

絨毛性ゴナドトロピンの抗ホルモンに関する 血清学的研究

Serological Studies on the Antihormone of Chorionic Gonadotropin

東京大學醫學部産科婦人科學教室（主任 長谷川教授）

安 田 幸 夫 Yukio YASUDA

目 次

第1章 緒 言

第2章 實驗方法

第1節 抗 原

第2節 免疫方法

第3節 寒天反應基の製法

第4節 反應の實施

第5節 反應の検討

第6節 實驗材料

第3章 實驗成績及び考案

第4章 結 論

第1章 緒 言

実験動物に長期間異種動物の proteohormone を投与した場合、動物の血清中にそのホルモンの拮抗する作用が現われてくる事は、Collip, Anderson 以来よく知られている事実である。即ち Collip は妊婦尿より抽出した gonadotropin を用いて実験し、斯かる作用を有する物質を Antihormone と名づけた。antihormone の本体に関しては、種々な説があり、論議されているが、現在免疫抗体とする説が有力である。この説を裏づけるものとして、最近柴生田は詳細な実験に基き、絨毛性ゴナドトロピン（以下絨ゴと略記する）に対する antihormone が、1) 絨ゴの連続投与により産出され、2) 特異的な抗ホルモン作用があり、3) γ -グロブリン分割にあるらしく、4) 37°C, 30分で破壊され、5) ペプシンで消化した絨ゴでは産出されない事等を確認して、一種の抗体であると結論した。其他、抗体説の根拠となる実験は以前から多数あるが、大体以上氏

の論点に要約される。絨ゴは分子量10万以上の蛋白質と考えられているから、異種動物に抗体を産生させることは、理論上当然ではあるが、従来の報告では抗体の証明は何れも間接的であつて、直接抗原抗体反応として捕えられていない。山下はシナホリン（帝国臓器製）で免疫した家兎血清中にシナホリンに対する沈降素を証明し、之を抗ホルモンそのものと考えているが、この様な物質を用いて免疫抗体を産出させた場合は、常に抗人蛋白抗体ができる可能性があり、従つて得られた抗体が必ずしも抗絨ゴ抗体とは断定できないから、抗体分析を充分に行わないと結論を誤るおそれがある。事実白井・宮本は妊婦尿、人胎盤水性エキスを家兎を免疫して得られた沈降素は、該ホルモン自体に由来するものではなく、混在物によるものと考えており、又柴生田も絨ゴの長期注射によつて生じた抗絨ゴ沈降素と、排卵抑制物質との間には何等直接の関係がなく、両者は全く別個のものであると結論している。

以上の様に絨ゴと抗絨ゴ抗体との抗原抗体反応の証明が困難なのは、所謂アンチホルモンが絨ゴに対する抗体ではないためか、或は該抗体であるとしても、充分強力且つ特異的な免疫抗体ではなく、殊に抗原が不純なためではないかと考えられる。

従つてアンチホルモンが抗体であるか否かを解明するには、絨ゴに依る排卵に対し抑制作用を有する。換言すれば絨ゴに対するアンチホルモンを含有する家兎血清内の抗体を分析する事が最も必

要である。

最近注目され出した Ouchterlony の方法（寒天中の沈降反応）による分析法は、この目的に最も適当な方法と考えられ、私は本法を用いて妊婦尿で免疫した家兎血清中の抗体を検討し、一応の成果を得たので報告する。

第2章 実験方法

第1節 抗原

抗原としては、出来得る限り余分な成分の混入しない事が望ましいので、胎盤抽出物やシナホリンの様なものは避けて妊婦尿を用いた。

絨毛の尿への排出は妊娠8～11週頃に最高を示すから (Smith, Albert 1951), 妊娠2～4カ月の妊婦尿から Zondek (1930) の簡易アルコール沈澱法により之を抽出した（他の蛋白抗原をなるべく除くため、ゾルフォで蛋白陽性の尿は使用しなかつた）。即ち家兎1匹に就て

1. 妊婦新鮮尿15ccを10%醋酸に依りpH5.0前後として濾過する。
2. 純アルコール60cc（4倍量）以上を加えて5分間振盪すると、灰白色の絮状沈澱を生ずる。
3. 之を氷室に1時間以上放置した後遠沈して上清を棄てる。
4. 除毒の為沈澱に20～30ccのエーテルを加えて数分間振盪する。
5. 之を遠沈して上清を棄て、乾燥器でエーテルを充分蒸発させる。
6. 之に蒸溜水5ccを加えてガラス棒で充分に攪拌し、上清を遠心分離して沈澱を棄てる。この上清は少々黄色を帯びており、その中に絨毛が移行している。

免疫用抗原としてはこの儘で使用したが、反応に用いる抗原は高濃度の必要があるので、尿50ccを濃縮して蒸溜水0.5～1.0ccの水溶液とした。

第2節 免疫方法

2.2kg前後の家兎4匹（雌3匹雄1匹）を用い、上記水溶液に5%ぶどう糖液5ccを加えたものを、週3回宛計10回、耳静脈に注射し、最終注射後1週間目に試験採血して反応を検した。4匹共に抗体の産出が認められたが、かなり強い個体差があつたので、力価の高いもの2匹を、夫々尿150ccより抽出した絨毛に更に1回追加免疫を行つた。以下の反応に使用した血清はこの家兎より採血したものである。この血清は絨毛生理食塩水溶液と混じて37°Cに1時間静置した後家兎に注射し、排卵抑制

作用のある事を確認した。

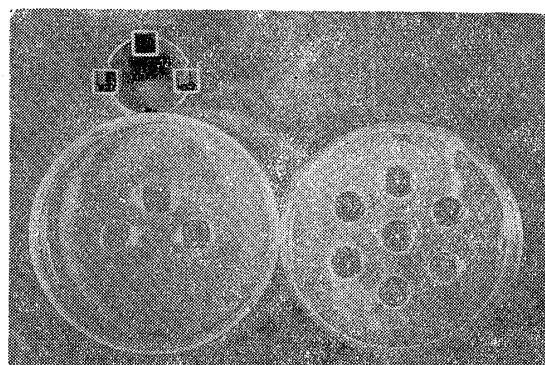
第3節 寒天反応基の製法

粉末寒天を再蒸溜水中に重量比1.5%位になる様に混じ、MerckのNaClを0.8～0.9%になる様に加え、三角コルベに入れて硫酸紙で口を覆い、Autoklavで100°C以上に15分間滅菌して濾過する。防腐剤として1%窒化ナトリウムを1/9容量加えて、滅菌試験管に15～20cc位ずつ分注し、硫酸紙を口にかぶせて保存する（室温で1ヵ月以上保存出来る）。

反応基を作るには次の様に2段に行う。即ち先ず試験管内の寒天を再び溶かして径8cmのシャーレに薄く流し込み、凝固したら金属鑄型をその上に置いて、更に3mm前後の深さになる様に寒天を追加し、凝固してから鑄型を引抜くと第1図の様な反応基が出来る。

2段に分けるのは、凹みの底面がガラスであると、抗原と抗体とが直接底を伝つて互に混合し、その場所で抗原抗体反応を起すからである。

第1圖 反應基と金屬鑄型



私の作つたものでは各々の凹みは略1cm離れているが、更に近くすると反応時間は早くなる。

第4節 反応の実施

第1図の様に凹みが3個からなる二等辺三角形をなすものでは頂点の凹みに、7個のものでは中央の凹みに抗血清を入れ、他の凹みに抗原液を入れて30°Cに保存する。両者は寒天の中に拡散して行くと次第に量が少なくなるから、2～3回追加する必要がある。大体24時間位で沈降反応を起して薄い白帯となつて現われてくるが、慣れないと甚だ見落し易く、2～3日以上経過しないと著明とならない。

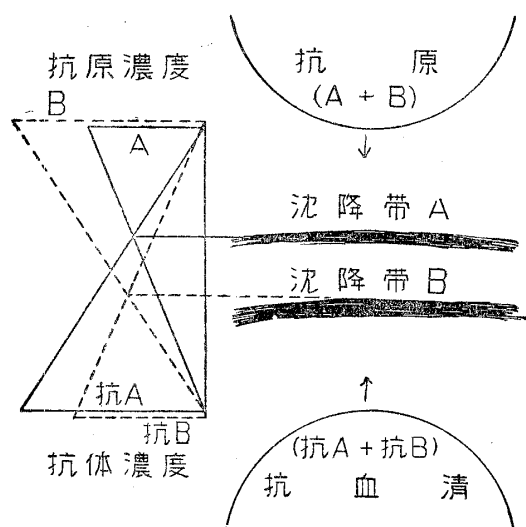
又10日以上も放置したり、低温に移したりすると白帯はぼけたり、分裂したり、時には消失する事もあるから、毎日観察箱でよく観察して白帯の数、位置を確実に記録

しておかなければならない。

第5節 反応の検討

凹みに入れられた抗原と抗体とは、各々周囲の寒天中に拡散し、抗原抗体の最適比の所で結合して沈降帯を作る。いくつかの抗原成分の混合物が抗原となつた場合、例えば第2図の様にA及びB抗原の混合物では、抗血清に各々別な対応する抗A・抗B抗体が含まれていれば、夫々の最適の濃度比の所に図の様に沈降帯を作る。寒天中への拡散は、抗原・抗体の最初の濃度、拡散係数によつて異つており、又最適の濃度比も各々異つてゐるから、二つの抗原成分の沈降帯ができる位置が一致する事は比較的少い。併し多数の抗原成分を含んだ反応系では、巾

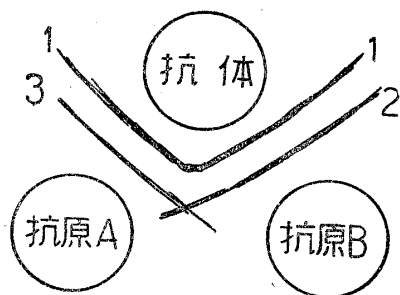
第2図



の広い沈降帯を作るものもあるから、その中に巾の狭い沈降帯を作るものがかくれる可能性はある。従つて沈降帯のできる数は、抗原成分の数と同じか又はそれより以下である。

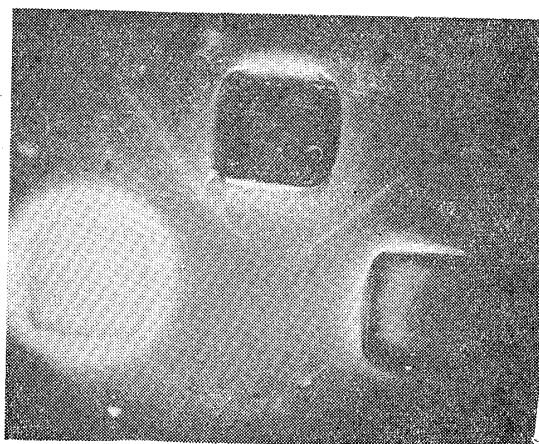
別々な抗原A、Bの抗原成分を比較する場合、同一抗

第3図



原成分を含んでいても、その濃度によつて沈降帯のできる位置は異つてくるから、同一成分であるか否かは第3図の様に隣合う沈降帯の接触する部分が融合するか、或は交叉するかによつて判定する。即ち1の様に融合している場合には、この沈降帯は抗原A、Bに共通する同一抗原成分によるものであり、2、3は夫々に固有の抗原成分によるものである (Ouchterlony)。

第4図 融合している例



第6節 実験材料

抗原として反応に使用した材料は2～10ヵ月の各月の妊婦計30名の尿で、他に対照としては

1. 非妊婦尿

褥婦(産褥直後～7日) 5名

正常婦人 4名

男性 2名

2. 血清 O型血清 2名

3. 血清蛋白分劃

人血清アルブミン (Cohn の分劃で SIV+PV)

人血清グロブリン (" " SII+III)

人血清γ-グロブリン (" " PII-1, 2, 3)

の各1%溶液

4. 絨毛製品

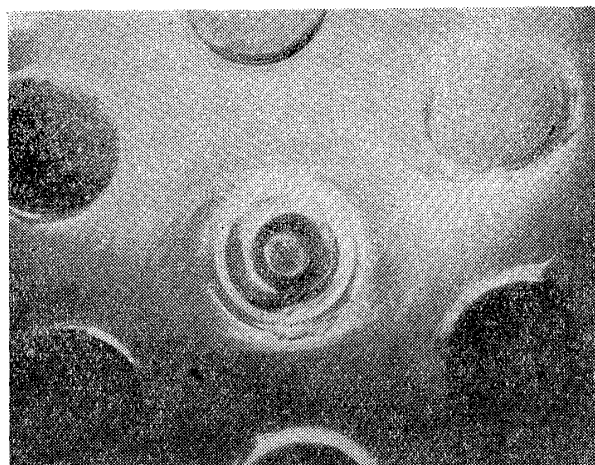
シナホリン(帝国臓器、絨毛と下垂体性毛との混合物であるが、使用したのは絨毛のみの粉末で、胎盤より抽出したものである)、ゴナゲン(三全製薬、胎盤より抽出した絨毛)の各2%溶液を用いた。

抗血清としては前記の血清の他、人血清で免疫した家兎の抗血清をも使用した。

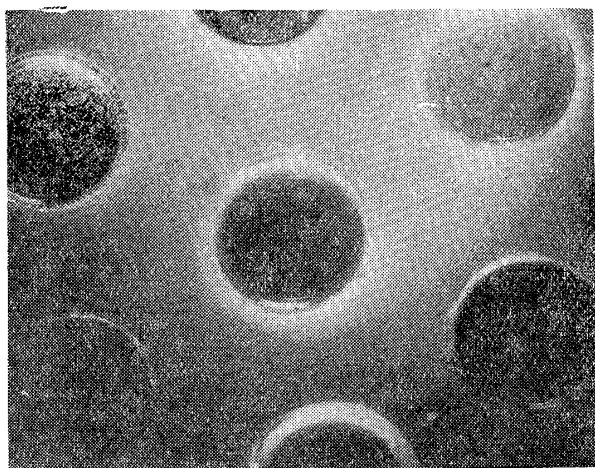
第3章 実験成績及び考案

定型的な例を図示して検討する。

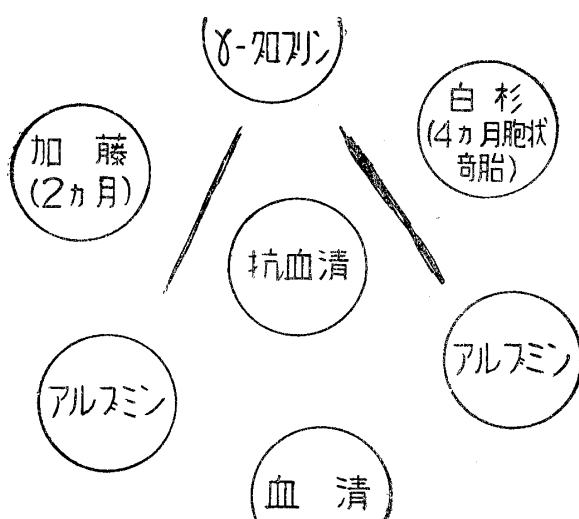
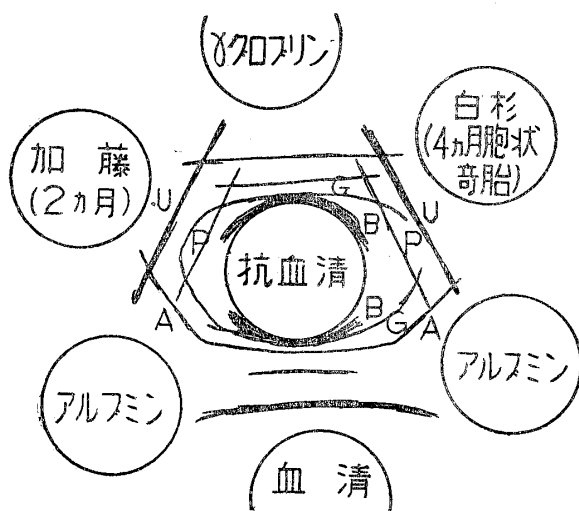
第5圖 (5日目)



第6圖 (5日目)



第5, 第6図は抗原として全く同じものを用いたが, 第5図は力価の高い抗血清を用いて反応因子(抗原と抗血清)を次々に補充した場合, 第6図は力価の低いものを用い反応因子の追加を行わなかった場合の反応である. 第5図で白杉, 加藤以外に血清, アルブミン, γ -グロブリンの何れにも沈降帯が現れたのは, Zondek の方法で尿より抽出した絨毛溶液中にも, 微量ではあるが種々な血清蛋白と共通な抗原成分が含まれており(この事は又第11図でも証明された), その様な微量でも反復注射する事によつて, 家兎に抗体を産出せしめ得る事を示すものである. 尿中にこの共通抗原成分が微量であるという事は, 加藤, 白杉には血清蛋白と相交叉する沈降帯のみで(U及びP)それらと共通な従つて互に融合する沈降帯が現れておらぬ点から容易に推定される. この事は, 普通単一に近いと考えられる程精製された物質でも, 実際には抗原となり得る多数の不純物が含まれており,



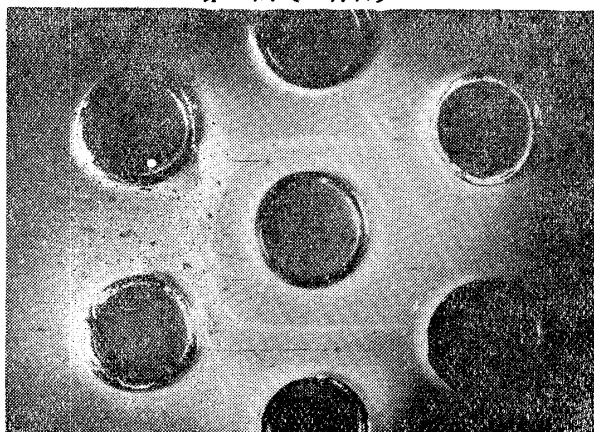
たとえ微量でも夫々に対する抗体が産出される可能性のある事を示すもので, 従つて如何なる方法で精製した絨毛物質で免疫しても, 単に沈降反応が生じたという事だけで, 抗絨毛抗体が産生されたと判断するのは危険である. アルブミン, γ -グロブリンも不純物が混在する為2~3本の沈降帯が見られ, その中AとGとは夫々アルブミン, γ -グロブリンと血清とに共通しているから, Aがアルブミン, Gが γ -グロブリンによる沈降帯と推定される.

加藤, 白杉に見られる沈降帯を抗血清に近い方から, B, P, Uと名づけると, B以外のPとUとは前述の如く血清蛋白と共通しない抗原成分である. 血清と共通し, 抗血清の極めて近くに見られる巾の広い不明確なBは, 体組織蛋白によるものと推定される. 従つて問題になるのはUとPである.

第6図では加藤, 白杉以外には沈降帯が現れていない,

この沈降帯は第5図のUに相当するものと推定され、以下の各図(第7図以下のU)にも見られる様に、褥婦、正常婦人、男性にも現われているから、妊娠に無関係な、尿に特有な抗原恐らく Mucoprotein による沈降帯と考えられる。之に対する抗体の力価が最も高く、抗原抗体の結合も強力で、一般に強く現れ、放置しても最後迄消

第7図(7日目)



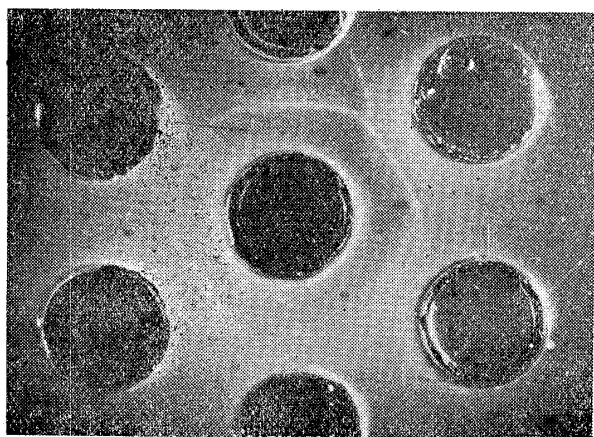
失せずに残存する。

第7図は対照としてグロブリンを使用したものであるが、之にも共通な沈降帯は見られない。坂田、河内にはU、P共に現われているが(河内ではUは極めて薄かつた)、安田、泉山にはUのみでPが見られない。第8図でも同様妊婦には総てPが見られるが、渡辺には見られない。

この様にPは男性及び正常婦人には現われないから、何か妊娠に関係のある物質によるものである事が推定される。特に第8図で白杉のUの位置が他の者と変わらないのに、Pが抗体側に近いのは、抗原過剰の場合には沈降帯が抗体側による(鈴木)から、胎状奇胎患者の尿に特に多い物質、即ち絨毛を予想させる。

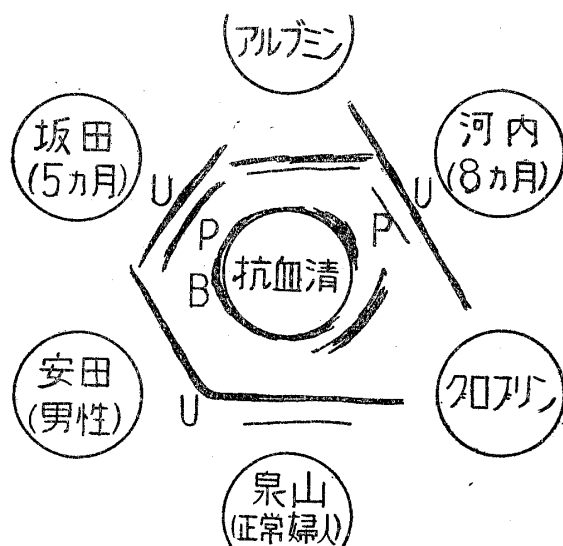
この点を更に確認する為にシナホリンを対照に置いて

第8図(6日目)



みると(第9、第10図)、Pはシナホリンと全く同一であり、又シナホリンにはBがなく、血清とは共通な沈降帯が見られない。

又人血清で免疫した高力価の家兎血清を用いて反応を実施すると(第11図)、シナホリンには沈降帯が現われないから、人血清と共通な抗原成分を全く有しない。前



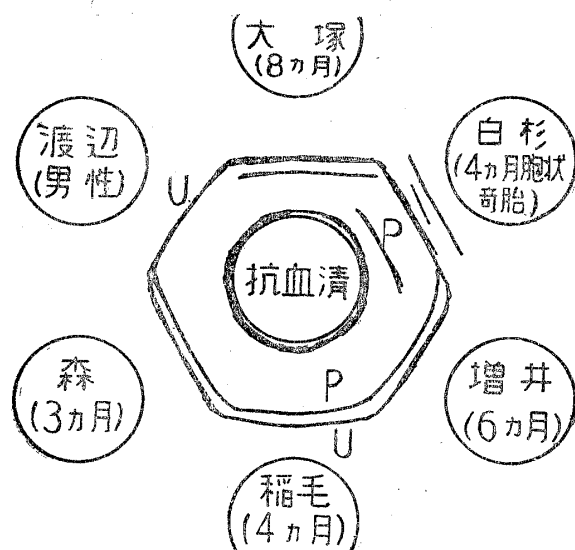
述した通り共通の抗原成分が微量含まれている白杉、増井には、極めて弱い沈降帯が現われている。

以上の結果からPは絨毛による沈降帯と推定してよいと考えられる。

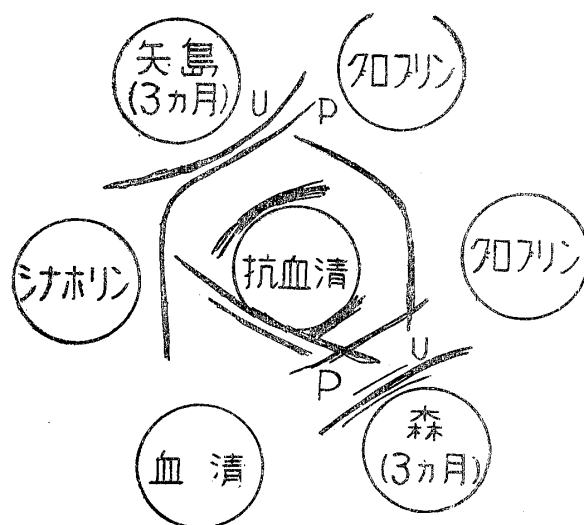
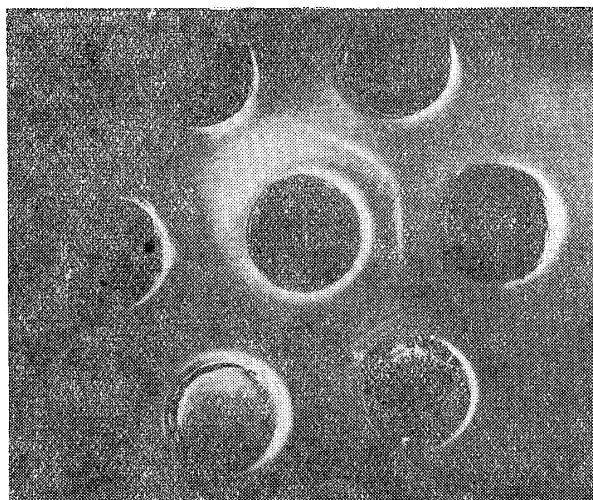
ゴナゲンに就て実施した実験では、シナホリンと全く同じ結果が得られた(第13図)。

反応の結果を整理して第1表に示す。

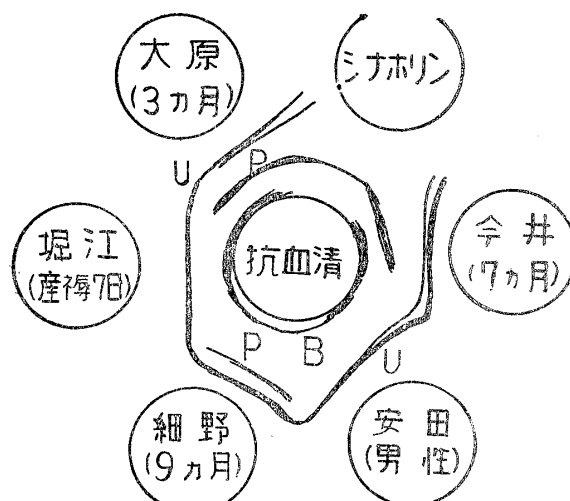
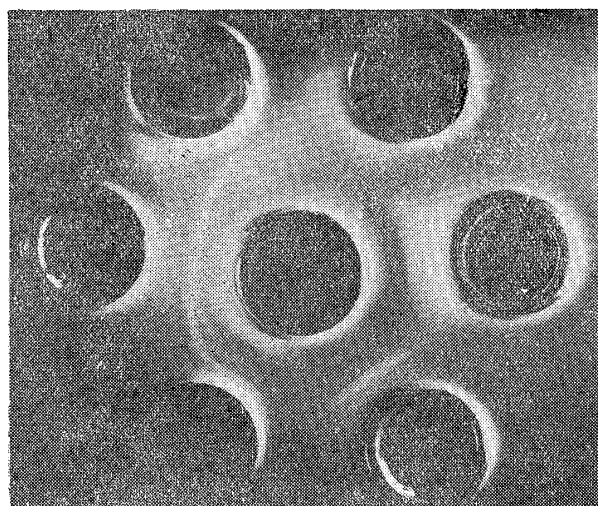
血中の絨毛は出産後直ちに消失するものでないから、産褥何日迄Pが現われるかを見る為に褥婦尿で実施し(第10、12、13図)、第2表の様な結果が得られた。例数



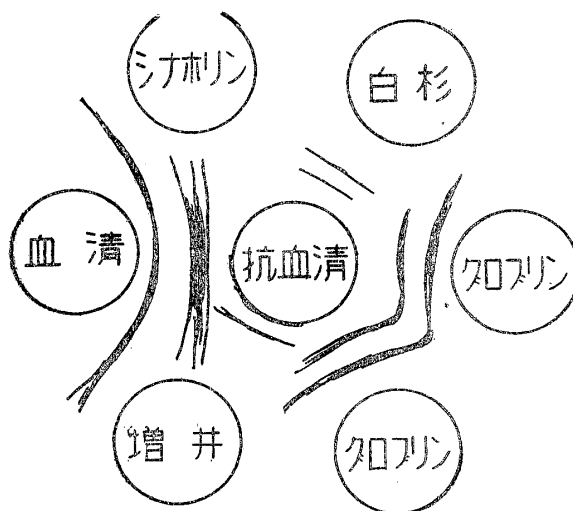
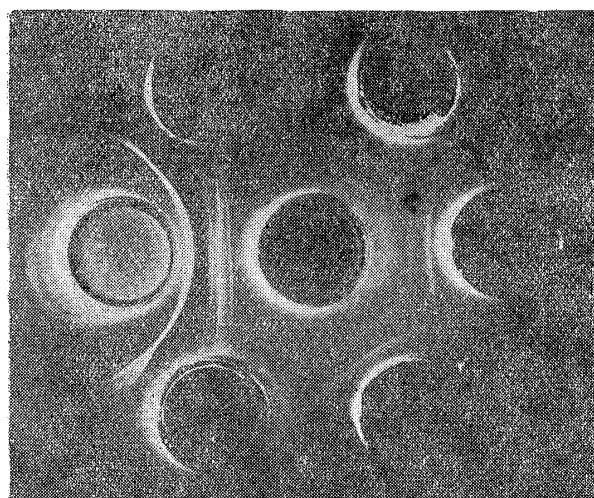
第9圖 (7日目)



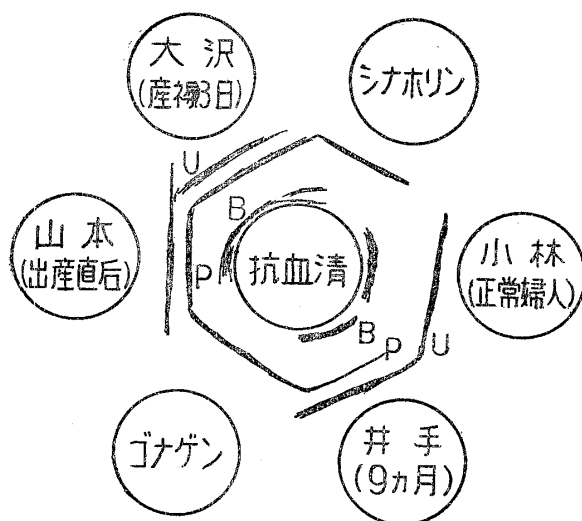
第10圖 (13日目, 稍日數がたつたので, 今井, 大泉にUの分裂が見られる.)



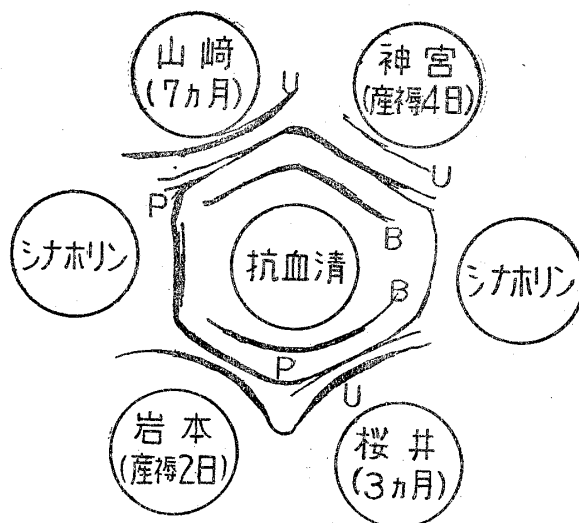
第11圖 (5日目 抗人血清を用いた例)



第12圖 (16日目)



第13圖 (6日目)



第 1 表

氏 名	採尿日の妊娠月数	備 考	沈降帯
	妊 婦		UPB
田 中	2ヵ月 (6週6日)	胞 状 奇 胎 象 卵 巢 囊 腫	+++
櫻 庭	2 " (7 ")		+++
加 藤	2 " (7 " 3 ")		+++
森	3 " (10 " 2 ")		+++
櫻 井	3 " (8 " 3 ")		+++
矢 島	3 " (9 ")		+++
大 原	3 " (10 " 5 ")		+++
稻 毛	4 " (12 " 2 ")		+++
白 杉	4 " (12 " 2 ")		+++
井筒屋	4 " (14 " 3 ")		+++
相 馬	5 " (16 " 3 ")		+++
坂 田	5 " (19 " 4 ")		+++
中 川	5 " (18 " 3 ")		+++
鈴 木	6 " (20 " 3 ")		+++
増 井	6 " (21 " 2 ")		+++
高 山	6 " (22 " 4 ")		+++
藤 田	6 " (23 " 2 ")		+++
伊豆原	7 " (24 " 5 ")		+++
山 崎	7 " (25 " 4 ")		+++
今 井	7 " (26 " 6 ")		+++
小代田	7 " (27 " 6 ")		+++
河 内	8 " (28 " 3 ")		+++
宮 崎	8 " (29 " 2 ")		+++
大 塚	8 " (31 " 4 ")		+++
井 手	9 " (33 " 2 ")		+++
細 野	9 " (33 " 5 ")		+++
大 川	9 " (35 " 1 ")		+++
齊 藤	10 " (38 " 2 ")		+++
神 宮	10 " (40 ")		+++
根 本	10 " (42 ")		+++
	正 常 婦 人		
小 林	子宮後屈手術後2日		++
泉 山			++
鎌 田			++
飯 尾			++

氏 名	採尿日の妊娠月数	備 考	沈降帯
	男 性		UPB
安 田			++
渡 邊			++
シナホリン		2% 溶液	+
ゴナゲン		2% "	+
血 清			+

が少ないので大体の傾向を示すに止まるが、産褥4日目頃迄Pが現われている。勿論血清学的反応は生物学的反応よりも鋭敏度が遙に劣るものであるから、之を以て血中絨毛の消失と考える事はできない。この点については更に多くの例又不全流産等について検討を要する。

第2表 褥婦に就ての反應

氏 名	備 考	沈 降 帯
		U P B
山 本	出 産 直 後	+++
岩 本	産 褥 2 日 目	+++
大 澤	" 3 "	++
神 宮	" 4 "	+++
堀 江	" 7 "	++

第4章 結 論

妊婦尿よりアルコール沈澱法により抽出した絨毛溶液を家兎に連続投与する事により、絨毛の排卵に対し抑制作用を有する抗血清が得られた。この抗血清中の抗体を Ouchterlony の方法で分析した結果、該血清中に

1. 妊婦、褥婦、正常婦人、男性尿に対して共

通する特有の沈降素がある。之は Mucoprotein に対する抗体と考えられる。

2. 妊婦及び産褥4日目迄の褥婦尿は正常婦人、男性尿には見られない、絨毛製品と共通する特有の沈降帯を作る。之は抗絨毛抗体と考えられる。

3. 血清蛋白に対する抗体がある。この事は上記抽出液中に血清蛋白と共通の抗原が含まれており、極めて微量であるに連続投与する事により、家兎に抗体を産出させる事を示す。

4. 体組織蛋白に対する抗体がある。

擧筆するに當り、終始御懇篤なる御指導を賜り、且つ御校閲の勞を賜つた 恩師 長谷川教授並びに絶えず御教示を賜られた 血清學 松橋助教授に深甚な謝意を表す。尙御助言、御協力を戴いた東大産婦人科教室及び輸血部の各位、殊に柴生田博士、梶原學士に深謝する。

主 要 文 献

- 1) Collip & Anderson : Lancet, 1; 76, 1934.
- 2) Collip : Am. J. Physiol., 109; 22, 1934.
- 3) 柴生田 : 日産婦誌, 8; 677, 1956. —4) Williams : Textbook of endocrinology, 1955.
- 5) 山下 : 日産婦誌, 8; 1071, 1956. —6) 白井 : 日産婦誌, 4; 8, 1952. —7) Wolfe : J. Immunol., 50; 349, 1945. —8) Twombly : Endocrinology, 20; 311, 1936. —9) 鳥飼 : 内分泌のつどい第5集, 1954. —10) Zondek : Klin. Wschr., 21; 964, 1930. —11) Ouchterlony : Acta path. et microbiol. scand., 32; 231, 1953. —12) 松橋 : 臨床病理特集, 第2號, 203, 1955. —13) 鈴木 : 日新醫學, 43; 342, 1956. —14) Smith & Albert : Am. J. Obst. & Gynec., 61; 514, 1951.

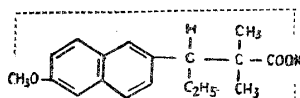
(No. 604 昭31・11・2受付)

注射のいらない…新合成卵胞ホルモン剤

バレストール

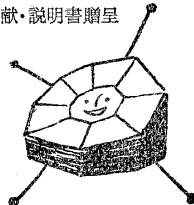
VALLESTRIL

3-(6-methoxy-2-naphthyl)-2,2-dimethyl pentanoic acid



従来の天然或は合成ホルモンと異なつた化学構造を有し…1錠中に 3mgを含有する特長ある白色八角形の錠剤です

★文献・説明書贈呈



★健保適用
20錠, 50錠, 100錠

- ★多くのホルモン剤にみられるような……不慮の子宮出血を起したり、胃腸障害などの副作用がないので安心して治療を続けることができます。
- ★また内服しても肝臓で分解を受けないため、注射する必要はなく、内服で注射と同等の効力を発揮します。

更年期障害
人工妊娠中絶後遺症
流産後の子宮出血
乳汁分泌の抑制
卵巣機能障害

老人性膣炎
小児外陰膣炎
無月経
月経過少、稀発月経
頻発月経
月経過多
月経困難症
にきびなど



大阪市東区道修町

大日本製薬株式会社

東京都中央区日本橋本町