Experimental Studies on Exophthalmos in Hyperthyroidism

—Studies on Exophthalmos Producing Substance—

Hiromasa TORIBE

The 1st Department of Internal Medicine, Osaka City University, Medical School

(Director : Professor Kenzo Shiota)

In order to obtain some information about endocrine exophthalmos, the author attempted to determine the exophthalmos producing activity of desiccated thyroid (thyradine), thyroxine (T_4) and triiodothyronine (T_3), to separate exophthalmos producing substance (EPS) from thyroid stimulating hormone (TSH) with column chromatography using pig thyrotropin preparation (pretiron) as the starting material and finally to test the effect of the thyroid hormone preparations on the exophthalmos producing response in gold fish, induced by pretiron.

The bioassay of EPS was performed by the determination of the percent increase in intercorneal distance (ICD) in gold fish after the intracloacal injection of the materials. The bioassay of TSH was performed with Bakke-Ogura's in vitro method using the suppressive effect of TSH on the release of ^{131}I from bovine thyroid slice. Column chromatography was performed on CM-C and DEAE-C.

The following results were obtained :

1) No marked diurnal variation was observed in ICD in gold fish, and ICD was not affected by the operative procedure of cutting off the fins or intracloacal puncture.

2) As the increase in ICD after the injection of 0.9% saline was under 5%, the author defined that an increase over 5% was significant. Macroscopic exophthalmos was observed at 3 hrs. after the injection of 5 Junkmann-Schoeller Units (JSU) of pretiron, and the peak of percent increase was reached at about 5 hrs.. The exophthalmic response of gold fish was decreased in summer when water temperature showed above 30°C.

3) At 5 hrs. after the injection of pretiron a linear responsiveness of percent increase in ICD to graded doses of TSH was observed to be between 1.25 JSU and 10.0 JSU of pretiron, but on the other hand, at 10 hrs it was observed to be between 1.25 JSU and 5.0 JSU.

4) Chromatographing pretiron on CM-C using 0.01M phosphate buffer solution for the first elution, and 1.0 M NaCl for the second, the second fraction had biologically highly thyroid stimulating and exophthalmos producing activity. Changing the elute beffer gradiently from the phosphate buffer to 1.0 M NaCl, the latter half of the second fraction also showed both thyroid stimulating and exophthalmos producing activity.

5) DEAE-C, 0.005 M glycine-NaOH, 0.1 M glycine-NaOH, 0.2 M NaH_2PO_4 and 1.0 M NaCl were used as the elute buffer. The fractions eluted by the 1st, 2nd, 3rd and

4th buffer were named Fraction I, II, III and IV, respectively. Fraction III showed marked thyroid stimulating activity, and Fraction II, III and IV showed exophthalmos producing activity equally.

6) An exophthalmic response was observed on the 4th day following the administration of a large quantity (20 mg) of thyradine, but it was not observed following the administration of T_3 or T_4 .

7) The pretreatment with T_3 showed a marked, inhibiting effect on exophthalmos production by pretiron, compared with that of thyradine or T_4 .

From the results above mentioned, it is suggested that EPS is distinct from TSH and that T_3 may be used as one of the therapeutic drugs for proptosis in patients with hyperthyroidism. (pp. 1117~1138)

甲状腺機能亢進症における眼球突出に関する実験

眼球突出因子に関する実験

大阪市立大学医学部第一内科教室 (主任 塩田憲三教授)

鳥 邊 博 正

(昭和39年7月16日受付)

I 緒 言

甲状腺機能亢進症は内分泌性疾患の中では糖尿病と共に最も多い疾患である。甲状腺機能亢進症には眼球突出 (以下眼突と略す) を伴う場合 (Basedow 氏病) と、伴わない場合 (不全型) とがあり、この眼突の病態生理を解明するために種々の試みがなされてきた。

1931年 Schockaert¹⁾ はアヒルに下垂体抽出物を注射して初めて実験的に眼突を起こしており、その後 Albert²⁾ (1945年) が下垂体抽出物に非常に感受性のある common Atlantic “minnow” (killifish = *Fundulus heteroclitus* Linn.) をみつめてから、其の後多くの研究者により種々の魚を用いて前葉抽出物や TSH 製剤に眼球突出惹起活性 (Exophthalmos producing activity) のあることがほぼ確認されている。1953年 Dobyns and Steelmann³⁾ は前葉抽出物に8%三塩化酢酸を加えて、TSH 作用はないが眼突効果の著明な物質を分離しこれを Exophthalmos producing substance (以下 EPS と略す) と呼んだ。Jefferies⁴⁾ (1949年) は前葉抽出物を沃度化することにより、又 Brunish⁵⁾ (1958年) はこれを pepsin で消化することにより TSH 作用はなくなるが眼突作用は残ることから両者は別個のものであると考えた。

そこで著者は Condliffe and Bates^{6,7)}, Condliffe et al⁸⁾ 等が粗製 TSH から TSH を精製している cellulose column chromatography を応用して、TSH と EPS が chromatographic に別個の行動をとるのではないかと考え、TSH 製剤である Pretiron を用いて両者の分離を試みんとした。

一方 Langford⁹⁾ (1957年) や Matty et al¹⁰⁾ (1958年) 等は乾燥甲状腺末、Thyroxine (T_4), Triiodothyronine (T_3) の甲状腺ホルモンで眼突が起きたとしているが、Albert²⁾ (1945年), Day¹¹⁾ (1960年), Dobyns et al¹²⁾ (1962年) 等は又これと反対の報告をしており一定していない。著者はこれら甲状腺ホルモンの眼突惹起活性の有無を、大量投与の場合と少量投与の場合とで比較検討すると同時に、甲状腺ホルモンの前投与が Pretiron の眼突惹起活性に如何なる影響を与えるかにつき検討を加えた。

II 実験材料並びに実験方法

1. 試薬並びに材料

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Na_2HPO_4

NaCl

Glycocoll ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)

NaOH

以上和光純薬の試薬特級を使用。

Carboxymethyl-Cellulose (CM-C)—Brown, イオン交換容量 0.8mEq/gm

Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE-C)—Brown, イオン交換容量 0.9mEq/gm

以上 Pharmacia Uppsala Sweden のものを使用。

2. 試料

Pretiron (Schering 社製品)

1 アンプル中に500モルモット単位 (Ms. E.=Junkmann-Schoeller Units) を含有する TSH 製剤で、豚の下垂体前葉より特殊の抽出法で得られたもの。下垂体後葉ホルモン、卵胞刺激ホルモン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン等を含まない。

Thyradine (帝国臓器製品)

発育完全な健康哺乳動物の新鮮な甲状腺より特殊の抽出法で得られた甲状腺ホルモン製剤で、1 ml 中に日本薬局方乾燥甲状腺0.2gm相当を含有。

Thyroxine (The British Drug Houses LTD. 製品)

L-Thyroxine Sodium Salt として存在。

Thyronamine (武田薬品製品)

L-3, 5, 3'-Triiodothyronine Sodium Salt として存在。

3. Cellulose Column の調製

Condliffe, Bates and Fraps⁹⁾ の報告に従い CM-C, DEAE-C 約 20gm に夫々 0.5N NaOH と NaCl の混合液を加えて良く攪拌し、吸引鐘に入れて水流ポンプにて減圧し、cellulose に吸着せる空気を完全に除去してから、先端に綿をつめた 2.5×50cm の column に充填し、更に同混合液で洗滌し、これに約 1l を使用した。次いで脱イオン水を滴加して流出液の pH が約 6 になる迄洗滌し、そして流出液を日立製 Spectrophotometer (type EPU-2A) を用いて波長 276m μ にて吸収率を測り、吸光度が 0.020 以下なる事を確かめてから、CM-C には pH 6.3, 0.01M の phosphate buffer を、DEAE-C には pH 9.5, 0.005M の glycine-NaOH buffer を流し、流入液と流出液の pH が一致する迄 bufferize した後 cold room に保存した。buffer の pH 値は日立製 pH Meter (Type EHP-2) を使用して測定した。

4. 試料の調製

Pretiron を initial buffer 即ち CM-C では 0.01M phosphate buffer 2.0ml, DEAE-C では 0.005M glycine-NaOH buffer 2.0ml で溶解し、その1.0ないし 1.5ml を cellulose column に添加し、ついで次に述べる elute solvent にて展開溶出した。

5. Column Chromatography の実施条件

column size は 0.9×20cm

fraction size は 5 ml

temperature は 0°~4°C (cold room にて行なう)

elute volume は 18~21ml/hr.

solvent は

1) CM-C pH 6.3, 0.01M phosphate buffer のあとは

a) 1.0M NaCl で stepwise に展開溶出

b) 1.0M NaCl で gradient に展開溶出

の二方法を実施。Gradient elution は Alm et al¹³⁾ を参考にして行なつた。(Fig. 1)

2) DEAE-C pH 9.5, 0.005M glycine-NaOH のあとは stepwise に pH 9.5, 0.1M glycine-NaOH で、ついで 0.2M NaH₂PO₄, 1.0M NaCl の順で展開溶出。

5 ml 宛 fraction collector で集めた各試験管の吸収率を 276m μ にて測定し、吸収率の peak の部分をそれぞれ pool して透析し、凍結乾燥して白色粉末を得、この粉末にそれぞれ 0.9% NaCl 2.0ml を加えて溶解し、各々 TSH の bioassay と金魚眼突の bioassay に使用した。

6. TSH 活性の Bioassay (Bakke-小倉氏法¹⁴⁾)

in vitro 法で新鮮な牛甲状腺スライスに ¹³¹I を含むヨードを負荷しておき、このスライスを各段階に稀釈した TSH を含む標準液中で incubate すると、medium 中に放出されるヨードの量は TSH によつて

Fig. 1. Schema for gradient elution of column chromatography

Fig. 2. The four gold fishes on the right treated with 10^{-2} JSU of Pretiron 5 hours previously. Control fish of 0.9% saline on the left.

抑制され、その放出抑制度と TSH 濃度との間には $\text{TSH } 10^{-2} \text{ JSU/ml}$ より 10^{-3} JSU/ml までの濃度範囲において推計学上直線回帰が成立し、この現象を利用して血中 TSH 活性の測定を行なう方法である。

7. 金魚の眼突反応の Bioassay

著者は入手、飼育容易な市販の金魚の一品種である和金 (*Carassius auratus*, var. *japonicus*) を用いた。生後1年から2年の体長7 cm 前後、体重4 gm 前後の和金5匹或いは10匹を一群とし、個々の識別には鰭の一部を切除した。ガラス容器に塩素を抜いた水道水を入れ、thermostat にて水温を $22^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$ に保ち、サイフォンポンプにて絶えず空気を送って飼育し、実験迄飼料は特に与えなかった。試料の投与方法は Albert,²⁾ Dobyns and Wilson,¹⁵⁾ 又 Der Kinderen et al¹⁶⁾ の報告を参考にした。即ち試料は朝9時頃に注射し、午後2時頃 (約5時間目)、午後7時頃 (約10時間目)、翌朝9時頃 (約24時間目) に角膜間距離 (Intercorneal Distance, 以下 ICD と略す) を測定した。1 ml ツベルクリン注射器に $1/4$ 針をつけ、汚溝を通じて穿刺しすぐ針の先が腹壁をこすようにして魚の長軸に平行に針を走らせ、内臓に損傷のないようにし腹腔内に試料を注入した。注入後汚溝より試料の漏出しない事を確認してから水中に放出した。投与回数は1回、投与量は体重10 gm あたり 0.5 ml の割とした。即ち和金は大体4 gm 程度であるので0.2 ml を注入することとした。眼突効果は試料注入前後の金魚の左右角膜間距離を測定し、注入前の ICD を100としてこれに対する増加率、即ち percent increase にて表わした。ICD の測定には副尺のある鋼のノギス (0.05 mm の精度) を用いて、1匹につき3回測定して平均値をとった。測定には常に同じ人間があたり、光源の位置、ノギスや金魚の保持の仕方も一定にした。注入前の金魚の ICD は7~10 mm であつた。Fig. 2 は金魚の眼突状態を示したものである。

III 実験結果

A 基礎の実験

実験1 自然放置下での金魚 ICD の経時的変動 (Fig. 3, Table 1)

飼料を与えず水温 24°C に自然放置した時の ICD の時間的変動を、2日間追跡し朝、昼、夕の3回計測を行なった。最大変動はほぼ $\pm 3.5\%$ で、2日間ではえさを与えなくても特に痩せて ICD に影響を与えるようなことはなく、著しい日内変動は認められなかった。以下実験中はえさを与えることなく観察を行なった。

実験2 機械的刺戟の ICD に及ぼす影響 (Fig. 4, Table 2)

Fig. 3. Diurnal variation of ICD on the gold fish (n=10)

Fig. 4. Change of ICD after operative procedure. On the right cut off of fin. On the left puncture in cloaca (n=10)

Table 1. Diurnal variation of ICD on the gold fish

	Percent increase in ICD				
	5hrs.	10hrs.	24hrs.	33hrs.	54hrs.
n = 10	-0.59 ± 0.52	-0.17 ± 0.39	0.31 ± 0.65	0.14 ± 0.51	-1.18 ± 0.54

Table 2. Change of ICD after operative procedure

	Percent increase in ICD after operation			
	5hrs.	10hrs.	24hrs.	48hrs.
Cut off of fin (n = 10)	0.28 ± 0.57	0.74 ± 0.49	-0.58 ± 0.42	-0.85 ± 0.65
Puncture in cloaca (n = 10)	0.94 ± 0.37	1.09 ± 0.51	-0.12 ± 0.68	0.51 ± 0.61

金魚を個々に区別するために尾鰭、胸鰭、腹鰭をそれぞれ切除し、又試料を投与するのに汚溝を通じてツバクリン針を挿入するので、これ等の機械的刺戟が ICD に影響を及ぼすか否かを検討した、即ち金魚の鰭を切断し或いはツバクリン針を汚溝を通じて挿入したあと経時的に ICD を測定した、その結果は Fig. 4 にみられる如く $\pm 4\%$ 以内の変動であつた。

実験 3 0.9%食塩水の ICD に及ぼす影響 (Fig. 5, Table 3)

試料はすべて 0.9% 食塩水に溶解して実験に供したため、この溶媒による ICD の変化を観察した。和金 45 匹に 0.9% 食塩水 0.2ml を注射した後 5, 10, 24, 48 時間目における ICD 増加率の 95% 信頼区間 (Confidence Interval) は図の如く 5% 以内である。このことから著者は 5% 迄の眼突出は正常範囲内の動きと判定し、5% 以上をもつて眼突出陽性とした。尚以下の実験では必ず 0.9% 食塩水の対照群をとることにした。

実験 4 Pretiron 10JSU 投与の ICD に及ぼす影響 (Fig. 6, 7, Table 4)

I) 1 回投与

Fig. 5. Influence on ICD after intra-cloacal injection of 0.5ml of 0.9% saline per 10gm body weight. (n=45)

Table 3. Influence on ICD after intracloacal injection of 0.5ml of 0.9% NaCl per 10 gm body weight (M±2S.D.)

	Percent increase in ICD			
	5hrs.	10hrs.	24hrs.	48hrs.
N=45	0.69±3.6	1.49±3.1	-0.28±3.99	0.86±1.7

Fig. 6. Percent increase of ICD after single injection of 10 JSU of Pretiron. (n=10)

Fig. 7. Percent increase of ICD after repeated injection of 10 JSU of Pretiron. (n=10)

Fig. 8. Percent increase of ICD after injection of 5 JSU of Pretiron (hourly observed). (n=3)

Table 4. Change of ICD after single injection of 10 JUS of Pretiron

	Percent increase in ICD					
	5hrs.	10hrs.	24hrs.	33hrs.	48hrs.	4days
n=10	9.33±0.65	7.16±0.44	3.74±0.27	3.69±0.40	1.93±0.31	-0.27±0.44

Pretiron 10 JSU を0.9%食塩水 0.2ml に溶かし腹腔内注射後5時間目で ICD 増加率は $+9.33 \pm 0.65\%$ と最高値を示し、10時間目では $+7.16 \pm 0.44\%$ と減少の傾向を来とし、24時間目では全例急速に減少して $+3.74 \pm 0.27\%$ と正常変動域に入り、48時間では更に減少し、約4日目で ICD は $-0.27 \pm 0.44\%$ と正常に復した。眼突の最高持続時間は約5時間である。以後の実験においては Pretiron の標準をもとることにした。

II) 2回投与

更に前回の実験にひき続き眼突の全く元に戻した5日目に Pretiron 10 JSU を再投与したが、Fig. 7の如く2回目も1回目と殆んど同様の ICD の変動がみられ、眼突反応は Pretiron により惹起されるのであつて他の偶発因子によらないことを確認した。

実験5 Pretiron 注射後1時間毎の ICD の変動 (Fig. 8)

Pretiron 注射後の ICD の変動を更に詳細に1時間毎に測定した。何れの場合も注射1時間後にすでに増加傾向がみられ、早いものは2時間目に肉眼的眼突を示し、3～4時間後では全例に眼突著明、又 peak は4～7時間内に来るようで、早いものは5時間目位から減少傾向が現われる。

実験6 Pretiron の投与量と眼突度との関係 (Fig. 9, 10, Table 5)

Pretiron の夫々1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 JSU を計158匹の金魚の腹腔内に投与し、5時間後と10時間後の ICD 増加率を比較検討した。投与5時間目 (Fig. 9) では1.25JSU 注射群 (n=21) は $3.49 \pm 0.51\%$, 2.5JSU 群 (n=28) では $6.06 \pm 0.87\%$, 5.0JSU 群 (n=26) では $8.29 \pm 1.11\%$, 10.0JSU 群 (n=62) では $9.94 \pm 0.54\%$, 20.0JSU 群 (n=21) では $10.16 \pm 0.85\%$ の増加率でありこれを図示すると Fig. 9の

Fig. 9. Dose response of ICD after the injection of various doses of Pretiron (after 5 hours) (n = 158)

Fig. 10. Dose response of ICD after the injection of various doses of Pretiron (after 10 hours) (n = 158)

Table 5. Percent increase in ICD after the injection of various doses of Pretiron

n = 158		Percent increase in ICD after injection of Pretiron				
		1.25 JSU n = 21	2.5 JSU n = 28	5.0 JSU n = 26	10.0 JSU n = 62	20.0 JSU n = 21
Observation time	5hrs.	3.49 ± 0.51	6.06 ± 0.87	8.29 ± 1.11	9.94 ± 0.54	10.16 ± 0.85
	10hrs.	3.19 ± 0.38	4.99 ± 0.57	8.37 ± 1.03	8.16 ± 0.65	7.8 ± 1.07

如く, 1.25 JSU から 10.0 JSU の間では直線的増加がみられた。投与10時間目では 1.25 JSU 群は $3.19 \pm 0.38\%$ の増加率であり, 2.5 JSU 群では $4.99 \pm 0.57\%$, 5.0 JSU 群では $8.37 \pm 1.03\%$, 10.0 JSU 群では $8.16 \pm 0.65\%$, 20.0 JSU 群では $7.84 \pm 1.07\%$ を示し, Fig.10の如く 1.25 JSU から 5.0 JSU の間でだけ直線的増加を示した。即ち投与10時間目では実験5で述べた如く, すでに ICD の減少傾向のみられたものがあるため, 直線的傾向が得られにくいものと思われる。

B Pretiron の Cellulose Column による分画

実験1 CM-C (stepwise elution) による分画

(Fig.11, 12, 13 Table 6, 7)

Fig.11は Pretiron 250JSU, 8.6mg (1.0ml に溶解) を pH 6.3, 0.01M phosphate buffer 及び 1.0M NaCl で stepwise elution により展開した結果を示

Fig. 11. Column chromatography of Pretiron (250 JSU) on CM-C Temp. 4°C, Elute volume 21ml/hr., Solvents I: pH6.3, 0.01M Sodium phosphate II: stepwise change to 1.0 M NaCl

Fig. 12. Absorption spectrum of Fraction A, B and Pretiron (5 JSU/ml)

したもので, Tube No. 4~6 (Fraction A) と, Tube No. 15~17 (Fraction B) の二分画を認めた。各分画における最高値を示す Tube の吸収スペクトルの結果は Fig.12で, 276mμ 附近に極大吸収を認めたが, 両分画とも Pretiron 5 JSU/ml の吸収スペクトルと同じ pattern を示した。Fraction A と Fraction B は凍結乾燥後0.9%食塩水 2.0ml に溶解し, TSH 活性を検定した結果は Table 6 の如くで, Fraction B に強い TSH 活性が認められたが, Fraction A には殆んど見る可き活性はなく TSH 回収率は 75.5% であった。次に残りの試料で眼突活性を検定し

Fig.13. EPS activity of Fraction A and B (n=9)

Table 6. TSH activity of each fractions on CM-C (stpwise elution)

	TSH activity
Fraction A	0.156 JSU
Fraction B	188.50 JSU

Table 7. EPS activity of Fraction A and B

	Percent increase in ICD after injection of each fractions		
	5hrs.	10hrs.	32hrs.
Fraction A n = 9	1.14±0.71	-0.01±0.59	0.49±0.57
Fraction B n = 9	11.44±1.51	9.42±1.66	3.66±1.39

たのが Fig.13, Table 7 で, Fraction A では5時間後の ICD 変化は $1.14 \pm 0.71\%$ と正常範囲内にあり, Fraction B では5時間値は $11.44 \pm 1.51\%$ と著明な眼突を示した. 即ち Fraction B に TSH と EPS の両活性が著明に認められた. 又 Fraction A の各試験管の吸光度の総計は246であり Fraction B の総計は605であった.

実験2 CM-C (gradient elution) による分画

(Fig.14, 15, 16, Table 8, 9)

Fig.14は Pretiron 250JSU, 8.4mg (1ml に溶解) を pH 6.3, 0.01M phosphate buffer のあと 1.0M NaCl で gradient elution を行なつたもので, 同じく二つの peak が得られたが NaCl buffer の gradient elution の所では tailing した展開が得ら

Fig. 14. Column chromatography of Pretiron (250 JSU) on CM-C Temp. 0°C, Elute volume 20ml/hr., Solvents I: pH 6.3, 0.01M Sodium phosphate II: gradient change to 1.0M NaCl

Fig. 15. Absorption spectrum of Fraction C,D,E and Pretiron (5JSU/ml)

れた。この部分を前後二つの Fraction に分け Tube No. 4~7 を Fraction C, Tube No. 16~19 を Fraction D, Tube No. 20~27 を Fraction E とした。Fig.15は各分画の最高値を示す Tube の吸収スペクトルを示したもので、いずれも $276\text{m}\mu$ 附近で極大吸収を認めた。

TSH 活性は Table 8 の如く Fraction D に少くし認められるが圧倒的に Fraction E に強く、TSH 回収率は 87.45% であった。又眼突活性は Fig.16, Table 9 の如く 5 時間値では Fraction C は $0.47 \pm 0.27\%$, Fraction D

Fig. 16. EPS activity of Fraction C, D and E (n=9)

Table 8. TSH activity of each fractions on CM-C (gradient elution)

	TSH activity
Fraction C	0.404 JSU
Fraction D	6.24 JSU
Fraction E	212.0 JSU

Table 9. EPS activity of Fraction C, D and E

	Percent increase in ICD after injection of each fractions		
	5hrs.	10hrs.	28hrs.
Fraction C n = 9	0.47 ± 0.27	1.13 ± 0.37	-0.87 ± 0.80
Fraction D n = 9	1.17 ± 0.48	1.56 ± 0.29	-0.18 ± 0.36
Fraction E n = 9	8.88 ± 0.82	6.39 ± 1.52	0.95 ± 0.62

は $1.17 \pm 0.48\%$ で全然活性はなく、Fraction E に $8.88 \pm 0.82\%$ と著明な眼突が認められた。このように gradient elution を試みて TSH と EPS を分離しようとしたが、TSH も EPS も同様の態度をとり分離出来なかった。又 Fraction C の各試験管の吸光度の総計は270であり、Fraction D の総計は 356 であり Fraction E の総計は444であった。

実験3 DEAE-C (stepwise elution) による分画 (Fig.17, 18, 19, Table 10, 11)

Pretiron 375JSU, 12.2mg (1.5ml に溶解) を pH 9.5, 0.005M glycine-NaOH buffer のあとは stepwise elution にて pH 9.5, 0.1M glycine-NaOH buffer, 0.2M NaH_2PO_4 , 1.0M NaCl の順で展開した結果が Fig.17である。図の如く4つの peak が得られたが Tube No. 6~8 を Fraction F, Tube No. 19~22 を Fraction G, Tube No. 33~36 を Fraction H, Tube No. 45~47 を Fraction I とし、各分画の最高値を示す tube の吸収スペクトルは Fig.18に示してある。Fraction F,G,H では $276\text{m}\mu$ 附近に極大吸収が認められ、Fraction I でも同じ波長の所に吸収を認めた。各 Fraction の TSH 活性は Table 10 に示してある

Fig. 17. Column chromatography of Pretiron (375 JSU) on DEAE-C Temp. 4°C, Elute volume 18ml/hr., Solvents I : pH 9.5, 0.005M Sodium glycinate II : stepwise change to pH 9.5, 0.1M sodium glycinate III : stepwise change to 0.2M NaH_2PO_4 IV : stepwise change to 1.0M NaCl

Fig. 18. Absorption spectrum of Fraction F,G,H,I and Pretiron (5 JSU/ml)

Fig. 19. EPS activity of Fraction F,G,H and I. (n=10)

Table 10. TSH activity of each fractions on DEAE-C

	TSH activity
Fraction F	0.442 JSU
Fraction G	2.014 JSU
Fraction H	322.0 JSU
Fraction I	0 JSU

Table 11. EPS activity of Fraction F, G, H, and I

	Percent increase in ICD after injection of each fractions		
	5hrs.	10hrs.	28hrs.
Fraction F n = 10	-0.49 ± 0.70	-0.12 ± 0.68	-1.04 ± 0.42
Fraction G n = 10	3.28 ± 1.01	3.21 ± 1.03	0.29 ± 0.51
Fraction H n = 10	2.79 ± 1.34	1.78 ± 1.16	-0.61 ± 0.38
Fraction I n = 10	2.66 ± 1.03	1.98 ± 0.94	-1.34 ± 0.53

通り Fraction F, G には TSH 活性が極めて低く, Fraction I では全く認められず Fraction H に著明に集まり TSH 回収率は86.5%であった。眼突活性はFig.19, Table 11の如く Fraction F では正常範囲内の変化であるが, Fraction G, H, I では眼突反応の悪い例もあるが 5%を越す例が認められ眼突活性は Fraction G, H, I に分散して現われた。又 Fraction F の各試験管の吸光度の総計は262であり, Fraction G の総計は395であり, Fraction H の総計は235であり Fraction I の総計は109であった。

C 乾燥甲状腺末 (Thyradine), Thyroxine (T_4), Triiodothyronine (T_3) の前処置が Pretiron の眼突作用に及ぼす影響

実験 1 Thyradine の ICD に及ぼす影響 (Fig.20, 21, 22, Table 12)

Fig. 20. Effect of 0.5ml of 0.9% NaCl per 10gm body weight on ICD (n=10)

Fig. 21. Effect of Thyradine of 5mg on ICD (n=8)

Thyradine 5mg, 20mg の投与が和金の ICD に及ぼす効果を 8 日間観察した. 5 mg 投与の場合の最高変化は $4.49 \pm 0.49\%$ で, 0.9% 食塩水での対照 (Fig.20) と同様に ICD の変化は正常範囲内であつたが, 20mg 投与の場合は 4 日目に $6.71 \pm 0.99\%$ とかなりの眼突を来たし, その内 2 例は肉眼的に判別出来る程度の眼突であり, Thyradine 大量投与では眼突惹起作用のあることが分つた.

実験 2 T_4 の ICD に及ぼす影響 (Fig.23 24, Table 12)

T_4 5 γ , 50 γ の投与に依る ICD への影響

Fig. 22. Effect of Thyradine 20mg on ICD. (n=7)

Table 12. Change of ICD for 8 days after injection of thyroid hormones

		Percent increase in ICD							
		1day	2days	3days	4days	5days	6days	7days	8days
0.9% NaCl n=10		1.67±0.34	1.03±0.43	3.14±0.29	3.14±0.48	3.67±0.60	4.04±0.40	4.12±0.62	2.41±0.66
Desiccated thyroid	5 mg n=8	0.68±0.43	4.11±0.38	3.37±0.44	3.11±0.43	4.49±0.49	3.38±0.47	3.37±0.41	4.21±0.22
	20mg n=7	0.81±0.56	3.49±0.61	4.47±0.69	6.71±0.99	5.86±1.11	6.60±0.79	6.41±0.87	4.96±0.57
Thyroxine	5 γ n=8	-1.61±0.74	-0.65±0.72	-0.03±0.98	-1.81±0.92	-0.57±0.83	-1.71±1.03	-0.72±0.89	1.53±0.74
	50 γ n=8	-2.09±0.74	-0.94±0.67	-0.32±0.65	-1.22±0.96	0.39±0.49	-0.82±0.72	-1.10±0.87	-0.68±0.71
Triiodothyronine	0.5 γ n=7	2.38±0.41	4.29±0.86	3.73±0.54	2.89±0.59	3.59±0.79	3.18±0.64	3.09±0.76	2.46±0.42
	2 γ n=8	2.33±0.71	4.02±0.73	4.27±0.77	2.04±0.66	2.63±0.46	2.84±0.75	2.46±0.64	1.88±0.74

Fig.23. Effect of Thyroxine 5 γ on ICD (n=8)

Fig.24. Effect of Thyroxine 50 γ on ICD (n=8)

Fig. 25. Effect of Triiodothyronine 0.5 γ on ICD (n=7) Fig. 26. Effect of Triiodothyronine 2 γ on ICD (n=8)

はFig. 23, 24の如く正常範囲内の動きであり, T_4 には眼突作用は認められなかった。

実験3 T_3 の ICD に及ぼす影響 (Fig. 25, 26, Table 12)

T_3 0.5 γ , 2 γ の投与ではFig. 25, 26の如く両者共2例に投与2日目から3日目に軽度眼突を示したが, 肉眼的に識別出来る程度ではなく, 他は全く正常範囲内の ICD 変化であつた。この結果 T_3 には著明な眼突作用はないと云える。

実験4 Thyradine 前処置後 Pretiron の投与 (Fig. 27, 28, Table 13)

Thyradine 20mg 投与後甲状腺ホルモンの末梢組織への作用の現われている3日目¹⁷⁾に, Pretiron 5JSU を注射し Pretiron の眼突活性の影響のされ方を観察したのがFig. 28である。2例において対照 (Fig. 27) よりむしろ著明な眼突を来したが残りは対照と同程度であり, Thyradine 前処置は Pretiron の眼突作用に殆んど影響を与えないものと思われる。

実験5 T_4 前処置後 Pretiron の投与 (Fig. 30, Table 13)

T_4 50 γ を投与し前実験と同様 Pretiron 5JSU を3日目に注射した例 (Fig. 29) でも, 対照 (Fig. 27) と同様であり有意の差はなかつた。

実験6 T_3 前処置後 Pretiron の投与 (Fig. 29, Table 13)

T_3 は末梢組織での作用発現が早い¹⁷⁾ T_3 2 γ 投与後24時間目に Pretiron 5JSU を投与したが, この

Fig. 27. Change of ICD after injection of 5 JSU of Pretiron on the 3rd day following pretreatment with 0.9% NaCl (n=9)

Fig. 28. Change of ICD after injection of 5 JSU of Pretiron on the 3rd day following pretreatment with 20mg of Thyradine (n=7)

Table 13. Change of ICD in gold fishes after injection of 5 JSU of Pretiron on the 3rd day following pretreatment with thyroid hormones

	Percent increase in ICD after injection of									
	Thyroid hormones			Pretiron						
	1day	2days	3days	5hrs.	10hrs.	24hrs.	2days	3days	4days	5days
0.9% NaCl n = 9	0.80± 0.56	2.04± 0.58	3.21± 0.80	12.43± 1.93	13.66± 1.23	6.74± 0.91	3.99± 0.88	3.77± 0.84	4.08± 0.87	3.63± 0.74
Desiccated thyroid 20mg n = 7	0.83± 0.64	2.36± 0.70	5.04± 0.79	19.42± 4.10	7.96± 2.04	2.57± 0.51	1.53± 0.87	4.05± 0.54	3.09± 0.69	2.82± 0.26
Thyroxine 50γ n = 6	-3.17± 1.10	-0.76± 0.98	-2.62± 0.46	11.43± 1.88	9.34± 2.25	-0.49± 1.53	-2.61± 0.59	-2.92± 1.38	-3.40± 1.15	-2.63± 1.23
Triiodothy- ronine 2γ n = 7 *	-0.86± 0.29	/	/	5.17± 0.42	4.69± 0.63	0.79± 0.59	1.33± 0.62	1.46± 0.70	1.75± 0.49	2.00± 0.78

* Pretiron was injected on the 24th hour following pretreatment with Triiodothyronine.

Fig. 29. Change of ICD after injection of 5 JSU of Pretiron on the 3rd day following pretreatment with 50γ of Thyroxine (n=6)

Fig. 31. Change of ICD after simultaneous injection of 0.9% NaCl and 5 JSU of Pretiron (n=5)

Fig. 30. Change of ICD after injection of 5 JSU of pretiron on the 24th hour following pretreatment with 2γ of Triiodothyronine (n=7)

Fig. 32. Change of ICD after simultaneous injection of 20mg of Thyradine and 5JSU of Pretiron (n=5)

Fig. 33. Change of ICD after simultaneous injection of 50 γ of Thyroxine and 5 JSU of Pretiron. (n=5) Fig. 34. Change of ICD after simultaneous injection of 2 γ of Triiodothyronine and 5 JSU of Pretiron. (n=5)

Table 14. Change of ICD after simultaneous injection of thyroid hormones and 5 JSU of Pretiron

	Percent increase in ICD						
	5hrs.	10hrs.	24hrs.	2days	3days	4days	5days
0.9% NaCl n = 5	7.52 $\pm$ 0.77	6.42 $\pm$ 1.09	3.69 $\pm$ 0.53	1.94 $\pm$ 0.44	1.11 $\pm$ 0.44	2.63 $\pm$ 0.27	1.62 $\pm$ 0.39
Desiccated thyrid 20mg n = 5	8.35 $\pm$ 1.49	8.11 $\pm$ 1.54	1.62 $\pm$ 0.74	0.34 $\pm$ 0.83	0.99 $\pm$ 0.64	1.28 $\pm$ 0.55	0.61 $\pm$ 0.74
Thyroxine 50 γ n = 5	7.88 $\pm$ 1.02	8.00 $\pm$ 1.14	2.50 $\pm$ 1.37	1.32 $\pm$ 0.32	1.19 $\pm$ 0.51	1.87 $\pm$ 0.78	1.13 $\pm$ 0.59
Triiodothyronine 2 γ n = 5	7.37 $\pm$ 0.53	6.24 $\pm$ 1.73	1.75 $\pm$ 0.49	-0.19 $\pm$ 0.46	0.12 $\pm$ 0.53	0.14 $\pm$ 0.97	0.40 $\pm$ 0.24

場合は Fig.30の如くで全例において対照 (Fig.27) と較べ明らかに眼突の程度が軽かつた。

実験7 乾燥甲状腺末, T₄ 或いは T₃ と Pretiron の同時投与 (Fig.31, 32, 33, 34, Table 14)

甲状腺ホルモン前処置後 Pretiron を投与した場合は先の実験の如くで, T₃ で抑制効果がみられたため本実験では甲状腺ホルモンと Pretiron を同時投与した。成績は Fig.32, 33, 34の如く Thyradine 20mg, T₄ 50 γ , T₃ 2 γ を Pretiron 5 JSU と同時投与しても, その眼突反応は Pretiron と生食投与の対照 (Fig. 31) と全く差はみられなかつた。

IV 考 按

1929年 Loeb and Basett¹⁸⁾ が下垂体前葉より TSH を分離してから2年後の1931年, Schockaert¹⁾ が若いアヒルに牛の下垂体前葉の抽出物を注射して初めて実験的に眼突を起こしている。その後多くの学者が色々の温血動物を実験に使用しており, 大黒鼠・猫・犬・猿等では不成功に終わっている¹⁹⁾が hamster¹⁹⁾・兎²⁰⁾・海獺では実験的眼突に成功している。このうちでは海獺が一番よく使用されており多数の報告がみられる^{21~29)}。

1945年 Albert²⁾ が初めて羊の脳下垂体抽出物に非常に感受性のある common Atlantic “minnow” をみ

つけてから、魚が広く用いられるようになり鯉 (*Cyprinus carpio*¹⁶⁾³⁰⁾、鮒 (*Cyprinus auratus*³¹⁾、金魚 (*Carassius auratus* var. *laponicus*³²⁻³⁶⁾), *Salmo salar*³⁷⁾, *Salmo gairdnerii*³⁸⁾, *Saivelinus fontinalis*³⁷⁾, *Anguille femelle*³⁹⁾, teleost fish¹⁰⁾ 等を実験に用いた報告がみられる。common Atlantic “minnow” を用いての眼突反応はその後多くの研究者⁵⁾⁹⁾¹¹⁾⁴⁰⁻⁴³⁾により観察されているが、この魚は我が国では入手し難い。著者は入手、飼育容易な又廉価な市販の金魚の一品種である和金を実験動物に用いた。上述の如く検定動物に金魚を用いた報告はあるが詳細な記述にとぼしく、従つて著者は一年間金魚を観察すると同時に基礎的な実験も合わせ行なつた。

水温24℃で金魚を自然放置した時 ICD に著しい日内変動はなく、鰭切断や注射針穿刺の機械的刺激も特に ICD に影響を与えなかつたことから、更に又生理的食塩水注射の場合に示す ICD の95%信頼区間の変化とから著者は5%迄の ICD 変化は自然変動とみなし、5%以上示した場合を初めて眼突ありとする基準をもうけた。

TSH 製剤である Pretiron を投与した場合、和金では投与4～7時間目で ICD が最高変化を示したが、*Fundulus* に羊の pituitary extract を注射した Albert,²⁾ standard pituitary extract を注射した Dobyns and Wilson¹⁵⁾ 等は24時間目、又鯉に reference standard を注射した Der Kinderen et al¹⁶⁾ は24～48時間目に ICD が最高値を示したと報告している。

著者の用いた大きさの金魚即ち7cm、4gm前後では24時間後には眼突がすでに消失する傾向にあり注意しなければならない。このように5時間前後で ICD が最高変化を示したという報告はなく、著者は海魚や他の温血動物に比し極めて少量の試料でしかも短時間で眼突効果を判定出来るという利点から、和金が最も優れた検定動物であると考え、この最高変化に要する時間の違いは *Fundulus* と金魚という種差或いは魚の大きさの差が第一に考えられるが、一方試料の純度により吸収に差が出ることも考えられる。著者は column で分離した Fraction でこのような1時間々隔での計測は行なわなかつたが更に敏感な反応を示すことが予想される。

鯉を用いた Der Kinderen et al¹⁶⁾ はこれら動物に季節の変動なく一年中使用出来ると報告しているが、著者の経験では年中一定した大きさの鯉を得ることは困難と思われる。*Fundulus* は Johnson⁴⁴⁾ が述べているように sexual activity の間が特に反応がよく、一方又 Dobyns et al⁴⁵⁾ は冬が一層反応性にとんでいと述べている。著者は同時に入手した金魚で6日後水温が25℃から30℃に上昇した時、同じ TSH 製剤でも眼突反応が9.07%から3.94%と低くなり、水温が30℃を越す夏は反応が弱くなり和金に季節の変動のあること知つた。又 Day¹¹⁾ は金魚が TSH 製剤の注射で眼突反応を示さず、このことは反応性にとむ *Fundulus* と比較して種の相違によるのだと説明しているが、金魚が眼突反応に敏感なことは著者の実験でも明らかである。一方 TSH 製剤でも余り眼突の認められない金魚もあり、Dobyns and Wilson¹⁵⁾ の云う如く平均値で表現することには問題があるようで、著者は ICD 変化を個々に図示して眼突効果を判定した。このような反応の差は個体差のみならず植村⁴⁶⁾等が報告しているように、雄群に反応が強いという性差によるのかもしれない。

下垂体前葉抽出物にて眼突効果を調べた報告は前述の如く Schockaert¹⁾ 以来諸家の報告があるが、TSH 製剤にて眼突効果のあることを初めて報告したのは1954年 Pickford⁴⁷⁾ で *Fundulus* に Armour の Thyrotropin を注射して眼突を起こしている。最近では1960年 Der Kinderen et al¹⁶⁾ が市販の TSH 製剤 (オランダ Organon 社の Reference Standard) を用いて鯉における著明な眼突を報告しており、日本では永田³³⁾が金魚を使って Pretiron 10 JSU/0.5ml、或いは 15JSU/0.5ml で何れも眼突の生ずることを観察している。著者は Pretiron での眼突効果がすでに消退した5日目に再度 Pretiron を投与して眼突を起こしており、金魚の眼突反応が Pretiron によつて惹起されることを確認した。又 Pretiron 投与量を1.25, 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 JSU と増やした場合その眼突度との間には、投与5時間目では1.25と10.0 JSU の間で直線的な増加のあることが認められた。このことは Der Kinderen et al¹⁶⁾ が Reference Standard (Organon) を、野口等³⁰⁾が Reference Standard (USP)を用いて ICD 増加率との間の Dose-response curve で直線的

的な関係を得ているのとよく一致している。

このように TSH 製剤に眼突を起こさせる因子のあることは明らかであるが、TSH そのものに眼突作用がある報告としては Asboe-Hansen et al⁴⁸⁾ が悪性眼突患者の血清 TSH 量が10例中9例に上昇していたことから、又 Asboe-Hansen et al⁴⁹⁾ はその患者の眼窩内における組織学的変化と血清 TSH 量が平行していたことから、Pickford⁴⁷⁾ は Thyrotropin における甲状腺刺激作用と眼突作用との間に量的な平行関係のあることから、Sonenberg and Money⁵⁰⁾, Lamberg et al⁵¹⁾, Wegelius et al⁵²⁾ 等は ³⁵S-TSH が眼窩内組織に選択的に集まることから、又 Albeaux-Fernet et al⁵³⁾ は重症進行性眼突患者の下垂体に TSH 分泌亢進像を認めたことから、或いは又 Purves and Griesbach⁵⁴⁾ は眼突と血清 TSH との間には著明な相関があるとしており、眼突反応は TSH それ自身による作用であるとしており Smelser²⁴⁾, Paulson²⁵⁾, Pochin²⁹⁾ も同様の立場をとっている。

これに反して Simkin and Starr⁵⁵⁾ は人に TSH 製剤を投与したにも拘らず眼突は起こらなかったと報告しており、Dobyns⁵⁶⁾ は各種の下垂体エキスが同じ TSH 効果を示すに拘らず眼突効果において異なることを確認している。更に1953年 Dobyns and Steelman³⁾ は下垂体前葉抽出物に8%三塩化酢酸を加え、生じた沈澱物から TSH 作用はないが眼突効果の著明な物質を分離しこれを Exophthalmos Producing Substance と呼んだ。彼より先1949年 Jefferies⁴⁾ は下垂体抽出物を iodination することにより、TSH 作用はなくなるが眼突作用の残ることを報告しており、更に1958年 Brunish⁵⁾ は牛下垂体前葉からの抽出物を、又 TSH 製剤の Armour's Thytropar をそれぞれ pepsin で消化することにより、TSH 活性は低くなるが眼突効果は殆んど不変であることを、1959年 Bates et al⁵⁷⁾ は Furth⁵⁸⁾ が記載した mouse における移植可能で、TSH を産生する下垂体腫瘍に眼突作用のないことを発表しており、この外 Der Kinderen et al¹⁶⁾ は眼突患者血清と匹敵する鯉眼突効果を下垂体前葉製剤で期待する場合、その中にある TSH 濃度は患者血清中で予想されるよりも遙かに高くなければ眼突を起こさないことから TSH と EPS は別個のものであることを推測している。Gilliland and Strudwick⁵⁹⁾ は眼突のみられない粘液水腫に TSH が多く、又重篤な眼症状があり乍ら TSH 量の上昇の認められなかつた症例を報告しており、更に又血中 TSH 量と眼症状が必ずしも平行しないという報告^{60~63)} がみられる。この外下垂体電気焼灼術⁶⁴⁾、下垂体摘出術⁶⁵⁾、下垂体茎部切断術⁶⁵⁾、間脳下垂体レントゲン照射^{66~68)}等の治療により眼突が軽快するという臨床的事実から、EPS が間脳下垂体系に関係があると思われる。

このように甲状腺中毒症患者の血中には TSH が増えているという報告と、増えていないという報告があり長らく論争が続いてきたのであるが、この原因には TSH の抽出法、検定法の不完全、不統一という技術的な面と、Adams⁶⁹⁾ や Mc Kenzie⁷⁰⁾ のいう所謂 abnormal TSH 或いは LATS (Long-Acting Thyroid Stimulator) が、甲状腺中毒症患者の或る者に増加しているという病態生理学的な面に依存しているのではないかと思われる。

1958年 Adams⁶⁹⁾ は abnormal TSH が Dobyns のいう EPS と一致すると説いたが、1961年 Mc Kenzie⁷¹⁾ の論文では LATS が現在甲状腺中毒症と眼突の両方を訴えたものでは89%に認められ、過去に中毒症があるが現在眼突のない場合は40%、又既往症及び現症に甲状腺中毒症と眼突のないものでは4%しか認められないと報告している。

このように眼突と LATS とは相関があるようにも思われるが、若し EPS と LATS が同じものであれば LATS が下垂体の手術をうけた人間に証明されたり⁷¹⁾⁷²⁾、又 TSH が Bates の percolation method⁷³⁾ により下垂体から抽出されるに反し、LATS は抽出されないことから LATS は下垂体で産出されるのではないらしい。従つて下垂体抽出物で眼突が起こる実験的事実から、並びに最近の我々の研究 data⁷⁴⁾ から EPS と LATS は同一物ということは否定され得る。故に既述のことから EPS は下垂体に存在するが TSH と別個のものであることが推測される。著者も上述の文献的考察から TSH と EPS は異なつた物質であるという観点から出発して、イオン交換セルローズを用いて両者の分離を試みてみた。

cellulose column chromatography は ion exchange chromatography の一つであり、その溶出が種々の

因子で多大に影響されることはよく知られている。pH は殊に吸着や溶離に鋭敏に左右するので、elute buffer の pH 調整には特に留意した。温度の変化により pH が変化することから著者は大体 4℃ の状態で処定の pH に調整した。Cellulose column を作製してから試料を charge する前に、充分 column を bufferize して pH を合わせると同時に cellulose が均一に充填されるようにした。又この cellulose のイオン結合の capacity を決めるため、CM-C の場合 Pretiron 375, 250, 125JSU をそれぞれ展開し、その展開曲線から 250JSU 以下なら妥当であることを知り以下の実験では Pretiron 250JSU を charge することにした。DEAE-C の場合も同様の検討を加え 375JSU を charge した。

Bates et al⁷⁵⁾ は牛の下垂体の crude TSH を CM-C にて pH 6.25, 0.01M Sodium phosphate ; 1.0M NaCl の順で elute し後者の Fraction 中にかなり精製された TSH を得たが、この際 EPS 活性は前者の Fraction に強かつたと報じている。が彼等は TSH と EPS の分離に関する実験結果の詳しい記載はしていない。野口等³⁰⁾は USP Reference Standard を pH 6.0, 0.01M Sodium phosphate ; 1.0M NaCl で展開した場合 TSH 活性は後者に強く、EPS 活性の方は両者に分散して現われたがやや前者に強かつたと報じている。

著者は Pretiron を pH 6.3, 0.01M Sodium phosphate ; 1.0M NaCl の順で elute したが、EPS と TSH は Column に吸着されて Fraction A には現われず、Fraction B に溶出されてき両者を分離出来なかつた。そこで共に溶出されてきた Fraction B の部分を、NaCl の mol 濃度を 0 から 1.0M 迄直線的に増加させ展開した場合、両者の溶出される態度に差はないかと考え linear gradient elution を行なつた。然し Fig. 14 の如く Fraction E の部分、即ち NaCl の濃度にして 0.23~0.36M の間で両者が溶出されてき同じく分離出来なかつた。

次に著者は DEAE-C の場合 pH 9.5, 0.005M sodium glycinate ; pH 9.5, 0.1M sodium glycinate ; 0.2M NaH₂PO₄ ; 1.0M NaCl の 4 種の elute buffer を使用したが、TSH も EPS も 0.005M sodium glycinate の展開の時は column に吸着されており、TSH は 0.2M NaH₂PO₄ の所で大半が溶出されてきた。EPS 活性は Fraction G, H, I で共に同程度に認められた。このように Fraction H に TSH 活性が極めて強かつたにも拘らず眼突効果の著明に認められなかつたこと、又 TSH 活性の低い又全くない Fraction G, I に眼突効果の認められたことから、眼突反応は TSH そのものによるのではなくて他の因子、恐らく EPS によることを確認することが出来た。

1957年 Langford⁹⁾ は乾燥甲状腺末 0.6mg, Triiodothyronine (T₃) の 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 γ をそれぞれ Fundulus heteroclitus に投与して眼突の起きたことを報告し、翌1958年 Matty et al¹⁰⁾ は Sparisoma squalidum, Scarus croicensis, Bathystoma aurolineatum なる 3 種の teleost fish に T₄ 10, 500 γ , T₃ 5 γ を投与して著明な眼突を認めている。Pickford and Atz⁴⁰⁾ は乾燥甲状腺末或いは T₄ の長期経口投与で、数種の魚に眼突を起こしたという報告を引用しており、Harms⁷⁶⁾ は長期 T₄ 注射での眼突を、又 La Roche and Le Blond³⁷⁾ は T₄ 並びに乾燥甲状腺末を Salmo salar や, Salvelinus fontinalis に投与しての ICD の増加を報告している。これに反し Albert²⁾ は T₄ が、Day¹¹⁾ は T₃ 1 γ が Fundulus に眼突を起こさぬこと、1962年 Dobyns et al¹²⁾ も又 T₃ 1.0, 2.5, 2.75 γ で眼突の起こらぬことを認めている。Dobyns et al¹²⁾ は Langford⁹⁾ の用いた T₃ は錠剤であるため、その賦形薬に眼突作用があるのだと推定しており、又彼は結晶 T₃、錠剤 T₃ でも意味ある眼突を起こさなかつたことを確認している。古くは Kunde³⁰⁾、Smith⁷⁷⁾ は T₄ 或いは乾燥甲状腺末で哺乳動物に眼突が起きたとしているが、Carlson et al⁷⁹⁾、Pochin⁷⁹⁾ は同じ方法で眼突を認めておらず、又甲状腺機能亢進症における甲状腺の外科的切除や、抗甲状腺剤の治療においてみられる眼突の亢進⁸⁰⁾⁸¹⁾、或いは眼突に対する ¹³¹I の治療効果^{82~85)}、或いは眼突に対して T₄、T₃ が効くという臨床的事実⁸⁶⁾⁸⁷⁾からも T₄、T₃ に眼突惹起作用があるとは思えない。

このように甲状腺ホルモンの眼突作用については区々の成績が得られているので著者は乾燥甲状腺末、T₄、T₃ の眼突効果を少量の場合と大量の場合で検討を加えたが、Thyradine 20mg 投与では 4 日目にかんりの眼突が起こり、従つて乾燥甲状腺末を眼突患者の治療に用いることは眼突を悪化させる可能性のある

ことが考えられる。事実 Brain⁸⁸⁾ は悪性眼突の治療に甲状腺剤は禁忌であると強調している。然し T_4 , T_3 では Langford,⁹⁾ Matty et al¹⁰⁾ 等の説とは異なり、純粋合成品を使用したためか著明な眼突は証明されなかつた。Thyradine 大量投与での眼突の原因は不明であるが恐らく乾燥甲状腺末を溶かすための溶媒、或いは又 T_4 , T_3 以外の不明の因子による影響ではなからうかと考えられる。

次に甲状腺中毒症患者に起きる眼突の機序を解明する一端として、甲状腺ホルモンの血中増加をきたしている時期に EPS が分泌された場合、眼突反応は如何なる影響を受けるかを観察するために、甲状腺ホルモンが末梢組織で作用を発現する潜伏期間¹⁷⁾ を考慮して乾燥甲状腺末、 T_4 では72時間後に、 T_3 では24時間後に Pretiron を注射したが、乾燥甲状腺末、 T_4 では眼突反応は対照と余り差がなく、 T_3 の場合は対照に比し全例かなり著明に抑制された。このことは臨床的には悪性眼突に T_3 が有効と述べている Williams and Bakke,⁸⁶⁾ Naffziger⁸⁷⁾ の説を支持するものである。 T_3 のこの抑制の機序は不明であるが、Asboe-Hansen⁸⁹⁾ によると TSH は球後組織の肥細胞の数を増加させると同時に原形質の顆粒をふやし、この顆粒はヒアルロン酸と考えられこのものが親水性のため浮腫を生ずるのだと述べている。従つて球後組織の TSH に対する感受性が T_3 の中毒量により抑制されるためか¹⁹⁾⁴²⁾、或いは T_3 が TSH 作用を不活性化する⁹⁰⁾ ためかとも考えられる。故に眼突の治療には T_3 と T_4 , Thyradine を使い分ける必要があると云える。

最後に著者は ion exchange chromatography としては CM-C と DEAE-C の二種につき検討を加えたが、一般に TSH 活性物質の分離には CM-C より DEAE-C の方が TSH の吸着力が高くて適當であるため、EPS との分離を期待したのだが両者の理化学的性状が良く似ていたため著明な分離をなし得なかつたことは前述した。採用した ion exchange chromatography の条件は、下垂体前葉抽出物から TSH を精製分離する目的で行なつた Condliffe and Bates,⁷³⁾⁷⁴⁾ Condliffe et al¹⁾ の方法にのつとつたものであつて EPS の分離に最適の条件ではないかもしれない。elute buffer の種類、pH、イオン強度、モル濃度、溶出速度等で試料の分離が鋭敏に左右されることは周知の如くで、今後更にこういった条件の検討並びに gradient elution, rechromatography, ion exchange chromatography と gel filtration の組合わせ、又 CM-或いは DEAE-Sephadex 等で検討を加えるなら両者を分離出来る可能性が考えられる。

V 総括及び結語

和金の眼突検定動物としての基礎的研究と、TSH 製剤である Pretiron 中の EPS の分離、並びに甲状腺ホルモンが Pretiron の眼球突出反応に与える影響を検討し以下の如き成績を得た。

1) 和金の ICD は自然放置では一定した日内変動なく、鰭切断や注射針穿刺による機械的刺戟にも影響されず、餌を与えなくても減少しなかつた。

2) 0.9%食塩水注射では最大変動は5%迄で、著者は5%以上を眼突ありと判定した。Pretiron 注射では3時間後すでに肉眼的眼突が発現し、5時間前後で ICD 増加率の peak が来た。又 Pretiron 注射でも水温が30℃を越す夏は金魚の眼突反応が悪かつた。

3) Pretiron 注射5時間目では、1.25JSU から 10.0JSU の間で ICD の percent increase は直線的であり、10時間目では 1.25JSU から 5.0JSU の間ではほぼ直線的に増加した。

4) Pretiron を CM-C で stepwise に column chromatography せる場合、第Ⅱ分画に TSH 活性も EPS 活性も認められ、gradient elution せる場合は第Ⅱ分画後半に同じく TSH 活性も EPS 活性も認められ両者を分離出来なかつた。

5) Pretiron を DEAE-C で column chromatography せる場合、TSH 活性は第Ⅲ分画に強かつたが EPS 活性は第Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ分画に平等に分散して現われたことから、TSH と EPS は別個のものであることを知つた。

6) Thyradine 大量投与では4日目にかんりの眼突が起こり、 T_3 では著明な眼突作用はみられなかつた。又 T_4 では対照と差がなかつた。

7) Thyradine, T_4 或いは T_3 を投与してから Pretiron を注射した場合、 T_3 は Pretiron の眼突反応を

かなり著明に抑制したが、他の二者では対照と差がなかった。

以上のことから眼突活性の検定に金魚の有用なことが、EPS は TSH と非常に類似しているが別個のものであること、乾燥甲状腺末は眼突を増悪させる可能性があるが、 T_3 は眼突の治療に応用出来ることの根拠を得た。

尚本論文の要旨は第34回 (昭和36年4月)、第35回 (昭和37年4月)、第36回 (昭和38年4月) 日本内分泌学会総会、又第76回大阪市医学会 (昭和39年2月) において発表した。

稿を終るにあたり、終始御懇切な御指導並びに御校閲を戴いた塩田教授に深く感謝し、併せて種々御助言及び御協力下さいました藤田栄一博士、蔵田典光博士、大楠隆昭学士に深謝すると共に、実験にあたり種々御便宜下さった本学生化学教室 (主任大谷象平教授) の奥田清講師並びに諸先生方に御礼申し上げます。

文 献

- 1) SCHOCKAERT, J.A. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 29 : 306, (1931). 2) ALBERT, A. : Endocrinology, 37 : 389, (1945).
- 3) DOBYNS, B.M. and STEELMAN, S.L. : Endocrinology, 52 : 705, (1953).
- 4) JEFFERIES, W.M. : J. Clin. Endocrinol., 9 : 927, (1949).
- 5) BRUNISH, R. : Endocrinology, 62 : 437, (1958).
- 6) CONDLIFFE, P.G. and BATES, R.W. : J. Biol. Chem., 223 : 843, (1956).
- 7) CONDLIFFE, P.G. and BATES, R.W. : Arch. Biochem. Biophys., 68 : 229, (1957).
- 8) CONDLIFFE, P.G., BATES, R.W. and FRAPS, R.M. : Biochim. Biophys. Acta, 34 : 430, (1959).
- 9) LANGFORD, H.G. : Endocrinology, 60 : 390, (1957).
- 10) MATTY, A.J., MENZEL, D. and BARDACH, J.E. : J. Endocr., 19 : 314, (1958).
- 11) DAY, R.M. : Arch. Ophth., 64 : 324, (1960).
- 12) DOBYNS, B.M., WRIGHT, A. and SANDERS, M.A. : Endocrinology, 70 : 864, (1962).
- 13) ALM, R.S., WILLIAMS R.J.P. and TISELIUS, A. : Acta Chem. Scand., 6 : 826, (1952).
- 14) 小倉一 : 日内科誌, 48 : 1045, (1959).
- 15) DOBYNS, B.M. and WILSON, L.A. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 14 : 1393, (1954).
- 16) DER KINDEREN, P.J., HOUTSTRALANZ, M. and SCHWARZ, F. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 20 : 712, (1960).
- 17) PITT-RIVERS, R. and TATA, J.R. : The Thyroid Hormones, (1959), 90, Pergamon Press, London, New York, Paris and Los Angeles.
- 18) LOEB, L. and BASETT, R.B. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 26 : 860, (1929).
- 19) SMELSER, G.K. : Am. J. Ophth., 54 : 928, (1962).
- 20) KUNDE, M.M. : Amer. J. Physiol., 82 : 195, (1927).
- 21) LOEB, L. and FRIEDMAN, H. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 29 : 648, (1932).
- 22) MARINE, D. and ROSEN, S.H. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 30 : 901, (1933).
- 23) FRIEDGOOD, H.B. : Bull. Johns Hopkins Hosp., 54 : 48, (1934).
- 24) SMELSER, G.K. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 35 : 128, (1936).
- 25) PAULSON, D.L. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 36 : 604, (1937).
- 26) AIRD, R.B. : Arch. Ophth., 24 : 1167, (1940).
- 27) AIRD, R.B. : Ann. Inter. Med., 15 : 564, (1941).
- 28) DOBYNS, B.M. : Surg. Gynec. and Obst., 82 : 290, (1946).
- 29) POCHIN, E.E. : Ciba Foud. Coll. Endocrinol., 4 : 316, (1952).
- 30) 野口秋人, 佐藤誠也, 山崎鋭一 : ホルモンと臨床, 10 : 29, (1962).
- 31) 加嶋政昭, 佐藤 智, 田中勝治, 青池 明 : 日内科誌, 44 : 324, (1955).
- 32) CANADELL, J.M. and BARRAQUE R, J. : Ann. Endocrinol., 17 : 369, (1956).
- 33) 永田 格 : 日内分泌誌, 35 : 1386, (1960).
- 34) DAY, R.M. and NELSON, R. : Am. J. Ophth., 50 : 1193, (1960).
- 35) MC GILL, D.A. : Quart. J. Med. (New Series), XXIX : 423, (1960).
- 36) 植村恭夫 : 臨眼, 15 : 76, (1961).
- 37) LA ROCHE, G. and LEBLOND. C.P. : Endocrinology, 51 : 524, (1951).
- 38) ROBERTSOM, O.H. : Trans. Ass. Amer. Physicians, 68 : 33, (1955).
- 39) GINESTE, P.J. :

- C.R. Soc. Biol. (Par), 149 : 551, (1955). 40) PICKFORD, G.E. and ATZ, J.W. : New York : New York Zoological Society, (1957). 文献11) より引用. 41) POLLACK, I., CONSTANT, M.A., ROSENBAUM, H. and BECKER, B. : Am. J. Ophthal., 45 : 930, (1958). 42) CANADELL, J.M. and BARRAQUER, J. : Endocrinology, 64 : 1017, (1959). 43) SCHULTZ, R.O., BRALEY, A.E. and HAMILTON, H.E. : Amer. J. Ophthal., 50 : 783, (1960). 44) JOHNSON, L.V. : American Ophthalmological Society, White Sulphur Springs, W. Va., May 28, (1958). 文献11) より引用. 45) DOBYNS, B.M., WRIGHT A. and WILSON, L. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 21 : 648, (1961). 46) 植村恭夫, 須賀純之助 : 日眼, 65 : 1851, (1961). 47) PICKFORD, G.E. : Endocrinology, 55 : 589, (1954). 48) ASBOE-HANSEN, G., IVERSEN, K. and WICHMAN, R. : Acta Endocrinol., 11 : 376, (1952). 49) ASBOE-HANSEN, G., QUAADE, F. and WICHMAN, R. : Acta Endocrinol., 18 : 557, (1955). 50) SONENBERG, M. and MONEY, W.L. : Recent Progress in Hormone Research, 11 : 43, (1955). 51) LAMBERG, B.-A., WEGELIUS, O. and HARJANNE, A. : Acta Endocrinol., 22 : 407, (1956). 52) WEGELIUS, O., NEUMAN, J. and BRUNISH, R. : Acta Endocrinol., 30 : 53, (1956). 53) ALBEAUX-FERNET, M., GUIOT, A., BRAUN, S. and ROMANI, J.D. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 15 : 1239, (1955). 54) PURVES, H.D. and GRIESBACH, W.E. : Brit. J. Exper. Path., 30 : 23, (1949). 55) SIMKIN, B. and STARR, P. : Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 84 : 99, (1953). 56) DOBYNS, B.M. : Surg. Gynec. and Obst., 82 : 290, (1946, a). 57) BATES, R.W., ALBERT, A. and CONDLIFFE, P.G. : Endocrinology, 65 : 860, (1959). 58) FURTH, J. : Recent Progress in Hormone Research, 11 : 221, (1955). 59) GILLILAND, I.C. and STRUDWICK, J.I. : Brit. Med. J., 1 : 378, (1956). 60) D'ANGELO, S.A., PASCHKIS, K.E., GORDON, A.S. and CANTAROW, A. : J. Clin. Endocrinol., 11 : 1237, (1951). 61) BLOCH-MICHEL, H. and HENRY, R. : Ann. Endocrinol., 16 : 268, (1955). 62) 小倉 一, 佐古田雅弘 : 日内分泌誌, 34 : 274, (1958). 63) 永田 格 : 日内分泌誌, 35 : 1285, (1960). 64) RASMUSSEN, A.T. and GARDER, W.J. : Endocrinology, 27 : 219, (1940). 65) Mc CULLAPH, E.P., CLAMEN, M. and GARDNER, W.J. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 17 : 1277, (1957). 66) LAMBERG, B.-A. : Acta Med. Scandinav., 156 : 361, (1957). 67) LAMBERG, B.-A. : Acta Med. Scandinav., 156 : 377, (1957). 68) LAMBERG, B.-A. : Acta Med. Scandinav., 156 : 391, (1957). 69) ADAMS, D.D. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 18 : 699, (1958). 70) Mc KENZIE, J.M. : Endocrinology, 62 : 865, (1958). 71) Mc KENZIE, J.M. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 21 : 635, (1961). 72) FURTH, E.D., BECKER, D.V., RAY, B.S. and KANE, J.W. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 22 : 518, (1962). 73) BATES, R.W., GARRISON, M.M. and HOWARD, T.B. : Endocrinology, 65 : 7, (1959). 74) 塩田憲三, 蔵田典光, 鳥辺博正, 大楠隆昭 : 第36回日本内分泌学会総会, (1963). 75) BATES, R.W. and CONDLIFFE, P.G. : Recent Progress in Hormone Research, 16 : 309, (1960). 76) HARMS, J.W. : Z. Wiss. Zool., 146 : 417, (1935). 77) SMITH, J.H. : Arch. Int. Pharmacodyn., 59 : 217, (1938). 78) CARLSON, A.J., ROOKS, J.R. and Mc KIE, J.F. : Amer. J. Physiol., 30 : 129, (1912). 79) POCHIN, E.E. : Clin. Sci., 5 : 75, (1944). 80) DOBYNS, B.M. : Surg. Gynec. and Obst., 80 : 526, (1945). 81) HAYLES, A.B., KENNEDY, R.L.L., BEAHR, O.H. and WOOLNER, L.B. : J. Clin. Endocrinol. and Metab., 19 : 138, (1959). 82) HAINES, S.F., KEATING, F.R., POWER, M.H., WILLIAMS, M.M.D. and KELSEY, M.P. : J. Clinol. Endocrinol., 8 : 813, (1948). 83) CLARK, D.E. and RULE, J.H. : J.A.M.A., 139 : 995, (1955). 84) CHAPMAN, E.M. and MALOOF, F. : Medicine, 34 : 261, (1955). 85) 藤田栄一 : 第2回甲状腺同好会研究会, (1959).

- 86) WILLIAMS, R.H. : Textbook of Endocrinology, 3rd. Ed. (1962), 150, W.B. Saunders Co., Philadelphia and London. 87) WERNER, S.C. and NAFFZIGER, H.C. : The Thyroid, 2nd. Ed. (1962), 536, Hoeber Medical Book Harper and Row, New York. 88) BRAIN, R. : Lancet, 1 : 109, (1959). 89) ASBOE-HANSEN, G. : Am. J. Med., 26 : 470, (1959). 90) DOBYNS, B.M. and RAWSON, R.W. : Endocrinology, 49 : 15, (1951).