Radioimmunoassay for Estrone, Estradiol-17 β and Estriol in Urine and Amniotic Fluid

Takuo MAKINO and Akira KAMBEGAWA

Pharmacological Research Department, Teikoku Hormone Mfg., Co. Ltd.,
Shimosakunobe, Kawasaki, Japan

Tomoko KOKUBU

Clinical Laboratories, Teikoku Hormone Mfg., Co. Ltd.

Radioimmunoassay for estrone(E₁), estradiol-17 β (E₂) and estriol(E₃) in human urine and amniotic fluid is described. A sample volume of 0.002—4.0 ml was used for the assay. As indicators, each tritiated estrogen of glucuronides, dominant conjugates in urine and amniotic fluid, was added to the samples to correct for procedural losses. Conjugated estrogens of glucuronide(G) and sulfate(S) type were hydrolyzed with 15 vol% HCl at 100°C for 60 minutes, and resulting free estrogens were extracted with ether. The dried extracts were applied to microcolumns of Sephadex LH-20, then E₁, E₂ and E₃ were separated by eluting with benzene-methanol (85:15) mixture. A 1/2 aliquot of the eluate was used for measuring recovery of the added tracer, and the remainder after being added with tritiated free estrogen was dried and incubated with the antiserum in a dilution of the borate buffer (pH 8.0) containing 0.06% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% bovine gamma globulin. The free and bound steroids were separated by 50% (NH₄)₂SO₄, and tritium activities in the supernatant were counted. The antisera used for the assay were anti-E₁-17-BSA for E₁, anti-E₂-6-BSA for E₂ and anti-E₃-6-BSA for E₃, which had been prepared by us. In urine, all recoveries were 65.0 $\pm$ 5.6 (mean $\pm$ S.D.)% for E₁-3-S, 68.8 $\pm$ 7.2% for E₁-3-G, 64.5 $\pm$ 5.8% for E₂-17 β -G and 41.1 $\pm$ 9.1% for E₃-16-G. In amniotic fluid, the recoveries were almost equal to those of the urine. Water blank in each estrogen assay was about 4 pg/sample. Accuracy and precision of the method were satisfactory. The results determined by this radioimmunoassay were in good correlation with those determined by Brown's colorimetry at high estrogen concentration in urine. As this method is accurate and highly sensitive, we can determine estrogen values of low level or with small assay volume in both urine and amniotic fluid.

(See pp. 788~796)

Radioimmunoassay による尿および羊水中 estrogen の三分画測定法

帝国臓器製薬 薬理研究部

牧 野 拓 雄, 神 戸 川 明

同 臨床検査所

国 分 知 子

(昭和49年1月11日受付)

Radioimmunoassay (RIA) による尿および羊水中 estrogen の三分画測定法を確立した。すなわち、被検物に回収率補正用の各 estrogen- ^3H glucuronide を添加してのち estrogen conjugates を酸水解し Sephadex LH-20 カラムクロマトにて estrone, estradiol-17 β , estriol に分画し、それぞれの抗 estrogen 血清を用いて RIA を行なつた。本法は従来の測定法に比較して迅速、簡便、正確であり、きわめて感度が高いことから、これまで測定困難であつた少量の被検量や幼児、男子等 estrogen 含量の少ない尿においても測定が可能である。

I 緒 言

一般に尿中 estrogen の測定は Kober 反応による比色法¹⁾²⁾、螢光法³⁾、ガスクロマトグラフィー法⁴⁾などにより行なわれているが、いずれも感度が低いため大量の被検尿を必要とし、尿中夾雑物の除去のために複雑な操作を行なわなければならない。羊水中 estrogen の測定も同様な問題点を有している。

近年、急速に進展した steroid の radioimmunoassay (RIA)⁵⁾⁶⁾により血中 estrogen (unconjugated) の定量もルーチン測定が可能となりつつあるが、尿および羊水中 estrogen 定量についての報告は少なく、その測定法はいまだ確立していない。

われわれは estrogen に対する抗血清を作製し、RIA により血中 estrogen の測定法についてすでに報告したが⁷⁾、今回は RIA による尿および羊水中 estrogen の測定法について基礎的検討を行ない、感度、精度、再現性ともに良好な free および conjugate 型 estrone (E_1), estradiol-17 β (E_2), estriol (E_3) の三分画測定法を確立したので報告する。

II 実 験 材 料

1) radioactive steroids

estrone-6, 7- ^3H (E_1 - ^3H) 40Ci/mM, estriol-6, 7- ^3H (E_3 - ^3H) 42.2Ci/mM, estrone-6, 7- ^3H -3 β -D-glucuronide (E_1 - ^3H -3G) 55Ci/mM, estrone-6, 7- ^3H -sulfate-ammonium salt (E_1 - ^3H -3S) 54.3Ci/mM, estradiol-6, 7- ^3H -17 β -D-glucuronide (E_2 - ^3H -17G) はいずれも New England Nuclear 社製, estradiol-6, 7- ^3H (E_2 - ^3H) 40Ci/mM は The Radiochemical Centre 社製で、すべて Sephadex LH-20 カラムクロマトにより精製後使用する。すなわち、free estrogen- ^3H においては benzene : methanol (85 : 15) により各ステロイドの溶出部位を採取し、conjugate estrogen- ^3H においては methanol 0.1ml にて2回カラムに添加後 benzene : methanol (85 : 15) 8ml にて prewash を行ない、ついで benzene : methanol (50 : 50) 5ml の溶出部

位を採取する。

2) E₃-16-G : 帝国臓器製薬

3) 抗血清 : 用いた抗 estrogen 血清の特性および本抗血清を用いて作製した標準曲線については既報⁷⁾の通りである。なお, Abraham⁸⁾の方法および scatchard plot⁹⁾により求めた association constant (K) は抗 E₁血清 1.83×10^{10} /mole, 抗 E₂血清 5.03×10^9 /mole, 抗 E₃血清 5.78×10^9 /mole であった。

4) 試薬類, クロマトカラム, 抗血清稀釈液, ジオキサンシンチレーターなどの調製法も既報⁷⁾にしたがう。

III 測定方法

1) 測定試料

測定に用いる尿量あるいは羊水量は, その中に含まれているステロイド量が assay 時に 20~500pg の範囲内になるように設定し, 被検量が 0.1ml 以下で測定を行なう場合は水で稀釈して 0.1ml とする。なお Table 1 は測定に用いるおよその被検量である。

Table 1. Approximate urine and amniotic fluid volume (ml) used for the assay of free and conjugate estrogens

	free	conjugate
(URINE)		
child	0.5~2.0	0.2~1.0
male	0.2~0.5	0.05~0.1
female		
follicular	0.1~0.2	0.05~0.1
ovulatory	0.1~0.2	0.01~0.05
luteal	0.1~0.2	0.01~0.05
pregnant 6~10W	0.05~0.1	0.001~0.005
(AMNIOTIC FLUID)		
pregnant 20~35W	0.05~0.1	0.02~0.05
36~40W	0.005~0.01	0.001~0.005

2) 酸加水分解および分離精製

測定試料に E₁, E₂, E₃ の各 glucuronide 型 ³H 標識物の各 1000dpm を含む水溶液を添加し, さらに稀塩酸 (濃塩酸26mlを水で100mlとしたもの) を水層と等量加えて 100℃, 60分間加熱する。のち水冷してこれに10倍量のエーテルを加えて thermo-mixer にて振盪後, 下層を吸い上げて捨て, ついでエーテル層を水洗後, 上清を他の試験管に移してわずかに加温しつつ窒素ガススプレーにより乾固する。これを Sephadex LH-20 のミクロカラムに benzene : methanol (85 : 15) 0.1ml で 2 回添加し, さらに同じ溶媒を流して estrogen の各溶出 fraction を採取する。通常, 内径 7 mm のカラムに LH-20 を 2 ml 充てんした場合には E₁ は 1.8~2.4ml, E₂ は 3.0~4.2ml, E₃ は 5.4~7.4ml に溶出し, 再現性はきわめて良好である。この溶出液の 1/2 量は回収率を補正するためにシンチレーターを加えて液体シンチレーションカウンターにて放射エネルギーを測定し, 残りについて RIA を行なう。

3) RIA

残りの 1/2 量の E₁, E₂, E₃ 各 fraction にその ³H 標識 estrogen 10,000dpm を加えて乾固し, E₁, E₂, E₃ の稀釈抗血清 0.25ml をそれぞれに加えて室温で 10 分間放置し, 50% (NH₄)₂SO₄ 0.25ml を加えて 10 分後に

遠沈して上清0.2ml を counting vial に入れ, dioxane scintillator 12ml を加えて放射能を測定する。

なお, 検体と同時に各 estrogen の 0, 20, 50, 100, 200, 500pg およびその estrogen-³H 10,000dpm を用いて同様に RIA を行ない E₁, E₂, E₃ の標準曲線を作製する。そして, この標準曲線を用いて検体の放射能測定値からその含有 estrogen 量を求める。

4) 測定試料中 estrogen 濃度 (S) の算出

$$S(\text{ng/ml}) = (M - a) \times \frac{100}{\text{回収率}(\%) } \times \frac{2}{\text{被検尿量}} \times \frac{1}{10^3}$$

M: 標準曲線から求めた estrogen 量

a: water blank

回収率: 測定試料中に加えた放射能量を R₀, クロマト 溶出液の 1/2 量の放射能量を R とすると

$$\frac{2R}{R_0} \times 100 \text{ により求まる。}$$

5) Free 型と Conjugate 型の分画測定

尿および羊水中の free 型と conjugate 型 estrogen を分画して測定する場合には, まず測定試料に free 型 estrogen-³H 各 1000dpm を加えてエーテル抽出し, これを free fraction とする。残りの水層には estrogen-³H glucuronide 各 1000dpm を加えて加水分解後, エーテル抽出し conjugate fraction とする。両方の fraction は以後, 同様の操作を行なつて estrogen 量を測定する。

IV 実験成績

1 加水分解

結合型 estrogen の加水分解についてはすでにわれわれも詳細な検討を行なっているが²⁾, 本実験においては immunoassay level での被検量における酸水解の影響について検討した。すなわち, 5 倍稀釈の男子尿 0.1ml に E₁-³H-3S, E₁-³H-3G, E₂-³H-17G, E₃-16G の 30~500pg を加えて 15vol % HCl, 100°C において水解後, 既述の方法により抽出, クロマトを行なつて各 estrogen fraction をとり, ³H 標識物については放射能量を測定, E₃-16G については RIA により E₃ 量を測定して estrogen conjugates の酸水解される割合を検討した。

この結果は Fig. 1 に示すごとくで, E₁-3S はほぼ10分位で maximum に達するのに反し, 一般に glucuronides は60分程度の水解時間が必要であつた。しかし, それ以上の加熱ではむしろ回収される estrogen は低値となることから水解時間は60分が適当と思われる。

2 尿不純物の除去

本実験に用いた E₂ および E₃ 抗血清の高い特異性を利用し, クロマトを省略して E₂ および E₃ を測定する方法が妊婦血漿において可能であるが¹⁰⁾, 尿および羊水中 E₃ について検討した結果ではクロマトによる分離精製を省略するとクロマトをした場合よりもはるかに高値を示す (Table 2)。

これは尿および羊水中不純物の影響であり, LH-20 カラムクロマトにおいては, これら不純物は void volume のすぐあとに溶出し, 除去が可能であつた。尿においては被検量が 2 ml を越えると尿中不純物の一部は E₁ fraction に混入し測定値に影響を及ぼすが, 幼児においても被検尿量は 1 ml 以下で十分測定可能であることから, ほとんどすべての検体において, このクロマトにより尿中ブランクの除去は可能であろう。

3 回収率

Estrogen conjugates の本測定における回収率を酸水解時, 酸水解後, 全行程について検討した。すなわち E₁-³H-3S, E₁-³H-3G, E₂-³H-17G および E₃-16G を男子尿0.1ml および妊娠 3 カ月の羊水 0.005ml に加えて全行程の回収率を求め, さらに, 酸水解後にそれぞれの free estrogen-³H を加えて水解後の回収率を求め, 両者の差から水解時における回収率を求めた。

Fig. 1. Effect of HCl hydrolysis time to estrogen conjugate added to urine
(Hydrolysis : HCl 15 vol% at 100°C)

Table 2. Comparison of urine and amniotic fluid estriol values (ng/ml)
between with and without chromatography

	case	chromatography		ratio
		without	with	
URINE	1	2.96	0.81	3.65
	2	10.9	3.27	3.33
	3	18.1	7.74	2.34
	4	20.9	13.4	1.57
	5	22.3	9.51	2.34
	6	36.8	15.2	2.45
	7	106.5	62.7	1.70
	8	224.3	96.1	2.33
AMNIOTIC FLUID	1	110.5	89.5	1.23
	2	267.4	106.9	2.50
	3	385.0	243.8	1.58

この結果は Table 3 に示すごとくで尿および羊水ともに酸水解後には E₁, E₂では約 70~80%, E₃では約 50%の回収率であり, 全行程における回収率は E₁, E₂では 60~70%, E₃では約 40%であつた. したがつて酸水解時における loss はいずれも 20%前後である.

4 精度および再現性

男子尿 0.02ml および妊娠 3 カ月の羊水 0.005ml 中に estrogen conjugates の一定量を加えて全測定操作を行ない回収率を補正して検討した本測定法の accuracy は Table 4 に示すごとくほぼ満足すべきもので

Table 3. Percent recovery of labelled and non-labelled estrogen conjugates added to urine and amniotic fluid (mean $\pm$ S.D.)

added conjugate	E ₁ -3-S (³ H)	E ₁ -3-G (³ H)	E ₂ -17 β -G (³ H)	E ₃ -16-G
(URINE)				
during hydrolysis	78.7 $\pm$ 6.8	83.3 $\pm$ 8.8	79.4 $\pm$ 7.2	80.4 $\pm$ 9.1
after hydrolysis	82.6 $\pm$ 5.6	82.6 $\pm$ 5.6	81.2 $\pm$ 8.5	49.8 $\pm$ 7.3
over all recovery	65.0 $\pm$ 5.6	68.8 $\pm$ 7.2	64.5 $\pm$ 5.8	41.1 $\pm$ 9.1
(AMNIOTIC FLUID)				
during hydrolysis	77.7 $\pm$ 9.8	81.0 $\pm$ 8.5	87.5 $\pm$ 7.5	80.4 $\pm$ 8.9
after hydrolysis	78.9 $\pm$ 5.4	78.9 $\pm$ 5.4	70.3 $\pm$ 5.5	49.1 $\pm$ 6.3
over all recovery	61.3 $\pm$ 6.0	63.9 $\pm$ 6.5	61.5 $\pm$ 7.2	39.5 $\pm$ 7.7

Table 4. Recovery of estrogen conjugate added to 0.02ml of male urine and 0.005ml of amniotic fluid

added conjugate	added pg as free	steroid quantified as free				regression equation
		mean (pg)	standard deviation	standard error	coefficient of variation (%)	
(URINE)						
E ₁ -3-S	0	40.1	3.97	2.29	9.90	Y=1.05X+34.1
	50	83.8	5.65	3.26	6.73	
	200	231	17.7	10.2	7.63	
	500	550	88.1	50.9	16.1	
E ₂ -17 β -G	0	16.7	3.50	2.02	20.9	Y=0.88X+16.6
	50	49.0	8.55	4.94	17.4	
	200	208	9.46	5.46	4.52	
	500	450	34.1	19.7	7.58	
E ₃ -16-G	0	130	23.7	13.7	18.2	Y=0.95X+134
	25	158	28.6	16.5	18.1	
	50	173	24.6	14.2	14.2	
	100	238	27.1	15.6	11.3	
	200	330	27.7	16.0	8.39	
	500	606	39.4	22.7	6.49	
(AMNIOTIC FLUID)						
E ₁ -3-S	0	19.0	5.60	2.32	29.5	Y=0.87X+20.4
	50	60.2	2.86	1.64	4.75	
	200	196	18.9	10.9	9.65	
	500	457	43.2	24.9	9.44	
E ₃ -16-G	0	21.8	2.62	1.52	10.4	Y=0.91X+28.6
	200	219	13.5	7.77	6.17	
	500	482	71.0	41.0	14.7	

No. of determinations : 3~4

X=steroid added, Y=steroid quantified.

あつた。また、尿中 E_3 を duplicate で測定して求めた precision は within (intra-) assay variance が 14.2% (range 53.8~387ng/ml, N=22), between (inter-) assay variance が 17.8% (range 3.4~261ng/ml, N=10) であり、男子尿中 E_3 を 5 回反復測定して求めた reproducibility は 6.69 ± 0.932 ng/ml (mean $\pm$ S.D.), C.V. (coefficient of variance) 13.9% であつた。

5 Water blank

水を用いて全測定操作を行なつて求めた water blank 値は free と conjugate との間に差はなく、 E_1 4.40 ± 2.87 pg, E_2 4.13 ± 3.18 pg, E_3 4.10 ± 4.07 pg (いずれも N=20) であつた。

6 Brown-神戸川変法と本法との比較

従来、われわれが尿中 estrogen のルーチン検査に用いている Brown-神戸川変法と本法との相関関係は同一尿について E_1 , E_2 , E_3 値を両者の測定法で比較したところ Fig. 2 に示すごとく有意の相関が認められ

Fig. 2. Comparison of urinary estrogen values between colorimetry by Brown-Kambegawa's and radioimmunoassay by our method

た ($P < 0.01$). しかし、およそ 5ng/ml 以下の低 estrogen 濃度においては両者の測定値間に差が認められた。

7 測定値

本法による正常有経婦人および妊娠初期婦人における尿中 free および conjugate estrogen 値を Table 5

Table 5. Urinary free(F) and conjugate(C) estrogen levels of normal and early pregnant females determined by radioimmunoassay

		estrone	estradiol	estriol
Follicular (4)	F	0.09 ± 0.06	0.22 ± 0.08	0.29 ± 0.33
	C	0.65 ± 1.05	1.94 ± 0.67	3.00 ± 1.85
Ovulatory (4)	F	0.13 ± 0.18	0.12 ± 0.17	0.38 ± 0.18
	C	7.70 ± 4.61	4.83 ± 1.02	10.6 ± 4.63
Luteal (5)	F	0.43 ± 0.44	0.08 ± 0.09	0.26 ± 0.17
	C	4.54 ± 0.85	3.67 ± 0.87	5.27 ± 0.97
Pregnancy 7~9 week (4)	F	4.47 ± 5.07	5.09 ± 2.87	3.75 ± 2.73
	C	51.8 ± 37.7	22.4 ± 2.82	89.5 ± 49.5

values : ng/ml (mean $\pm$ S.D.)

parentheses : No. of determinations

Table 6. Urinary estrogen values (ng/ml) determined by radioimmunoassay

name (age)	case	estrone	estradiol	estriol
T.H. (75)	postmenopausal	0.41	0.47	1.28
T.S. (50)	"	0.45	0.51	0.56
T.M. (36)	male	1.76	1.63	6.65
S.S. (26)	"	0.20	0.09	3.36
M.K. (4)	"	0.11	0.66	0.37
H.A. (4)	prematurity	0.13	1.07	0.81
M.T. (5)	"	0.80	1.37	1.22
K.M. (4)	"	0.52	0.62	3.19
S.H. (0)	4 days after birth			46.0
K.M. (0)	5 days after birth			43.4
H.T. (0)	"			26.6
A.E. (0)	"			65.6

に, また, 従来測定困難であつた男子, 更年期婦人, 小児 (性早熟症), 新生児の尿中 estrogen 値を Table 6 に示す.

一方, 妊娠10カ月の羊水中 estrogen 値 ($N=8$) は E_1 25.1 ± 11.3 , E_2 17.3 ± 7.40 , E_3 232 ± 84.0 (ng/ml, mean $\pm$ S.D.) であつた. なお, free estrogen の割合は E_3 においては $3.27 \pm 1.48\%$ であり, ほとんどが conjugates として存在していた.

V 考 察

尿中に排泄される estrogen の存在様式については Neeman ら¹¹⁾¹²⁾ が妊婦尿から E_3 -16-G を同定してのち, とくに Diczfalussy 一派¹³⁾¹⁴⁾ により E_3 -3-G, E_3 -3-S 等の尿中 E_3 代謝物が同定されている. その後, さらに conjugated estrogen として E_1 -3-G, 16α -OH- E_1 -3-S- 16α -G, 16α -OH- E_1 -3-G, 16α -OH- E_1 - 16α -G, E_2 - 17β -G, epi- E_3 - 16β -G, E_3 -3-S- 16α -G 等の存在が認められ¹⁵⁾, 妊娠末期において尿中 estrogen の大部分をしめる E_3 conjugates の排泄は E_3 -16-G 68.0%, E_3 -3-G 22.9%, E_3 -3-S- 16α -G 6.5%, E_3 -3-S 2.5% であると報告されている¹⁶⁾.

しかし, 非妊婦人や男子においては estrogen の排泄量がわずかであるということもあつてその尿中代謝物および抱合型についてはほとんど検討されていない.

われわれの作製した抗 estrogen 血清は free 型 estrogen と反応し, conjugate 型とは一部を除いてほとんど affinity をもたない. したがつて本抗血清を用いて尿中 estrogen を測定するためには estrogen conjugates の加水分解を行なう必要がある.

尿中 estrogen の測定をルーチンに行なうには尿中に多種にわたつて存在する各種 estrogen を測定することは困難であるため, 加水分解後代表的 estrogen である E_1 , E_2 , E_3 の測定を行なつた. 加水分解には各種の方法があるが, 簡便で迅速であること, glucuronide と sulfate がともに水解出来ることなどから酸水解法を採用した. しかし, 一般に estrogen は酸加熱により酸化的に分解されることが知られており, われわれも borate buffer および精製水へ E_3 -16-G および E_3 を添加して既述の条件で酸水解を行なうと free E_3 としての回収は E_3 -16-G では添加量の 30~40%, E_3 では 10% 以下であつた. このことは buffer 中および精製水中では E_3 が酸加熱により分解するものと思われる. 一方, 尿中へ E_3 -16-G および free E_3 を添加して酸加熱を行なつても, E_3 の分解は60分以内ではほとんどみられなかつた. このことは尿中不純物が酸加熱による E_3 の分解を防禦しているのであろう.

測定時の回収率補正は尿中に存在する E_1 , E_2 , E_3 の各種抱合型のすべてについて行なうことは實際上,

困難であり、しかも入手可能である high specific な conjugate 型 estrogen- ^3H の種類にも限りがある。加えるに、妊娠時を除いては尿中 estrogen 抱合型の種類およびその割合がまだ明らかでないことを考えると、尿中には glucuronide 型が大半をしめると思われるので、入手可能な estrogen- ^3H -glucuronide を代表させて回収率補正を行なうこともやむを得ないものとする。さらに測定手技が一定したのちは酸水分解後に free estrogen- ^3H を加えて水解後の操作における回収率を求め、それに水解時における estrogen conjugates の平均回収率を 82.0% として、0.82 倍した値を全測定操作における回収率とすることも可能である。

本測定法においては被検尿量がきわめてわずかであるために、一日全尿を蓄尿して一日排泄量を求める場合には被検尿の採取量誤差に留意する必要がある。この点から、尿中 estrogen 濃度の高い妊婦尿においては比較的精度よく測定出来る比色法²⁾¹⁷⁾によるのが賢明であろう。

Estrogen conjugates の RIA には、それと親和性をもつ抗血清を用いて測定すれば加水分解は不要である。Gurpide ら¹⁸⁾は E_3 -16, 17-dihemisuccinyl-BSA による抗血清を用いて妊婦尿を直接反応させることにより尿中 estrogen の測定を行なっている。しかし、 E_3 -16G, E_1 , E_2 , E_2 -17G, 16-keto- E_2 などはこの抗血清に対し E_3 と同程度の affinity を有するが、sulfate 型や 3-glucuronide 型の estrogen は affinity を持たないため測定値は尿中 total estrogen 値を示すことにはならず、この抗血清に対する 'immunoreactive' estrogen 値を示すことになる。妊娠時には E_3 -16G が尿中 estrogen の大半を占めるので、この方法は簡易測定法として価値があるが、これによる criteria を確立するためには測定はすべて同一抗血清による必要があろう。Castanier ら¹⁹⁾は尿を水解後、直接 E_2 -17 β -succinyl-BSA 抗血清を反応させているが、この抗血清も各種 estrogens に対して affinity を有するため、測定値は ' E_2 equivalent' あるいは 'estrogens as E_2 ' として示される。

われわれは、水解後クロマトにより E_1 , E_2 , E_3 を分離して RIA を行なつたが、この方法は直接抗血清と反応させる方法に比較して煩雑であるのは否めない、しかし、 E_1 , E_2 , E_3 そのものを測定しているという価値はあるものと思われる。

free steroid に対する抗血清作製の報告は数多くあるが、conjugate steroid に対するその報告はほとんどなく、わずかに testosterone glucuronide 抗血清による尿中 testosterone の測定²⁰⁾と estrogen を含む各種 steroid glucuronide BSA に対する抗血清の作製²¹⁾が散見されるにすぎない。

しかし、estrogen においてはその抱合型の種類も多く、しかもこれら抱合型の分離操作は煩雑であるため²²⁾、きわめて特異性の高い抗血清を除いて、直接測定の際には何を測定しているのかが問題となろう。

羊水中 estrogen の大部分は E_3 およびその抱合体であり²³⁾²⁴⁾、その大半は glucosiduronate が占め sulfate がこれにつぎ free はわずかであるとされている²⁵⁾。従来の方で羊水中 estrogen を測定するには妊娠末期においても羊水 10ml 程度を必要とするが RIA においては感度が優れているため、0.1ml 以下で十分であり、その測定法は尿と全く同様に行なうことができた。今後、羊水中ステロイド分析の進展により、母-胎児-胎盤系の内分泌相関が一層明らかになるであろう。

今後は尿中、羊水中のみならず、血中においても dominant estrogen である conjugate 型の測定が進展し、そのルーチン化と測定値に関する criteria の確立が期待される。

稿を終るにあたり、御校閲を賜わった帝国臓器製薬薬理研究部長鈴木竜太博士に感謝致します。また、羊水の測定に際し多大の御助言と羊水の御提供を頂きました広島大学医学部産婦人科藤原篤教授ならびに同教室笹木智子先生に深謝致します。

なお、本論文の要旨は第21回日本内分泌学会東部部会総会において発表した。

文 献

- 1) Kober, J.B.: J. Endocrinol., 8: 196 (1952).
- 2) 神戸川明: 日内分泌誌, 37: 807, (1961).

- 3) Ittlich, G. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 312 : 1 (1958). 4) Wotiz, H.H. and S.C. Chattoraj : Anal. Chem., 36 : 1466 (1964). 5) Mikhail, G., C.H. Wu, M. Ferin and R.L. V. Wiele : Steroids, 15 : 333 (1970). 6) Wu, C.H. and L.E. Lundy : Steroids, 18 : 91 (1971). 7) 牧野拓雄 : 日内分泌誌, 49 : 629, (1973). 8) Abraham, G.E. and W.D. Odell : Immunologic methods in steroid determination, (1970), 87, Appleton-Century-Crofts. 9) Feldman, H. and D. Rodbard : Principles of competitive protein-binding assays, (1971), 158, J.B. Lippincott Company. 10) 牧野拓雄, 他 : 臨床病理, 21 : 858, (1973). 11) Neeman, M. and Y. Hashimoto : J. Am. Chem. Soc., 84 : 2972 (1962). 12) Hashimoto, Y. and M. Neeman : J. Biol. Chem., 238 : 1273 (1963). 13) Goebelsmann, U., K. Sjöberg, N. Wiquist and E. Diczfalusy : Acta Endocrinol., 50 : 261 (1965). 14) Wilson, R., G. Eriksson and E. Diczfalusy : Acta Endocrinol., 46 : 525 (1964). 15) Ahmed, J. and A.E. Kellie : J. Ster. Biochem., 3 : 31 (1972). 16) Tikkanen, M.J. : J. Ster. Biochem., 4 : 57 (1973). 17) 神戸川明 : ホと臨床, 19 : 355, (1971). 18) Gorpide, E., M.E. Giebenhain, L. Tseng and W.G. Kelly : Amer. J. Obstet. Gynec., 109 : 897 (1971). 19) Castanier, M., J. Grenier and R. Scholler : J. Ster. Biochem., 3 : 305 (1972). 20) Hennam, J.F., W.P. Collins and I.F. Sommerville : Steroids, 21 : 285 (1973). 21) Kellie, A.E., V.K. Samuel, W.J. Riley and D.M. Robertson : J. Ster. Biochem., 3 : 275 (1972). 22) Tikkanen, M.J. and H. Adlercreutz : J. Ster. Biochem., 3 : 807 (1972). 23) Goebelsmann, U., G. Eriksson, E. Diczfalusy, M. Levitz and G.P. Condon : Acta Endocrinol., 53 : 391 (1966). 24) Schindler, A.E. and W.L. Herrmann : Am. J. Obst. Gynec., 95 : 301 (1966). 25) Kloppe, A. : Am. J. Obstet. Gynec., 112 : 459 (1972).