Immunological Estimation of Luteinizing Hormone in the Urine

Jun MIYATA

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University School of Medicine, Osaka, Japan

(Director : Professor Yoshio Ashitaka)

Measurement of luteinizing hormone (LH) in the urine has much significance in the diagnosis of menstrual disorders. Urinary LH assay has been previously carried out by troublesome, time-consuming bioassay. Recently, immunological method has become available for that purpose, since Wide and Gemzell (1961) reported LH-immunoassay using HCG antigen-antibody system which was based upon the cross-reaction between HCG and LH. It is the purpose of this report to demonstrate the cross-reaction between HCG and LH, to establish the immunological assay method of urinary LH and to investigate the relationship between immunological and biological activities of LH.

Anti-HCG sera were obtained from rabbits received 2 injections each of 1,000 IU of crude preparation of HCG (Primogonyl, HCG-P), freshly emulsified with complete Freund's adjuvant at two weeks interval. The injections were made in the footpads and i.d. After 3 weeks of rest, a series of booster injections with 1,000 IU of HCG-P without adjuvant were given i.p. nine times at every other day. Rabbits were bled 7 days after the last injection and the sera were kept. The antibody titers were in the range from 6,400 to 51,200 by tanned hemagglutination. Antiserum which had the highest antibody titer was used in this study.

This anti-HCG serum contained several antibodies which reacted not only with HCG but also with normal human serum (NHS) and child urine protein (CUP) by immunoelectrophoresis. In order to remove antibodies against proteins other than HCG, 1ml of anti-HCG serum was absorbed with 30mg of lyophilized NHS and 20mg of CUP, thus the absorbed anti-HCG serum showed one precipitin band only to HCG. This absorbed serum also showed one precipitin band to human menopausal gonadotropin (Pergonal, HMG-P) which contained LH and FSH by agar gel diffusion and immunoelectrophoresis, and this band completely coalesced to the band which appeared against HCG.

This absorbed anti-HCG serum was examined for neutralization of LH and FSH. An assay method based on the rate of increase in the weight of the ventral prostates of hypophysectomized male rats (Greep) was used for LH assay and Steelman-Pohley's augmentation method was used for FSH assay. When 2 IU or 4 IU of LH and 2 IU or 4 IU of FSH were incubated with 0.002 ml of absorbed anti-HCG serum at 37°C for 60 min., biological activity of LH was completely neutralized but the FSH activity was not. From the above immunological and biological results, it could be concluded that LH had a similar antigen to HCG and LH was completely neutralized with anti-HCG serum.

The amount of LH in the urine is so small for immunoassay that concentration of urine using pervaporation, carbowax 6,000 and alcohol precipitation to 1 : 20 is necessary. The recovery of LH was almost complete. The components of medium to dissolve the standard HCG influenced the sensitivity of tanned hemagglutination inhibition reaction. The concentration from 1 to 1 : 20 of the child urine as the medium of HCG, showed 4 fold as sensitive as phosphate buffered saline, thus 1:2 concentrated child urine was used for the medium to dissolve the standard HCG or to dilute the test materials.

Ten women from 23 to 34 years old who had the normal menstrual cycle, were examined every day for BBT, and LH value in the first morning urine by immunoassay. Seven women who showed clearly biphasic BBT gave the peak of LH level, in the range from 80 IU to 320 IU HCG equivalent/L, from 15 to 13 days before next menstruation. These peaks coincided with the rise of BBT.

Three women among them were examined LH level in the urine by using immunological and biological methods simultaneously. The urine for each 48 hours during the cycle was collected, and 60ml of that was used for immunoassay and the rest was used for bioassay. The kaolin adsorption method by Bradbury-Matsushima was used to extract gonadotropin from the urine. The recovery of gonadotropin was found to be almost satisfactory by bioassay. In all three cases, the LH value by bioassay showed a peak around ovulation in accordance with the value by immunoassay, but FSH value was kept low level during whole cycle. Thus, the LH values by immunoassay were almost parallel with LH values by bioassay but not with FSH values.

From our immunological and biological simultaneous assay for LH, we could conclude that LH can be assayed immunologically for the clinical use, but there are still many problems to determine whether the antigenic substance measured by immunological method is the biologically active LH molecule or not.

In conclusion, 1. LH had a similar antigen to HCG. 2. LH level by immunoassay in the urine of women who had the normal menstrual cycle, showed a peak around ovulation. 3. FSH does not take part in the LH immunoassay. 4. LH level by immunoassay is almost parallel with that by bioassay. 5. LH immunoassay could be used for the clinical purpose.

(pp. 43~56)

ヒト下垂体性LHの免疫学的測定について

大阪大学医学部産科婦人科学教室 (主任 足高善雄教授)

宮 田 順

(昭和42年2月9日受付)

I. 緒 言

黄体化ホルモン (luteinizing hormone, 以下 LH と略す) の尿中排泄量の測定は、産婦人科領域では、間脳、下垂体、卵巣系の機能異常の有無を内分泌学的に知る方法として、その臨床的意義はきわめて大きい。しかし、LH の尿中排泄量は非常に少なく、しかも尿中より LH を純化精製することが困難であるため、その測定はこれまで煩雑で長時間を要する Bioassay に依存していた。このため Bioassay にとつてかわる、より簡単でしかも感度のよい LH 測定法の開発が求められてきた。

近年、蛋白性ホルモンの Immunoassay の進歩は著しいものがある。なかでも LH とその生物学的作用のきわめて類似する HCG (Human chorionic gonadotropin) の Immunoassay は、1960年、Wide および Gemzell ら¹⁾が血球凝集阻止反応、Brody および Carlström ら²⁾が補体結合反応、McKean³⁾が沈降反応による方法を発表して以来、飛躍的な研究成果がみられるようになった。現在では、これらのうち比較的簡単な血球凝集阻止反応 (或は同じ原理に基づく Latex 凝集阻止反応⁴⁾) による HCG 測定法が、これまでの Bioassay に比して応用性の高いことが知られ、我が教室ではすでに routine test として、日常臨床に好んで利用されている。^{5)~8)}

LH-Immunoassay については、Wide および Gemzell ら⁹⁾ (1961) が、LH と HCG の免疫学的交叉反応に基づき、HCG の Antigen-antibody system を用いて LH-Immunoassay が可能であると報告した。LH-Immunoassay には、LH の Antigen-antibody system を用いるのが理想的ではあつても、精製純度の高い LH を大量に得ることは今日至難であると云つてよい。これに反して HCG は比較的簡単に純度の高いものを大量に抽出できるようになったので、それ以来 HCG の Antigen-antibody system を用いて LH を免疫学的に測定しようとする試みがなされるようになった。

しかし、未だ LH はもちろん HCG そのものも純粋には抽出されておらず、その抗原性についても不明の点が多いので、このような方法で LH が測定されても果して LH そのものがどうか、あるいは免疫学的測定値が直ちに生物学的活性を表わすことが可能であるのかも明瞭ではない。このような方法が臨床応用されるためには、LH に対する特異性、生物学的活性との関係や測定法自体についても慎重な検討を加えなければならない。そこで著者は、抗 HCG 家兔血清および HCG 感作羊血球を用いた血球凝集阻止反応による LH-Immunoassay について、これらの問題点をまず基礎的に検討し、さらに臨床応用への可能性について検討して若干の知見を得たので報告する。

II. 基 礎 実 験

HCG Antigen-antibody system を用いて LH を免疫学的に測定するためには、HCG と LH との間に免疫学的に交叉反応の成立することが前提条件であり、ついで HCG に比し尿中排泄量が微量である LH の免疫学的測定法そのものにも多くの検討と吟味の必要が残されている。そこで基礎実験において、これらの問題について検討を行った。

1. 実験材料ならびに方法

i) 抗 HCG 血清の作製法

a) 抗原：部分精製 HCG 製剤である Primogonyl (Schering, 1 管 1000IU 含有、以下 HCG-P と略す) を用いた。

b) 免疫法: HCG-P1000 IU/ml を含有する生理的食塩水 (以下生食水と略す) 溶液を等量の Complete Freund's adjuvant (Difco) と water in oil の状態に混合し, 雌性成熟家兎 (体重 2.5~3.0kg) の両足蹠趾間および背部皮内に0.1ml づつ20カ所, 合計 2 ml, 1000IU を注射した。2週間後, 同様の方法で一家兎当り 1000IU の HCG-P を注射し, さらに3週間後より Booster injection として, 1000IU の HCG-P 生食水溶液を隔日に9回腹腔内に注射した。用いた HCG-P は, 一家兎につき総量 11000IU である。

c) 採血: 最終注射の1週間後心臓突刺により全採血し, 血清を分離した後 -20°C に凍結保存した。実験には 56°C , 30分 incubate して非働化を行つた後使用した。

d) 吸収抗 HCG 血清の作製法

抗 HCG 血清 1 ml に対して凍結乾燥した正常男子血清 (Normal human serum, 以下 NHS と略す) 30mg (蛋白量) および下垂体性 Gonadotropin (以下 G と略す) を殆んど含まないことが知られている 4才以下の小児尿¹⁰⁾よりアルコール沈澱法で作製した小児尿蛋白の乾燥粉末 20mg (蛋白量) を加え, 37°C , 1時間 incubate した後, 4°C で一夜放置し, 遠沈後その上清をとつた。

ii) ゲル内沈降反応

PH8.4 の硼酸緩衝生食水 (Borate buffered saline, 以下 BBS と略す) に Special Agar Noble (Difco) を0.85% に溶解して厚さ 1 mm の寒天板を作製した。抗原孔, 抗体孔は共に直径2.5mm, 抗原-抗体孔間距離は 5 mm とした。抗原は BBS 溶液とし, 抗血清, 抗原溶液を毛細管を用いて各々 3 回該当する孔に充填した後, 恒湿箱中に一昼夜放置した。ついで生食水で一夜浸洗後さらに純水で 1 時間浸洗し, 乾燥させた後, Amido black 10B にて染色して標本とした。

iii) 免疫電気泳動法

pH8.2, イオン強度 0.05μ の Veronal 緩衝液に, 0.85% の Special Agar Noble (Difco) を溶解して厚さ 1 mm の寒天板を作製し, 直径2.5mm の抗原孔を設け, 抗原の BBS 溶液を 3 回充填した。6V/cm, 45分間通電により抗原を泳動させた後, 抗原孔端より 4 mm の所に幅 1 mm の抗体溝を設けて抗血清を 3 回充填した。一昼夜恒湿箱中に放置した後生食水で一夜浸洗後さらに純水で 1 時間浸洗し, 乾燥させた後 Amido black 10B で染色して標本とした。

iv) 血球凝集反応 (Hemagglutination reaction, HAR) および血球凝集阻止反応 (Hemagglutination inhibition reaction, HAIR)

a) HCG 感作血球の作製法

Wide および Gemzell らの方法⁷⁾では成績の一定をみなさいとがあつたので, ホルマリン化, タンニン酸処理および HCG 感作時の条件に再検討を加え, 以下の方法によつて HCG 感作血球を作製した。

イ) ホルマリン化

羊血球浮遊液 (Alsever's solution) を, pH7.2 の生食水で数回遠沈洗滌し, 血球沈澱を pH7.2 の生食水で 8% の浮遊液とする。

次いで血球浮遊液に等量の pH7.2, 3% ホルマリン生食水溶液を加え室温に20時間放置し (時々振盪する), 生食水で数回遠沈洗滌後, 1/10000 の Merthiolate を含む生食水を加えて 10% 血球浮遊液として 4°C で保存した。

ロ) タンニン酸処理

10%ホルマリン化血球浮遊液を pH6.4 の磷酸緩衝生食水 (Phosphate buffered saline, PBS) で 3 回遠沈洗滌後, 血球沈澱を PBS で 3.3% 浮遊液とする。これに 1/20000 のタンニン酸を含む PBS 溶液を等量加えて 37°C , 30分間 incubate する。その後 PBS で数回洗滌し, 再び PBS にて 3.3% の血球浮遊液とする。

ハ) HCG 感作

3.3%ホルマリン化, タンニン酸処理羊血球浮遊液に, HCG (純度 5000IU/mg) を 100IU/ml 含む PBS 溶液を等量加えて 56°C , 2時間 incubate する。PBS で 2 回遠沈洗滌し, 保存液 (PBS 45.5ml, 非働化吸収家兎血清 1 ml, 蔗糖 3.0 g, 1% の Merthiolate 溶液 0.5ml を混合したもの) で 3.3% の HCG 感作血球浮

遊液とし、小試験管に分割注入して使用時迄 -20°C に凍結保存した。また、3.3%ホルマリン化、タンニン酸処理血球浮遊液に等量の PBS を加えて同じ操作を行い、対照血球を作製した。

b) HAR

抗 HCG 家兎血清を PBS で倍数稀釈し、その 0.45ml を 2 列の小試験管にとり、その 1 列には 3.3% HCG 感作血球浮遊液 0.05ml を加え他の 1 列には対照血球を加えてよく振盪した後室温に静置した。4 時間後に管底より Stavitsky の方法に従って凝集像を観察し、何倍稀釈迄凝集が生じたかを判定し、凝集の認められる最高の稀釈倍数をもって抗体価とした。

c) HAIR

Fig. 1 のように、横二列の小試験管に稀釈した抗 HCG 血清 0.1ml を入れ、倍数稀釈した検体(1)を縦二列に順次 0.4ml づつ加える。上段の列(2)には HCG 感作血球浮遊液を、下段の列(3)には対照血球浮遊液を各々 0.05ml づつ加えてよく振盪し、室温放置 4 時間後管底を観察して、検体の何倍稀釈迄凝集阻止が認められるかを Stavitsky の方法¹¹⁾で判定した(4)。この時、対照血球群(3)には非特異的凝集像のないことを確認した。また、同時に同じ操作を、既知単位の標準 HCG 溶液 (5000IU/mg の HCG を Standard HCG としてもちいた。以下 St. HCG と略す) について行ない、凝集阻止に必要な最低の HCG 濃度 (IU/L) を求めて免疫学的反応系の凝集阻止感度とし、この値に検体の凝集阻止を生じた最高稀釈倍数を乗じて、検体 1 L 中の LH を、HCG 相当量 (HCG equivalent) として表わした。

また、HAIR を行う時は毎回必ず Fig. 1 のように稀釈液対照、抗血清対照をとって、免疫学的反応系が正しく作働していることを確認した。なお、検体の倍数稀釈には、PBS, G を含まないとされている 4 才以下の小児尿蛋白液 (後にのべる被検尿の濃縮法に準じて作製した) などを使用した。

v) 生物学的活性の中知実験

抗 HCG 血清に下垂体性 G として、FSH および LH を含む HMG 製剤である Pergonal-500TM (Istituto Farmacologico Serrone, HMG-P) を加えて 37°C 、1 時間 incubate し、 4°C で一夜放置した後 LH-, FSH-Bioassay を行ない、各々の生物学的活性に対する抗 HCG 血清の中和作用を検討した。

vi) LH-, FSH-Bioassay

a) LH-Bioassay

Greep¹²⁾-三宅変法¹³⁾に準じて、生後 21 日目、体重 30~40 g の Sprague-Dawley 系雄ラットを用意し、生後 22 日目に、小山-田中変法¹⁴⁾により経耳道的に下垂体を適出し、生後 23 日目より検体を 1 日 1 回 4 日間連続背部皮下に注射した。最終注射の翌日屠殺して腹側前立腺重量を秤量し、生食水を同様に投与した対照ラットの同重量に対する増加比 (Rate) を求めて LH 活性の指標とした。また屠殺時開頭を行って下垂体摘出の完否を検べ、摘出不完全なものは除外した。

b) FSH-Bioassay

Steelman-Pohley¹⁵⁾-三宅変法¹³⁾に準じて、生後 21 日目、体重 30~40 g の Sprague-Dawley 系雌ラットを用意し、生後 23 日目より、40IU の HCG を添加した検体を 1 日 1 回 4 日間連続背部皮下に注射した。最終注

Fig. 1. HAIR

射の翌日屠殺して両側卵巣重量を秤量し、体重100g 当りの重量 (mg%) に換算し、同様に HCG 40IU のみ注射した対照群ラットの同重量に対する増加比を求めて FSH 活性の指標とした。

2. 実験成績

i) 抗 HCG 血清の純化

抗 HCG 血清の作製に抗原として用いた HCG-P は部分精製品であるため、HCG 以外の蛋白が混在していると思われる。したがって、そのような夾雑蛋白に対する抗体も同時に産生されている可能性がある。そこで、HCG に対する抗体のみ有する抗血清の作製を試みた。

a) 抗体価測定

HCG-P で免疫した4羽の家兎より得た抗 HCG 血清につき、血球凝集反応により抗体価を測定すると、Tab. 1 のように、 $\times 6,400 \sim \times 5,200$ であつた。以後 No. 3 の抗 HCG 血清を用いて実験を行つた。

b) 免疫電気泳動法

抗 HCG 血清中に含まれる夾雑蛋白に対する抗体を検出するため、抗原として、免疫に用いた HCG-P の 5000IU/ml 溶液、HCG を含まない NHS の 50mg/ml (蛋白量) 溶液および G を含まない CUP の 40mg/ml (蛋白量) 溶液と抗 HCG 血清を用いて免疫電気泳動を行うと、Fig. 2 のように、抗 HCG 血清と、HCG-P の間には、5~6本の沈降線がみられ、同時に NHS、CUP との間にも数本の沈降線がみられた。このことより抗原として用いた HCG-P 中には、HCG 以外の血清蛋白、尿蛋白が混在し、抗血清中にはこれら夾雑蛋白に対する抗体も同時に産生されていることが明らかになった。

このような夾雑蛋白に対する抗体を除くため、抗 HCG 血清を NHS および CUP にて吸収すると、Fig. 3 のようにもはや NHS、CUP とは反応しないで HCG-P とのみ一本の沈降線を形成する吸収抗 HCG 血清が得られた。以後この吸収抗 HCG 血清を用いて実験を行つた。

ii) 抗 HCG 血清に対する LH の抗原性について

吸収抗 HCG 血清に対する LH の抗原性を検討するため、LH および FSH を含む HMG-P について、

Table 1. Antibody titer of antisera

No. of rabbits	Antibody titer
No. 1	$\times 12800$
No. 2	$\times 25600$
No. 3	$\times 51200$
No. 4	$\times 6400$

Fig. 2. Immunoelectrophoresis (Before absorption)

1 : Normal human serum
2 : HCG-P
3 : Child urine proteine
A : Unabsorbed anti-HCG

Fig. 3. Immunoelectrophoresis (After absorption)

1 : Normal human serum
2 : HCG-P
3 : Child urine proteine
B : Absorbed anti-HCG

血球凝集阻止反応, ゲル内沈降反応, 免疫電気泳動法および生物活性の中和実験を行った. HMG-P は, 1 管10mg中に 75IU の LH および FSH を含む乾燥粉末製剤である.

a) HAIR

HMG-P について, 吸収抗 HCG 血清を用いて HAIR を行うと, 明らかな凝集阻止がみられ, HMG-P, 1mg は約 2IU の HCG に相当する抗原性を示すことを知った.

b) ゲル内沈降反応

抗原孔に各々 HMG-P 500IU HCG eq/ml, HCG-P 500IU/ml および St. HCG 500IU/ml をいれ, 中央の抗体孔に吸収抗 HCG 血清を入れると, Fig. 4 のように, HMG-P は, 吸収抗 HCG 血清に対して単一の沈降線を形成し, しかも HCG-P, St. HCG の沈降線と全く一つに融合した. この場合 spur formatoin はみられなかった.

Fig. 4. Agar gel diffusion

- 1 : HMG-P
- 2 : HCG-P
- 3 : HCG-P
- 4 : Standard HCG
- B : Absorbed anti-HCG

c) 免疫電気泳動法

抗原として, HMG-P 5000IU HCG eq/ml, HCG-P および St. HCG 各々 2000IU/ml を電気泳動させた後, 吸収抗 HCG 血清と反応させると, Fig. 5 のように, HMG-P の沈降線は HCG-P 或は St. HCG と同じ位置に出現し, しかも抗血清溝を途中で切ると, Fig. 6 のように HMG-P の沈降線は HCG-P 或は St. HCG の沈降線とそれぞれ一本に融合した.

d) 生物学的活性中和実験

2IU および 4IU の LH, FSH に相当する HMG-P に対して抗 HCG 血清0.002mlを加えて incubate した後, LH-, FSH-Bioassay を行うと, Fig. 7 に示すように, 抗 HCG 血清により, HMG-P の FSH 活性は有意の減少を示さないが, LH 活性は明らかに中和されて著しく減弱した. なお, FSH-Bioassay で

Fig. 5. Immunoelectrophoresis

- 1 : HCG-P
- 2 : HMG-P
- 3 : Standard HCG
- B : Absorbed anti-HCG

Fig. 6. Immunoelectrophoresis

- 1 : HCG-P
- 2 : HMG-P
- 3 : Standard HCG
- B : Absorbed anti-HCG

は, 負荷した HCG が, 抗 HCG 血清により中和されて augmentation effect が減少する可能性もあるので HCG 40IU に, 実験群と同量の抗 HCG 血清を加えたものを注射してこれを対照とした.

iii) HAIR におよぼす尿成分の濃度変化の影響

Fig. 7. Neutralization of biological activities of HMG-P by anti-HCG

止反応を行い、尿成分の濃度変化が凝集阻止反応におよぼす影響を観察した。

Tab. 2 のように、1 倍～20 倍の範囲内の尿成分の濃度変化では、凝集阻止感度は変化しないが、PBS を用いた場合と比較すると、1/4 の HCG 濃度で凝集阻止が認められた。したがって、濃縮された被検尿を用いて Immunoassay を行うとき、検体、標準 HCG の希釈に PBS を用いると実際より 4 倍高い値が得られることになる。この場合、1～20 倍に濃縮された小児尿を希釈液として用いると、正しい値が得られることになる。

Table 2. Influence of diluents on the sensitivity of HAIR

HCG IU/ml	1.6	0.8	0.4	0.2
Diluents				
PBS	○			
X20 concentrated child urine			○	
×5 //			○	
×2 //			○	
×1 //			○	

III. 臨床実験

月経周期の尿中 LH の排泄量は、これまでの Bioassay では、排卵期に一致してピークを示すことが知られている^{17)~20)}。基礎実験において検討した LH-Immunoassay でも同様に排卵期尿に LH 排泄のピークを証明し得るかどうか、又このような測定値が果して LH の Bioassay と平行するかどうかを検討した。

1. 実験対象と実験方法

i) 実験対象 問診により正常月経周期を有する23才から34才の婦人を対象とした。

ii) 実験方法 実験対象とした婦人につき、月経周期を通じて基礎体温 (BBT) を記録させるとともに連日早朝尿を採取させて、その LH-Immunoassay を試みた。又、月経周期の各時期に48時間尿を数回採取して、その一部を用いて LH-Immunoassay を、残りの尿について LH-, FSH-Bioassay を行ない Immunoassay と Bioassay の相関について検討した。

a) LH-Immunoassay

イ) 検体の作製

被検尿60mlを濾過し、Visking tube につめ、Polyaethylen glycolum 6000 をふりかけて一夜4℃に放置して濃縮する。内容を他の容器にうつして Visking tube 内を PBS で数回洗滌して洗液を濃縮尿に加えて最初の1/10容、すなわち6mlとする。氷醋酸で被検尿を pH4.5～5.0 とし、4 倍量の99%冷エタノールを加えて4℃に数時間放置した後遠沈し、沈澱をエタノール、エーテルで各々1回洗滌後乾燥させ、PBS で最初の1/20容、3 mlに溶解して、20倍濃縮被検尿とした。

なお、既知量の HMG-P の小児尿溶液について同じ操作を行って、次にのべる LH-Immunoassay により LH の回収率をみると、略完全に回収されることを知った。

ロ) 尿中 LH の Immunoassay 実施法

1000倍稀釈吸収抗 HCG 血清を用いて、20倍濃縮被検尿につき、基礎実験 1-iv-c でのべた方法により LH を測定した、なお、検体の倍数稀釈、標準 HCG 溶液の作製、倍数稀釈には、基礎実験 2-iii で検討した結果にもとづいて、検体と同様の方法で作製した2倍濃縮小児尿蛋白液を稀釈液として用いた。この時の免疫学的反応系の凝集阻止感度は 200IU/L であった。

イ) 尿中 G 抽出法

48時間尿より、Bradbury²¹⁾ 松島変法²²⁾にしたがってカオリン吸着、NH₄OH 抽出、エタノール沈澱により、Gの粗抽出を行った。なお既知量の HMG-P の小児尿溶液について同じ操作を行って、次にのべる LH-, FSH-Bioassay を行ない回収率をしらべると、略完全であつた。

ロ) 尿中 LH の Bioassay

さきにのべた Greep¹²⁾-三宅変法¹³⁾に準じて行つた。被検ラット是一群4匹とし、1匹につき総量8時間尿相当のG抽出物生食水溶液を注射した。

ハ) 尿中 FSH の Bioassay

さきにのべた Steelman-Pohley¹⁵⁾-三宅変法¹³⁾に準じて行つた。被検ラットは一群2匹とし、1匹につき総量8時間尿相当のG抽出物生食水溶液に HCG 20IU を負荷して注射した。

2. 実験成績

i) 正常月経周期婦人の早朝尿中

LH-Immunoassay

LH-Immunoassay を試みた症例のうち、BBT が明らかに二相性変化を示した7例の正常月経周期婦人の早朝尿中 LH の排泄パターンを Fig. 8~14 に示した。

症例 Y-1 (23才, 未婚, Fig. 8) では、月経周期の第18日(次回月経前13日目)に 320IU HCGeq./L のピークを示した。同一個人について、一周期をおいてもう一度測定を行なうと (Y-2, Fig. 9), 月経周期の第15, 16日(次回月経前14, 13日目)

Fig. 8. LH-Immunoassay of the urine during a menstrual cycle

Fig. 9. LH-Immunoassay of the urine during a menstrual cycle

に 160IU HCG eq./L のピークを示した。

症例 S-1 (27才, 既婚, 未経妊, Fig. 10) では, 月経周期の第15, 16日 (次回月経前15, 14日目) に 160 IU HCG eq./L のピークを示した。

症例 M-2 (34才, 既婚, 3回経産, Fig. 11) では, 早朝尿について LH-Immunoassay を行ない, 同時に 48時間尿より G 抽出を行つて, LH, FSH-Bioassay を行つたが, 月経周期の第18~20日 (次回月経前15~13日目) に, LH-Immunoassay で 40~80 IU HCG eq./L のピークを示した。LH-Bioassay は, LH-Immunoassay のピークに応じて高値を示したが, FSH-Bioassay 値はむしろその時期には低値を示した。

症例 K-1 (24才, 未婚, Fig. 12) は, 月経周期の第14日 (次回月経前14日目) に 80IU HCG eq./L, 症例 T (23才, 未婚, Fig. 13) は, 月経周期の第14日目 (次回月経前15日目) に 80IU HCG eq./L, 症例 L (25才, 既婚, 未経妊, Fig. 14) は 月経周期の第20日目 (次回月経前13日目) に 160IU HCG eq./L のピークをそれぞれ示した。

これらの症例において, 尿中 LH の排泄量がピークを示した時期は, いずれも BBT の変化の他に次回月経前15~13日の間にあることから推して排卵期と考えられる。

ii) LH-Immunoassay と LH-, FSH-Bioassay の関係

前記の実験対象婦人の K.M.S につき, 排卵期に 1 回, 排卵期には連続数回, 分泌期に 1 回 48時間尿を採取して, LH-Immunoassay, LH-,FSH-Bioassay を行ない, それぞれの相互関係を検討した。その成績は図 15~17 の如くである。

症例 K-2(Fig. 15), M-3(Fig. 16) において, 黒い丸印で示される LH-Immunoassay 値は, 白いバーで示されている LH-Bioassay 値と平行して増減しているが, LH-Immunoassay 値と黒いバーで示される FSH-Bioassay 値との間には, そのような関係は認められなかった。

症例 S-2(Fig. 17) は, 妊娠に移行した 1 例であるが, やはり前 2 症例と同様の傾向がみとめられた。

以上 3 例の成績をまとめたものが Tab. 3 である。

また, これらの成績について, X軸に対数目盛で LH-Immunoassay を, Y軸に LH-或は FSH-Bioassay

Fig. 10. LH-Immunoassay of the urine during a menstrual cycle

Fig. 11. LH-Immunoassay and LH-, FSH-Bioassay of the urine during a menstrual cycle

Fig. 12. LH-Immunoassay of the urine during a menstrual cycle

Fig. 13. LH-Immunoassay of the urine during a menstrual cycle

必ずしも一致を見ていないことが挙げられる。また、LH は HCG に比して尿中への排泄が微量であると云う不利な条件下におかれているが、このような条件下での LH 測定法についても充分な検討が行われねばならない。以上のように、LH-Immunoassay には究明を要するに幾多の問題点を含んでいるので、未だ一般に臨床検査として用いられる段階にまで到達していないものと考えられる。

そこで著者は、HCG と LH の抗原性について基礎的に検討を行ない、さらに尿中 LH の Immunoassay の測定条件について検討を行った後、さらにその臨床応用を試み、かつ免疫学的活性と生物学的活性との相関関係の有無についても検討した。

1. 抗 HCG 血清について

HCG 製剤の中には、その製品の純度に応じて数種類の夾雑蛋白質が混在していることは、既に多数の研

をとると、Fig. 18 のように、LH-Immunoassay 値が増加するにしたがつて、LH-Bioassay 値も次第に増加していることが明らかであるが、Fig. 19 のように LH-Immunoassay 値と FSH-Bioassay 値についてはそのような一定の関係は認められなかった。

IV 総括ならびに考按

LH の免疫学的測定には、Immunoassay の常識として LH の Antigen-antibody system を用いるのが理想的ではあるが、精製された純度の高い LH の必要量を入手することは、実際には至難である。Wide および Gemzell ら⁹⁾ (1961) が HCG と LH の間には cross-reaction が成立し、それに基づいて LH-Immunoassay が可能であると報告して以来、この方法がにわかに注目を集めるようになった。そして実際に尿中 LH の測定を、このような方法で試みた報告も見られるようになってきた^{23)~28)}、しかし、このような免疫学的な LH 測定法が果して真に LH を測定しているかについては未だ明らかでない。その理由として、HCG、LH はともに未だ純粋には抽出されていないので、これらのホルモンの抗原性についても不明の点が多く、しかも LH の Immunoassay と、生物学的活性との関係についても諸家の報告は

Fig. 14. LH-Immunoassay of the urine during a menstrual cycle

Fig. 15. LH-Immunoassay and LH-, FSH-Bioassay of the urine during a menstrual cycle

Fig. 16. LH-Immunoassay and LH-, FSH-Bioassay of the urine during a menstrual cycle

究者によつて報告されている。^{5)~7) 29)~31)}

著者が作製した抗 HCG 家兔血清においても尿蛋白、ヒト血清と共通する数種類の夾雑蛋白に対する抗体の存在することを免疫電気泳動法によつて確認し得た。しかし、これらの夾雑蛋白に対する抗体も、吸収操作によつて完全に除去することができた。

2. LH と HCG の共通抗原性について

Wide および Gemzell ら⁹⁾(1961), Wide²³⁾(1962), Butt, Crooke, および Cunningham ら³²⁾(1961) は, HAIR を用いて, 又 Goss および Taymor ら²⁹⁾³³⁾(1962.3) は, Latex-HCG Agglutination inhibition によつて, HCG と LH の cross-reaction の存在することを報告している。また, Taymor および Goss ら²⁹⁾(1963) Shahani および Rao ら³⁰⁾(1964), Goss および Lewis ら³⁴⁾(1964) は, ゲル内沈降反応, 免疫電気泳動法によつて LH と HCG の間に cross-reaction の存在することを報告している。

その他, HCG 或は LH が各々抗 LH, 抗 HCG 血清により, その生物活性が中和されるとの報告は, Butt, Crooke および Cunningham ら³²⁾(1961), Moudal および Li ら³⁵⁾(1961) その他多くの学者によつてなされている²³⁾²⁹⁾³³⁾³⁴⁾。

著者は, 精製純度の高い LH 製剤を入手できなかったため, LH および FSH を含む HMG 製剤を用いて実験を行つた。その結果, HMG 中には, 吸収抗 HCG 血清に対して HAIR, ゲル内沈降反応および免疫電気泳動法において HCG と全く同じ反応を示す物質の存在することが明らかとなつた。しかも抗

Fig. 17. LH-Immunoassay and LH-, FSH-bioassay of the urine during a menstrual cycle

HCG 血清が HMG の生物学的活性のうちの LH 作用を完全に中和したが, FSH 作用には有意の影響を与えなかったことから, HCG と同じ免疫学的反応を示す物質が LH であることが推定された。

Taymor および Goss ら (1964, 5)³⁴⁾³⁶⁾は, HCG と LH は, 抗HCG 血清に対して spur を以つて一本につながるると報告しているが, 著者の実験においては, このような spur は出現しなかった。これは, spur formation に関与する component

Table 3. Relationship between LH-immunoassay and LH-, FSH-bioassay

Case and day of cycle	FSH-Bioassay		LH-Bioassay		LH-Immunoassay IU HCG equivalent
	Rate of increase in weight of ovaries (M±SE)	No. of rats	Rate of increase in weight of ventral prostates (M±SE)	No. of rats	
K-2 : 9,10	2.0±0.10	2	1.5±0.07	4	5.6
K-2 : 13,14	1.8±0.22	2	3.6±0.26	4	46.6
K-2 : 15,16	1.7±0.57	2	2.2±0.17	4	13.3
K-2 : 17,18	1.5±0.36	2	1.3±0.13	4	12.9
K-2 : 23,24	1.5±0.64	2	1.6±0.11	4	12.8
M-3 : 8, 9	—		1.2±0.29	3	5.5
M-3 : 13,14	—		1.1±0.23	4	5.5>
M-3 : 15,16	1.2±0.28	2	1.6±0.18	3	4.2>
M-3 : 17,18	1.2±0.42	2	2.0±0.59	4	3.5
M-3 : 19,20	0.8±0.00	2	2.8±0.41	4	42.0
M-3 : 21,22	0.8±0.10	2	2.3±0.25	4	18.7
M-3 : 28,29	0.9±0.14	2	1.7±0.16	4	3.8
S-2 : 7, 8	2.6±0.64	2	2.6±0.38	4	15.3
S-2 : 15,16	2.5±1.35	2	2.4±0.38	4	14.3
S-2 : 17,18	1.6±0.42	2	2.4±0.49	4	12.3
S-2 : 19,20	1.7±0.50	2	3.0±0.22	4	38.7
S-2 : 21,22	1.7±0.10	2	4.5±0.66	4	30.7
S-2 : 23,24	1.3±0.00	2	3.2±0.22	4	40.0
S-2 : 31,32	1.4±0.22	2	5.7±0.90	4	36.3

が, 著者の用いた抗原中に少なかったか, 或はあつても免疫のさい家兎における抗体産生がほとんどなかったためと考えられる。

また, Hamashige および Arquilla ら³¹⁾ (1964) は, HCG の抗原性に関して, HAR, 沈降反応に関与する抗原-抗体と, 生物学的活性に関与する抗原-抗体は別個のものであると主張しているが, この点に関しては, 今日未だ HCG, LH 抗原が純粋に抽出できない現況であるので今後の研究に待たねばならない。

Fig. 18. Relationship between LH-Immunoassay and LH-bioassay

Fig. 19. Relationship between LH-immunoassay and FSH-bioassay

3. 尿中 LH-Immunoassay の実施条件について

今日まで報告されている尿中 LH-Immunoassay は、既存の HCG-Immunoassay をそのまま応用した測定法で実施されているが、HCG に比して生理的には極めて微量の尿中 LH を免疫学的に測定するには、まず測定法自体を十分に検討しなければならない。特に尿中 LH-Immunoassay では、被検尿に濃縮操作を加えるため、それだけ夾雑蛋白が反応に関与する可能性が増大するので、著者は夾雑蛋白に対する抗体を完全に除去した吸収抗 HCG 血清を用いた。また、従来の LH-Immunoassay では、阻止感度決定に際して、既知単位の HCG について生食水、または PBS の medium 中で決定しているが、実際の反応は 1~20 倍に濃縮された尿成分中で行われる。このような尿成分の濃度が、凝集阻止反応におよぼす影響を検討してみると、果して生食水又は PBS の medium 中の場合よりも、1~20 倍の濃度の尿成分中では、1/4 の HCG 濃度で凝集阻止が生ずることを確認した。したがって、著者は 2 倍に濃縮した小児尿中で凝集

阻止感度を決定し、また被検体の倍数希釈を行い、正しい測定値を得るように努めた。

4. 臨床成績について

これまで Bioassay によつて、月経周期における尿中 LH の排泄は、排卵期に一致してそのピークが出現することが知られている^{17)~20)}。

Immunoassay によつても同様に排卵期に尿中 LH がピークを示すことは Wide および Gemzell ら²⁶⁾ (1962) の報告、Bermes ら²⁸⁾ (1965)、Sato ら²⁷⁾ (1965) の報告にみられる。

著者も、吸収抗 HCG 血清が LH と免疫学的反応を起すことを基礎的に確認した後、この吸収抗 HCG 血清を用いて測定条件を予め検討した上で、尿中 LH-Immunoassay を試みた。7 症例において、それぞれ排卵期に一致して 80~320 IU HCG eq./L のピークの出現することを認めた。この測定値は、Wide および Gemzell ら²⁶⁾ (1962)、Sato ら²⁸⁾ (1965) の報告に比らべて全般的にやや低値を示しているが、これは標準品として用いた HCG 製剤が異なること以外に、著者は吸収抗 HCG 血清を使用したこと、および阻止感度決定、検体の希釈に濃縮小児尿を使用したことなどが関係しているものと考えられる。

5. 免疫学的測定値と生物学的活性について

LH-Immunoassay が Bioassay にとつて代つて臨床応用されるためには、両者が少なくとも平行関係にあ

ることが当然必要となつて来る。

尿中 LH の Immunoassay 値と Bioassay 値の関係について、Wide および Gemzell ら⁹⁾ (1961), Wide (1962)²³⁾ は、非妊婦尿濃縮物や HMG 製剤に関して両者の一致をみているが、Goss および Taymor ら²³⁾ (1962) は、HMG 製剤についての比較実験で Bioassay 値/Immunoassay 値の比率が2~3にもなると報告し、Butt, Crooke および Cunningham ら²⁵⁾ (1964) は、これとは反対に若年婦人の尿については、Bioassay 値に比して Immunoassay 値が相当高いことがあるとのべている。又、Hipkin²⁴⁾ (1965) も種々の内分泌疾患を有する患者尿について調べたところ免疫学的活性はあつても生物学的活性の検出ができないものが多くあつたとのべている。

て以上のように、尿中 LH の Bioassay と Immunoassay の関係は、報告者によつて、必ずしも一致をみないことに現今多大の疑問が集中されている。

しかし著者が行つた実験では、標準となる純度の高いヒト LH がなかつたため、尿中 LH の免疫学的活性と生物学的活性を LH 量として直接比較できなかつたが、月経周期中の尿中 LH の Immunoassay 値の消長は、Bioassay 値の動揺とよく一致し、両者は略平行関係にあることを知つた。このことは、Immunoassay により、尿中 LH の絶対量は知り得ないとしても、排泄量の増減を比較測定できるので、これまでの Bioassay に代つて臨床的にも応用できるものと考えられる。

V. 結 語

HCG Antigen-antibody system を用いた HAIR による尿中 LH-Immunoassay につき、基礎的ならびに臨床的検討を行ない、次の結果を得た。

1. HCG-P 中には、HCG 以外の血清蛋白、尿蛋白成分が混在し、抗 HCG 家兔血清の作製に際してこれらの夾雑蛋白に対する抗体も産生されることを知つたので、先ず吸収操作によりこれらの抗体を除くことにより、HCG とのみ反応する吸収抗 HCG 血清を作製した。

2. 吸収抗 HCG 血清に対して、HAIR、ゲル内沈降反応および免疫電気泳動法において、HCG と共通の抗原性を示す物質が HMG-P 中にみられ、しかも HMG-P の LH 活性が抗 HCG 血清により完全に中和されることより、この物質は LH であると推定される。

3. 吸収抗 HCG 血清および HCG 感作羊血球を用いた凝集阻止反応では、その阻止感度は1倍~20倍の範囲の濃度に濃縮された尿成分中では変化しないが、PBS 或は生食水中の場合と比較すれば、1/4のHCG濃度で凝集阻止が生じた。したがつて、濃縮被検尿について免疫学的に測定するには、同様に濃縮した小児尿溶液を用いて稀釈、測定することが望ましい。

4. 7例の正常月経周期婦人の早朝尿中 LH の Immunoassay を試みた結果、月経周期の第14~20日に80~320IU HCG eq/L のピークの出現することを認めた。この時期は、いずれも次回月経より逆算して、15~13日目に相当し、しかも基礎体温と併せて考えて、いわゆる排卵期に相当する時期である。

5. 3例の正常月経周期婦人の月経周期の各時期の48時間尿につき、LH-Immunoassay および LH-, FSH-Bioassay を行つた結果、LH-Immunoassay 値の増減は、LH-Bioassay 値の増減と略平行したが、FSH-Bioassay 値とは一定の関係をみとめなかつた。

以上のことより、このような LH の免疫学的測定法は、LH の尿中排泄量の増減を知る方法として臨床的に意義あるものと考えられる。

稿を終るに当り、御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師足高教授に深甚の謝意を表します。又本研究の実施に当り直接御指導を頂いた徳大産婦人科磯島助教授および終始御教示御鞭撻を頂いた倉智助教授、第二病理学教室松本講師に感謝の意をささげます。

なお、精製 HCG を提供された帝國臓器製薬 KK 松島博士、Primogonyl を提供された日独薬品 K.K., Pergonal-500TM を提供された東洋醸造 K.K. およびラット下垂体剔除術に御協力を賜つたシオノギ製薬 KK, 三宅研究室、田中博士、小林博士、糸賀氏に心より感謝いたします。

文 献

- 1) WIDE, L., and GEMZELL, C.A. : *Acta Endocrinol.*, 35 : 261, (1960)
- 2) BRODY, S. and CARLSTRÖM, G. : *Lancet*, II : 99, (1950)
- 3) MCKEAN, C.M. : *Am. J. Obst. & Gynec.*, 80 : 596, (1960)
- 4) ROBBINS, J.L., HILL, G.A., GARLE, B.N., CARLQUIST, J.H., and MARCUS, S. : *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 109 : 321, (1962)
- 5) 足高善雄, 谷沢修 : 産婦人科治療, 7 : 373, (1963).
- 6) 谷沢修, 磯島晋三 : 日本内分泌誌, 39 : 08 (1964)
- 7) 谷沢修 : 日産婦誌, 17 : 145, ((1965).
- 8) 磯島晋三, 他 : 産婦の世界, 18 : 520, (1966).
- 9) WIDE, L., ROOS, P., and GEMZELL, C. : *Acta Endocrinol.* : 37, 445, (1961)
- 10) GOSS, D.A. : *J. Clin. Endocrinol.*, 24 : 408, (1964)
- 11) STAVITSKY, A.B. : *J. Immunol.*, 72 : 360, (1954)
- 12) GREEP, R.O., VAN DYKE, H.B. and CHOW, B.F. : *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 46 : 644, (1941)
- 13) 三宅有 : 日本内分泌誌, 37 : 576, (1961).
- 14) 田中明 : 塩野義年報 5 : 678, (1955).
- 15) STEELMAN, S.L. and POHLEY, F.M. : *Endocrinology*, 53 : 604, (1953).
- 16) 足高善雄, 磯島晋三 : 産と婦, 33 : 33, (1966).
- 17) MCARTHUR, J.W., WORCESTER, J., and INGERSOLL, F.M. : *J. Clin. Endocrinol.*, 18 : 1186, (1958)
- 18) FUKUSHIMA, M., STEVENS, V.C., GANTT, C.L., and VORYS, N. : *J. Clin. Endocrinol.*, 24 : 205, (1964)
- 19) ROSEMBERG, E., and KELLER, P.J. : *J. Clin. Endocrinol.*, 25 : 1262, (1965).
- 20) 倉智敬一 : 第17回日産婦総会宿題報告要旨, p.229 (1965).
- 21) BRADBURY, J.T., BROWN, E.S. and BROWN, W.E. : *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 71 : 228, (1947)
- 22) 松島早苗, 出口雅之 : ホと臨, 8 : 749, (1960).
- 23) WIDE, L. : *Acta Endocrinol.*, Suppl., 70, (1962)
- 24) HIPKIN, L.J. : *Acta Endocrinol.*, 50 : 224, (1965)
- 25) BUTT, W.R., CROOKE, A.C., CUNNINGHAM, F.J. and INGRASSIA, F. : *Proc. Roy. Soc. Med.*, 57 : 851, (1964)
- 26) WIDE, L., and GEMZELL, C.A. : *Acta Endocrinol.*, 39 : 539, (1962)
- 27) SATO, T., GREENBLATT, R.B., and MAHESH, V.B. : *Fertil. & Steril.*, 16 : 223, (1965)
- 28) BERMES, E.W. Jr., HEFFERMAN, B.T. and ISAACS, J.H. : *Obst. & Gynec.*, 25 : 792, (1965)
- 29) TAYMOR, M.L., GOSS, D.A. et BUYTENDORP, A. : *Fertil. & Steril.*, 14 : 603, (1963)
- 30) SHAHANI, S.K., and RAO, S.S. : *Acta Endocrinol.*, 46 : 317, (1964)
- 31) HAMASHIGE, S., and ARQUILLA, E.R. : *J. Clin. Investigation*, 43 : 1163, (1963)
- 32) BUTT, W.R., CROOKE, A.C., and CUNNINGHAM, F.J. : *Proc. Roy. Soc. Med.*, 54 : 647, (1961)
- 33) GOSS, D.A., and TAYMOR, M.L. : *Endocrinology*, 71 : 321, (1962)
- 34) GOSS, D.A., and LEWIS, J. JR. : *Endocrinology*, 74 : 83, (1964)
- 35) MOUGDAL, N.R., and LI, C.H. : *Nature*, 191 : 192, (1961)
- 36) TAYMOR, M.L., SARAVIS, C., BATT, R. and GOSS, D.A. : *Fertil. & Steril.*, 16 : 579, (1965)