Studies on the Biochemical and Immunochemical Properties
of Human Placental Lactogen (hPL: Human
Chorionic Somatomammotropin, hCS)
Part III Studies on Immunological Character and Its Clinical Application

Hajime MORIKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kobe University School of Medicine, Ikutaku,
Kobe 650, Japan (Director : Professor Shimpei Tojo, M.D.)

Purification and Biochemical character of hPL were already described (Folia Endocri. Japon., 49, 882 and 49, 1059, 1973).

In this paper, the author describes the immunological character of hPL and the method of the immunological measurement using its antigenicity. Anti-hPL serum was prepared by injecting purified hPL-Kobe with complete Freund's adjuvant into the male guinea pig or male rabbit, and had the specific titer to show cross reaction with 25 μ g/ml hPL on Ouchterlony, but no cross reaction with human serum.

1. Immunological Character of HPL-Kobe

As reported, the biological action of hPL includes somatotrophic or metabolic action (Sciarrà et al., 1963, Tojo et al., 1972, Tanaka, 1972) and lactogenic or luteotrophic action (Ito & Higashi, 1961, Josimovich et al., 1962). So the cross-reactivity of anti-hPL serum was investigated on Ouchterlony immunodiffusion against the human pituitary proteohormones, such as human growth hormone (hGH) and human prolactin (hPRL), or the human chorionic such as human chorionic gonadotropin (hCG) and human chorionic thyrotropin (hCT).

HPRL, hCG and hCT did not show the precipitation line against anti-hPL serum and a single line was observed against hGH which showed only a partial identity for hPL. On immunoelectrophoresis using anti-hGH serum, hGH and hPL showed a single precipitation line in agar gel and hGH migrate more rapidly to the cathode. These results reveal that hPL shares antigenic determinants not present in the other.

2. Immunoassay of HPL

For the estimation of human placental lactogen (hPL) three different immunoassay procedures, such as radioimmunoassay (RIA), single radial immunodiffusion (SRI) and hemagglutination inhibition reaction (HAIR) are reported here.

(1) HPL-Double Antibody Radioimmunoassay (HPL-RIA)

HPL-Kobe was used as the standard sample or the sample for iodination, and antisera to hPL was prepared in guinea pig against a purified hPL-Kobe. The iodination step presently used followed after the procedure described for growth hormone (Greenwood et al., 1963) with very minor modification. The reaction time of chloramin T

was 15 sec.. The dilution of anti-hPL serum was 1:10000, first incubation time was 48 hrs. and second incubation time was 24 hrs.. The standard curve obtained was sensitive, and unlabelled hPL over 0.006 $\mu\text{g/ml}$ was measurable. Using this method, serum hPL of the normal pregnant woman was measured, which revealed that hPL was detectable on the 8th week of gestation. The concentration was 0.03~0.01 $\mu\text{g/ml}$. Thereafter, it rapidly increased to reach a peak of 4~10 $\mu\text{g/ml}$ at term. A small amount of hPL was detectable in the cord blood and urine of the pregnant woman. Serum hPL was very low or undetectable in the abnormal pregnancy with hypofunction or dysfunction of placenta such as threatened abortion which terminated in abortion, ectopic pregnancy, fetal death in utero and hydatidiform mole. These facts indicate that measurement of serum hPL in the pregnant woman by hPL-RIA is one of the helpful ways to judge placental function.

(2) HPL-Single Radial Immunodiffusion (HPL-SRI)

The principle of SRI reported by Mancini et al. (1965) was applied to the measurement of hPL. The conditions of method were determined by easiness to read the precipitation ring and the area of the ring: anti-serum concentration in the agar plate, 1.0%: thickness of the plate, 1.2 mm.: the diameter of the well, 4 mm. HPL-Kobe as a standard sample was diluted at stepwise concentration and placed in the well. Three days later, the diameter of each precipitation ring formed a line with 5.48 of regression coefficient and the sensitivity was 5 $\mu\text{g/ml}$. When serum hPL of normal pregnant women was measured simultaneously by hPL-SRI and hPL-RIA, the values measured by hPL-SRI were 2-3 times higher than those by hPL-RIA. But normal ranges by both methods increased with identical pattern.

(3) HPL-Hemagglutination Inhibition Reaction (HPL-HAIR)

As serum was the sample to test in the measurement of hPL by HAIR, the effect of serum on hemagglutination was evaluated at first. Then, the sensitivity and reliability of this method were tested. Anti-hPL rabbit serum was used as antiserum, and sheep erythrocyte treated with formalin-tannic acid after Wide et al. was employed for hPL-sensitized erythrocyte. The effect of serum protein on hamagglutination was negligible when serum of nonpregnant woman was diluted more than 20 times.

Five-hundred-time dilution of anti-hPL serum made it easiest to read the end point of the reaction. In other words, the sensitivity of this hPL-HAIR system was 0.1 $\mu\text{g/ml}$, and serum hPL is measurable if it is more than 2 $\mu\text{g/ml}$. In this hPL-HAIR method, prozone phenomenon was not observed even when hPL concentration of serum was 1 mg/ml, and moreover, 60000 IU/ml of serum hCG did not interfere with the reaction.

But, three of 18 nonpregnant women who were rheumatic showed a doubtful positive reaction. This is probably due to the fact that the rheumatic factor has a component to react with rabbit γ -globulin (anti-hPL serum). The sensitivity was elevated when hPL-HAIR was stored for two months at 45°C, but it remained the same when stored for 6 months at 37°C.

So, this system was regarded as a very stable and reliable method. Measurement of serum hPL in 250 normal pregnant women by hPL-HAIR revealed that a constant value, $2 \mu\text{g/ml}$, was obtained at the 17th week of gestation. And then it continued to increase until the 40th week when the value was 6.5 ± 1.1 ($M \pm S.D.$). Values measured by hPLHAIR was somewhat higher than those by hPL-RIA from the same sample, but the patterns of normal range by both methods were almost identical. Summarizing the findings of the above three methods, hPL-RIA is the best method in its sensitivity ($0.006 \mu\text{g/ml}$), accuracy and specificity. But it sometimes takes much time before the measurement is really performed because of poor timing for sampling, and availability of isotope. HPL-SRI is much less sensitive and specific than hPL-RIA, but measurement can be performed at any time, and the technique is simple. So, analysis of serial measurement may be helpful for the follow-up of the pregnancy course.

HPL-HAIR is useful for the measurement of hPL in clinical practice at late stage of pregnancy because of two advantages; the value almost corresponds to that of hPL-RIA when it is over $2 \mu\text{g/ml}$; the time for procedure is the shortest, 2 hrs., among the three methods.

(See pp. 42~59)

ヒト胎盤ラクトージン (Human Placental Lactogen: hPL, Human Chorionic Somatomammotropin: hCS) の生化学的ならびに免疫学的性格にかんする研究

第三編 hPL (hCS) の免疫学的性格とその臨床応用に関する研究

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 東條伸平教授)

森 川 肇

(昭和48年10月13日受付)

hPL-Kobe は, Ouchterlony 法で hPRL, hCG (hC-LH) 及び hCT とは免疫交叉性を示さなかつたが, hGH とは部分交叉性を示し, 免疫電気泳動上 hGH よりやや陽極に泳動され, hPL と hGH は共通抗原を有すると考えられた. hPL の蛋白体としての antigenicity を利用して, RIA, SRI 及び HAIR による hPL 測定法を考案したが, 母体血中 hPL は, 正常妊娠では妊娠初期から末期に向つて増加する pattern を示し, 一方胎盤機能の障害が疑われた症例では, きわめて低値であつた.

緒 言

著者は, 第一編¹⁾ 及び第二編²⁾ で, ヒト胎盤ラクトージン (hPL ; hCS) の抽出精製ならびに生化学的性質を報告した. 本編では, まず hPL-Kobe の免疫学的性格を検討し, ついでその蛋白体としての antigenicity を利用して, hPL 測定法を工夫し, 妊娠個体における hPL の分泌動態を検討したので報告する.

I. 研究の目的と計画

hPL は, 生物学的作用の面から lactogenic な作用と³⁾⁴⁾, somatotropic 或は metabolic な作用^{5)~8)} を持つことが明らかにされているので, このような作用を持つ下垂体性蛋白ホルモンのプロラクチン (hPRL), 及びヒト成長ホルモン (hGH), さらに胎盤産生蛋白ホルモンのヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) やヒト絨毛性甲状腺刺激ホルモン (hCT) などとの免疫交叉性を, Ouchterlony 法⁹⁾ により検討し, ついでその抗血清を用いて hPL 測定法を考案し, 臨床症例につき測定を行い, hPL の分泌動態を検討することとした.

II. 実験材料と方法

A. 実験材料

1. ヒト胎盤ラクトージン (HPL ; HCS)

実験に用いた hPL は, 著者が第一編¹⁾ 及び第二編²⁾ で既述した hPL-Kobe である.

2. ヒト成長ホルモン (hGH)

NPA の Dr. A.E. Wilhelmi より提供された hGH である.

3. ヒトプロラクチン (hPRL)

NIA, NIAMD の Dr. R.W. Bates から提供されたものである.

4. ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG)

hCG は, 東條, 足高, 望月らにより, ヒト胎盤より抽出精製された hCG (hC-LH) を用いた¹⁰⁾¹¹⁾.

5. ヒト絨毛性甲状腺刺激ホルモン (hCT)

hCT は、東條、金沢¹²⁾ らによりヒト胎盤より抽出精製されたものを用いた。

6. 抗 HPL 血清

i 抗 HPL モルモット血清

抗 hPL 血清は、hPL-Kobe をモルモットに反復投与して作製した。この抗 hPL 血清は、Ouchterlony 法⁹⁾により、標準 hPL の 25 μ g/ml でも唯一の沈降線を示し、ヒト血清に対しては全く沈降線を示さなかった^{13)~15)}。

ii 抗 HPL 家兎血清

hPL-Kobe を雄成熟家兎に反復投与して作製した¹⁶⁾。

以上の抗血清は、いずれも血清分離直後に、56°Cで30分間インキュベートして非動化を行い、使用するまで-20°Cで凍結保存した。

7. 化学薬品

i BACTO AGAR

DIFCO Laboratories (Detroit 1, Michigan, U.S.A.) のものを使用した。

ii Agarose

半井化学薬品株式会社製、免疫電気泳動用のものを用いた。

iii リン酸緩衝液 (PB)

半井化学製品株式会社製試薬特級のリン酸一ナトリウム及びリン酸二ナトリウムを用いて、pH 7.5, 0.05 M PB 及び pH 7.5, 0.5M PB を作成した。

iv Bovine Serum Albumin (BSA)

Armour Pharmaceutical Company (Chicago, Illinois, 60690, U.S.A.) のものを使用した。

v クロラミンT溶液

半井化学薬品株式会社製試薬特級のものを使用し、4 mg/ml の割合に 0.05M PB に溶解した。

vi メタ重亜硫酸ナトリウム溶液

和光純薬株式会社製試薬特級のものを、2.4mg/ml の割合に 0.05M PB に溶解した。

vii ヨウ化カリウム溶液

和光純薬株式会社製試薬特級のものを、10mg/ml の割合に 0.05M PB に溶解した。

viii Na ¹³¹I

New England Nuclear Corporation (U.S.A.) の carrier free, 放射能純度 99 % で、0.1 % 苛性ソーダ溶液に 530mCi/ml 以上に濃縮されたものを使用した。

B 実験方法

1. HPL の免疫学的性格の検討

0.8% DIFCO AGAR を用いた Ouchterlony double immunodiffusion 法⁹⁾によつた。

寒天平板の中心孔には抗 hPL モルモット血清を、周囲の小孔には hGH, hPRL, hCG (hC-LH)あるいは、hCT 溶液（それぞれ 1 mg/ml の濃度に溶解したもの）をそれぞれ注入し、4 °C で24時間静置後、各々の免疫交叉性を検討した。対称の hPL-Kobe は、100 μ g/ml の濃度とした。

2. HPL 測定法の検討

血中 hPL 測定法は、二抗体 radioimmunoassay, 一元平板免疫拡散法及び赤血球凝集阻止反応などの原理を応用し、工夫した。

i HPL Double Antibody Radioimmunoassay (HPL-RIA)

標準及び標識用 hPL は、hPL-Kobe であり、抗血清は第一抗体に抗 hPL モルモット血清、第二抗体に抗モルモット γ グロブリン家兎血清を使用した。Carrier protein は正常モルモット血清である。また稀釈用 buffer は、pH 8.6 バロナール緩衝液に、0.5% BSA, 0.9% NaCl を加えた溶液である。

a 抗原の標識と ¹³¹I-hPL の精製

44 ヒト胎盤ラクトゲン (Human Placental Lactogen : hPL, Human Chorionic Somatomammotropin : hCS) の生化学的ならびに免疫学的性格にかんする研究 (森川)

ホルモンの標識は, Greenwood & Hunter のクロラミン T 法¹⁷⁾¹⁸⁾をやや改良して行なった。即ち 5mCi の Na ¹³¹I に, 正確に pH 7.5 に調整された 0.5M PB を 0.05ml 加え, pH を大体 8.5 に調整した。これに hPL 10 μ g/0.05ml を加えてよく混合し, クロラミン T 溶液 0.05ml (200 μ g) を加えてよく混合した。クロラミン T の反応時間は, 正確に 5 秒, 15 秒, 30 秒間の 3 種とし, いずれの場合にもメタ重亜硫酸ナトリウム溶液 0.2ml (240 μ g) を加えて反応を停止させ, ヨウ化カリウム溶液 0.8ml (8 mg) を加えた。

¹³¹I-hPL と free ¹³¹I の分離は, あらかじめ BSA で飽和した Sephadex G-75 カラム (10 $\times$ 250mm) によるゲル濾過法によった。

各溶出液の放射活性は, Aloka 製キューリーメーター IGC-1B, RIC-319 で測定した。

damaged ¹³¹I-hPL の検討は, 放射活性の最高の部位を Sephadex G-150 カラム (10 $\times$ 300mm) で re-filtration することによった。

b 抗 HPL 血清稀釈率の検討

2000, 4000, 6000, 8000, 10000, 12000, 16000, 及び20000倍に稀釈した抗 hPL 血清のそれぞれ 0.5ml と ¹³¹I-hPL 0.5ml (¹³¹I-hPL として 0.02 μ g/0.5ml) を混合し, 4 $^{\circ}$ C で48時間インキュベーションしたあと, 第二抗体として抗モルモット γ グロブリン家兎血清希釈液 0.2ml を, carrier として50倍稀釈した正常モルモット血清 0.2ml を加え, 4 $^{\circ}$ C, 24時間インキュベーションした。抗体と結合した ¹³¹I-hPL (B) と結合していない ¹³¹I-hPL (F) の分離は, 反応終了液を 3000rpm., 15分間遠沈し, 上清を除去したあと, さらに沈渣に稀釈用 buffer を 1 ml 加え, 3000r.p.m. で再遠沈して行つた。沈降率は, B + F 及び B の放射活性を well type の scintillation counter にて測定し, B + F に対する B の割合を百分率で表現した。

c Incubation time の検討

¹³¹I-hPL 0.02 μ g/0.5ml と 10000 倍稀釈した抗 hPL 血清 0.5ml を混合し, incubation time を検討した。まず first incubation time は, 36, 48, 60, 72時間の4種とし, second incubation time を24時間と一定にして, それぞれの反応終了後の B + F に対する B の百分率から検討した。また second incubation time は, first incubation time を48時間と一定にし, second incubation time を 12, 18, 24, 30, 36時間の5種とし, それぞれの反応終了後の沈降率から検討した。

d 標準曲線の作成

¹³¹I-hPL 0.02 μ g/0.5ml, 10000 倍稀釈抗 hPL 血清 0.5ml 及び 0.005 μ g/ml から 10 μ g/ml の濃度に段階稀釈した標準 hPL 1ml をそれぞれ混合し, first incubation time を48時間, second incubation time を 24時間として反応させ, 反応終了後, それぞれの沈降率を算出し, 標準曲線を作成した。

e 実際の臨床症例の HPL 測定

神戸大学医学部附属病院を受診或は入院した正常及び異常妊娠妊婦及び新生児を対称とした。

正常妊娠 8 週から40週までの妊婦 200 例の肘静脈血を採取し, 血清 hPL を測定した。

また正常妊娠40週の妊婦 5 例につき採尿し尿中 hPL を測定した。

さらに妊婦40週で正常分娩した新生児 5 例の臍帯静脈血を採取し, 血清 hPL を測定した。

一方異常妊娠については, 切迫流産 6 例 (流産に終つたもの 4 例, 妊娠を維持できたもの 2 例), 子宮外妊娠 4 例, 子宮内胎児死亡 4 例, 妊娠中毒症 7 例 (うち 1 例は preeclampsia), 胎状奇胎 6 例, の母体肘静脈血を採取し, 血清 hPL を測定した。

ii HPL Single Radial Immunodiffusion (HPL-SRI)

Mancini の報告した一元平板免疫拡散法による蛋白定量法を, 血清 hPL の測定に応用した。

a 寒天平板の作成

生理食塩水に 1.5% Agarose, 0.1% NaN₃ を加え, 温湯浴中で寒天が完全に溶けるまで加温する。

寒天が完全に溶けたら56 $^{\circ}$ Cの恒温槽中に移し, 10分以上経過後, 抗 hPL 血清を加え泡をたてぬようによく混和し, ガラス板上に流し寒天平板とする。

b 寒天内抗血清濃度の検討

抗 hPL 家兔血清の濃度を、0.5%、1.0%、1.5%及び2.0%とし、それぞれ厚さ 1.2mm、抗原孔の直径 4mm の寒天平板を作成した。1 μ g/ml から 40 μ g/ml まで段階希釈した標準 hPL を、各々の抗原孔に 10 μ l ずつ注入し、室温で3日間静置し、沈降輪の面積を測定し、標準回帰直線を作成した。

c 寒天平板の厚さの検討

抗血清濃度 1.0%、抗原孔の直径 4mm とし、寒天平板の厚さは 1.2mm 及び 2.0mm の2種を検討した。30 μ g/ml の濃度の標準 hPL をそれぞれの抗原孔に注入し、室温に3日間静置後の沈降輪の面積を測定した。

d 抗原孔の検討

厚さ 1.2mm、抗血清濃度 1.0%とし、抗原孔の直径を 3mm、4mm、及び 5mm とした寒天平板を作成し、1 μ g/ml から 40 μ g/ml まで段階希釈した標準 hPL をそれぞれの抗原孔に注入し、室温に3日間静置後の沈降輪の面積を比較検討した。

e HPL-SRI による血清 HPL の測定

測定に用いた寒天平板は、抗血清濃度 1.0%、厚さ 1.2mm、抗原孔の直径 4mm とし、5 μ g/ml から 40 μ g/ml に段階希釈した標準 hPL を抗原孔に注入し、標準回帰直線を作成した。

一方被検血清を同様に抗原孔に注入し、生じた沈降輪の面積を標準回帰直線に照合し、血清 hPL を測定した。

正常妊娠例については、妊娠8週から42週までの100例の妊婦血清を採取し、血清 hPL を測定したが、そのうちの20例については hPL-RIA により同時測定し、hPL-SRI と hPL-RIA による測定値を比較検討した。

また正常分娩直後の新生児5例の臍帯血を採取し、血清 hPL を測定した。

異常妊娠例については、流産に終わった切迫流産3例、子宮内胎児死亡3例、妊娠中毒症1例、無脳児妊娠1例、胎盤機能不全1例の母体血清を採取し、血清 hPL を測定した。

iii HPL Hemagglutination Inhibition Reaction (HPL-HAIR)

HPL-HAIR により妊婦血中 hPL を測定するために、まず測定系に及ぼす血清蛋白体の影響を検討したあと、本系の感度の決定と安定性につき検討した。

a HPL-HAIR の作成

抗血清としては、抗 hPL 家兔血清を用い、hPL 感作赤血球は、Wide の方法²⁰⁾によるホルマリン、タンニン酸処理した羊赤血球を用いた。

本系による測定手技は、Table 1 の如くであり、反応終了時にアンフル底のリング形成を認めたものを、hPL 陽性とした。

Table 1. Testing procedures of hPL-HAIR

Ampoule A : diluted anti hPL serum (freeze-dried powder)
Ampoule B : hPL sensitized sheep erythrocytes (freeze-dried)
Ampoule C : 0.4ml of buffer solution
1. The test sample is reacted with the anti-hPL serum by adding 0.1ml of either standard hPL-Kobe or a suitable solution of the serum sample to ampoule A.
2. The buffer solution in ampoule C is added to ampoule B to make a suspension fluid of sensitized erythrocytes.
3. The hPL-sensitized erythrocyte suspension fluid in ampoule B is added to ampoule A and mixed thoroughly by shaking.
4. Ampoule A is then placed in a rack and left standing for 2 hours.

稀釈用 buffer は、0.1% BSA を含む pH 7.5 PB を、hPL free diluent は正常男子血清を、稀釈用 buffer にて20倍に稀釈したものをを用いた。

① 血球沈降像に及ぼす血清成分の影響にかんする検討

非妊婦血清を1~1024倍に稀釈したもの0.1mlとhPL感作赤血球浮遊液0.3mlを混合し、円底小試験管に入れ、2時間静置し、管底の血球沈降像を観察した。

② 抗 hPL 血清の稀釈倍数と正常ヒト血清の稀釈倍数の検討

非妊婦血清を1~30倍に稀釈したもの0.1mlと抗 hPL 血清を100~1000倍に稀釈したもの0.1mlの組み合わせをそれぞれ作成し、それらにhPL感作赤血球浮遊液0.3mlを加え、円底小試験管内でよく混和し、2時間静置後の赤血球凝集反応による血球沈降像を観察した。

③ 感度の検討

hPL free diluent に0.05 μ g/ml~0.3 μ g/mlの濃度に標準 hPL を溶解したものの各々の0.1mlと、400、500及び600倍稀釈した抗 hPL 血清の各々の0.1mlとを混合し、それぞれの組み合わせにhPL感作赤血球浮遊液0.3mlを加えよく混和後、2時間静置し、赤血球凝集阻止反応による血球沈降像から至適抗血清濃度及び感度を決定した。

b プロゾーン現象の検討

標準 hPL を、1 μ g/ml~50 μ g/mlの濃度に、hPL free diluent に溶解し、hPL-HAIR による2時間後の血球沈降像を観察した。

c 血中蛋白体の影響の検討

妊婦血中に多量に存在する hCG とリウマチ因子につき検討した。

ヒト胎盤より抽出精製した hCG (hC-LH) を1IU/ml から3000IU/mlの濃度にhPL free diluent に溶解し、hPL-HAIR による赤血球沈降像を観察した。

また RA test 陽性非妊婦18例の血清を20倍稀釈して、hPL-HAIR による赤血球沈降像を観察した。

d 本測定系の安定性にかんする検討

本測定系の安定性の検討は以下の如き方法によった。

まず、抗 hPL 血清と hPL 感作赤血球、或いはそれぞれを、56℃及び70℃で24時間加熱した。これらの処理を行なった測定系と段階稀釈した標準 hPL を用いて、赤血球凝集阻止反応を行ない、本系に及ぼす温度の影響を検討した。

ついで抗 hPL 血清と hPL 感作赤血球を同時に、56℃で24、48及び72時間加熱したあと、段階稀釈した標準 hPL を用いて、赤血球凝集阻止反応を行ない、加熱時間の影響を検討した。

また、37℃及び45℃でそれぞれ、0日、2週間、1、2、3、4、5、6ヶ月間保存したあと段階稀釈した hPL を用いて、赤血球凝集阻止反応を行ない、保存期間の影響を検討した。

e 妊婦血中 HPL の測定

正常妊娠例については、妊娠9週から妊娠40週までの妊婦250例の血清を、また異常妊娠例については、妊娠中毒症10例(うち preeclampsia 2例)、子宮内胎児死亡3例、切迫流産1例、Rh-sensitization 1例、糖尿病を合併したもの2例、胎状奇胎3例の母体血清をそれぞれ利用した。それらの検討は、稀釈用 buffer により、20倍、40倍、60倍、80倍稀釈したあと、hPL-HAIR にて血清 hPL を測定した。また若干例については、hPL-RIA により同時測定を行ない、hPL-HAIR による測定値と比較検討した。

C 実験成績

1. HPL の免疫学的性格の検討

hPL と他の蛋白ホルモンの免疫学的交叉性を検討した成績は、Fig. 1 の如くである。

抗 hPL 血清に対して、hPL と hGH のみが、明瞭な一本の沈降線を示し、両者は部分交叉を示した。

2. HPL 測定法の検討

i. HPL Double Antibody Radioimmunoassay (HPL-RIA)

Fig. 1. Immunoreactivity of hPL

Fig. 2. Purification of ^{131}I -hPL on Sephadex G-75 gel filtration : reaction time of chrolamin T, 1 : 5sec. 2 : 15sec. 3 : 30sec.

Fig. 3. Dilution of anti hPL serum

a 抗原の標識と ^{131}I -hPL の精製

^{131}I により hPL を標識して, Sephadex G-75 にて分離した成績を Fig. 2 に示す.

クロラミンTの反応時間が5秒間だと, ^{131}I -hPL peak (1) のはきわめて小さく, 30秒間では, ^{131}I -hPL の peak (3) は二峰性を示す.

一方反応時間を15秒間とすると鋭い一峰性の ^{131}I -hPL の peak (2) が得られた. この peak で最も高い放射活性を示した tube を, Sephadex G-150 で refiltration したところ, 強い放射活性を示す均等な鋭い一峰性の peak を示し, ホルモン標識の際に hPL の破壊がきわめて少ないことがわかる.

b 抗 HPL 血清稀釈率の検討

抗 hPL 血清を段階稀釈し, 沈降率を検討した成績が Fig. 3 である. 沈降率は, 抗 hPL 血清の稀釈が 8000~10000倍で最高であつた.

c Incubation Time の検討

incubation time の検討成績は, Fig. 4 と Fig. 5 に示す. first incubatson time は48時間が, second

Fig. 4. First incubation time of hPL-RIA
(second incubation time : 24hrs.) Fig. 5. Second incubation time of hPL-RIA
(first incubation time : 48hrs.)

incubation time は24時間が適当であつた。

以上の成績から、hPL-RIA の測定手技を Fig. 6 のようにした。

d 標準曲線の作成

標準曲線は Fig. 7 の如くで、hPL 濃度 $0.006\mu\text{g/ml}$ から $0.1\mu\text{g/ml}$ の間で急峻な勾配を示した。

e 実際の臨床症例の hPL 測定

正常妊娠での母体血中 hPL を測定した成績を Fig. 8 に示す。母体血中 hPL は、妊娠8週から測定可能で $0.01\sim 0.03\mu\text{g/ml}$ であるが、妊娠中期以後に急激な増加を示し、妊娠末期には $4\sim 10\mu\text{g/ml}$ となつた。

妊婦尿中 hPL は、 $0.2\sim 0.6\mu\text{g/ml}$ と低値であつた。

また臍帯血中 hPL は、 $0.15\sim 0.45\mu\text{g/ml}$ であつた。

Fig. 6. Assay system of hPL-RIA

^{131}I hPL ($0.04\mu\text{g/ml}$)	0.5ml
standard sample or serum sample	1.0ml
anti hPL serum (first antibody)	0.5ml
↓ first incubation 4°C , 48hrs.	
second antibody	0.2ml
normal guinea pig serum (1×50 , carrier)	0.2ml
↓ second incubation 4°C , 24hrs.	
↓ centrifugation 3000rpm., 20min.	
↓ sediment	
↓ add 1.0ml 0.5BSA, 0.9% NaCl, pH 8.6 veronal buffer	
↓ centrifugation 3000rpm., 20min.	
↓ sediment	
↓ counting	

Fig. 7. Standard curve of hPL-RIA

Fig. 8. Serum hPL in normal pregnancy (hPL-RIA)

異常妊娠での母体血中 hPL 値は, Table 2 に示す如くである. 切迫流産で, 流産に終った4例は, いずれも正常妊娠同時期の hPL 値より低値を示しているが, 妊娠を維持できた2例はいずれも正常範囲内にあつた.

子宮外妊娠の4例は, いずれも正常妊娠同時期の値以下を示した. 4例の子宮内胎児死亡例では, 血清 hPL は測定できなかった.

preeclampsia を含む妊娠中毒症7例の血清 hPL 値は, いずれも正常範囲内にあつた.

胞状奇胎例は, 全例きわめて低値であつた.

ii HPL Single Radial Immunodiffusion (HPL-SRI)

a 寒天内抗血清濃度の検討

寒天平板内抗血清濃度を検討した成績を, Fig. 9

Table 2. Serum hPL in abnormal pregnancy (hPL-RIA)

Case	Weeks of gestation		Serum hPL ($\mu\text{g/ml}$)
1	11	Threatened abortion	0.01
2	12	" "	0.01
3	14	" " (...labour)	0.08
4	16	" "	0.02
5	20	" " (...labour)	0.5
6	27	" "	0.36
7	8	ectopic pregnancy	0.01
8	9	" "	0.02
9	10	" "	0.01
10	12	" "	0.02
11	16	intrauterine fetal death	undetectable
12	18	" "	"
13	25	" "	"
14	26	" "	"
15	31	toxemia	3.6
16	37	"	5.2
17	37	"	5.7
18	39	"	4.9
19	39	"	5.6
20	40	"	4.8
21	40	toxemia (preeclampsia)	8.2
22	8	hydatidiform mole	0.01
23	12	" "	0.02
24	16	" "	0.01
25	18	" "	0.01
26	20	" "	0.02
27	24	" "	0.01

Fig. 9. A linear dose-response curve between the diameter of precipitation ring and the antigen concentration (hPL-SRI)

1 : anti hPL serum 1.0% 2 : anti hPL serum 1.5% 3 : anti hPL serum 2.0%

に示す。抗血清濃度が0.5%では、生じた沈降輪の面積は最大であつたが、沈降輪の判読はきわめて困難であつた。

1.0, 1.5と2.0%では、沈降輪の判読容易であり、沈降輪の面積は1.0%が最大で、regression coefficientは5.48であつた。

b 寒天平板の厚さの検討

厚さ1.2mmの寒天平板では沈降輪の直径は11mm、一方厚さ2.0mmでは9.6mmであつて、厚さ1.2mmの方が沈降輪の面積は大であつた。

c 抗原孔の検討

抗原孔の直径を、3, 4, 5mmとした時の沈降輪の面積は、5mmの場合に最大で、ついで4mm, 3mmの順であつたが、regression coefficientは、3mmの場合には4.23, 4mmの場合には5.48, 5mmの場合には4.88であり、抗原孔の直径は4mmが最適であつた。

d HPL-SRIによる血清HPLの測定

作成した標準回帰直線から、hPL-SRIの測定感度は5μg/mlであつた。hPL-SRIによる正常妊娠母体血中hPLは、Fig. 10に示す如くであり、妊娠18週から測定可能で5.0~8.6μg/mlで、以後妊娠末期まで漸増するパターンを示し、妊娠39週でpeakとなり10~34μg/mlであつたが、妊娠40週から妊娠42週にかけ減少傾向を示した。

これらの検体のうちの20例につき、hPL-SRIとhPL-RIAで同時測定を行なつた成績をTable 3に示す。hPL-RIAでは、血清hPLは妊娠8週から測定可能であつたが、hPL-SRIでは、妊娠18週から測定可能である。またhPL-SRIによる測定値は、hPL-RIAのそれに比し、かなり高値であつた。しかし両測定法による妊娠の経月的な測定値の増加傾向のパターンは、よく類似していた。

また臍帯血中hPLは、hPL-SRIでは測定できなかつた。

Table 4は、hPL-SRIによる異常妊娠例の測定成績である。切迫流産例のうち、2例は血清hPLの測定が不能であり、1例は当初は、血清hPL値は7.5μg/mlと正常範囲内にあつたが、follow up中に5μg/ml, undetectableと減少して流産に終つている。子宮内胎児死亡例は、全例血清hPLは測定できなかつた。

Fig. 10. Serum hPL in normal pregnancy (hPL-SRI)

Table 3. Comparison of serum hPL value simultaneously estimated by hPL-SRI and hPL-RIA.

Case	Weeks of gestation	hPL-SRI ($\mu\text{g/ml}$)	hPL-RIA ($\mu\text{g/ml}$)
1	8	undetectable	0.02
2	10	"	0.68
3	10	"	0.07
4	15	"	4.0
5	15	"	1.0
6	18	8.2	2.0
7	18	5.0	1.0
8	20	10.2	1.0
9	20	5.0	1.0
10	25	5.0	2.0
11	25	9.0	3.5
12	28	22.5	6.2
13	30	15.0	6.0
14	32	18.5	6.5
15	34	15.2	7.5
16	36	19.5	8.2
17	38	22.0	7.9
18	40	19.5	8.3
19	40	16.5	4.2
20	40	19.2	8.2

妊娠中毒症の1例(軽症型)は、 $5\mu\text{g/ml}$ で、正常妊娠同時期の下界よりも低値を示した。妊娠40週の無脳児妊娠では、血清 hPL は $13.5\mu\text{g/ml}$ と正常値であつた。経過的な follow up ができた抗体産生 Rh 陰性妊婦のケースでは、妊娠29週から36週まで血清 hPL 値は増加し、以後やや減少したが、いずれも正常範

Table 4. Serum hPL in abnormal pregnancy (hPL-SRI)

Case	Weeks of gestation		Serum hPL ($\mu\text{g/ml}$)
1	19	Threatened abortion	undetectable
2	20	" "	"
3*	19	" "	7.5
	19+1day		5
	19+2day		undetectable
4	21	intrauterine fetal death	"
5	32	" "	"
6	22	" "	"
7	40	toxemia	5
8	40	anencephalus	13.5
9*	29	Rh sensitization	17.5
	32		20
	34		21.5
	36		22.5
	38		15
	40		17
10*	21	placental insufficiency	5
	25		7.5
	27		5
	28		7
	32		14
	34		8
	36		7
	38		5.5
	39		5
	40		5

* Estimations of hPL in case 3, 9 and 10 were performed serially.

囲内での変動を示した。一方胎盤機能不全の症例の経過的な follow up では、妊娠中期の血清 hPL 値は、正常範囲内にあつたが、後期から末期にかけては正常範囲以下の低値を示した。

iii HPL Hemagglutination Inhibition Reaction (HPL-HAIR)

a HPL-HAIR の作成

① 血球沈降像に及ぼす血清成分の影響にかんする検討

正常ヒト血清 1～8 倍の稀釈では、血球沈降像は不均一であつたが、16 倍以上の稀釈では血球沈降像は均一となり、血球沈降に及ぼす血清の影響は認められなくなった。

② 抗 hPL 血清の稀釈倍数と正常ヒト血清の稀釈倍数の検討

非妊婦血清の各種稀釈と抗 hPL 血清の各種稀釈の組み合わせを用いた赤血球凝集反応の成績を Fig. 11 に示す。非妊婦血清を 15 倍以上に稀釈すると、血清成分の赤血球凝集反応に及ぼす影響は認められなくなり、また抗 hPL 血清を 500 倍以上に稀釈すると正常な凝集反応が認められた。

③ 感度の検討

最終的な抗 hPL 血清の稀釈率を赤血球凝集阻止反応で検討したところ、抗 hPL 血清の稀釈は 500 倍が最適であり、この時の反応系の感度は、 $0.1\mu\text{g/ml}$ (原血清中濃度として $2\mu\text{g/ml}$) である。

Fig. 11. Relationship between various dilutions of anti-hPL serum and various dilutions of normal human serum.

Aliquots of 0.1ml of various dilutions (1-30X) of nonpregnant serum and 0.1ml of various dilutions (100-1000X) of anti-hPL serum with 1% BSA solution were mixed with 0.3ml of the hPL-sensitized erythrocyte suspension fluid and the formation of the erythrocyte sedimentation ring produced by the hemagglutination reaction at the bottom of the ampoule was observed.

b プロゾーン現象の検討

50 μ g/ml (原血清中濃度として 1mg/ml) の高濃度の hPL が存在しても、赤血球凝集阻止反応に対する抑制は起らなかった。

c 血中蛋白体の影響の検討

hCG は 3000IU/ml (原血清中濃度として 60000IU/ml) の濃度に存在しても反応感度に影響は認められなかった。

リウマチ因子の存在する血清18例のうち、3例に偽陽性の反応を認めたが、他の15例の反応感度に変化はなく、陽性の反応を示したものはなかった。

d 本測定系の安定性にかんする検討

本系の安定性を検討した成績を Fig. 12, Fig. 13 に示す。本測定系を56°C, 24時間加熱しても感度の変化

Fig. 12. Effect of temperature on stability of reaction
reaction temperature 26°C, reaction time 2 hrs.

heat treatment	56°C, 24hrs.								70°C, 24hrs.							
	standard hPL (µg/ml)															
	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.05	0		
erythrocytes & serum	○	○	○	○	○	±	—	○	○	○	○	○	○	—		
erythrocytes only	○	○	○	○	○	±	—	○	○	○	○	○	±	—		
serum only	○	○	○	○	○	±	—	○	○	○	○	○	○	—		

Fig. 13. Effect of storage period of hPL-HAIR on the test result.

storage period	37°C										45°C									
	standard hPL ($\mu\text{g/ml}$)					nonpregnant serum					standard hPL ($\mu\text{g/ml}$)					nonpregnant serum				
	0.2	0.1	0.05	0	A	B	C	D	E	F	0.2	0.1	0.05	0	A	B	C	D	E	F
0	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-
2W	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-
1M	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-
2M	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	-	-	-	-	-	-	-
3M	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-	○	○	○	±	-	±	-	±	-	-
4M	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-										
5M	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-										
6M	○	○	±	-	-	-	-	-	-	-										

W; week M; month

reaction time; 2hrs.

reaction temperature; 26°C

Fig. 14. Graphic representation of measured values and standard deviations of hPL serum levels during normal pregnancy in 250 subjects.

は認められなかったが、抗血清あるいは抗血清と hPL 感作赤血球を70°Cで24時間加熱すると、本測定系の反応感度が0.05 $\mu\text{g/ml}$ に上昇した。また56°Cで最高72時間まで加熱したが、感度に変化は認められなかった。

さらに本測定系を、37℃で6ヶ月間保存しても反応感度に変化は認められなかったのに比べ、45℃で2ヶ月間保存すると反応感度が0.05 μ g/mlと上昇し、また3ヶ月間の保存では、非妊婦血清に対して偽陽性の反応が認められた。

e 妊婦血中 hPL の測定

正常妊娠250例の母体血清 hPL を測定した成績を Fig. 14 に示す。妊娠17週から一定した測定成績が得られ2 μ g/mlであり、妊娠末期に向つて増加し、妊娠40週では、 $6.5 \pm 1.1 \mu$ g/mlであつた。

また250例のうちの40例につき、hPL-HAIR と hPL-RIA で同時測定を行なつた成績を Table 5 に示す。hPL-HAIR による測定値は hPL-RIA のそれに比し、やや高値を示すものの近似した値となつている。

異常妊娠例についての成績を Table 6 に示す。妊娠中毒症では、いずれも正常範囲内の血清 hPL 値であつたが、子宮内胎児死亡の3例は全例測定不能であつた。切迫流産例は、妊娠27週で2 μ g/mlと低値で、その後流産に終つた。妊娠30週、抗体産生 Rh 陰性妊婦の血清 hPL は、8 μ g/mlと正常範囲よりやや高値であつた。糖尿病を合併した2症例は、いずれも正常範囲内高値を示した。

胞状奇胎例の血清 hPL 値はいずれも測定不能であつた。

III. 考 按

Human placental lactogen (hPL)の免疫学的性格についてはじめて報告したのは、Josimovich and MacLacen (1962)⁴⁾であつて、彼等は抗 hGH 血清を用いた実験で、hGH と retroplacental serum や胎盤抽

Table 5. Comparison of simultaneous determinations of serum hPL levels (μ g/ml) with hPL-HAIR and hPL-RIA.

Gestation		hPL concentration		Gestation		hPL concentration	
Months	Weeks	RIA	HAIR	Months	Weeks	RIA	HAIR
3	9	0.08	0	7	25	2.2	4
	10	0.09	0		26	4.0	6
	10	0.1	2		26	4.0	4
	11	0.8	0		27	3.5	6
	12	0.62	2		28	3.0	4
4	13	0.4	2	8	29	4.8	6
	13	0.09	0		30	4.5	4
	14	0.1	2		31	4.1	6
	15	0.1	2		32	4.2	8
	16	0.1	2		32	5.5	6
5	17	0.1	2	9	33	3.3	4
	17	0.7	2		34	5.8	8
	20	0.7	2		36	6.8	8
	20	1.0	2		36	7.0	6
	20	0.5	2		36	6.5	8
6	22	0.6	2	10	37	6.0	6
	23	0.8	2		38	4.5	6
	24	3.0	4		39	7.0	8
	24	2.0	4		40	5.4	8
	24	2.0	4		40	6.8	8

Table 6. Serum hPL levels in abnormal pregnancy and in pregnancy associated with other complications.

Case	Weeks of gestation	Complication	RIA	HAIR
1	40	toxemia (preeclampsia)	8.2	8
2	40	toxemia	4.8	4
3	39	toxemia	7.5	8
4	39	toxemia	5.6	6
5	39	toxemia	4.9	4
6	37	toxemia	5.7	6
7	37	toxemia	5.2	4
8	36	toxemia (preeclampsia)	7.2	8
9	32	toxemia	5.0	6
10	31	toxemia	3.6	4
11	28	intrauterine fetal death	0.2	0
12	20	intrauterine fetal death	0.96	0
13	17	intrauterine fetal death	0.3	0
14	27	threatened abortion	3.6	2
15	30	Rh sensitization	5.5	8
16*	39	diabetes mellitus	8.2	8
	40	diabetes mellitus	8.6	8
17	16	hydatidiform mole	0.01	undetectable
18	16	hydatidiform mole	0.01	undetectable
19	18	hydatidiform mole	0.02	undetectable

* Estimations of hPL in case 16 were performed serially.

出物が免疫学的に部分交叉性を示すことを明らかにした。その後 Sciarra, Kaplan and Grumbach (1963)⁵⁾, Friesen (1965)²¹⁾, Florini et al. (1966)²²⁾ などが同様の報告をしたが、hPL と hGH 以外の蛋白ホルモンとの免疫交叉性を検討したものは少なく、わずかに Josimovich et al. (1963)²²⁾ の hPL と sheep prolactin 並びに human chorionic gonadotropin (hCG) 及び Josimovich and Mintz (1968)²⁴⁾ の hPL と monkey placental lactogen (mPL) 並びに monkey growth hormone (mGH) の免疫交叉性の報告をみるのみである。

ところで、最近までの知見によれば、hPL は成長ホルモン様作用、lactogenic な作用、luteotrophic な作用を持つと報告されており、そこで著者は、hPL とそれらの作用を示すヒト下垂体ならびにヒト胎盤産生蛋白ホルモンとの免疫交叉性を検討した。

その結果、hPL は抗 hGH 血清に対し唯一本の沈降線のみを示し、hPL とは部分交叉であつたが、hPRL, hCG, hCT は抗 hPL 血清に対してなら沈降線を示さなかつた。

また第一編に示したように、hPL は免疫電気泳動で抗 hGH 血清に対し一本の沈降線のみを示し、対称の hGH よりやや陽極に泳動されている。つまり蛋白体としての hPL と hGH は、共通の免疫活性基を有するが、全く同一のものではないと考えられる。

そこで、このような hPL の antigenicity を利用して妊娠時のこのホルモンの動態を知るための測定法を工夫した。

ところで蛋白ホルモンの微量測定法としては、現在 radioimmunoassay 法が盛んに用いられている。

この方法はきわめて微量の物質に関する抗原抗体反応を利用したものであるので、標識及び標準用の純度

の高いホルモンと特異性の強い抗血清を得ること、ならびに測定の手技を十分に検討して信頼度を高めることが要求される。著者が用いた hPL-Kobe は、単一の蛋白体にまで精製されており、抗 hPL 血清は標準 hPL 25 $\mu\text{g/ml}$ に対して唯一本の沈降線を示す高い抗体価を持ったものである。

hPL の標識に際しては、既述した如く hPL が単純蛋白体で、しかも非常に不安定であるところから、用いる Na ^{131}I 、標識反応の pH や蛋白質変性剤であるクロラミン T の反応時間などが重要な問題となる。著者が用いた Na ^{131}I は還元剤を含み純度の高いものであり、標識の場はほぼ正確に pH 8.5 としている。

またクロラミン T の反応時間を30秒間とすると、 ^{131}I -hPL の比放射能は最も高くなつたが、 ^{131}I -hPL の peak は二峰性となり、hPL の破壊が起つていると考えられた。一方、反応時間を15秒間とすると、 ^{131}I -hPL の peak は鋭い一峰性を示し、比放射能は 100 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ であつたが、Sephadex G-150 で refiltration を行なつても鋭い一つの peak しか示さず、クロラミン T による hPL の破壊がきわめて少なく、特異性の高い ^{131}I -hPL が得られたと考えられる。

また抗 hPL 血清の稀釈率は、assay 系の感度を左右する最も重要な point であるが、抗体の稀釈率が低すぎても高すぎても、抗原との結合率が低く、抗 hPL 血清の稀釈は、8000~10000倍が最適であつた。

抗体と結合した ^{131}I -hPL (B) と遊離の ^{131}I -hPL (F) の分離には、二抗体法を用い第一反応時間は48時間、第二反応時間は24時間が最適であり、反応終了後の B と F の分離には、buffer による洗滌操作を加えて測定誤差を最少とした。

そこでこれらの特異性の高い抗原、抗体を用いた、hPL radioimmunoassay 系で hPL-Kobe を標準品として標準曲線を作成したところ、標準 hPL 0.006 $\mu\text{g/ml}$ から 0.1 $\mu\text{g/ml}$ の間で急峻な勾配を示し、この測定系はきわめて感度が高いことが明らかとなつた。

この hPL-radioimmunoassay (hPL-RIA) 系で、正常妊娠 200 例の妊婦血清 hPL を測定したところ、妊娠 8 週ではじめて測定可能となり、(0.01~0.03 $\mu\text{g/ml}$)、胎盤が完成するといわれている妊娠中期から急速に増加し、妊娠後期から末期に peak (4~10 $\mu\text{g/ml}$) となつた。しかし臍帯血中 hPL は 0.15~0.45 $\mu\text{g/ml}$ と低値であり、hPL が胎児側へは移行していないか、移行しているとしてもごく微量であると考えられた。

また流産に終つた症例、子宮外妊娠、子宮内胎児死亡及び胎状奇胎例などの胎盤機能の低下又は廃絶が凝われるものでは、血清 hPL 値はきわめて低値が測定不能であつた。

これらのことから、hPL-RIA による妊婦血清 hPL の測定は、妊娠経過の follow up の指標として、特に胎盤機能検査法の一手段として有用であると思われる。

ところで、radioimmunoassay による hPL 測定法は精度、感度、特異性が秀れ、一度に大量のサンプルを測定できるが、特殊な装置、設備を要すること、標識用 Isotope の入手時期、標識ホルモンの保存などの点で、どこでも、いつでも測定するというには困難がある。

そこで、サンプルを採取後速やかに測定し、その結果をみながら、経時的或いは経日的に臨床経過を追跡するために、hPL 簡易測定法を工夫した。

一元平板免疫抗散法 (SRI) は、抗体を含む寒天の薄層に小孔をあけ、ここに抗原を入れて放射状に拡散させ、十分時間をかけて抗原を全て結合させると、生じた沈降輪の面積は抗原量に比例し、抗体濃度に逆比例することから、Mancini et al.¹⁹⁾ によつて報告されており、この SRI を hPL の測定に応用した。

しかし沈降輪の判読には、寒天平板の厚さ、寒天内抗血清濃度、抗原孔の大きさ、注入抗原量が影響を与えられ、まずそれらの条件を検討した。

寒天内抗血清濃度であるが、抗血清の稀釈をうすくすると、測定感度はよくなるが、沈降輪の判読が困難となるので、その濃度を 1.0 % とした。一方その他の条件については、沈降輪の濃淡よりむしろ抗原孔からの広がり具合を主な指標として検討し、寒天平板の厚さ 1.2 mm、抗原孔の直径 4 mm、注入量 10 μl と決定した。この hPL-SRI を用いれば、検体を採取後72時間で血清 hPL 値を知ることができ、感度は標準 hPL-Kobe 5 $\mu\text{g/ml}$ であつた。

正常妊娠母体血清 hPL は、妊娠18週から測定可能で5~8 μ g/mlであつたが、以後漸増し、妊娠末期には10~33 μ g/mlとなり、妊娠40週にはやや減少した。hPL-RIA と hPL-SRI で同時測定した成績を比較すると、hPL-SRI による測定値は、hPL-RIA のそれに比し2~3倍高値となつたが、妊娠初期から末期にかけて増加する正常値域のパターンは hPL-RIA のそれと類似していた。これらのことから、hPL-SRI は、検体を入手後すぐ血清 hPL を測定でき、臨床症状に対処できる利点があるが、感度、特異性の点で hPL-RIA に劣り、one point の測定値よりむしろ連続測定によるパターンを分析した方がよいと考えられた。

そこで hPL-SRI の長所を改善した方法として、赤血球凝集阻止反応による hPL 測定法を考案した。

hPL-HAIR は、羊赤血球の沈降状態から hPL を測定する方法であり、検体として用いる血清成分が測定に大きな影響を及ぼすため検体の稀釈及び抗血清の稀釈に重要なポイントがある。著者の検討では、ヒト血清を20倍以上稀釈すれば、血清による赤血球の沈降率に多少の変化はあるものの、hPL-anti hPL serum の反応をますます特異的にすることができた。

抗 hPL 血清は、抗体価の範囲内で稀釈する程、微量の hPL が測定できる反面、あまり鋭敏にすると、赤血球凝集阻止反応の end point が不明瞭になったり、再現性が悪くなつたりするため、稀釈倍数を500倍即ち感度を0.1 μ g/mlとした。

この hPL-HAIR 系では、多量の hPL が存在してもプロゾーン現象は認められず、また hCG は60000IU/ml 存在しても赤血球沈降像に影響は認められず、わずかに RA test 陽性の血清のみが偽陽性の反応を示した。

リウマチ因子は、Losspalluto²⁵⁾や Milgrom²⁶⁾が報告した如く、家兎 γ グロブリンと反応する特質を持つため、抗 hPL 血清(家兎 γ グロブリン)と反応したものと考えられるが、陽性の反応を示す程の影響は認められなかつた。また hPL-HAIR は、抗 hPL 血清を凍結乾燥して保存するため、保存条件により感度が変化する可能性もあつたが、37 $^{\circ}$ C、6ヶ月間保存しても安定であつた。これらのことから hPL-HAIR は血清を採取後わずか2時間で hPL を測定でき、感度、特異性に秀れ、きわめて安定な測定系であることが判明した。そこで hPL-HAIR を用いて正常妊娠母体血中 hPL を測定したところ、妊娠17週より一定した測定値が得られ、この時期では hPL 値は2 μ g/mlであつたが、以後急増し、妊娠末期に peak となり、4~8 μ g/ml となつた。hPL-HAIR と hPL-RIA で同時測定した成績では、hPL-HAIR による測定値が、hPL-RIA のそれよりやや高値であり、特に hPL 濃度が低い場合には、この傾向が強かつたが、正常妊娠測定値域のパターンはきわめてよく一致した。つまり血清 hPL 濃度が2 μ g/ml 以上の場合には、特に妊娠後半期では、hPL-HAIR の測定値はきわめて信頼度が高いことが判明した。

結 語

1. Ouchterlony 法及び免疫電気泳動法により、hPL-Kobe の免疫学的性格を検討した。

hPL は、hPRL、hCG、hCT とは、免疫交叉性を示さなかつたが、hGH とは部分交叉性を示し、免疫電気泳動上 hGH よりやや陽極に泳動され、hPL と hGH は共通抗原基を有するものの全く同一の物質ではないことが明らかとなつた。

2. radioimmunoassay 法、single radial immunodiffusion 法及び hemagglutination inhibition 反応などの原理により、hPL 測定法を考案した。hPL-RIA は感度、精度、特異性の点で最も秀れた方法で、感度は0.007 μ g/mlであつたが、Isotope の入手の時期により検体採取後測定までに長時間を要することがあり、症例の follow up には retrospective になる危険性がある。hPL-SRI は、感度は5 μ g/mlで、かつ特異性の点でも hPL-RIA にかなり劣るが、誰でも、いつでも作製、測定できる利点があり、測定値のパターンの分析を行なえば、妊娠経過を十分に追跡できる方法である。hPL-HAIR は、感度が2 μ g/ml 以上であるが、きわめて安定な測定系であり、反応時間も2時間と短かく、妊娠後半期の follow up では、hPL-RIA ときわめて近似した値を示した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師東條伸平教授に衷心より感謝するとともに、

直接御指導，御鞭撻をいただいた望月真人講師及び曹洙鎔博士，平井至医学士をはじめとする教室の蛋白グループの諸兄姉に感謝します。また hGH 及び hPRL を提供していただいた NIH, NIAMD, Dr. R.W. Bates ならびに NPA の Dr. A.E. Wilhelmi に感謝します。また抗血清の作製にあたって，ご助力いただいた清水製薬甲賀博士，及び持田製薬小宮博士，小川博士に感謝します。

本論文の一部は第43回日本内分泌学会で報告した。

参 考 文 献

- 1) 森川 肇：日内泌誌，49：882 (1973).
- 2) 森川 肇：日内泌誌，49：1059 (1973).
- 3) Ito, Y. & Higashi, K. : Endocri. Japon., 8 : 279 1961.
- 4) Josimovich, J.B. and MacLaren, J.A. : Endocrinology, 71 : 209 (1962).
- 5) Sciarra, J.J., Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M. : Nature, Lond., 199 : 1005 (1963).
- 6) 東條伸平，望月真人：最新医学，26：1148 (1971).
- 7) 村田孝美：日内泌誌，48：6 (1972).
- 8) 田中敏子：日内泌誌，48：698 (1972).
- 9) Ouchterlony, O. : Acta Path. Microbiol. Scand., 32 : 231 (1953).
- 10) Ashitaka, Y. : Acta Obst. et Gynaec. Jap., 17 : 124 (1970).
- 11) Ashitaka, Y., Mochizuki, M. and Tojo, S. : Endocrinology, 90 : 609 (1972).
- 12) 東條伸平，金沢精一，北垣壮之助，望月真人：日内泌誌，48：364 (1972).
- 13) 望月真人，森川 肇，水沢富一，村田孝美，椋田 亨，東條伸平：臨床免疫，2：335 (1970).
- 14) 東條伸平，望月真人，森川 肇，水沢富一，村田孝美，椋田 亨，岡部桂一郎，曹洙鎔：ホと臨，19：283 (1971).
- 15) Morikawa, H., Mochizuki, M. and Tojo, S. : Endocr. Japon., 18 : 417 (1971).
- 16) 東條伸平，望月真人，森川 肇，平井 至，小川信久，新海弘之，小雀浩司：産婦の世界，25：173 (1973).
- 17) Greenwood, F.C., Hunter, W.B. and Glover, W.B. and Glover, J.S. : Biochem. J., 89 : 114 (1963).
- 18) Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. : Biochem. J., 91 : 43 (1964).
- 19) Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F. : Immunochem., 2 : 235 (1965).
- 20) Wide, L. and Gemzell, C.A. : Acta Endocrinol., 35 : 261 (1960).
- 21) Friesen, H. : Endocrinology, 76 : 369 (1965).
- 22) Florini, J.R., Tonelli, G., Breuer, C.B., Coppola, J., Ringler, I. and Bell, P.H. : Endocrinology, 79 : 692 (1966).
- 23) Josimovich, J.B., Atwood, B.L. and Goss, D.A. : Endocrinology, 73 : 410 (1963).
- 24) Josimovich, J.B. and Mintz, D.H. : Ann. N.Y. Acad. Sci., 148 : 488 (1968).
- 25) Losspalluto, J. : J. Exp. Med., 110 : 169 (1959).
- 26) Milgrom, F., Witebsky, E., Goldstein, R. and Loza, U. : J. Am. Med. Ass., 181 : 476 (1962).