of petroleum ether]
    L --> M[→extracted twice with 9ml. of 1% NaOH]
    L --> N[→benzene-petroleum ether (neutral fraction contained)]
    N --> O[discard.]
    L --> P[NaOH extract]
    P --> Q[→9gr. Na2CO3·10H2O and 2ml. HCl added  
(pH 10.5 buffer solution)]
    P --> R[→extracted twice with 20ml. of ethyl ether  
carbonate buffer solution]
    R --> S[discard.]
    P --> T[ether extract]
    T --> U[→washed with 10ml. of 8% NaHCO3]
    U --> V[discard.]
    T --> W[→washed with 10ml. of dist. water]
    W --> X[discard.]
    T --> Y[ether evaporated to dryness]
  
```

Adsorbent : partially inactivated Alumina mesh 200~300
(7ml. dist. water added to 100gr. activated Al_2O_3)

Flowrate : 15~20 drops/min.

Temperature : room temp.

1. Adsorption to 3gr. part. inact. alumina

- ## 2. Elution

a	Eluant	5ml. CCl ₄ ,	5ml. benzene
		9ml. 0.8% ethanol in benzene	
		other steroids, chromogen contained	
b	Eluant	12ml. 0.8% ethanol in benzene	estrone eluted
c	Eluant	10ml. 3% ethanol in benzene	estradiol eluted
d	Eluant	12ml. 30% ethanol in benzene	estriol eluted

3. Solvent evaporated to dryness

1ml. Hydrochinone- H_2SO_4 reagent added to the specimen

optimal concentration	52vol. % H ₂ SO ₄ for estrone
	estradiol
	68vol. % H ₂ SO ₄ for estriol

for 2min. cooled immediately in ice-water 1.5ml dist. water added, after cooling well shaken, cooled again for 3 min.

2%

a major step for the purification of urinary extracts is affected after the kober reaction has been carried out, using a specific extraction of the kober colours with P-Nitrophenol-Slution

for 2min. centrifugal separation, then its upper phase discarded.

(interferencefilter excludes wave length shorter than $560\text{m}\mu$ or 576 to $578\text{m}\mu$)

3) 分割：内径10mm，長さ30cm，上端に約30mlの貯液部を備え，下端の点滴口の径が1mmであるクロマト管を使用した．使用に当つて，クロマト管の下端に綿栓を施し，予め estrogen (estrone, estradiol-17 β , estriol) の各分割が適当な溶出域を得る様に活性度を標定した Alumina (和光純薬株式会社製活性アルミナ mesh 200~300 に蒸留水を 7 gr% の割合に均一に加え活性を調節したもの) 3 gr をクロマト管に入れ，此れを四塩化炭素で満した後，アルミナ柱の上面に石英砂を 5 mm の厚さに重ね上面を安定にした．

次いで、クロマト管中の四塩化炭素を滴下させ、四塩化炭素の液面がアルミナの上面約 5 mm の所に下降した時に、estrogen 抽出乾固物を 2 ml の benzene に加温溶解し、此れに 4 ml の四塩化炭素を加え混和した検体溶液を室温に保つた後にアルミナ柱に重畳し、吸着させ、此れを 5 ml の四塩化炭素と 5 ml の benzene で 1 回宛洗つた後、下記の如く溶出を始め分割した。

- ① 9 mlの 0.8% ethanol 加 benzene 溶液で estrogen 以外の steroids や不純物を溶出.
- ② 12ml の 0.8% ethanol 加 benzene 溶液で estrone を溶出.
- ③ 10mlの 3% ethanol 加 benzene 溶液で estradiol-17 β を溶出.
- ④ 12ml の 30% ethanol 加 benzene 溶液で estriol を溶出.

この際、溶出液の温度は室温、その他溶出速度等の条件は一定とした。又、予め検体容器を溶出溶媒で良く洗ひ、特に難溶な **estriol** はクロマトに充分移行させる事が大切である。此の様に、溶出を終れば各々の溶媒を蒸発乾固し比色に供する。

4) 螢光発色：分割した各検体に 1 ml の hydrochinon-H₂SO₄ 試薬を加え、これを 40 分間、沸騰中の water-bath で加熱し螢光発色を行う。加熱が終れば検体を直ちに 3 分間水冷し、其の各々に蒸留水 1.4 ml を加え、3 分間更に水冷した後振盪混和する。此れを再び水冷した後 4.5 ml の P-Nitrophenol-solution (100 ml の四塩化エタンに 2 gr の p-nitrophenol 及び 1 ml の ethanol を含む溶液) を加え 3 分間水冷した後、検体容器を密栓し、30 秒間激しく振盪し、次いで、2 分間遠心分離 (1500 回転/分) すると、検体は上下の 2 層に分離される。此の操作は kober 反応に依つて生じた抽出物中の不純物を除去する 目的で行はれるのであり、

此れが操作中最も特異且つ有力な purification step である。Kober substance は下層の organic phase に選択的に抽出されて居り、蛍光発色の際、強酸との加熱によつて生ずる chromogen は上層の水溶液相に留まつて居る。そこで、上層をピペットで吸引棄捨し、Kober substance が移行した下層 (organic phase) を検体として測定まで暗氷室中に保存する。

5) 測定：検体と同一条件で蛍光発色させた standard の蛍光値を100とした時の読みに就き、予め estrone, estradiol-17 β , estriol の0.05~1 γ の各濃度に依り製作した標準直線と対照して測定値とした。

測定器 日立分光光度計

1次 filter : 546m μ green mercury line

2次 filter : 562m μ

(Interference filter : 560m μ 以下の短波長及び577~579m μ の波長を除去)

光源 : mercury source

$$\frac{Fu \cdot Cst \cdot 1500}{Fst \cdot U} \mu g / 24 \text{時間尿}$$

Fu : 尿抽出エストロゲン蛍光値

Fs : 対照蛍光値 (estrogen standard)

Cst : 対照エストロゲン濃度

1500 : 24時間尿量

U : 抽出に用いた尿量 (100ml)

6) 本法の回収率：Estrogen 含有量を予め測定した卵巣、副腎剔除婦人尿100mlを酸加熱水解し、此れに estrone, estradiol-17 β , estriol を各々2 μ g宛添加し、抽出、精製、分割の全操作を行い測定値を求め、此の値より平均回収率と精度を求めた。其の結果は下図の如くである。

測定回数	添加E量	E O	E D	E T
10	2 μ g	76 $\pm$ 4.5	72 $\pm$ 5.7	75 $\pm$ 6.1
平均回収率 % : $\pm$ 標準偏差				

又、Chromatography の平均回収率は下表の如くである。

2 μ g	E O	94	○	○	% %
〃	E D	○	92	○	
〃	E T	○	○	97	
溶出溶媒		0.8% E . 加 . B	3 % E . 加 B .	30% E . 加 B .	

7) 本法の測定域：0.1 μ gの estrogen を尿 100ml (estrogen 含有量が既知の水解尿) に添加して回収試験を5回行つた結果、其の測定誤差は $\pm$ 25%以下で、標準偏差は $\pm$ 0.08と言う成績を得た。従つて、0.1 μ g以上の estrogen を含有する場合、本法は測定可能である。

8) 標準直線：Estrone, estradiol-17 β , estriol のいづれも1~0.05 γ の範囲では、Estrogen 各濃度と蛍光値との間に直線的関係を示した。

($P < 0.001$ にて直線的回帰を取る)

第二項 小括

estrogen の化学定量法は加水分解、抽出、精製操作、chromogen 除去法等いくつかの点で尚問題が残さ

れて居り、完全と言える方法は見出されていない。そこで、以下、著者の用いた方法を中心として、此等の問題点に就き逐次言及する事とする。

先づ水解法に就いては、人尿中の estrogen は既知のグルクロン酸や硫酸の他、恐らく 尚未知の酸とも結合し、水溶性の conjugated estrogen として排泄されると考えられて居るので、現行の estrogenconjugate の水解至適条件が或る程度不正確、不完全である事は当然の事と言え、又、estrogen (3 分劃) の glucuronide が化学的に合成出来ないで、水解操作に依る真の estrogen 回収率を測る事が不可能である事も其の一因と成つて居る。所で、著者が routine procedure として用いた水解法は 15vol. % conc. HCl で 1 時間加熱水解するが、此の方法は酸加水分解法としては現在最も普遍的であり、Marrian et al (1933) の系統的な研究に依つても、本法が臨床応用の範囲内では適當であるとされて居る。且し、此の方法も臨床的に意味の大きい、即ち、生物学的作用の高い 3 classic estrogen の抽出時にのみ適當であり、最近見出された一連の very sensitive ketolic estrogen の場合は、此等が酸加熱水解に依つて分解され易いので、不適當であるとされて居る。今日迄に人体から約 18 種の天然 estrogen が分離同定され、人の尿中に既に 12 の新しい estrogen が代謝産物として報ぜられて居るが、此等の多くは何れも生物学的活性が弱く、其の生物学的特性も不明のことが多い。更に、此等の中、 $16\alpha,\beta$ -hydroxyestrone, 16-keto-17 β -estradiol, 18-hydroxyestrone の如きはアルカリに非常に sensitive である事から、従来のアルカリ抽出法では抽出が不可能であるとされ、又 2-methoxy-estrone は有機溶媒からアルカリに容易に移行しないので定量的に抽出出来ない。又、slauwhite (1953) の研究に依れば、2-methoxyestrone, 16-ketoestrone, 17-desoxoestrone 等の新しい estrogen は何れも硫酸試薬と殆んど反応せず、螢光を発しないと報告されて居る。此の様に、此等の新しい estrogen の定量的抽出法や螢光特性は今後検討されるべきである。

次に抽出、精製過程に就いてであるが、Cohen and Marrian¹¹⁾ (1934) 酸加熱水解した妊婦尿から estriol と estrone, estradiol の抽出、精製方法を発表して以来、此れが今日に於ても、依然、抽出精製操作の基本となつて居る。著者の方法でも加水分解尿は ether で抽出され、従つて、此の抽出物は ether soluble steroids や他の有機物を包含して居るので、此のものを PH10.5 の Na_2CO_3 buffer solution, 8% NaHCO_3 Solution で洗滌して、其の acid fraction と不純物を除去した。此の原理は弱いアルカリ溶液から estrogen を ether で定量的に抽出出来るが、もし此のアルカリ溶液が PH10~10.5 であると、estrogen に伴う不純物の多くはアルカリ相に留るので、精製操作とも成り得る事が Engel 等に依つて示されて居る事にある。又、Brown の研究に依ると ether とアルカリの間の estrogen 分配係数は PH 値より ion 強度に依存する事が確められて居り、PH10.5 の carbonate buffer solution から estrogen を定量的に抽出し、極めて著しい精製効果をあげ得るとされて居る。次に、アルカリ溶液に依る phenolic fraction の抽出は estrogen が ether 層からアルカリ溶液に依つて定量的に直接抽出されないで、ether を一旦蒸発乾固した後に、benzene-petrolether に溶解させ、1% NaOH 溶液をもつて estrogen を抽出し、neutral fraction を分離し、再度、此のものを carbonate buffer solution を用いて精製した。

次に、分劃法として行つた Alumina column chromatography は Heard et al²⁾ (1941) Stimmel¹³⁾ (1946) に依つて estrogen の分劃、定量に用いられたものであるが、本法の欠点は市販のアルミナの性質に依つて吸着能に可成りの相異が認められる事とアルミナの不十分な調製に依つて分劃が不完全且つ不正確に成り勝ちな事であろう。従つて、満足すべき分劃、回収を得るには、アルミナの活性を非常に注意深く正確に標定する必要がある。此の点、Brockmann 標定は分劃に用うるにはやや不正確にすぎるうらみがあり、標定するには必ず estrogen をもつて直接確めねばならない。Stimmel の原法は回収率が幾分低く、特に estriol の回収率が低い。そこで、Brawn はアルミナ柱で分劃の際に蒸溜水を用いて其の partial inactivation を行つて居るが、著者は Ittrich の方法に従い、前記の如く標定したアルミナ柱で分劃し、一応満足すべき結果を得た。

次に螢光発色に就いてであるが、従来の抽出、精製、分劃法に依ると、いづれも、尿抽出物中に estrogen 以外の不純物が含まれて居り、此れが Kober 反応時に nonspecific brown colour として干渉し、測定の

障碍と成つて居た。従つて、比較的 estrogen 量の多い抽出物に於いてのみ正確な測定が可能であり、微量の estrogen を測定するには、此の nonspecific brown colour substance を可及的分離する必要がある。此の目的で従来から種々の光学的補正式や測定後の加熱、アセトン添加、或いは過酸化水素水添加に依る消去法が試みられて居たが、此等の方法は不純物が多くしかも estrogen の微量な場合は効果が甚だ不充分であつた。此の点に注目した Ittrich は kober 反応後に生ずる colour compound を p-nitrophenolchloroform 溶液で選択的に抽出し、不純物の大部分を除去する事に成功した。螢光測定法でも尿抽出物を強酸で処理すると kober 反応の場合と同様な障碍が chromogen に依つて惹起されるが、此の選択的抽出に依つて chromogen の大部分が除去される結果、chromogen に由来する励起光及び螢光の減弱は著るしく減少するので estrogen 本来の螢光は強められる結果となる。のみならず fluorescence spectrum の長波長側への移行は、energy の高い励起光（短波長）に依つて励起される雑螢光を殆んど生ぜしめないで、此れが chromogen の除去とあいまつて雑螢光を著るしく弱めて居る。さて、此の様な選択的抽出に使用される溶媒は前記の P-Nitrophenol-chloroform 溶液の他、その後 Ittrich や Salokangas and Bulbrook 等に依り検討が加えられ、 CHBr_3 - CHBr_3 や CHCl_3 - CHCl_3 が挙げられて居る。そして、此等の溶液は螢光の stability, specificity 及び sensitivity の点で chloroform より更にすぐれ、特に fluorescent compound の安定度は著しく上昇すると言う。

又、estrogen の螢光定量法と比色法を比較すると、前者は後者の10乃至100倍の感度を有するものであるが、其の反面、螢光の不安定性、不純螢光及び此れに対する簡便な補正法の無かつた所から、従来、常に其の信頼度が危惧されて来た。しかし、上記の著者の検討した成績、即ち回収率 72~76%、其の測定下界は 0.1ug で、其の誤差が $\pm 25\%$ を越えないと言う成績が示す通り、充分な抽出、精製操作を行い、次いで螢光発色後に specific colour compound の選択的抽出を行い、此れに依つて chromogen を除去し、低エネルギー励起に依る不純螢光の減弱、specific fluorescence の増強や安定化を計るならば、臨床内分泌の診断上はほぼ信頼するに足る成績を螢光測定法に依つて得る事が可能と言えるようである。

第三章 臨床成績

第一項 正常月経周期婦人の場合

成熟婦人 2 名に就いて、数周期に亘つて基礎体温を測定し二相性である事を確めた後、1 月経周期間隔日に尿中 estrogen 値の測定を行い、其の推移を観察し、以後の実験成績の対照とした。

測定成績は、Fig. 1 に示す通り、各例共、月経周期の前 1/4 の時期では月経周期を通じ最も低値を示して居るが、第 7 周日頃より増量し始め第 13 乃至 14 周日附近で急速な上昇を示して居る。しかも、BBT の上昇と同時に estrogen 値は比較的急速に下降するので、第 14 周日頃を最高とする一つの鋭い peak を排卵期に一致して作ることになる。其の後 estrogen 値は引き続き増殖期前半より高い値を保持し、殊に第 20 周日より第 26 周日頃にかけて、即ち黄体の開花期に一致して緩かに上昇し、高値を維持し月経直前になって再び急速に下降するので、黄体期にも一つの鈍な peak が形成されて居る。

次に、此の周期的変動を 3 分割に分け観察すると、各分割はほぼ平行して増減して居り、ovulation peak を除き、其の平均分割比 (ET/EO+ED) は 1.1 であつた。

第二項 去勢婦人の場合

手術的に卵巣を剔除し、術後の一般状態が安定し且つ異常所見（殊に肝機能）を認めない症例の尿中 estrogen を測定した。先づ子宮頸癌手術患者に就いて、術後の尿中 estrogen を逐日的に測定する一方、手術直後より術後 1 年までの間で種々の日数を経過した去勢婦人を約 50 例選り合計 63 回の測定を行つて、去勢後の尿中 estrogen 値の時間的変動を観察した。測定成績は、Fig. 2 に示す如くで、去勢直後の尿中 total estrogen 値は急速に減少したが、其の後、やや増加し始め、術後 20 乃至 30 日頃迄に、其の値は術前値の約 1/2 程度まで恢復する傾向が認められた。以後の推移は大体、此の level を維持して居るが、其の間の estrogen 3 分割別の変化を見ると、estriol 値のみ恢復を示し、estradiol, estrone は一旦減少した後さしたる変化なく低

値を保つて居る。尚、閉経期婦人に於いても卵巣剔除後の尿中 estrogen 値は Fig. 2' に示す通りやや減少しているが、その減少の程度は有経婦人の場合に比べて遙かに軽度である。また、尿中 estrogen の平均分割比 (ET/EO+ED) を比較すると、有経婦人の場合は術前値は1.1、術後の値は1.9で、閉経期婦人の場合は術前値は1.5、術後の値は2.1を示した。

Fig.1. Estrogen outputs in urine of normal, menstruating women

Fig.2. Effect of oophorectomy on levels of urinary estrogen

Fig. 2' Effect of oophorectomy on levels of urinary estrogens

第三項 種々の hormone の性腺外 estrogen の分泌に及ぼす影響

Extragenital estrogen の分泌を control する上位刺激 hormone, 或いはその他の steroid hormone との関連を検討する目的で, 去勢婦人に gonadotropin (serum gonadotropin, chorionic gonadotropin), ACTH, corticoids, 19-norsteroid 等を投与して, 尿中 estrogen の変動を観察した。

1) PMS 投与の場合 :

4 例の去勢婦人に FSH 作用の強い PMS (Anteron, Serotropin) を 1 日 1000~2000 単位, 2 日間連続投与した。其の成績は Fig. 3 に示す様に, 連続 5 日間の測定結果は, 全例, 投与前, 投与中, 投与後を通じ特記すべき変動を示さなかった。

2) HCG 投与の場合

3 例の去勢婦人に LH 作用の強い HCG (Primogonyl, Gonatropin) を 1 日 2000 単位, 3 日間連続投与した。其の成績は, Fig. 4 に示す様に, 此の場合に於いても 2 例に estrogen 値の僅かな増加を見たが, 有意

Fig. 3 Effect on PMS administration on levels of urinary estrogens after castration

PMS 1000~2000 i.u./day × 2 i.m.

Fig.4 Effect of HCG administration on levels of urinary estrogens after castration

の増加とは思はれなかつた。

3) ACTH 投与の場合

去勢婦人6例に ACTH-Z を4日間に40単位 (投与第1日目20i.u., 第2日目10i.u., 第3~4日目5i.u.) 投与して, 尿中 estrogen 値の動きを観察した. 其の成績はFig. 5, 6に夫々示す様に, 此の場合は有意に増加した. 即ち, ACTH 投与開始直後より estrogen 値は上昇し始め, 投与第4日目に最高値を示し, 投与終了後, 第5~7日目にほぼ投与前の値にまで下降した. 此の様に ACTH に対する性腺外 estrogen の反応は極めて速である. 次に, 此れを3分割に就いて検討すると, estriol の増加が其の大部分を占めてをり, estrone, estradiol の増加は軽度すぎないが, estriol より速かに増加して居る. 此の6例の測定成績を集約すれば投与中の total estrogen 値の増加の平均91%は estriol の夫れで占められて居る.

4) Corticoids 投与の場合

去勢婦人2例宛に夫々 prednisolone (30mg/日) と dexamethasone (0.5~1.5mg/日) を5日間連続投与し, 尿中 estrogen 値を測定した. 測定成績はFig. 7に示す通り, 尿中 estrogen 値は夫々の常用量で有意に減少して居る. 即ち, Prednisolone 投与例では投与を開始した日より, 漸次尿中 estrogen が減少し, 一方 dexamethasone 投与例では其の減少は前著よりより速かであつた. そして投与終了後第1~2日目頃では, 両者共, 僅かに回復の傾向を示して居る.

次に, 此を3分割に分け観察して見ると, estriol 値の減少が最も著しく, 此れに対し estrone, estradiol 値の減少は軽度であつた.

5) norethindrone 投与の場合

Fig. 5. Effect of ACTH administration on levels of urinary estrogens after castration
ACTH-Z 40i.u. over a 4-day period i.m.

Fig. 6. Effect of ACTH administration on levels of urinary estrogens after castration
ACTH-Z 40i.u. over a 4-day period i.m.

去勢婦人に norethindrone を 1 日 5 mg, 10mg, 20mg 宛, 夫々 14 日間連続投与した所, 5 乃至 10mg 投与例では軽微な total estrogen 値の減少, 殊に estriol 値の減少傾向が認められた (Fig. 8). しかし, 10 mg 投与の一部と 20mg 投与例では, total estrogen 値が増加し, 殊に estrone と estradiol 値に増加傾向を認めた. そこで, 投与量を増して, 1 日 50mg 2 日間連続投与した所, 尿中 estrogen 値は著しく増加し, 3 分割の中でも estrone 値が最も著るしく, 次いで, estradiol 値の増加が見られると言う結果を得た (Fig. 9). また, 去勢と両側副腎切除を同時に行つた乳癌患者に norethindrone を 1 日 50mg, 2 日間連続投与し

Fig. 7. Effect of corticoids administration on levels of urinary estrogens after castration

Fig. 8. Effect of norethindrone administration for long time on levels of urinary estrogens after castration

norethindrone 5~20mg/day $\times$ 14 per OS

Fig.9. Effect of norethindrone administration (large dosis) on levels of urinary estrogens (over a 2-day period)

てみても、前者と同様の結果を得る事が判明した。

従つて、以上の成績を要約すると次の様になる。即ち、性腺外 estrogen が ACTH, corticoids の投与に依つて有意に変動し、しかも gonadotropin の支配下でない事は、副腎皮質が性腺外 estrogen の主要分泌源である事を示唆して居る。一方、norethindrone 投与の増量は、少量の投与によつて estriol の減少が見られたが、大量投与時では、反つて、estrone, estradiol の増加が見られた。これは、去勢、副腎全剝婦人に於いても同様な結果を得る事から、norethindrone の生体内に於ける estrogen への extraglandular conversion を示すと考えられる。

第四項 卵巣、副腎剝出婦人の場合

前述の実験成績から、extragonadal estrogen の分泌源として副腎皮質の持つ意味の甚だ大きい事が覗かれたので、此处では、副腎皮質が性腺外 estrogen の分泌源として果して唯一無二のものであるか否か、さらに、此れと関連して肝での estrogen 代謝の問題を検討する目的で、以下の様な実験を行つた。

1) 卵巣、副腎全剝術後の尿中 estrogen

症例は末期或いは再発乳癌患者で、本院第二外科に於いて卵巣及び副腎全剝術を行つた13例の婦人を対象とした。測定成績は、Fig.10,11,12に示す如くで、卵巣、副腎全剝術後の尿中 total estrogen 値は急激に著しく減少し、3分割のいずれも低値を示してをり、全例の total estrogen の平均値は 3.7ug/24 時間尿であつた。これを去勢後の尿中 total estrogen 値と比較すると、前者の値は後者の約 1/2に相当して居る。又、術後1~2ヶ月の間では、去勢時と異つて、尿中 estrogen 値の恢復傾向は全く認められず、試みに、ACTH-Z を3日間に60単位投与した症例でも、estrogen 値の有意の増加を見なかつた。

2) 卵巣剝出、一側副腎剝出、他側副腎静脈と脾静脈吻合術後の尿中 estrogen

肝に於ける estrogen の不活化を目的として、卵巣剝出及び右側副腎剝出、左側副腎静脈と脾静脈との吻合術を併せ行つた乳癌婦人の尿中 estrogen 値を測定した。其の成績は、Fig.13,14に示す様に、術後の尿中 estrogen 値の減少度は、前述の全剝例に比較すると、明かに緩徐であり、吻合術後、ほぼ、全剝例の尿中

Fig.10. Effect of castration & total adrenalectomy on levels of urinary estrogens

Fig.11. Effect of ACTH, or norethindrone administration on levels of urinary estrogens after castration & total adrenalectomy

Fig.12. Comparison between the two groups on mean value of urinary estrogens

Fig.13. Effect of operation as below on levels of urinary estrogens

Fig.14. Comparison between the two cases on the output of urinary estrogens to ACTH administration

estrogen level 迄に減少するのに約1ヶ月の期間を必要とする事が判明した。又、本例に ACTH 負荷を試みた所、全剔例と異つて、尿中 total estrogen 値、殊に、estriol の明かな増加が認められた。

尚、吻合術後に全剔術を重ねて行つた症例では、其の estrogen 値は、各々、吻合例、全剔例の所見と一致して推移を示した。

第五項 副腎剔出婦人の場合

症例は2例の乳癌患者であるが、既に閉経後約10年を経過していたので、卵巢性 estrogen の分泌は停止して居ると考え、両側副腎剔出のみ行つて治療効果を観察した例である。此の成績は、Fig.15に示す様に、2例共、副腎全剔後、尿中 total estrogen 値は急速に低下し、術前値の約1/2程度と成つたが、依然、副腎、卵巢全剔時よりは高い値が保たれ、其の分割比はほぼ1に近い値を示して居た。同時に estrogen 値の恢復傾向が幾分覗はれて居る。しかし、本例はいつも其の治療効果が卵巢副腎全剔例に比し不良であつたため副腎全剔後、夫々16乃至22日目に、両側卵巢を追加剔除した。この結果、卵巢剔除後の尿中 estrogen 値は更に減少し、卵巢副腎全剔例と同じ estrogen level にまで低下した。よつて以上の成績は閉経後の卵巢からも、尚微量の estrogen を分泌する事を意味すると考えられる。

しかし、此の反面本例に於いては metabolic estrogen の急墜と言う特殊な事態に対処する生体の調節機構の一つの現れとも解されるので、速断する事は慎みたい。

尚次に Cushing 氏病のため入院加療中の年令23才の未婚婦人の尿中 estrogen 値の測定を行つたので、此の成績を前二者と比較して見た。

症例は約1年前より月経不順、過少月経を自覚すると共に、急激に肥胖し、約半年前より全く無月経と成り、症状の悪化を訴えて始めて当院を訪れたものである。本例は一側副腎剔出、他側副腎 3/5 剔出が行なはれたが、術前、術後の尿中 estrogen 値の推移は Fig.16に示す如くである。即ち、術前値は著しく低値を示

Fig.15. Effect of total adrenalectomy and later successive castration on levels of urinary estrogens

Fig.16. Effect of subtotal adrenalectomy for Cushing disease on levels of urinary estrogens

したが、術後日数の経過と共に次第に estrogen 値の増加が見られ、始めて術後47日目より4日間性器出血を見た。其れ以後の尿中 estrogen 値は、更に上昇し、殆んど正常月経周期に見られると同様の pattern を示し、前回の性器出血第1日より数へて第14日目には排卵を思はせる鋭い peak を作り、其の直後 BBT は上昇して高温相と成り典型的な二相性を示すに至つた。又黄体開花期に相当して estrogen 値は高値となり、次いで下降すると共に第29日目より4日間、排卵性月経の発来を見た。以後は整調な排卵性月経を反復して居る。

第四章 総括並びに考按

去勢婦人の尿中 estrogen 値の変動を長期間観察した結果、estrogen は去勢直後急速に減少するが、その後或る程度恢復する事が判明した。また total estrogen 値と3分割中の estriol 値との変動はほぼ平行性があり、estriol/estrone+estradiol 分割比が増大する事から、total estrogen 値の恢復は主として estriol 分割の恢復に依ると結論した。去勢後のかかる尿中 estrogen 値の減少に就いては Bioassay に依る多くの測定結果とも一致し、又 chemoassay を行つた Diczfalusy et al.¹⁴⁾ (1956), Strong et al.⁵⁾ (1956), Bulbrook et al.⁶⁾ (1957), Birke et al.⁷⁾ (1958), Brown et al.^{18), 9)} (1959), 永田²⁰⁾ (1960), 高山²¹⁾ (1960) 等も著るしい estrogen 値の減少や少くとも全般に低値を示すと報じて居る。此れに対し Persson, Risholm²²⁾ (1961) は閉経前や閉経後の乳癌患者に於いて去勢後8~10日間までの尿中 estrogen 値を測定しても、去勢前後の測定値に著るしい差異を認めないので、此れは恐らく estrogen の enterohepatic circulation の持続に依るものか、或いは postoperative stress の作用に依るものであらうと説明して居る。次に去勢後の尿中 estrogen の3分割比の変動を比較して見ると、著者の成績では Diczfalusy et al.²⁾ (1949) が報告した様な分割比 (ET/EO+ED) の減少は認められず寧ろ estriol の相対的な増加を認めた。此の結果は去勢婦人に就いての Brown et al.⁹⁾ (1959) の測定成績や Bulbrook²⁴⁾ (1957), Brown²⁵⁾ (1958) の正常閉経期婦人に就いての成績と同傾向であり、又乳癌患者で irradiation menopause から長期間経た婦人の尿中 estrogen の測定を行つた Brown¹⁹⁾ の報告とも一致する。

次に、性腺外 estrogen に対する gonadotropin, ACTH 投与の影響に就いて観察したが、著者の用いた投与量では PMS, HCG は共に去勢後の尿中 estrogen 値に有意の変動を来さない事が判明した。此の結果は Gemzell, Diczfalusy²⁶⁾ (1959), Bayer, Breuer, Nocke²⁷⁾ (1957, 1960), 徳山²⁸⁾ (1955), 松浦²⁹⁾ (1958) 等の報告と一致するものである。gonadotropin の投与実験に於いて estrogen 値の増加を認めたと言う報告もあるが、市販の gonadotropin 製剤は屢々 ACTH の contamination が認められるので、其の判定は慎重に行はれるべきであらう。

去勢動物に於いて、副腎皮質の肥大、発情期の異常持続や皮質の腫瘍性増殖の惹起される事を Dorfmann (1944), Frantz (1949) が報告し、Stieve³⁴⁾ (1947), Wense³⁵⁾ (1958) 等はようやく人に於いて、卵巣性 estrogen の分泌停止や減少が代償的と解される副腎皮質束状層の hyperplasia を惹き起す事を組織学的に証明したが、皮質に於ける estrogen の生成は厳密な localisation がなく、其の生成の証明すら不完全である。しかし乍ら、著者の実験成績からはやはり性腺外 estrogen を主に control する上位 hormone は ACTH であると考えねばならない。

また著者は corticoid の投与を行つて見たが其の結果は予期した通り、尿中 total estrogen 値の減少、殊に estriol 分割の著しい減少を認め、Persson et al.³⁰⁾ Nissen-Meyer et al.³¹⁾ (1949) Bayer et al.²⁾ (1961) の成績とはほぼ一致する事を知つた。

次に合成 gestagen 剤 norethindrone の投与が去勢婦人の尿中 estrogen に及ぼす影響に就いて観察したが、其の結果は前述の様に、少量投与時には尿中 estrogen の3分割中殊に estriol が減少し、corticoid と同様に副腎皮質に対し抑制的に働く様に見えた。此の成績は教室の野喜の去勢婦人に norethindrone を投与すると pregnanetriol 値の著るしい減少を見たと言う成績や Fortherby³³⁾ の pregnanetriol の precursor である 17 α -hydroxyprogesterone が estrogen の生合成に一部関与すると言う最近の報告と対比して可成り

興味深い。且し此の機序に就いては不明であり、唯 Huis int Veld & Van der Spek⁴⁾ (1958) は 19-nor. の投与は 17-KS, 17-OHCS の排泄値を低下させ、しかもこれが副腎皮質に対する本剤の直接的な作用に依るものであると述べて居る。一方, norethindrone の大量投与時には主に estrone, 次いで estradiol 分割の増加を認めたが、此の成績は Kaiser⁵⁾ (1957), Breuer et al⁶⁾ (1960) の報告と一致し、estrogen の conversion の可能性を示して居り、又本剤の投与が臨床的にも breast engorgement や climacteric symptoms の緩和をもたらすと言う Paulsen⁵⁷⁾ (1962) 等の報告を支持する成績を得た。著者は更に本剤を 卵巣副腎全剔例にも投与して全く同一の結果を得た。

此の様な所謂 steroid conversion は他の 19-norsteroids や dehydroepiandrosterone, testosterone 等を生体に投与した実験でも明かにされて居り、従つて卵巣性 estrogen の分泌の停止後や去勢後では尿中 estrogen の大部分が副腎皮質に由来するとは言え、extraglandular に androgen 等の neutral steroids から estrogen が生成され得る可能性のあることを忘れてはならない。

次に、乳癌患者に行なはれた卵巣、副腎全剔術後の尿中 estrogen 値の測定結果は結論的に言つて、性腺外 estrogen の大部分がやはり副腎皮質に由来する事を裏付けたと言えるが、此の成績は Strong et al¹⁸⁾ (1956), Bulbrook et al⁸⁾ (1960), 永井⁹⁾ (1960) 等の報告とほぼ同一であり、中でも Brown¹⁹⁾ (1959) の報告した値に最も近似して居る、そして去勢後に見られた尿中 estrogen 値の恢復傾向や ACTH 投与に依る増加は此の場合認められない。また本手術後に於いても尿中 estrogen 値が 0 にはならないと言うことは興味ある知見であり、Bulbrook⁸⁾ (1960) もこれを生物学的に実証して居る。そこで此の分泌源として①補副腎の形式、②Steroidhormon 特に術後の副腎不全防止に投与せられた cortisone からの conversion、③食餌性 estrogen の摂取等が推定されて居るが此の点に就いての解決は将来に待たねばならない。唯、Chang et al¹⁰⁾ (1961) は 4-C¹⁴cortisone acetate が 0.07% の割合で estrogen に conversion される事を証明している。

次に乳癌患者で卵巣、右側副腎を剔出し、左側副腎静脈と脾静脈の吻合を行つて、其の静脈血を門脈系に還流させた症例の尿中 estrogen を測定したが、此の場合全剔例に比し、術後の尿中 estrogen の減少度は、より緩徐であつた。又全剔例及び吻合例に夫々 ACTH 負荷を行つたが、全剔例では尿中 estrogen 値の増加を認めないのに反し、吻合例では肝の不活性化作用に依つて可成り減少して居た尿中 estrogen が一過性に明かに増加し、overflow phenomenon とも解されるべき所見を得た。吻合例の尿中 estrogen 値に就いて検討した研究は少ないが、永井⁹⁾ (1960) は total estrogen 値から見て 50% の減少率を見たと報告し、Galante et al¹¹⁾ (1955) は吻合例に ACTH を投与すると、生物学的測定成績から見て、尿中 estrogen 値は減少しなかつたと述べて居る。

又肝の estrogen 代謝に極めて重要な役割を果す enterohepatic circulation の存在を初めて証明した Cantarow et al¹²⁾ (1942) の研究に依ると肝に於ける estrogen molecule の分解は従来の in vitro の成績に反し、生体内では緩やかであるとし、Twombly et al¹³⁾ (1950) も radioactive bromestron を用いて同様の結果を人体に於いて得て居るのは衆知の通りである。

さて、以上の成績を概観すると、Meyer¹⁴⁾ (1955) 等の副腎皮質組織存在下に於ける 19-hydroxyandrostendione からの estrogen 生合成に就いての報告、或いは副腎静脈血中の estrogen 濃度は末梢静脈血中の夫れより遙かに高いと言う Hardy¹⁵⁾ (1957) らの報告と共に、性腺外 estrogen の大部分が副腎皮質に由来する事を示して居る。其れでは此のものが果して如何なる型で副腎皮質より分泌されるか、即ち estrogen そのものの型としてか、それとも前駆物質として estrogen の生合成にあづかるかは甚だ興味ある問題である。今もし、これが estrogen として分泌されるのであれば、此の大部分は生体内で estriol に代謝され、尿中に排泄せられなければならない。尿中 estrogen と生体内で産生された estrogen との関係を調べた Brown¹⁶⁾ (1957) の実験成績に依ると、投与 estrone の約 46% が又 estradiol-17 β の場合は約 44% が estriol に代謝されて尿中に排泄されるに過ぎないのであるから、副腎皮質より estrone, estradiol-17 β が分泌されて居るとすれば、前記の ACTH 投与時に見られた様に、尿中 estrogen 値の増加の約 70~90% が estriol

で占められる事実と一致しない事に成る。又 *estriol* 投与時は100% *estriol* の型で直ちに排泄される事が知られて居るが、もし *estriol* として皮質より分泌されたとすれば、前記の如く *ACTH* の投与に依つて尿中の *estriol* が *estrone*, *estradiol* の増加より1日遅れて最大値に達する様な事はない。何故ならば此の1日の遅れは *estriol* の排泄に時間を要したためではなく、*estriol* への代謝に時間を要するためである事がすでに確められて居るからである。従つて此の場合、*estrone* や *estradiol-17 β* でなく、高率に *estriol* に代謝され得る *estrogen* の存在の可能性も予想される次第である。更に *estrogen* の前駆物質として分泌せられるとすれば、此のものは前記した様に *estrogen* え高率に *conversion* され易い化合物として分泌されるのであろう。しかし、現在迄に副腎皮質組織中に存在し、*estrogen* に転換される事が知られて居る *Androst-4-en-, 3, 17-dion*, *Dehydroepiandrosteron* 等の *estrogen* えの *conversion rate* は、生体内に於いては僅か1%以下に過ぎず、従つて現在の見解では此等の *neutral steroids* の果す役割は性腺外 *estrogen* の極く一部を占めるにすぎないと言わなければならない。

次に前記の副腎切除例に就いての測定成績から、閉経後の卵巣も尚微量の *estrogen* を分泌する可能性のあることが推定されたが、*Paulsen et al*⁴⁷⁾ (1958) は閉経後1~2年を経過しても卵巣は依然 *gonadotropin* の投与に依つて反応し、尿中 *estrogen* の増加を見たことと報じ、一方 *Gemzell et al*⁴⁸⁾ (1959) は卵巣に於ける *follicle* の消滅後は *FSH* に反応しない事を報告した。*Hardy et al*⁴⁹⁾ (1957) も40才以下と40才以上(平均年齢57才)の2群の婦人の卵巣静脈の血中 *estrogen* 値を測定し、後者に於いても尚前者の約1/3に相当する *estrogen* 分泌能が維持されて居ると述べて居る。*Heller and Heller*⁴⁸⁾ (1944) は更年期後に於ける卵巣切除が所謂 *vegetative instability* を強める事から此の時期に於いても卵巣は依然重要な *estrogen* 分泌源であろうと考え、*Hertig*⁴⁹⁾ (1944) は閉経後の卵巣は其の間質細胞が *estrogen* を分泌すると述べて居るが本邦の松本⁵⁰⁾ (1962) も閉経と同時に卵巣機能が全く停止するのでは無く多少の内分泌活動があると報告して居る。上述の報文を総合すると、著者の成績も被検者の年齢よりして人に於ける卵巣間質細胞の *estrogen* 分泌能を示すものではなからうかと考えられる。

最後に著者は *Cushing disease* と診断された21才の婦人の副腎全切除前後の尿中 *estrogen* 値の変動を検べたが、極めて興味あるものであつた。*Frank*⁵¹⁾ (1933) は副腎の *benign hyperplasia* や *adenoma* の場合 *estrogen* 値は通常低値であると述べ、又 *Diczfalusy*⁵²⁾ (1961) は *estrogen* 生成能のある *adrenocortical tumor* は比較的稀であるとして居る。本例の術前の *gonadotropin* 値は正常で、*17-OHCS* 値は著しい高値を示したが、*17KS*値はやや増加した程度であり、身体所見として著しい肥胖の他男性化兆候は認められなかつた。さて *androgen* 過剰型の無排卵性月経異常に対し *cortisone*, *dexamethasone* 投与が有効である事は一般に認められて居るが、*Seelen et al*⁵³⁾ (1960) も報告する様に *adrenocortical dysfunction* の所見のない無排卵のものに対しても此等の投与が屢々排卵を誘発する事等は此等の *corticoid* 投与や副腎全切除との間に排卵に関して共通の機序が存在し、恐らく副腎皮質機能の正常化乃至は抑制が或種の *corticoids* の過剰分泌を低下させる事に依つて直接的或いは間接的に卵巣機能を賦活するのであろうと想像させる。

性腺外 *estrogen* との関連の未だ漠然とした臨床上の多くの知見を人での正確な *hormone assay* に依つて検討する必要から、上述の如き実験を行つたが今後卵巣と副腎皮質の機能的関連に就いて下垂体をも含めて更に慎重に検討を進めたい。

稿を終るに臨み、御懇篤な御指導御教閲を戴いた植田教授に深く謝意を表すると共に、御助言、御支援下さつた林講師及び貴重な実験の機会を与えられた第2外科石川教授、長谷川講師、津田博士を始め便宜を計つて下さつた協同研究者に深謝します。

文 献

- 1) *CALLOW, N.H. et al* : *Biochem. J.*, 34 : 276, (1940).
- 2) *BEALL, D.* : *Biochem. J.*, 34 : 1293, (1940).
- 3) *HUGGINS, C., et al* : *J.A.M.A.*, 147 : 101, (1951).
- 4) *ITTRICH, G.* :

- Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. : 312 : 1, (1958). 5) ITTRICH, G. : Zbl. f. Gynäk., 7 : 255, (1959). 6) ITTRICH, G. : Zbl. f. Gynäk., 11 : 429, (1960). 7) ITTRICH, G. : Acta endocrinol., 35 : 34, (1960). 8) SALOKANGAS, R.A.A., et al : J. Endocrinol., 22 : 47, (1961). 9) BROWN, J.B. : Biochem. J., 60 : 185, (1955). 10) BROWN, J.B. et al : J. Endocrinol., 16 : 49, (1957). 11) COHEN, H. et al : J. Chem. Soc., 6 : 653, (1934). 12) HEARD, R.D.H. et al : J.B.C., 141 : 709, (1941). 13) STIMMEL, B.F. : J.B.C., 162 : 99, (1946). 14) DICZFALUSY, E. et al : Acta endocrinol., 21 : 321, (1956). 15) STRONG, J.A. et al : Lancet, 2 : 955, (1956). 16) BULBROOK, R.D. et al : Acta endocrinol. Suppl., 31 : 324, (1957). 17) BIRKE, G. et al : Acta endocrinol., 29 : 55, (1958). 18) BROWN, J.B. et al : J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp., 66 : 177, (1959). 19) BROWN, J.B. et al : J. Endocrinol., 19 : 52, (1959). 20) 永田 : 神戸医大紀要, 21 : 154, (1960), 21) 高山 : 日産婦誌, 12 : 1015, (1960). 22) PERS-SON, B.H. et al : Cited from Diczfalusy, G. edited "Oestrogene beim Menschen." (1961). 23) DICZFALUSY, E. et al : J. Clin. Endocrinol. & Met., 19 : 1230, (1959). 24) BULBROOK, R. D. : Cited from "Oestrogene beim Menschen,, Brit. Med. J., 1 : 662, (1957). 25) BROWN, J. B. : Cited from "Oestrogene beim Menschen,, 26) GEMZELL, C.A. et al : Acta obst. et Gynec. Scand., 38 : 465, (1959). 27) BAYER, J.M. et al : Cited from Endocrinologie, 40 : 9, (1961). 28) 徳山 : 日内分泌誌, 31 : 549, (1955). 29) 松浦 : 日内分泌誌, 34 : 190, (1958). 30) PERSSON, B.H. et al : Cited from "Oestrogen beim Menschen" 31) NISSEN-MEYER, R. et al : ibid. 32) BAYER, J.M. et al : Endokrinologie, 40 : 9, (1961). 33) FORTHERBY, K. : J. Endocrinol., 25 : 19, (1962). 34) HUIS IN'T VELD., et al : Acta endocrinol., 33 : 388, (1960). 35) KAISER, R. et al : Arch f Gynäk., 194 : 146, (1960). 36) BREUER, H. et al : Acta endocrinol., 33 : 10, (1960). 37) PAULSEN, C.A. et al : J. Clin. Endocrinol. & Met., 22 : 1033, (1962). 38) BULBROOK, R.D. et al : J. Endocrinol., 20 : 220, (1960). 39) 永井 : 日外会誌, 61 : 1021, (1960). 40) CHANG, E. et al : J. Endocrinol., 21 : 624, (1961). 41) GALANTE, M. et al : Surg. Forum., 5 : 667, (1955). 42) CANTAROW, A. et al : Endocrinol., 31 : 515, (1942). 43) TWOMBLY, G.H. et al : Cancer, 3 : 601, (1950). 44) MEYER, A.S. : Cited from "Oestrogene beim Menschen,, 45) HARDY, J.D. et al : Surg. Forum., 9 : 109, (1957). 46) BROWN, J.B. : J. Endocrinol., 16 : 202, (1957). 47) PAULSEN, C.A., et al : J. Amer. Geriat. Soc., 6 : 803, (1958). 48) HELLER, C.G. et al : J. Clin. Endocrinol., 4 : 101, (1944). 49) HERTIG, A.T. : J. Clin. Endocrinol., 4 : 581, (1944). 50) 松本 : 日産婦宿題報告要旨, (1962). 51) FRANK, R.T. : Cited from "Oestrogene beim Menschen. 52) DICZFALUSY, E. : ibid 53) SEELEN, J.C. et al : Acta endocrinol., 34 : 189, (1960). 54) STIEVE, H. : Z. Geburtsh. Gynäk, 127 : 209, (1947). 55) WENSE, Th. VON et al : Cited from Diczfalusy, G. edited "Oestrogene beim Menschen" (1961).