

絨毛性ゴナドトロピン (HCG) の免疫学的研究

名古屋大学医学部産科婦人科学教室 (主任 石塚直隆教授)

大学院学生 宮 河 昭 夫

概要 従来行われて来た生物学的妊娠反応は多数の実験動物を必要とし、且つ長時間を要し、その煩雑性は日常誰もが痛感して来た所である。

HCG を免疫反応によつて定性、定量せんとする試みは1931年以降、多数の研究者によつて検討されて来たが、Bioassay に代る程の良好な成績はえられなかつた。近年、Wide ら、Robbins らは方法論的に更に進んだ免疫反応によつて単時間に、特異的に尿中HCGの Immunoassay が可能であると報告した。

そこで私は従来漠然としていた Antihormone の性状をしらべると共に、Immunoassay の特異性及び感度を検討し、臨床応用を行つた。

Antihormone の性状を検討するために Ouchterlony の Gel 拡散法によつて抗原、抗体分析を行つた。免疫学的妊娠反応は Robbins らの Latexagglutination Inhibition Reactionによつて行つた。成績は次の如くである。

1) 抗原として使用した Commercial HCG は抗原分析の結果、血清、尿蛋白成分の Contamination があり、家兎抗血清にはそれらと反応する非特異性抗体の産生が起こることを明らかにした。

2) 家兎抗血清を血清、尿蛋白成分によつて吸収を行うと HCG を含む試料に対して特異的であり、Antihormone の確認が可能であつた。

3) 免疫学的妊娠反応は吸収抗血清を使用することによつて特異性反応を示し、感度8~10 iu/cc でもつて臨床応用出来た。

4) 即ち正常妊婦 223例では妊娠初期98.9%、中期94.8%、後期85.1%の陽性率であり、後期に於てやゝ成績の低下をみたが、全体として93.3%の陽性率であつた。

5) 外妊の疑、胞状奇胎、絨毛上皮腫患者では 100%の定性率であつた。

6) 筋腫、頸癌患者などの非妊婦人に於ては99.1%の陰性率であつた。

7) Friedman 反応と平行して行つた35例は全例共一致した。

8) 以上 363例に行つた免疫学的妊娠反応の定性率は95.6%であつた。

9) 正常妊婦の尿中HCGの定量を行い、妊娠初期に一峰性のある定量曲線がえられ、妊娠初期115555 iu/l、中期 35333 iu/l、後期 26666 iu/l の定量値をえた。胞状奇胎、絨毛上皮腫患者に於ても治療処置後の Hormone 定量が可能であつた。

Antihormone の性状をしらべることによつて特異性のある抗血清がえられ、Robbins らの方法を検討し、臨床試料に於て 95.6%の定性率があり、定量への応用の可能であることを明らかにした。本法の臨床的意義は極めて大であると考えられる。

緒 論

蛋白性ホルモンの Antigenicity に関しては近年数多くの興味ある報告が行われている。即ちHCGをはじめとし、Insulin¹¹⁾~¹⁵⁾、Thyrotropin¹⁶⁾~¹⁹⁾、Growth hormone²⁰⁾~²⁸⁾、ACTH²⁹⁾などの各種のホルモンに於てその抗原性、或は Antihormone、更に Immunoassay などに関する数多くの報告がみられ、内分泌学に於ける新しい研究分野が進展しつつある。

HCG に関しては1931年以降 Zondek³⁰⁾、Mcphail³¹⁾らによつて生物反応上その抗原性が推察され、以来 Antihormone を免疫学的に確認するところみが数多く行われ³²⁾~⁴¹⁾、一方抗原抗体反応によりHCGを定性、定量せんとする Immunoassay のところみもまた数多く行わ

れて来た³³⁾~³⁴⁾、³⁶⁾~⁴²⁾、⁴³⁾。しかし免疫反応に於ける Antihormoneの確認には決定的な結論が出ず、免疫学的妊娠反応に於ても従来の Bioassay の特異性に及ぶ所がなかつた。従つて Antihormone の存在は生物反応上現象的に把握されたに過ぎず、免疫反応に於ては漠然とした段階で近年にいたつたと云える。

1960年 Wide & Gemzell¹⁾ が Hemagglutination Inhibition Reaction によつて特異的に尿中HCGの Immunoassay が可能であると発表して以来、その追試⁷⁾~⁴⁴⁾~⁵⁰⁾及び種々なる反応形式の免疫学的妊娠反応が相次いで報告され⁵¹⁾~⁵⁵⁾、HCGの抗原性が再び興味ある研究課題としてとりあげられて来た。更に1962年 Robbinsら⁶⁾ が Polystyrene latex によつてHCGの Immunoassay が

可能であると発表するにいたって免疫学的妊娠反応は Wide ら^{1)~5)}の方法を含め、方法論的に一段と進歩を示し、実用性に於ても臨床応用の可能性が充分示唆せられるに至った。

従来我々が行つて来た生物学的妊娠反応は多数の実験動物を必要とし、且つ長時間を要し、その煩雑性は日常誰もが痛感して来た所である。

そこで著者は以上の諸点を考慮し、従来免疫反応上漠然としていた Antihormone の確認を行い、次いで Robbins ら⁶⁾の Immunoassay について検討し、更に進んで臨床試料に於ける特異性につき検討を行つた⁹⁾。以下それらについて報告する。

HCG の抗原性の検討

Zondek³⁰⁾ が妊婦尿抽出物をマウスに注射して行く時に認めた生物反応の消滅現象は Aschheim-Zondek 反応⁵⁶⁾、白井反応³⁷⁾、Friedman 反応⁵⁷⁾などの生物学的妊娠反応に直接関連した問題であつたために多くの追試が行われた。その結果、HCG が動物に対して抗原的に働き、Antihormone の産生が起り、そのためによるものであらうと云う見解に達した^{32)~34) 36)}。

Ehrlich^{33) 34)}、Sulman³⁵⁾、Twombly³⁶⁾ らは免疫学的立場からこれらの問題を解明せんとし、純粹と思われる HCG (Präpitan, Follutein) により免疫し、沈降反応、補体結合反応によつて Antihormone を確認せんとしたが、肯定するもの^{33) 34) 36)}、否定するもの³⁵⁾があつて一致した見解はえられなかつた。白井ら³⁹⁾は人胎盤エキスを抗原として抗血清を作り、沈降反応によつて検索を行つた所、抗原中の混存物が反応の主体をなしたと云う結果を報告し、非特異性反応の存在する事を示した。

1949年 Ouchterlony⁵⁸⁾ が考案した gel 拡散法による抗原抗体反応は反応の数だけの沈降帯を寒天中に識別でき、免疫反応にとつて有用な方法であることが知られている。そこで著者は HCG の抗原性の検討を Ouchterlony 法によつて検討した。

実験材料並びに実験方法

家兎免疫法：Primogonyl (Deutsch Schering) 10000iu を生理的食塩水 2 cc に溶解し、同量の Freund's complete Adjuvant (Difco. Lab.) に無菌的に混入し、充分 emulsion の状態とした後、成熟雌家兎の背部数箇所に分けて皮下注射した。免疫回数は 1 週おき 5 回、更に 1 週おき 2 回 3000iu 皮下注射した (第 1 表)。

採血及び抗血清の処理：耳静脈採血により抗体価の上昇を確かめ、最後の免疫から 1 週間目にエーテル麻酔下

第 1 表 家兎免疫法及び抗体価

家兎番号	免疫方法		抗体価	
	抗原	Booster	抗血清	吸収抗血清
I	Primogonyl (10000iu) Adj 2 cc $\times 5$	Primogonyl 3000iu $\times 2$	512 $\times$	256 $\times$
II	Primogonyl (10000iu) Adj 2 cc $\times 5$	Primogonyl 3000iu $\times 2$	256 $\times$	128 $\times$

で頸静脈より徐々に全採血を行つた。血清を分離し、56°C、30分間非働化を行い、防腐剤として NaN₃ を入れ、凍結保存し、要にのぞみ実験に供した。

抗原、抗体分析法：Ouchterlony 法⁵⁸⁾ (以下 O 法と略記) による gel 拡散法によつて行つた。使用した Agar は J. Agar S.P. (三光純薬) であり、NaN₃ を 0.1% の割に加え、一般操作は松橋⁵⁹⁾の方法に準じた。抗原、抗体分析に使用した材料は健康男女、妊婦、胞状奇胎並びに絨毛上皮腫患者、正常家兎血清、及び Plasma (日本製薬) などの各血清成分であり、またそれらの尿を安息香酸吸着法⁶⁰⁾によつて抽出した尿蛋白成分である。下垂体ホルモンとの干渉を検討するために、Prolactin, Anteron, ACTH, Hypohorin などの製剤を使用した。

抗血清の吸収法：家兎抗血清 10cc に健康人尿抽出物 (安息香酸吸着法⁶⁰⁾) 20mg, Plasma 10mg の割に加え、37°C、2 時間 incubate した後、4°C に保存し、24 時間後に沈降物を遠心分離し、吸収抗血清とし、凍結保存した。

実験成績

Primogonyl の抗原性：Primogonyl を抗原として免疫した家兎抗血清は第 3 週に於てすでに O 法上沈降反応を認めた。免疫終了後の抗血清と Primogonyl との反応は写真 1、2 の如くであり、48~72 時間以後に於て明確な沈降帯として観察され、125~1000iu/cc の抗原濃度では 2~3 個の反応帯が、62.5iu/cc 以下の濃度では 1 個の反応帯が認められた。この反応から Primogonyl には 2~3 個の抗原が存在することが推測された。

家兎抗血清の特異性：複数の抗原性が認められた Primogonyl を使つて免疫した家兎抗血清の性状を知るために抗体分析を行つた。各種の血清試料と抗血清との反応を行つてみると写真 3 の如くであり、妊婦血清及び胞状奇胎患者血清との間には 2 個の沈降帯を認め、健康男女の血清との間にも 1 個の反応帯を認めた。詳細に観察すると妊婦血清、胞状奇胎患者血清の外側沈降帯は胞状

昭和38年12月1日

宮 河

1357—65

写真 1



写真 2

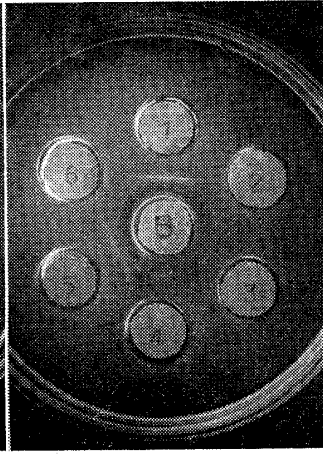


写真 3

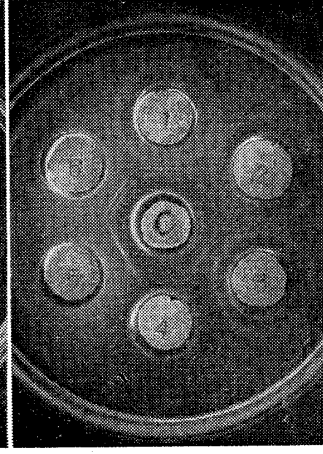
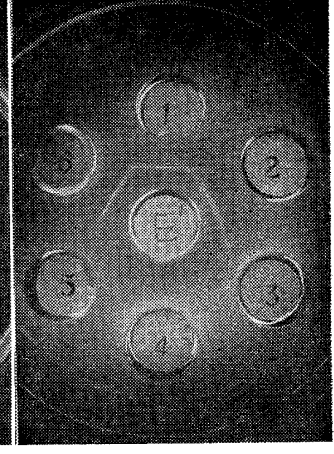


写真 4



A. Crude Antiserum

1. Primogonyl 1000iu
2. " 500iu
3. " 250iu
4. " 125iu
5. " 62.5iu
6. " 31.25iu

B. Crude Antiserum

1. Primogonyl 1000iu
2. Anteron 1000iu
3. ACTH 10iu
4. Prolactin 100iu
5. 胞状奇胎患者尿抽出液
6. Hypohorin 10KE

C. Crude Antiserum

1. 妊婦血清
2. 正常非妊婦人血清
3. 正常男子血清
4. 正常家兎血清
5. 胞状奇胎内溶液
6. 胞状奇胎患者血清

E' Crude Antiserum

1. Pimogonyl 500iu
2. 正常非妊婦人尿抽出液
3. Prolactin 100iu
4. Hypohorin 10KE
5. Anteron 1000iu
6. 人血漿

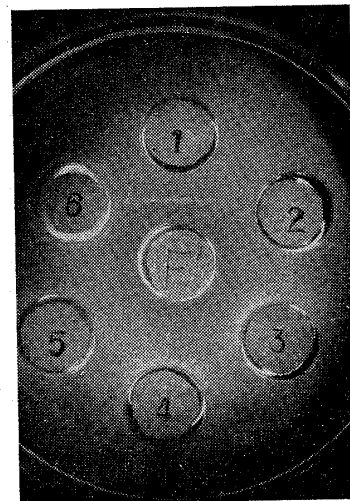
奇胎内容液の反応帯に連絡し、同じく内側帯は健康男女血清の沈降帯と連続しており、抗血清中にはHCGに対する抗体以外に血清蛋白と非特異的に反応する抗体があることが明らかとなった。尿蛋白成分との反応に於ても写真4, 6の如く健康婦人尿抽出物の間に非特異性反応帯を認め、健康男子尿抽出物でも略く同様の結果がえられ、尿蛋白成分に対する非特異性抗体の存在することが明らかとなった。

Prolactin, Anteron, ACTH, Hypohorin との間には沈降帯は認められなかった(写真2)。

Antihormone の確認: 家兎抗血清中に存在する非特異性抗体を吸収操作によつて除去を行い、吸収抗血清として反応を行うと写真5, 6の如く Primogonyl とは唯1個の沈降帯で反応し、尿抽出物、血清成分との間には反応帯は認められなかった。妊婦、胞状奇胎並びに絨毛上皮腫患者などの血清及び尿抽出物との間に於ても唯1個の反応帯を認め、HCGを含む試料に対してのみ特異性反応を示した。

以上の成績をまとめてみると第2表の如くなり、O法により Primogonyl の抗原性を検討した結果、2~3個の抗原が存在することがわかり、HCG以外に血清蛋白、尿蛋白成分の Contamination のあることが明らかになった。抗血清をこれらの成分と反応させ、吸収操作を加えるとHCGに対してのみ特異的であり、Antihor-

写真 5



F' Absorbed Antiserum

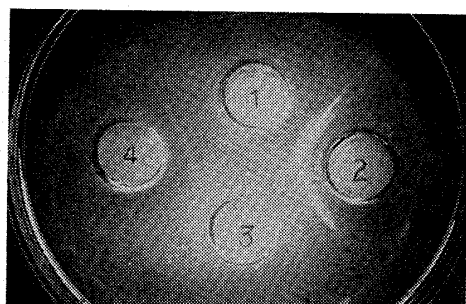
1. Primogonyl 500iu
2. 正常非妊婦人尿抽出液
3. Prolactin 100iu
4. Hypohorin 10KE
5. Anteron 1000iu
6. 人血漿

mone との間の特異性反応と考える事が出来た。

免疫学的妊娠反応への応用

1960年, Wide¹⁾ らが従来の反応形式から脱し、Hem-agglutination Inhibition Reaction (以下HAI Rと略

写真 6



1. Primogonyl 500iu
2. Crude Antiserum
3. 正常非妊婦人尿抽出液
4. Absorbed Antiserum

第2表 Primogonyl の抗原分析

抗 原	抗 体	吸 収	
		抗血清	抗血清
Primogonyl	HCG	++~+++	+
Prolactin	LTH	—	—
Anteron	PMS	—	—
ACTH	ACTH	—	—
Hypohorin	PG, TSH etc	—	—
健康男子血清	血清成分	+	—
健康女子血清		+	—
人血漿 (プラズマ)		++	—
正常家兎血清		—	—
妊婦血清		++	+
絨毛上皮腫患者血清		++	+
胞状奇胎患者血清	尿 成 分	++	+
胞状奇胎内容液		+	+
健康男子尿抽出液		++~+++	—
健康女子尿抽出液		++	—
妊婦尿抽出液		++	+
絨毛上皮腫患者尿抽出液		++	+

記) によつて短時間に、特異的に尿中HCGのImmunoassayが可能であると発表して以来多くの追試検討が加えられて来た。本邦でも石塚ら^{7)~10)}、谷沢^(46) 47) 49)、吉村ら⁴⁸⁾、古賀ら⁵⁰⁾によつてその特異性の検討が行われて来たが、本反応は鋭敏ではあるが、反応が恒常的となる迄には可成りの熟練が必要である事が示された。

1962年、Robbins ら⁶⁾は蛋白質を吸着しやすい Polystyrene latex を利用し、Latexagglutination Inhibition Reaction (以下 LAIR と略記) により HCG の Immunoassay が可能であると発表し、純粋な試料にもとづ

く実験結果から臨床応用の可能性を示唆した。

そこで著者は上述した抗血清の特異性に関する知見をもとにして、LAIRの臨床試料に於ける特異性につき検討した。

実験材料並びに実験方法

Latex のHCG感作；Primogonyl 750iu を pH 7.4 の Phosphate Buffered Saline 29cc に溶解し、Polystyrene latex (Difco. Bacto Latex 0.81) を 1 cc 加え、よく振盪混合し、室温で12時間放置し、Latex のHCG感作を待ち、4°C に保存した。

抗血清の調整：LAIRに使用した抗血清はHCGに対してのみ特異性を有する吸収抗血清を使用した。吸収抗血清は先に述べた方法で調整し、次のLARによつて抗体価を決定し、抗血清の稀釈を行った。

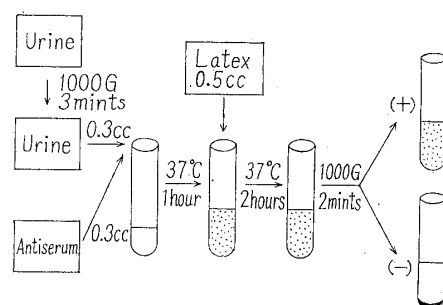
Latexagglutination Reaction (LAR)；LAR系を抗血清の抗体価決定に利用した。即ち抗血清 0.8cc を段階稀釈し、各試験管に生理的食塩水 0.3cc を加え、更に感作 Latex 0.5cc を混入し、37°C、2時間、incubate し、2時間後1000G、2分間高速遠心にかけ、判定した。LARの起つた試験管は Latex が沈澱し、透明の試験管となる。

著者がえた抗血清は 256×、512×の Titre を有し、吸収抗血清では 128×、256×の Titre であった。

Latexagglutination Inhibition Reaction；実験操作：LAIRの一般操作は Robbins ら⁶⁾の方法に従つたが、第1図の如く簡易化した。即ち尿をあらかじめ遠心し、浮遊物を除き、上清 0.8cc と抗血清 0.8cc とを小試験管 (内径10mm、長さ75mm) にとり、37°C、1時間 incubate し、次いで感作 Latex 0.5cc を加え、再び37°Cに incubate した。2時間後1000G、2分間、高速遠心にかけ判定した。

判定 (写真7)：妊娠反応陽性：尿中HCGによつて抗血清の中和が起こり LAIR が成立し、試験管は白濁

第1図 免疫学的妊娠反応

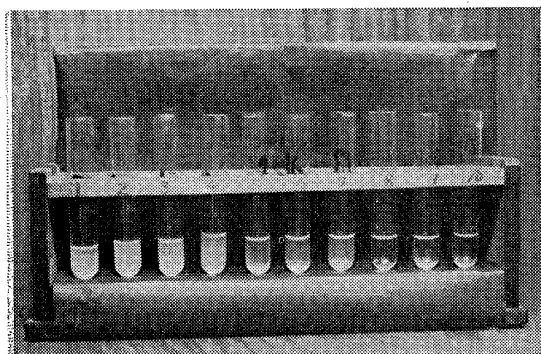


昭和38年12月1日

宮 河

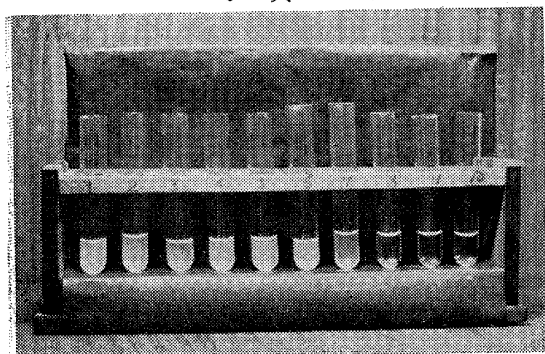
1359—67

写 真 7



No. 1～4 妊娠反応陽性 (+)
 No. 5～7 妊娠反応偽陽性 (±)
 No. 8～10 妊娠反応陰性 (-)

写 真 8



No. 1～6 LAIR (+)
 No. 7 LAIR (±)
 No. 8～10 LAIR (-)

している。

妊娠反応陽性：抗血清の中和が起こらないのでLAIRが成立し、試験管は透明となる。

妊娠反応偽陽性：尿中HCGにより抗血清の一部が中和され、部分的にLAIRが成立し、試験管は或る程度の混濁度を有する。これを次の判定基準に従った。

判定基準(写真8)：Primogonylの希釈液(40000～5000iu/c)を作り、LAIRの限界を求めると第3表の如くであった。従ってInhibitionの限界は8000～10000iu/lの範囲にあり、10000iu/lに於ける混濁度をもつて判定基準とした。

尿中HCGの定量法：尿を倍数希釈し、LAIRによつて尿中HCGの定量を行った。

実験成績

正常妊娠婦人：妊娠2～11カ月(妊娠5～42週)迄の223例の成績は第4, 5, 6, 7表の如くである。即ち

妊娠2～4カ月(91例)では98.9%, 妊娠5～7カ月(58例)では94.8%, 妊娠8～11カ月(74例)では85.1%の陽性率であった。また妊娠前半期(113例)の陽性率は99.1%であったが、妊娠後半期(110例)では86.4%と稍々陽性率は低下した。

胞状奇胎, 絨毛上皮腫患者など：胞状奇胎(15例), 絨

第3表 Primogonyl によるLAIRの限界

	HCG iu/l	I	II	III
1	40000	+	+	+
2	32000	+	+	+
3	25600	+	+	+
4	20000	+	+	+
5	16000	+	+	+
6	12800	+	+	+
7	10000	±	+	±
8	8000	-	-	-
9	5000	-	-	-
10	Saline	-	-	-

第4表 Immunological Pregnancy Test 妊娠月数による成績

Ms	No.	Positive		false negative	
		No.	%	No.	%
II	20	19	95.0	1	5
III	38	38	100	0	0
IV	33	33	100	0	0
V	22	22	100	0	0
VI	24	22	91.6	2	8.4
VII	12	11	91.6	1	8.4
VIII	11	10	90.9	1	9.1
IX	21	18	85.7	3	14.3
X	33	28	84.8	5	15.2
XI	9	7	82.4	2	17.6
Total	223	208	93.3	15	6.7

第5表 Immunological Pregnancy Test 妊娠前, 中, 後期による成績

Ms	No.	Positive		false negative	
		No.	%	No.	%
II～IV	91	90	98.9	1	1.1
V～VII	58	55	94.8	3	5.2
VIII～XI	74	63	85.1	11	14.9
Total	223	208	93.3	15	6.7

第6表 Immunological Pregnancy Test 妊娠週数
による成績 (1)

Ws	No.	Positive		false Negative	
		No.	%	No.	%
5	1	1	100	0	0
6	4	4	100	0	0
7	6	6	100	0	0
8	9	8	88.8	1	11.1
9	10	10	100	0	0
10	9	9	100	0	0
11	14	14	100	0	0
12	5	5	100	0	0
13	6	6	100	0	0
14	9	9	100	0	0
15	8	8	100	0	0
16	10	10	100	0	0
17	6	6	100	0	0
18	6	6	100	0	0
19	4	4	100	0	0
20	6	6	100	0	0
21	6	6	100	0	0
22	7	6	85.7	1	14.3
23	7	7	100	0	0
24	4	3	75	1	25
25	5	4	80	1	20

毛上皮腫患者 (12例) の処置前後並びに子宮外妊娠の疑 (4例) に於ける成績は第8表の如くである。全例共 Friedman 反応と一致した。

非妊婦人：子宮頸癌 (36例), 子宮筋腫 (10例), 膣部癰爛患者など (63例) の非妊婦人 109例の成績は第9表の如くであり, 頸癌患者1例に偽陽性を認めたのみで他は全例共陰性反応を示し, 99.1%の陰性率であつた。

Friedman 反応との比較：Friedman 反応 (200単位) と平行して行つた35例の成績は第10, 11表の如くで

第7表 Immunological Pregnancy Test 妊娠週数
による成績 (2)

Ws	No.	Positive		false Negative	
		No.	%	No.	%
26	4	4	100	0	0
27	1	1	100	0	0
28	2	2	100	0	0
29	2	2	100	0	0
30	4	4	100	0	0
31	4	3	75	1	25
32	1	1	100	0	0
33	4	4	100	0	0
34	3	3	100	0	0
35	7	5	71.4	2	28.6
36	7	6	85.7	1	14.3
37	5	5	100	0	0
38	13	10	76.9	3	23.1
39	8	7	87.5	1	12.5
40	7	6	85.7	1	14.3
41	4	4	100	0	0
42	5	3	60	2	40
Total	223	208	93.3	15	6.7

あり, 全例共生物学的反応と一致した。

尿中HCGの定量：妊娠2～10カ月の妊婦60例の随時尿について行つたHCGの定量値は第12, 13表, 第2図の如くであり, 妊娠前期 (妊娠6～16週) に於て排泄量多く, 20000～320000iu/l, 平均115555iu/l, の定量値をえた。胎状奇胎, 絨毛上皮腫処置前後に於ける定量値は第12表, 第3図の如くであり, 胎状奇胎娩出後に於ては10000～40000iu/l 平均 23333iu/l, 絨毛上皮腫処置前では40000～160000iu/l, 平均100000iu/l, 処置後では10000～80000iu/l, 平均 37500iu/l の排泄量をそれぞれ定量出来た。

まとめ：正常妊娠, 胎状奇胎並びに絨毛上皮腫及び

第8表 Immunological Pregnancy Test 胎状奇胎, 絨毛上皮腫などの成績

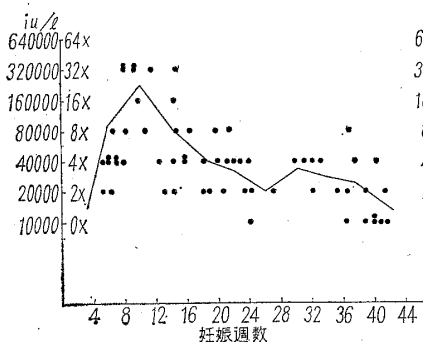
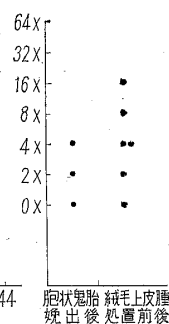
	No.	Correct			incorrect			
		Positive			false Positive		false Negative	
		No.	No.		No.	%	No.	%
胎状奇胎	15	6	9	100	0	0	0	0
絨毛上皮腫	12	8	4	100	0	0	0	0
子宮外妊娠?	4	2	2	100	0	0	0	0
Total	31	16	15	100	0	0	0	0

第9表 Immunological Pregnancy Test 非妊婦人における成績

	No.	Correct			incorrect			
		Positive	Negative		false Positive		false Negative	
		No.	No.		No.	%	No.	%
子宮頸癌	36		35	97.2	1	2.8		
子宮筋腫	10		10	100	0	0		
膣部糜爛	12		12	100	0	0		
機能性出血	10		10	100	0	0		
膣炎, その他	25		25	100	0	0		
健康人	16		16	100	0	0		
Total	109		108	99.1	1	0.9		

第10表 免疫学的妊娠反応と Friedman 反応との比較 (1)

		免疫学的 妊娠反応	Friedman 反応	
			+	—
妊 娠 の 疑		+	5	0
		—	0	4
子宮外妊娠の疑		+	1	0
		—	0	2
胞状奇胎	処置前	+	1	0
		—	0	0
	処置後	+	5	0
		—	0	5
絨毛上皮腫	処置前	+	2	0
		—	0	0
	処置後	+	6	0
		—	0	4

第2図 尿中HCGの定量
(正常妊婦)第3図 尿中HCG
の定量

非妊婦人などの368例の免疫学的妊娠反応の成績を総括すると第14表の如くなり、全体として95.6%の定性率がえられた。妊婦に於ては妊娠後半期に陽性率がやや低下

第11表 免疫学的妊娠反応と Friedman 反応との比較 (2)

	No.	Friedman 反応		比較%
		+	-	
免疫学的妊娠反応	+	20	0	100
	-	15	15	100
Total	35	20	15	100

第12表 尿中HCGの定量成績

	No.	ばらつき iu/l	平均値 iu/l
Preg. II	12	10000~320000	90000
Preg. III	5	80000~320000	240000
Preg. IV	10	20000~320000	84000
Preg. V	5	20000~80000	40000
Preg. VI	9	10000~80000	34444
Preg. VII	1	20000	20000
Preg. VIII	4	20000~40000	35000
Preg. IX	2	20000~40000	30000
Preg. X	9	10000~80000	26666
Preg. XI	3	10000~20000	13333
胞状奇胎娩出後	3	10000~40000	23333
絨毛上皮腫処置前	2	40000~160000	100000
絨毛上皮腫処置後	4	10000~80000	37500

第13表 妊娠前, 中, 後期における尿中HCGの定量値

	No.	ばらつき iu/l	平均値 iu/l
Preg II~IV	27	20000~320000	115555
Preg V~VII	15	10000~80000	35333
Preg VIII~XI	18	10000~80000	26666

したが、前半期では99.1%の陽性率がえられ、妊婦全体としては93.3%の陽性率であった。胞状奇胎、絨毛上皮

第14表 Immunological Pregnancy Test まとめ

	No.	Correct		incorrect	
		No.	%	No.	%
正 常 妊 娠	223	208	93.3	15	6.7
絨毛上皮腫, 奇胎など	31	31	100	0	0
非 妊 婦 人	109	108	99.1	1	0.9
Total	363	347	95.6	16	4.4

腫患者では 100%の定性率であり, 非妊婦人では99.1%の陰性率であった。

妊娠各期の妊婦尿についてHCGの定量を行った所, 妊娠前期に一峰性のある定量曲線がえられ, HCG排泄量が算定された。胞状奇胎娩出後, 絨毛上皮腫処置前後の患者に於てもそれぞれHCG排泄量が定量された。

考按並びに総括

HCGの抗原性について;

生物反応に於てHCGの抗原性が推論されて以来³⁰⁾³¹⁾, 今日にいたる迄免疫学的に充分な解明がえられなかったのは当時の免疫反応に於て少くとも次の諸点に問題があつたためによるものと考えられる。即ち抗体価, 抗原の純度, 或は抗血清の特異性などである。

近年に於ては比較的純粋なHCGが高単位に使用でき, Adjuvant, Booster効果を利用して免疫効果が高められ, 可成り高い抗体価がえられている^{1)~6)45)}。Sulman³⁵⁾が Antihormone を確認できなかったのは抗体価が低かつた事によるものと考えられる。

免疫抗原が純粋である事は免疫反応に於て第1要件であるが, 化学的に純粋なものが抗原性に於ても単一であるとは限らないようである。緒方⁶¹⁾は結晶性ニワトリ卵白アルブミンが免疫学的に単一でなかつた事実を述べている。HCGに関しても Brody ら⁵²⁾⁵³⁾は高度に純化したHCG結晶⁷⁶⁾を免疫抗原として抗血清を作り, 免疫反応に使用した結果, 非特異性反応が起る事を認めており, また Mc Kean⁵¹⁾は Commercial HCG を Amb-erlite IRA 400によつて純化し, 免疫抗原として使用し, 比較的 Contamination の少い抗血清がえられたと述べているが, 非特異性反応が起ることを認めている。これらの事実は上述した抗原性の複雑さを示しているものとも考えられるが, 多くの研究者^{44)45)55)62)72)~74)}は純粋なHCGを免疫抗原として利用出来ないため, 比較的純粋と考えられる commercial HCGを使用し, 動物を免疫しており, 抗血清中に非特異性抗体の存在することを報告している。著者はO法によつてこれらの非特異性抗体

が血清蛋白, 尿蛋白成分と反応することを明らかにし, 抗原として使用した Primogonyl にこれらの蛋白成分の Contamination があることを明らかにした。この結果は Blobel ら⁶³⁾が Dewex を使つて Primogonyl を3つの蛋白成分に分離した実験結果と良く一致している。

Ehrlich³³⁾³⁴⁾, Twombly³⁶⁾ らが Antihormone の確認を決定的に行えなかつたのはこれらの非特異性反応の介入があつたためと考えられる。Midgley ら⁶²⁾は Immunoelectrophoresis により詳細に抗体分析を行った所, 8~10箇に分離したと述べている。従つて commercial HCGの純度に於ては, 種々なる非特異性抗体の產生は避けられないものと考えられるが, Hormone 中の夾雑物が強い抗原性を有し, Antihormone の產生を阻害すると Gordon⁶⁴⁾が述べており, HCGの抗原性を高かめるためには Mc Kean⁵¹⁾が行つた程度の純化操作が必要ではないかと考えられる。

白井³⁸⁾は牛下垂体抽出物で免疫してえた抗血清が in vivo に於て人胎盤エキスのHCG作用を中和する現象を報告し, HCGとLHとが抗原性に於ても類似することを認め, Wide ら²⁾⁴⁾も in vivo, in vitro に於てHCGとLHとが交叉反応を起こすことを認めており, 生物学的活性と同様に抗原性の上でも興味ある問題が示されている。

免疫学的妊娠反応について;

現在迄に行われて来た各種の免疫学的妊娠反応の主なものは次の如くである。

1. 皮膚反応³⁶⁾
2. 沈降反応³⁶⁾⁴³⁾⁵¹⁾⁵⁵⁾
3. 補体結合反応^{52)~54)}
4. HAIR^{1)~5)}
5. LAIR⁶⁾

沈降反応, 補体結合反応は1934年以降HCGの免疫反応として最も広く利用されて来ており, 近年に於ても Mc Kean⁵¹⁾は沈降反応によつて臨床応用が可能であると発表しており, Brody ら^{52)~54)}も補体結合反応によつて血中HCGの定量を行つており, 詳細な報告が行われているが, 長時間を要する点がやゝ難点とされている。Wide ら¹⁾が1960年発表したHAIRはその後臨床試料について詳細な検討が加えられ, 鋭敏な反応性が示されているが, 実験試料の調整がやゝ複雑であり, 反応が恒常的となる迄には可成りの熟練が必要である。

Robbins ら⁶⁾が1962年に発表したLAIRは本来 Rheumatoid Arthritis^{65)~67)}, Histoplasmosis⁶⁸⁾などの診断に利用されていたLARをHCGの Immunoassay に迄発展せしめたものであり, HAIRに於ける複雑性を解消し, Immunoassay に更に実用性をもたらしたと云

える。即ち比較的簡単な操作によつて反応が恒常的となり、試料の調整も簡単である。この安定した反応性を利用して米国ではすでに製品化され、臨床応用の段階にいたっており、本邦でも石塚ら⁹⁾¹⁰⁾は92例の成績を発表しており、その他数氏⁶⁹⁾⁷⁰⁾の報告がみられる。

免疫学的妊娠反応に特異性をあたえるためには非特異性反応を除去する事であり、このためには抗原、抗体のうち少くともいずれか一方が純粋であればその可能性が生じて来る。諸家の非特異性反応の回避法をみると、1) 抗原の純化⁵¹⁾、2) 非特異性抗体の吸収⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁵⁴⁾⁷²⁾

3) 抗原、抗体の組合^{1)~5)}、4) 稀釈法^{1)~5)20)}などがあげられる。著者を含めて多くのものは吸収法によつて妊娠反応の特異性をえているが、Wide⁴⁾は吸収法以外に2種類の抗原から多数の抗血清を作り、抗原と抗血清の組合わせを検討し、特異性のある反応がえられたと述べている。

免疫学的妊娠反応の特異性の第2の問題点はLHとの交叉反応の問題である。Keele⁵⁵⁾は沈降反応に於てFSH、LHとの間には交叉反応は認めておらず、Mc Kean⁵¹⁾は更年期婦人がfalse Positiveを示したことからその可能性があると述べている。Wide⁴⁾はHAIRで鋭敏度を増すと定性率に影響したと述べ、逆に交叉反応を利用してLHの定量を行つた所、更年期婦人では最高0.4 iu HCG/ccの値であつたと報告している。Goss⁷⁵⁾もLAIRに於てLHがInhibitorとして反応に介入する事を認め、LHの定量に応用している。著者が行つたO法では哺乳動物のLHとの間には反応は認められなかつた。この意味に於て免疫学的妊娠反応は絶対的な特異性をもつた反応とは云い切れない所があるが、次に述べる感度の点から著者及び諸家の反応には交叉反応の影響はまず回避されているものと考えられる。

従来の生物学的妊娠反応の感度はFriedman反応に於ては藤井⁷⁷⁾は3 iu、東条⁷⁸⁾はPrimogonylを使つて5~10iuであると述べ、Mainini反応では諸家の成績は30~70iu、約40iuと報告されている⁷⁹⁾。免疫学的妊娠反応ではWide⁴⁾らは0.6~1.0iu/cc、Lunenfeld⁴⁵⁾は 2.8 ± 1.3 iu/cc、補体結合反応ではBrody^{52)~54)}は0.1~0.5iu/cc、沈降反応ではMc Kean⁵¹⁾は8 iu/ccであつたとそれぞれ報告されている。著者の行つたLAIRでは10iu/ccであり、諸家の成績よりも稍高い値であつた。従つて妊娠後半期に於てfalse Negativeの例があつたのはこのためによるものと考えられる。今後少くとも5 iu/ccに定性限界をさげる必要があり、更に検討の余地があるものと考えている。

Wide⁴⁾は2701例について検討を行い、妊婦1526例で

は99.8%の陽性率をえており、胎状奇胎、絨毛上皮腫でも100%の定性率がえられている。Schuyler⁴³⁾は沈降反応で200例を検討し、陽性率93.4%の成績を報告している。

LAIRではCopeland⁷¹⁾は1390例をPregnancy test kitを使つて検討し、定性率97.5%、false Negative 2%、false Positive 0.5%の成績を報告している。著者の成績では妊娠初期98.9%、中期94.8%、後期に於て稍々陽性率の低下をみたが、全体として93.3%の成績であつた。これらの成績は随時尿について行つた成績であり、早朝尿について行えば更に陽性率は上るものと考えている。非妊婦人、胎状奇胎、絨毛上皮腫患者に於ても良好な結果がえられた。定量成績でもwide⁴⁾の成績と略々一致し、Brody⁵³⁾⁵⁴⁾の血中HCG量と平行関係を認めた。しかし胎状奇胎、絨毛上皮腫の予後追求のためには更に感度の高い反応系が要求されるものと考えられるからこの点検討の必要がある。

著者が行つたLAIRによる免疫学的妊娠反応には猶多くの改良すべき点があるものと思われるが、多くの試料を一度に、短時間に、Bioassayに於ける如き煩雑性なくして容易に行えると云う点に重要な意義があるものと考えられる。従つて妊娠の診断はもとより子宮外妊娠、胎状奇胎、絨毛上皮腫などの診断に於ける臨床的意義は極めて大であると考えられる。

結 論

著者はPrimogonylによつてHCGの抗原性を検討し、Robbinsらの免疫学的妊娠反応の臨床応用を行い、次の結果をえた。

1) Commercial HCG, PrimogonylはOuchterlony法による抗原分析の結果、HCG以外に血清蛋白、尿蛋白成分のContaminationがあつた。

2) 家兎抗血清中には血清蛋白、尿蛋白成分と非特異的に反応する抗体が産生される事が明らかとなつた。

3) 家兎抗血清を血清蛋白、尿蛋白成分によつて吸収操作を加えるとHCGを含む試料に対して特異性を示し、Antihormoneの確認が可能であつた。

4) LAIRは吸収抗血清を使用することによつてHCGに対して特異性反応を有し、定性感度10iu/ccでもつて免疫学的妊娠反応として臨床応用出来た。

5) 即ち正常妊婦223例では妊娠初期98.9%、中期94.8%、後期85.1%の陽性率であり、後期に稍々陽性率の低下をみたが、全体としては93.3%の陽性率であつた。

6) 外妊の疑, 胎状奇胎, 絨毛上皮腫患者では 100% の定性率であった。

7) 子宮筋腫, 子宮頸癌などの非妊婦人に於ては99.1%の陰性率であった。

8) Friedman 反応と平行して行つた35例は全例共一致した。

9) 363例に行つたL A I Rの定性率は95.6%であった。

10) 正常妊婦の尿中HCGの定量を行い, 妊娠初期に一峰性のある定量曲線がえられ, 妊娠初期11555iu/l, 中期 35333iu/l, 後期 26666iu/l, の定量値をえた。

11) 胎状奇胎, 絨毛上皮腫患者に於ても治療処置後のHormone 定量が可能であった。

(本論文の要旨は第15回日本産科婦人科学会総会に於て発表した。)

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石塚教授に深く感謝します。尚, 終始御協力を戴いた風戸学士並びに教室員各位に感謝します。

文 献

- 1) Wide L., Gemzell C.A.: Acta Endocr., 35, 261, 1960. — 2) Wide L., Roos P., Gemzell C.: Acta Endocr., 37, 445, 1961. — 3) Wide L., Gemzell C.: Acta Endocr., 39, 539, 1962. — 4) Wide L.: Acta Endocr., 41, Suppl., 70, 1962. — 5) Mishell D., Wide L., Gemzell C.A.: J. Clin. Endocr. Met., 23, 125, 1963. — 6) Robbins J.L., Hill C.A., Carle B.N., Carlquist J. H., Marcus S.: Proc. Soc. exp. Biol., 109, 321, 1962. — 7) 石塚直隆, 平野貞治, 吉村靖夫: 産婦の進歩, 13, 359, 1961. — 8) 石塚直隆, 加納泉, 宮河昭夫, 風戸貞之: 第34回東海産科婦人科学会 (1962). — 9) 石塚直隆, 宮河昭夫, 風戸貞之: 第15回日産婦会総会 (1963). — 10) 石塚直隆, 宮河昭夫, 風戸貞之: 産投投稿中 (1963). — 11) Arquill E.A., Stavitsky A.B.: J. Clin. Invest., 35, 458, 1956. — 12) Arquill E.A., Stavitsky A.B.: J. Clin. Invest., 35, 467, 1956. — 13) Allison A.C., Humphrey J.H.: Immunol., 3, 95, 1960. — 14) Slatyer J.D.H., Samaan N.A., Fraser R., Stillman D.: Brit Med. J., 1, 1712, 1961. — 15) Hales C.N., Randle P.J.: Lancet, 1, 200, 1963. — 16) Cline M.T., Fishman J.: Endocr., 67, 273, 1960. — 17) Werner S.C., Otero-Duiz E.: Nature, 185, 472, 1960. — 18) Mc Kenzie T.M., Fishman J.: Proc. Soc. exp. Biol., 105, 126, 1960. — 19) Pascasio F.M., Selenkow H.A.: Endocr., 71, 254, 1962. — 20) 諏訪域三: 日内泌誌, 38, 1114, 1963. — 21) Knobil E., Wolf R.C., Greep R.O., Wilhelm A.E.: Endocr. 60, 160, 1957. — 22) Read C.H., Stone D. B.: Am. J. Dis. Child., 96, 538, 1958. — 23) Hayashida T., Li C.H.: Endocr., 63, 487, 1958. — 24) Grumbach M.M., Kaplan S.L., Solomon S.: Nature, 185, 170, 1960. — 25) Trenkle A., Mondgal N.R., Sadri K.K., Li C.H.: Nature, 192, 260, 1961. — 26) Giradd J., Vest M., Roth N.: Nature, 192, 1051, 1961. — 27) Dominguez J.M., Pearso O.H.: J. Clin. Endocr. Met., 22, 865, 1962. — 28) Hayashida T.: Endocr. 70, 846, 1962. — 29) Marshall J.M.: J. Exp. Med., 94, 21, 1951. — 30) Zondek B.: cit. in 4). — 31) Mc Phail M.K.: J. Physiol., 80, 105, 1933. — 32) Seyle H., Collip J.B., Thomson D.L.: Proc. Soc. exp. Biol., 31, 487, 1934. — 33) Ehrlich H.: Wein. Klin. Wschr., 47, 1323, 1934. — 34) Ehrlich H.: Wein. Klin. Wschr., 48, 410, 1935. — 35) Sulman F.: J. Exp. Med., 61, 1, 1937. — 36) Twombly G.H.: Endocr., 20, 311, 1936. — 37) 白井貞次郎: 近畿婦会誌, 11, 1341, 1928. — 38) 白井貞次郎, 丹正巖: 日産婦誌, 3, 82, 1951. — 39) 白井貞次郎, 宮本弥福: 日産婦誌, 4, 8, 1952. — 40) 丹正巖, 宮本弥福, 白井昭二: 日大医学誌, 11, 713, 1952. — 41) 丹正巖, 宮本弥福, 白井昭二: 日大医学誌, 11, 716, 1952. — 42) Cohen H. R., Freda V.C.: Proc. Soc. exp. Biol., 43, 22, 1940. — 43) Schuyler L. H., Anderson K., Saslaw S., Erickson C.C.: Proc. Soc. exp. Biol., 75, 517, 1950. — 44) Rao S.S., Schahani S.K.: Immunol., 4, 1, 1961. — 45) Lunenfeld B., Isersky C., Selensnyak M.C.: J. Clin. Endocr. Met., 22, 555, 1962. — 46) 谷沢修: 産婦の進歩, 13, 359, 1961. — 47) 谷沢修: 産婦の進歩, 15, 34, 1962. — 48) 吉村靖夫, 田守陳哉, 平野貞治, 須川信: 産婦の進歩, 15, 34, 1962. — 49) 磯島晋三, 谷沢修: 第36回日内泌学会総会シンポジウム (1963). — 50) 古賀康八郎, 楠田雅彦, 嶋崎要, 空閑茂登: 日内泌誌, 38, 特別号, 105, 1963. — 51) McKean C.M.: Am. J. Obst. Gynec., 80, 596, 1960. — 52) Brody S., Carlström G.: Lancet, II 99, 1960. — 53) Brody S., Carlström G.: Nature 189, 841, 1961. — 54) Brody S., Carlström G.: J. Clin. Endocr. Met., 22, 564, 1962. — 55) Keele D.K., Demple J., Webster J.: J. Clin. Endocr. Met., 22, 287, 1962. — 56) Aschheim S., Zondek B.: Klin. Wschr., 6, 1322, 1927. — 57) Friedman M.H.: Am. J. Physiol., 90, 653, 1929. — 58) Ouchterlony Ö.: Acta Path. Microbiol. Scand., 25, 186, 1949. — 59) 松橋直: 臨床病理, 特集第2号, 203, 1955. — 60) Katzman P.A., Doisy E.A.: J. Biol. Chem., 106, 125, 1934. — 61) 緒方富雄, 島田正雄: 血清免疫学雑誌, 2, 17, 1941. — 62) Midgley A.R., Pierce G.B., Weigle W.D.: Proc. Soc. exp. Biol., 108, 85, 1961. — 63) Blobel R., Uhlig H., Schumacker G.: Acta Endocr., 67, 72, 1962. — 64) Gordon A.S.: Endocr., 29, 35, 1941. — 65) Singer J.M., Plotz C.M.: Am. J. Med., 21, 888, 1956. — 66) Rheims M.S., Mc Coy F.W., Burrell R.G., Buehler E.V.: J. Lab. Clin. Med., 50, 113, 1957. — 67) Rothermich N.O., Philips V.K.: J. Am. Assoc., 164, 1999, 1957. — 68) Saslow S., Carlisle H.N.: Proc. Soc. exp. Biol., 97, 700, 1958. — 69) 水野潤三, 船曳和子, 天野智子, 岡野須子: 産婦の進歩, 15, 35, 1962. — 70) 古賀康八郎, 楠田雅彦, 嶋崎要, 空閑茂登: 産婦の世界, 15, 203, 1963. — 71) Copeland B.E.: J. Am. Med. Assoc., 179, 184, 1962. — 72) Kiistala U., Kaivola S., Axelsson E.: Ann. Med. Exp. Fenn., 40, 414, 1962. — 73) Kaivola S., Kiistala U., Axelsson E.: Ann. Med. Exp. Fenn., 40, 419, 1962. — 74) Kaivola S., Kiistala U., Axelsson E.: Acta Endocr., 42, 395, 1963. — 75) Goss D.A., Taymor M.L.: Endocr., 71, 321, 1962. — 76) Claesson L., Hogberg B., Rosenberg T.H., Westman A.: Acta Endocr., 1, 1, 1948. — 77) 藤井久四郎: 産婦の世界, 4, 1019, 1952. — 78) 東条伸平: 産婦の進歩, 15, 35, 1962. — 79) 古賀康八郎: 産婦人科選書 (医学書院), 3, 72, 1954.

(特別掲載 No. 1665 昭38・10・7 受付)