



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | EstrogenのRadioimmunoassayに関する研究                                                                                                                 |
| Author(s)    | 正田, 常雄                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1973, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/30795">https://hdl.handle.net/11094/30795</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|         |                                    |
|---------|------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | 正 田 常 雄                            |
| 学位の種類   | 医 学 博 士                            |
| 学位記番号   | 第 2813 号                           |
| 学位授与の日付 | 昭和48年3月24日                         |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当                       |
| 学位論文題目  | Estrogen の Radioimmunoassay に関する研究 |
| 論文審査委員  | (主査)<br>教授 倉智 敬一                   |
|         | (副査)<br>教授 天野 恒久      教授 北川 正保     |

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

Estrogen の測定法は最初 bioassay に始まり、種々な化学的測定法へと進歩し、感度、精度の点でも次第に秀れたものとなってきたが、測定手技にかなりの煩雑さを伴い、実際の臨床応用には困難な点が多かった。最近、蛋白性ホルモンの血中微量測定法として radioimmunoassay (RIA) が普及し、感度、特異性、手技の簡易さが認められるにつれ、本法をステロイドホルモン測定に応用しようとの試みがなされるようになった。今回 estradiol-BSA を抗原として抗体を調製し、硫酸塩析法を用いて estrogen の簡易 RIA 法を開発し、特異性、基礎的諸条件などを検討した。次いでこれを妊婦血中 estrogen のうち特に estrogen 活性の指標ともなる free estrone、estradiol 分画を測定し、若干の成績を得たので報告する。

#### 〔方法ならびに成績〕

- (1) 抗血清の調製：estradiol-17 $\beta$ -succinyl bovine serum albumin (E<sub>2</sub>-BSA) を抗原とし、complete Freund's adjuvant を用いて家兎およびモルモットを免疫し、採血後、硫酸塩析法にて血清の  $\gamma$ -globulin 分画を抽出した (抗 E<sub>2</sub>-BSA)。
- (2) estradiol-17 $\beta$ -6, 7-<sup>3</sup>H (<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>) : specific activity 48 Ci/mM、1 mCi/ml benzene ethanol 溶液を 16,000 倍稀釈し、最終濃度を 6  $\mu$ Ci/0.1ml とした。
- (3) 抗体の抗ホルモン作用：幼若雌性ラットの背部皮下に E<sub>2</sub>40  $\mu$ g 注射し、同時に各濃度に稀釈した家兎抗 E<sub>2</sub>-BSA 血清を腹腔内に投与し、6 時間後に子宮重量を測定したところ、わずか 0.01ml の抗血清に E<sub>2</sub> の生物学的活性中和作用を認めた。
- (4) RIA 測定手技：HCG の RIA 測定法に準じ、<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> 0.1ml (6  $\mu$ Ci)、標準 E<sub>2</sub> または被検液 0.4 ml、1,600 倍稀釈モルモット抗 E<sub>2</sub>-BSA  $\gamma$ -gl. 0.1ml を混合し 4℃、2 時間 incubatè したのち

飽和硫酸溶液 0.6 ml を加え 3,500rpm で 20 分間遠沈し、沈渣を saline 1.0ml に溶解しこれに Bray's solution 10ml を加え liquid scintillation counter で 10 分間放射能を測定した。標準曲線による測定域は 312.5pg/ml ~ 5.0ng/ml であった。

- (5) 交叉反応性：各種 steroids について標準曲線を描くと、 $E_2$  に対して estrone ( $E_1$ ) はほぼ完全に (100%)、estriol ( $E_3$ ) は比較的弱い (4%) 交叉反応を示したが、testosterone、hydrocortisone、progesterone は 1  $\mu$ g/ml 以下の濃度ではいずれもこの系に干渉しなかった。
- (6) 血中 steroids の簡易抽出法——estrogen 抽出と  $E_3$  除去——：血清 0.1 または 0.2ml に  $H_2O$  2 ml 添加、これに石油エーテル 6 ml を加え振盪し、石油エーテル相を排除したのち血清相にエーテル 6 ml を加え振盪し、今度はエーテル相を採取し加温・蒸発乾固した。次いでこれに 3% 炭酸ソーダー溶液 5 ml、石油エーテル・エーテル (2 : 1 容) 混合液 5 ml を加え振盪後、石油エーテル・エーテル混合相を採取し加温・蒸発乾固し、これに PBS 1.0ml を加えて溶解し被検液とした。以上の操作で  $E_3$  は  $\frac{1}{4}$  ~  $\frac{1}{2}$  に減少した。
- (7) 妊婦血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  の測定：妊娠第 9 週から第 42 週に亘る 69 例の正常妊婦血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  値を測定した結果、妊娠初期 (4 ヶ月) では平均 9.5ng/ml であるが、妊娠中期 (7 ヶ月) には 16.6ng/ml、妊娠末期 (10 ヶ月) には 29.5ng/ml と漸次上昇した。なお毎回  $^3H-E_2$  12m $\mu$ Ci について血清試料と同様の抽出操作を行なって回収率を計算すると  $41.3 \pm 2.0\%$  となり、同一試料を繰り返し測定した値の assay 間の変異系数は妊娠 3, 4 ヶ月に相当する比較的低いレベルにおいてもそれぞれ 13.1%、22.5% であった。
- (8) 胎盤娩出後血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  及び血中 HCG の消退：11 例につき胎盤娩出時より経時的に採血して血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  及び HCG を測定した結果、胎盤娩出後の半減期は、それぞれ 14.2 分、3 時間 42 分であった。
- (9) 異常妊婦血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  の測定：各種異常妊婦 29 例につき血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  を測定した結果、子宮内胎児死亡 4 例はすべて低値であり、切迫流早産 6 例では 4 例が正常値を、予後の悪かった 2 例が低値を示した。また無脳児 1 例は正常範囲の下限値を、中毒症 5 例では正常範囲内かやや低値を示し、予定日超過 1 例はやや低値であった。なお胎状奇胎 8 例では低値を示すもの 5 例、正常範囲のもの 2 例、高値のもの 1 例であり、双胎では高値 2 例、正常値のもの 2 例を認めた。

#### 〔総括〕

Estradiol-BSA を抗原とし、家兎およびモルモットを免疫して得た抗血清をもとに RIA を設定し、血中 estrone ( $E_1$ )、estradiol ( $E_2$ ) 抽出法を簡易化することにより主として妊婦血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  測定法の開発を行ない、その臨床応用を試みて以下の成績を得た。

1.  $E_2$ =抗  $E_2$ -BSA 系の RIA において各種 steroids の交叉反応をみたところ、 $E_1$  は 100%、estriol ( $E_3$ ) は 4%、testosterone、hydrocortisone、progesterone は 0.03% 以下であった。
2. 妊婦血清をエーテルで抽出し蒸発乾固したものを、3% 炭酸ソーダー溶液によって洗浄、石油エーテル・エーテル (2 : 1) 混合液によって抽出することにより、free  $E_3$  を約 90% 除去することができた。
3. 本 RIA の測定域は 0.3 ~ 5.0ng/ml であり、試料の抽出による回収率は  $41.3 \pm 2.0\%$ 、同一試料の

測定による assay 間の変異係数は22.5%以下であった。なお測定手技は極めて簡易であり、所要時間も4時間以内と迅速である。

4. 正常妊婦血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  値は妊娠初期より末期にかけて漸次増量し、従来の複雑な測定法による実測値に比肩する成績を得た。
5. 胎盤娩出後の血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  の消退は極めて速やかであり、半減期が14.2分であった。
6. 妊婦血中 free  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  の測定は切迫流早産の診断及び予後判定、あるいは分娩誘発時期の決定などに役立つことを知った。

## 論文の審査結果の要旨

本論文は estradiol-17 $\beta$ -succinyl bovine serum albumin を抗原として家兎およびモルモットを免疫し、血中の遊離型 estrone ( $E_1$ ) および estradiol ( $E_2$ ) の radioimmunoassay (RIA) に関する基礎的ならびに臨床応用に関する研究を行なったものであるが、次の諸点に独創性を認める。

### 基礎的事項

- (1) 抗原抗体反応後の抗体結合型と非結合型標識ステロイドの分離のために、硫安塩析法を用いて、十分な精度を保ちつつ、手技の簡易迅速化を計り、本法の臨床応用を容易ならしめた事。
- (2) 血中ステロイドの抽出に際して、chromatography を行なわないで、estriol ( $E_3$ ) を除去し、 $E_1$  および  $E_2$  を抽出することのできる方法を考案した事。

### 臨床的事項

感度、特異性、精度について充分検討したのち、本法を臨床応用し、次の諸点を明らかにした。

- (1) 正常妊婦各週の血中遊離型  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  値を明らかにした。
- (2) 分娩後に血中から消退してゆく  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  値の様相を human chorionic gonadotropin (HCG) と対比して明らかにし、その臨床的意義を指摘した。
- (3) 各種の異常妊娠（切迫流早産、無脳児妊娠、胞状奇胎、双胎など）について、本法による血中遊離（生物活性）型  $\langle E_1 + E_2 \rangle$  測定値を示し、従来、専ら行なわれていた尿中結合（非活性）型  $E_3$  測定との臨床的意義の相違を指摘した。

以上の諸点から、本論文が学位論文として適格なものと認める。