

免疫学的妊娠反応に関する研究

大阪大学医学部産科婦人科学教室（主任 足高善雄教授）

谷 沢 修

概要 絨毛性ゴナドトロピンの異種動物に対する抗原性を利用した Immunoassay は1960年 Wide らによつて特異性の高い方法として臨床応用の可能性が示された。著者は Immunoassay を実用化する為、抗原の純度に検討を加えた後 passive haemagglutination inhibition technique (H.I.T.) による定性的妊娠反応の特異性と簡易迅速な定量法の臨床応用について検討し、次の成績を得た。

- (1) complete Freund's adjuvant を用いた免疫方法により5000 I.U. 以下の抗原量で充分抗体価を上昇せしめる事が出来た。
- (2) gel 内沈降反応により市販 H.C.G. 製剤及び抽出 H.C.G. (Gurin 法) には血清 albumin を主とする爽雜蛋白質を数種類認めた。
- (3) H.I.T. では H.C.G. 0.03 I.U./cc (m μ g level) の微量を検出できたが、この反応系の鋭敏度を調整して尿中 H.C.G. 1200~2400 I.U./l で陽性となる様にすると妊娠反応的中率は99.6% (854例) となった。
- (4) 以上の成績は抗血清をそのまま用いた結果であるが、定性妊娠反応に於て血球感作に市販 H.C.G. 製剤程度の純度のものを用いても特異的抗 H.C.G. 抗体の高い抗血清であれば吸収操作は不必要であると思われる。
- (5) 定量的測定を妊娠各時期の正常妊婦 227例と流早産・切迫流産等の25例について行つたところ従来の Bioassay のよく一致した成績を示した。
- (6) 子宮外妊娠の補助診断に用い26例中24例に陽性を見た。特に定量的測定により役立つ事が多かった。
- (7) 絨毛性腫瘍患者尿中 H.C.G. も同様にして測定しうる事がわかつた。
- (8) Friedman 反応による定量値との間には、10 I.U./l (H.I.T.) $\doteq$ 1 Rab. U./l (Friedman) の関係が成立した。

I. 緒 言

絨毛性ゴナドトロピン (H.C.G.) が異種動物に対して抗原性を有する事は既に1931年 Zondek¹⁾ その他の人々²⁾³⁾⁴⁾によつて報告され、Collip⁵⁾ により Antihormon と呼称された。併し当初の方法ではその特異性にも問題があり、且つ亦 in vitro に於て微量な抗原の assay に利用しうる鋭敏な方法がなかつたので、妊娠反応としての臨床応用には程遠かつた。

最近免疫化学の進歩に伴い、Insulin, Growth hormon 等の免疫学的測定 Immunoassay⁶⁾⁷⁾ を行いうる事が知られてより、H.C.G. に関しては Wide らの Paessive haemagglutination^{8)~11)} や、補体結合反応¹²⁾、沈降反応¹³⁾、Latex agglutination¹⁴⁾¹⁵⁾ 等の報告が相次いでいる。

著者は Immunoassay を実用化する為、市販 H.C.G. 製剤等を抗原に選び passive haemagglutination inhi-

bition test (以下 H.I.T. と略) による定性的妊娠反応の特異性と、簡易迅速な定量法の臨床応用について検討し若干の知見を得たのでその大要を報告する。

II. 基礎実験

「H.C.G.」抽出物の抗原活性物質について

「H.C.G.」は既に数種類の市販製剤があり、又 Gurin 等¹⁶⁾は妊婦尿より抽出してかなり純度の高い事を報告している。併しこれ等「H.C.G.」は未だ均質な物とは考え難いので、著者は先ず免疫学的妊娠反応に用いる「H.C.G.」抗原を Gel 内沈降反応等により検索し爽雜物質についてこれを明らかにせんとした。

次に著者は精製 H.C.G. (Gurin 法) を副標準品に用い、H.I.T. による妊娠反応を routine 化する為の諸条件を決定した。なお同時に絨毛性腫瘍患者の尿中排泄 Gonadotropin の抗原性についても免疫化学的検討を加えた。

実験材料並びに方法

(1) 抗血清の調製

(i) 抗原；市販 H.C.G. 製剤 Primogonyl (以下 H.C.G.-P と略) 及び妊婦尿より抽出精製 (Gurin 法) したものの (以下 H.C.G.-G と略) の2種類を用いた。

免疫方法；(i) 第1次免疫 上記抗原の生理的食塩水 (以下生食水と略) 溶液を Complete Freund's adjuvant¹⁷⁾ と等量混合し雌性成熟家兎の両足蹠趾間及び背部皮内に各 0.1cc ずつ20カ所に注射した。

(ii) 第2次免疫 (booster injection) 第1次免疫より2週間後に (a) 3日間隔で500~1000 I.U. を2回筋注射し (No. 1~8), (b) 2週間毎に5000~6000 I.U. を2, 3回静注した。

(iii) 採血 最終注射より7日後試験採血の上, 心臓穿刺により全採血し血清を分離, 56°C 30分間非飮化し0.01%の割合に sodium merthiolate を加え-20°Cに凍結保存した。

(2) 抗血清による生物学的活性の中和

幼若ラット卵巣重量法¹⁸⁾を用い, H.C.G.-G 100~300 I.U. に抗 H.C.G.-G 血清 (No. 11) 0.1cc を (対照：正常家兎血清 0.1cc) 加え, 4°Cに約12時間放置後遠沈し上清を用いた。

(3) Gel 内沈降反応による分析

(i) Ouchterlony 法¹⁹⁾；Difco Bacto-Agar Standard を pH7.2, 0.15M 磷酸緩衝生食水に1.4%に溶解し0.01%の割合に sodium merthiolate を加えた。抗原溝には H.C.G.-P (1000~2000 I.U./mg: Folin 法による蛋白量からの推定) 2000 I.U./cc 生食水溶液, H.C.G.-G (3000~4000 I.U./mg) 2635 I.U./cc 生食水溶液, 正常妊婦血清, 正常男子尿濃縮液 (尿をvisking tubeに入れ Carbowax 6000で濃縮後4倍容の Ethanol 沈澱を Ether で2回洗滌乾燥し 5 mg/ccの割合で生食水に再溶解) を入れ, 抗体溝に抗 H.C.G.-P 血清 (No. 9) を入れた。反応は25°C 湿室中で行った。

(ii) Immunoelectrophoresis^{20) 21)}；Difco Bacto-Agar Standard (1%), pH8.2 Veronal 塩酸緩衝液 ($\mu=0.05$) を用い, 泳動硝子板13×9 cm, 泳動条件 2.5 Volt/cm 定電圧4~5時間とした。試料は中央に径5 mmの円筒溝を作って入れ, 正常男子血清を対照とし, 泳動後 Bromphenolblue 染色又は対応抗血清との沈降線を指標とし泳動位置を比較した。抗原には H.C.G.-P 及び, -G 5000 I.U./cc 緩衝溶液を用い, 抗血清には抗 H.C.G.-P (No. 9) 及び -G (No. 11) 血清並びに $1/10$ 容の正常男子血清を加

えて37°C 1時間 incubate 後4°Cに約12時間放置した遠沈上清を「吸収血清」として使用した。反応は25°C 湿室中で行ない7日後に写真撮影した。なお沈降弧線と生物学的活性の関係を H.C.G.-G について電気泳動直後の分画抽出液についてしらべた。

(4) 絨毛性腫瘍患者 (以下絨腫と略) の尿中排泄 Gonadotropin

(i) 生物学的活性の中和 絨腫尿から安息香酸飽和アセトン吸着法により抽出し, これを幼若ラット卵巣重量法により測定後, 正常妊婦尿抽出 H.C.G. で調製した抗 H.C.G.-G 血清 (No. 11) により中和実験を行った。

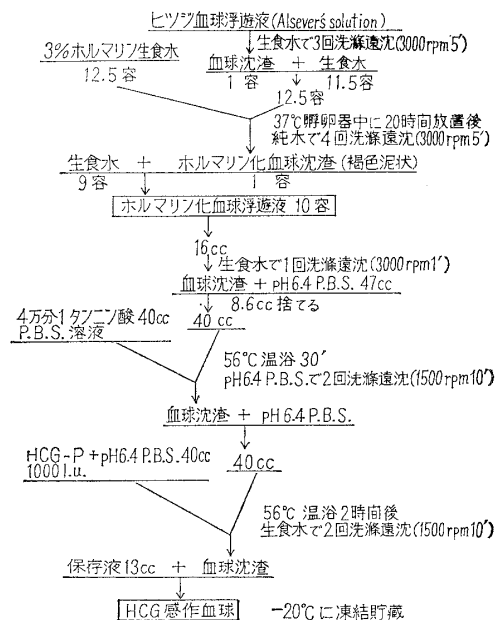
(ii) Ouchterlony 法 絨腫, 胎状奇胎, 正常男子尿より抽出 (前述(3)) し, 夫々 H.C.G.-P (5000 I.U./cc) 及び対応抗血清 (No. 9) との関係を検討した。

(iii) Immunoelectrophoresis 破壊性胎状奇胎患者血清 (本例は尿中 H.C.G. が Friedman 20万家兎単位陽性) と抗 H.C.G.-P 血清 (No. 9) の関係を検討した。

(5) passive haemagglutination 及び inhibition test (H.T. 及び H.I.T.)

H.C.G. 感作血球の調整；Wide (1961) の方法²²⁾を簡易化して次の如く行なった (第1表)。

第1表 H.C.G. 感作血球の調製方法



(i) ヒツジ血球のホルマリン化 ヒツジ血球浮遊液(Alsever 溶液中)を生食水で3回洗滌後血球沈澱1容を生食水11.5容に浮遊, これに等容の3%ホルマリン生食水(pH 7.0)を加え37°Cに20時間 incubate する。次に

純水で4回洗滌し血球沈渣(褐色泥状)を9容の生食水に再浮遊せしめる。

(ii) タンニン酸処理及び抗原感作 上記ホルマリン化血球浮遊液16ccを生食水で1回洗滌する。血球沈渣をpH6.4, 0.15M 磷酸緩衝生食水(以下 P.B.S. と略) 47ccに浮遊させ、そのうち40ccを $\frac{1}{40000}$ タンニン酸 P.B.S. 溶液40ccと混じったものに56°C浴槽で30分間 incubate した後 P.B.S. で2回洗滌する。血球沈渣に P.B.S. を加えて40ccとしこれに H.C.G.-P 1000 I.U. を溶解した P.B.S. 40ccを加え56°C 2時間 incubate 後生食水で2回洗滌し、沈渣を保存液(蔗糖10g, 正常家兎血清4cc又は bovine serum albumin; Armour 0.4g, 1% sodium merthiolate 1ccに生食水を加えて100ccとした溶液)13ccに溶解する。この H.C.G. 感作血球浮遊液は0.5ccずつ小試験管に分け-20°Cに凍結保存し、使用時に P.B.S. 1.0ccを加えて溶解し使用する。

方法; 小試験管(内径10mm, 深さ70~80mm)に P.B.S. を用いて抗 H.C.G. 血清0.45ccの倍数希釈系列を作る。次に上記 H.C.G. 感作血球浮遊液0.05ccを加え、よく振盪後室温に約2時間静置し管底に沈んだ血球像を Stavitsky の原著²³⁾に照して判定しその血清の抗体価を定めた。H.I.T. は被験液(H.C.G. 標準液又は尿) 0.4ccに抗 H.C.G. 血清希釈液0.05ccを加え振盪後たゞちに H.C.G. 感作血球浮遊液0.05ccを加え再びよく振盪してから静置し凝集又は阻止を同様の方法で判定する。

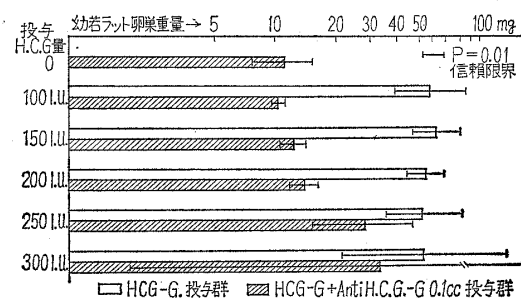
実験成績

(1) 抗血清の調製 complete Freund's adjuvant 及び booster effect を適宜用いた(第2表)結果、抗原

H.C.G. 総量 5000 I.U. 以下の家兎群(No. 1~8)はほぼ1:5120, 25000~40000 I.U. の家兎群(No. 9~13)は1:10240の抗体価(H.T.)の血清を得た。

(2) 抗血清による生物学的活性の中和 著者は H.

第1図 抗 H.C.G.-G 血清による生物学的活性の中和実験



C.G. の幼若ラット卵巢重量増加作用に対する抗 H.C.G. 血清 0.1cc の中和作用を観察した所 H.C.G. 200 I.U. 以下の投与群は完全に活性が中和され、卵巢の充血、腫大が認められなかった。250 I.U. 以上の投与群では卵巢重量はやゝ増加するが対照に比し活性は強く阻止された(第1図)。

(3) H.C.G.-P 及び-G の gel 内沈降反応による分析, H.C.G.-P. と対応抗血清との間には Ouchterlony 法で8本以上の沈降線があらわれ(写真1), それ等は男子血清と共通の沈降線群(3本以上), 濃縮男子尿とのみ共通の沈降線群(2本以上)と, その何れにも共通せず, たゞ H.C.G.-G とのみつながる沈降線(必ずしも sharp な1本ではない)の3群に分ける事が出来た。H.C.G.-G. との間では沈降線の数は減少し先に述べた H.C.G.-P と

第2表 免疫方法及び抗体価

家兎No.	抗 原	Freund's adjuvant	booster injection		抗 原 量	抗 体 価
1	HCG-P	600 I.U.	1000 I U × 2	500 I U	3100 I U	1 : 640
2	"	1500	1000 × 2	500 × 4	5500	1 : 5120
3	"	1200	500 × 5		3700	1 : 5120
4	"	900	500 × 3		2400	1 : 5120
5	"	900	500 × 4		2900	1 : 10240
6	"	900	500 × 4		2900	1 : 5120
7	"	900	500 × 4		2900	1 : 6400
8	"	900	500 × 4		2900	1 : 3200
9	"	10000	6000 × 2	5000	27000	1 : 10240
10	"	10000	5000 × 3		25000	1 : 10240
11	HCG-G	15000	5000 × 3		30000	1 : 10240
12	"	15000 × 2	5000	6500	41500	1 : 10240
13	"	10000	6000	5000 × 2	26000	1 : 10240

写真1 抗 HCG-P 血清による寒天 Gel 内沈降反応

- C : 抗 H.C.G.-P 血清
1 : H.C.G.-P
2 : H.C.G.-G
3 : 男子尿濃縮液
4 : 妊婦血清

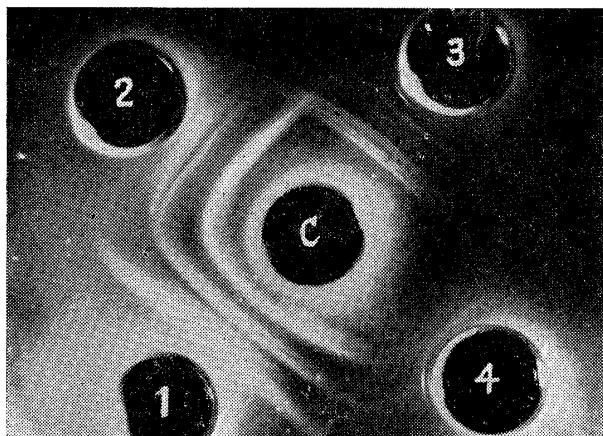
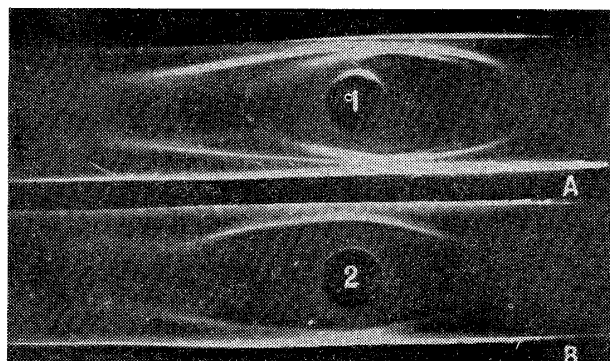


写真2 H.C.G.-P 及び-G の Immunoelectrophoresis

- 1 : H.C.G.-P
2 : H.C.G.-G
A : 抗 H.C.G.-P + 正常男子血清
B : 抗 H.C.G.-G + 正常男子血清
写真左側が陽極。



-Gのみに共通する沈降線以外は殆んど血清蛋白と共通する沈降線群のみとなつた。Immunoelectrophoresis では H.C.G.-P には β -Globulin に相当した易動度を示す強い factor が H.C.G.-G より多く含まれていた (写真2)。H.C.G.-G と対応抗血清の関係は (写真3) α_2 -Globulin とほぼ等しい易動度に強い沈降線があらわれたが、その他に albumin 位置にも沈降線が認められた。H.C.G.-G を同時に正常男子血清蛋白に対する抗血清と

写真3 Immunoelectrophoresis による H.C.G.-G の分析 (I)

- 1 : 正常男子血清
2 : H.C.G.-G
A : 抗正常男子血清 (家兎血清)
B : 抗 H.C.G.-G

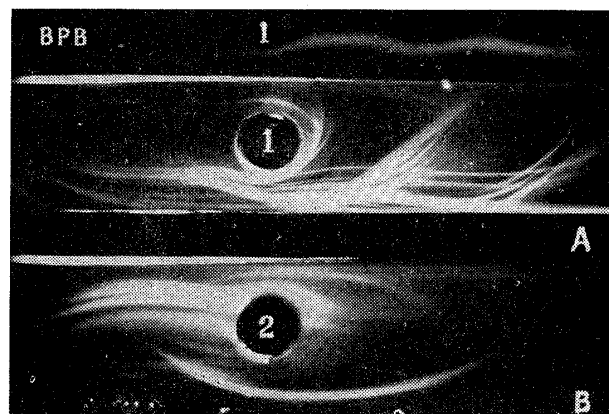
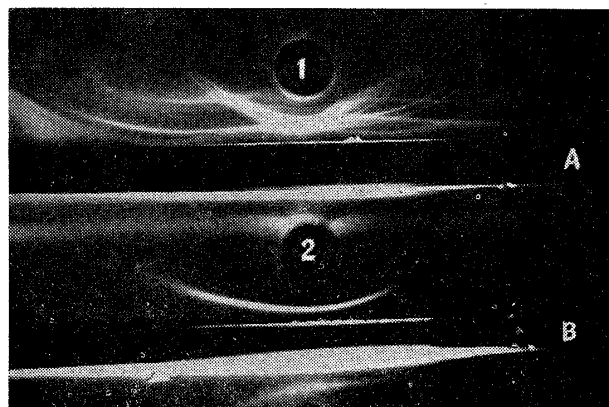


写真4 Immunoelectrophoresis による H.C.G.-G の分析 (II)

- 1 : 正常男子血清
2 : H.C.G.-G
A : 抗正常男子血清 (家兎血清)
B : 抗 H.C.G.-G



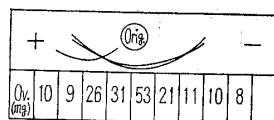
作用させると albumin に3本のかかなり強い沈降線があらわれ、以下弱い沈降線が α に1本、 β から γ にかけて2本見られた。「吸収血清」(実験方法(3))では(写真4) α_2 -Globulin位置にsharpな沈降線のみあらわれると共に吸収の為に加えた男子血清と抗正常男子血清との間にも2~3本の直線的な沈降線があらわれた。電気泳動後の各分画の卵巢重量増加作用は α_2 -Globulin位置の沈降弧線の頂点と平行した高まりを示した(第2図)。以上の結果では α_2 -Globulin位置の沈降線をH.C.G.自体のものと断定する事は出来ないが少なくともこの沈降線

昭和40年2月1日

谷 沢

149—47

第2図 Immunelectrophoresis による沈降線と生物学的活性の関係 (幼若ラット卵巢重量法)



以外のものは contamination であり, 更に鋭敏度の高い H.I.T. を用いた妊娠反応に於て, 蛋白尿の場合に特に検討を要する事を知った。

(4) 絨腫の尿中排泄 Gonadotropin 正常妊婦尿より抽出した H.C.G. に対する抗血清を2例の絨腫尿抽出物に加えるとその卵巢重量増加作用は阻止された。添加抗血清との量的関係も(2)の場合と大差がなかった(第3図)。Ouchterlony 法によると(写真5)H.C.G. と考えら

第3図 悪性絨毛上皮腫患者尿中 H.C.G. の中和実験

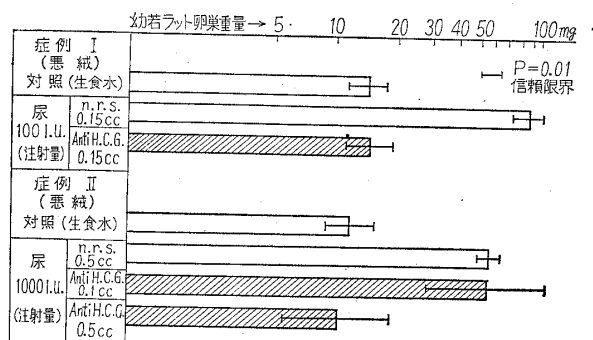


写真5 絨毛性腫瘍患者尿中 H.C.G. と正常妊娠時の H.C.G. の関係 (Ouchterlony法)

- C : 抗 H.C.G.-P
1 : H.C.G.-P
2 : 胎状奇胎患者尿濃縮液
3 : 悪性絨毛上皮腫患者尿濃縮液
4 : 正常男子尿濃縮液

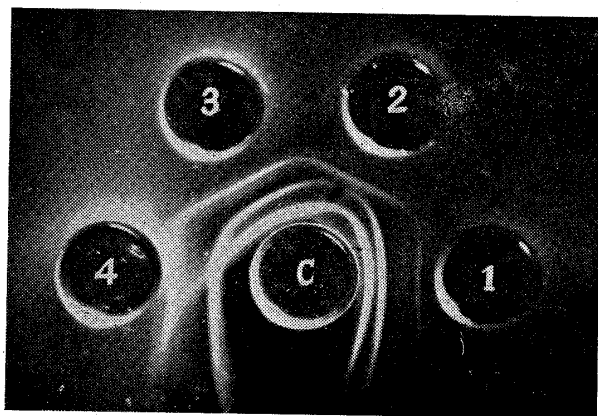
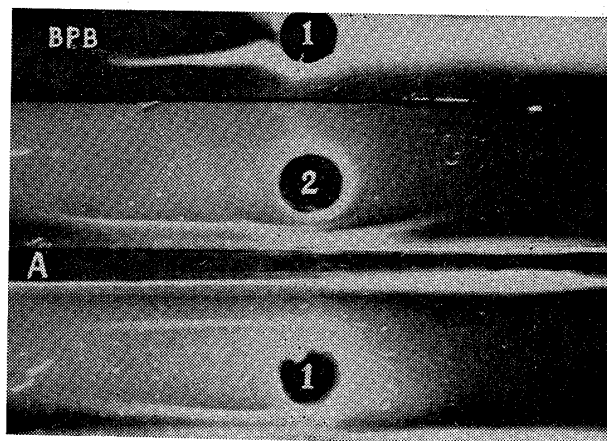


写真6 破壊性胎状奇胎患者血清の Immunelectrophoresis

- 1 : 正常男子血清
2 : 破壊性胎状奇胎患者血清
A : 抗 H.C.G.-P 血清



れる最も内側の沈降線は正常妊婦尿と絨腫尿に於て共通する事がわかった。破壊性胎状奇胎患者血清と抗H.C.G. 血清との Immunelectrophoresis (写真6) では正常男子血清との沈降線 (albumin 位置) 以外に先に述べた「H.C.G.」の α_2 -Globulin 位置に相当して沈降弧線が認められた。

(5) H.T. 及び H.I.T., H.C.G. 感作血球はタンニン酸処理及び H.C.G. 感作を56°Cで行なう Wide の方法を用いた。感作血球保存液には正常家兎血清に代えて bovine serum albumin を用いる事が出来た。副標準品として H.C.G.-G (3437 I.U./mg) を H.I.T. に用い I.U./ml 濃度と抗血清稀釈倍数の関係 (第4図) を見ると両値の対数がほぼ反比例の直線関係を示した。実際に数

第4図 凝集阻止反応に於ける抗 H.C.G. 血清濃度と阻止 H.C.G. 量の関係

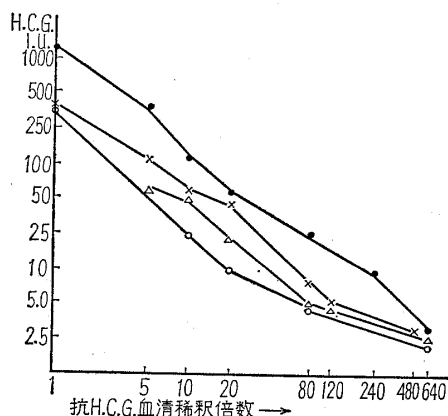
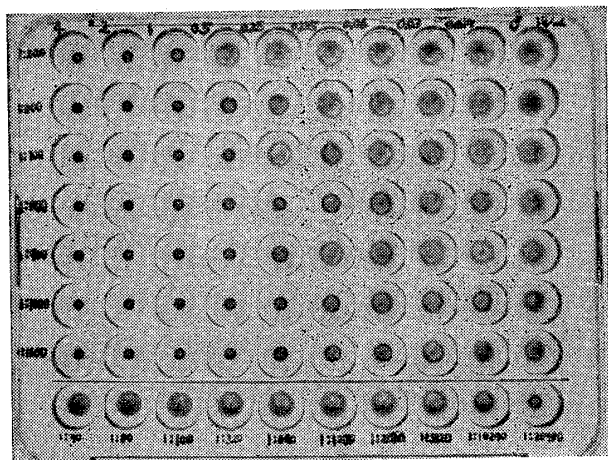


写真7 阻止反応の鋭敏度



段階の稀釈抗血清 (No. 9) について行った写真 (写真7) から抗体価 1:10240 の血清を 1:1100 で H.I.T. に用いると 0.03 I.U./cc (μg level) で既に阻止反応の起るのがわかるが, 1:500 の稀釈抗血清の如く明確な endpoint を示さず疑陽性が中間に 2 本介在した. 抗血清と H.C.G 感作血球が同一である限り 1 カ月後にも反応は再現されたが, 感作血球の状態によって異なるので新しく調製する毎に H.I.T. の条件を定める必要がある. 又臨床検査としての必要条件である反応の明確さと再現性を考慮すれば 0.5~1.0 I.U./cc 程度に H.I.T. の鋭敏度をおさえる事が望ましい.

III. 臨床実験

免疫学的妊娠反応の臨床応用

生物学的妊娠反応は一定条件の動物を常に多数飼育する必要があり且つ亦判定にかなりの日時を要する等の欠陥があった. 最近臨床応用への道が開かれた Immunoassay は in vitro に於ける簡易, 迅速な反応である事から「妊娠反応」は方法論上一つの転期に至ったとも考えられる. 著者は基礎実験によつて明らかにし得た「H.C.G.」の免疫化学的性質をもとに H.I.T. による妊娠反応の特異性と定量的測定の応用性について検討した.

実験対象並びに方法

実験対象; 阪大病院産婦人科外来及び入院患者尿を使用した.

実験方法; H.I.T. は先に述べた方法を用い抗 H.C.G.-P 及び-G 血清は吸収せずにそのまま使用した. H.I.T. の鋭敏度は 600 I.U./l に調整した. 被験尿は濾過後 pH 6.4 P.B.S. により反应用試験管で直接倍数稀釈した. 定性的妊娠反応は全例 1:2 及び 1:4 稀釈尿について行ない, 判定は第5図の如く行つた. 定量的妊娠反応は

第5図 定性的妊娠反応判定基準

判定	尿稀釈倍数		H.C.G.量 I.U./l
	1:2	1:4	
陽性			>2,400
			$\approx 2,400$
			1,200 < 2,400
疑陽性			$\approx 1,200$
陰性			<1,200

1:2 から 1:2¹⁰ (1024倍) 稀釈尿に至る10本の倍数稀釈例について行つた.

実験成績

(1) 定性的妊娠反応, 経過により正常妊娠 (第5週以後) と確認された515例 (451名) 及び非妊娠339例 (339名) 合計 854例について (第3表) 600 < 1200 I.U./l を基準とすると 98.4%, 1200 < 2400 I.U./l を基準とすると 99.6% の的中率を示した. 非妊娠 339例 (第4表) で

第3表 定性的妊娠反応成績

	例数 (患者数)	陽性	疑陽性	陰性	的中率
正常妊娠 (第34日以後)	515 (451)	514 (450)	0	1 (1)	98.4%
非妊娠	339 (339)	2	11	326*	(99.6%)

* 鋭敏度 1200 < 2500 I.U./l に調整した時の的中率

第4表 非妊娠例の疾患別分類

疾患名	例数	陽性	疑陽性	陰性
正常婦人	16	0	0	16
卵巣機能不全	30	0	0	30
更年期障害	15	0	1	14
子宮癌	63	2	5	56
子宮筋腫	26	0	1	25
子宮後屈	24	0	0	24
卵巣嚢腫	14	0	1	13
附属器炎・子宮周囲炎	15	0	0	20
腔部糜爛・頸管炎	49	0	1	48
腔炎	30	0	1	30
原発性不妊	20	0	1	19
奇形	4	0	0	4
子宮脱	3	0	0	3
産褥 (1カ月)	15	0	0	15
腎臓疾患 (蛋白尿)	9	0	0	9
計	339	2	11	326

昭和40年2月1日

谷 沢

151—49

第6図 妊娠尿中H.C.G.の半定量的測定値

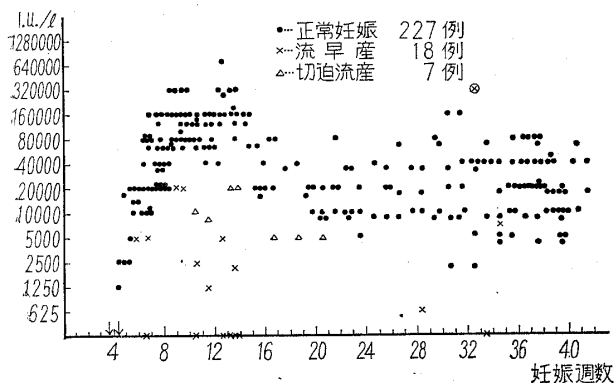
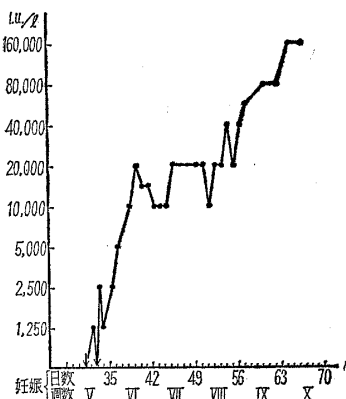
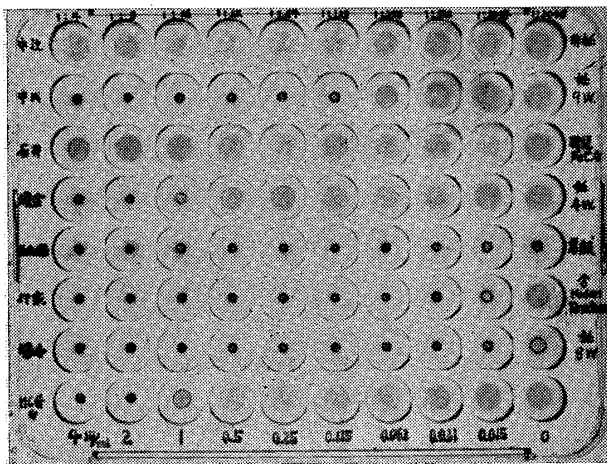
第7図 妊娠早期の1症例
患者 ○井○余○ 30才 未婚産

写真8 定量的妊娠反応判定時の写真



は子宮癌患者(術前及び術後)に最も多くの false positiv があらわれた。また腎疾患の蛋白尿患者(1~10%土屋氏法)9例は全例陰性を示した。

(2) 定量的妊娠反応, 正常妊婦 227例(第6図)では第5週より尿中 H.C.G. 量が急速に増量し, 第9週~

第14週は最高値(80,000~320,000 I.U./l)を保ち, 第15週以後下降する。妊娠第6カ月には平均値 14,390 I.U./l ($P=0.01$ とした信頼限界は 24,000~86,000 I.U./l)と最低値となり其の後少々増加し 14,000~28,000 I.U./l の平均値を分娩迄維持する。この変動状態は従来の Bioassay による諸家の成績²⁴⁾ともよく一致していた。妊娠早期の H.C.G. 上昇について観察した1例(第7図)では妊娠第33日目早朝尿で初めて陽性となり以後急速に上昇して第10週に入り160,000 I.U./lを示した。H.I.T. 判定時の試験管底の像は明確なものでその1例を(写真8)に示した。

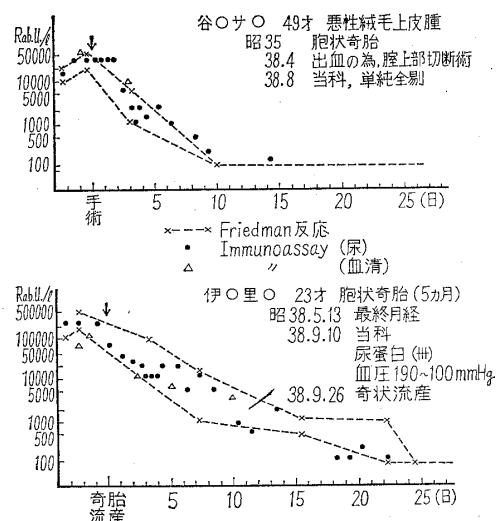
(3) 異常妊娠時に於ける臨床応用

(i) 流・早産 下腹痛・性器出血等の流産徴候をあらわし流産に終った症例及び胎児死亡或いは子宮内容除去後の胎盤の変性状態から稽留流産と診断された症例18例(15名)は第6図に×印で記入した。何れも同時期の正常妊娠例に比較し著しい低値を示した。また切迫流産の徴候を示したが治療により症状が消失し結局は分娩に至った症例7例に△印を附した。⊗の1例は子癇発作を起した胎児死亡例で尿中 H.C.G. 値の高い事はBioassay による諸家の報告²⁴⁾ともよく一致している。以上の成績から尿中 H.C.G. の H.I.T. による測定値が低い場合には流産を考慮すべき事を知った。

(ii) 子宮外妊娠; 26例中1例陰性, 1例疑陽性, 24例陽性を示した(第5表)。本症の鑑別診断に用い有用な数例(症例1, 3, 14, 22, 23)を経験した。

(iii) 絨腫; 胎状奇胎26名, 絨腫7名について, Friedman 反応²⁵⁾と同時に施行した 105回中95回の一致した

第8図 絨毛性腫瘍(2例)の尿中 H.C.G. 追跡

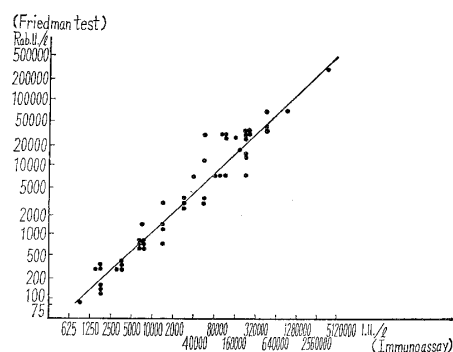


第5表 子宮外妊娠症例

	氏 名	年令	経妊	無月経 期間(週)	発症より (日)		開腹診断	反応結果	備 考
					出血	腹痛			
1	K K	24	0	12	1	1	右卵流	160000	DP (—)
2	S E	25	5	15	8	1	右卵流	+	DP (+) BBT ↑
3	K S	33	2	5	—	3	右卵巢	5000	DP (—) FR 200
4	S O	33	1	9	26	1	左卵破	5000	FR (+)
5	K Y	21	0	9	10	—	右卵流	1250	DP (+) FR (+)
6	T M	32	3	8	17	2	左卵流	2000	DP (+) FR (+)
7	T O	40	1	12	30	30	右卵流	128000	胎児 7 cm FR 10 < > 20 ⁴
8	A T	32	4	7	22	1/2	左卵破	+	DP (+)
9	S S	27	0	9	18	9	左卵破	20000	DP (+)
10	T S	28	2	6	7	7	左卵流	8000	DP (+)
11	T Y	21	0	7	23	2hrs	右卵破	320000	DP (+) FR (+)
12	M O	33	2	9	15	1	右卵破	+	DP (+)
13	T D	32	4	4	1	1	左卵破	+	DP (—)
14	Y Y	27	2	8	9	1	左卵流	640000	DP (±) 10日前中絶?
15	I O	27	1	5	29	7	右卵流	10000	DP (+) FR 500 < > 1000
16	M S	27	2	7	22	14	右卵流	600	DP (+)
17	U M	31	2	7	7	7	左卵破	+	DP (+)
18	F O	27	1	13	16	2hrs	左卵流	+	DP (+) FR (+)
19	T U	35	4	9	24	5	右卵流	2500	
20	S N	34	2	6	5	2	左卵流	+	
21	N I	26	2	9	28	4	左卵流	+	
22	E N	40	8	7	28	—	右靱帯内	70000	FR (+)
23	S K	29	2	7	47	2hrs	右卵破	320000	DP (—)
24	Z N	36	1	5	23	5	左卵流	+	
25	Y S	28	3	9	30	3	右卵流	+	発熱
26	M O	29	7	5	—	1	右卵流	—	DP (+)

註：数字は I.U./l 註：DP=ダグラス窩穿刺 FR=フリードマン反応

第9図 Immunoassay と Friedman test の関係



結果を得た。不一致の10回中2回は明らかに家兎の自然排卵による(再検)もので、Immunoassayのみ陽性の場合が2回、Friedman反応のみ陽性の場合が6回であったが何れも100家兎単位以下の低単位排泄例であつ

た。次に胞状奇胎娩出直後及び絨腫に対する子宮全剔除術後の血清及び尿中 H.C.G. (第8図)は Friedman 反応と平行し10~20日で消失した。こうした H.C.G. の追跡も極めて簡単に行ないうる所から臨床に絨腫の診断と予後判定の指針として役立つ事を知った。

(4) Friedman 反応との比較

Friedman 反応による測定値との比較を同一尿について行つた(第9図)。症例は正常妊婦14例、絨腫37例、合計51例。測定値は両法とも陽性から陰性に転じた両値の中央値をとる事とした。その結果 I.U./l (H.I.T.) ÷ Rab. U./l (Friedman) を求めると 10.5 ± 0.72 (標準誤差) となつた。このうち正常妊婦のみから求めた値 8.4 ± 1.4 、絨腫のみから求めた値 11.3 ± 0.85 の間に有意の差は認めなかつた。且つ亦両法とも半定量値であるか

ら, 10 I.U./l (H.I.T.) $\div$ 1 Rab. U./l (Friedman) として簡単に換算 (危険率5%以下) しうる事を知った。

IV. 総括並びに考按

「H.C.G.」抽出物の抗原活性物質について

Wide らは免疫学的妊娠反応の実施に際し H.C.G. 抗原として市販 H.C.G. 製剤を基礎的検討を行なわずに用いたが Lunenfeld²⁶⁾, Rao²⁷⁾, Midgley²⁸⁾, Brody²⁹⁾ らは製剤中に含まれる夾雑蛋白質を gel 内沈降反応等により確認し, 吸収・飽和の操作により抗 H.C.G. 血清の純化を行なう事が反応の特異性を高める為に必要であろうと述べている。著者も妊娠反応の実用化を考慮し本邦に於て入手に便利な製剤 Primogonyl 及び抽出 H.C.G. (Gurin 法) を抗原として用いた。これ等「H.C.G.」中に含まれる抗原活性物質を検討したところ, 血清 albumin を主とする血清蛋白質と尿中のみに見られる蛋白質が, なお数種類含まれている事を知った。この際抗血清の調製には complete Freund's adjuvant 及び booster effect を用いたが, これは Ramon's adjuvant を用いた Wide 等⁸⁾の $\frac{1}{20}$ の抗原量で同様の抗体価を上げた事になり著者の方法は実験上にも役立つ事がわかった。

H.C.G. に対する抗体の直接の証明は生物学的活性の中和作用を見なければならぬので, 著者は幼若ラット卵巢重量法を用いてこれを証明した。gel 内沈降反応により「H.C.G.」の夾雑抗原について血清蛋白質等を明らかにしたが, α_2 -Globulin 位置の沈降線のみは正常男子血清等による吸収によつても消失せず, H.C.G. によるものと想像される。しかし沈降線を H.C.G. 自体によるものと決定するにはなお検討の余地がある。また熱処理により活性の消失した後も抗原性は存在するという事が著者ら³⁰⁾³¹⁾³²⁾により認められているので, H.C.G. の抗原性と生物学的活性の active site の関係は今後の問題として残されている。

絨腫尿中に排泄される H.C.G. が正常妊婦の H.C.G. と異なる性質の物ではないかとの点に関しては, Sober³³⁾, Reisfeld³⁴⁾ らによると血清中に於けるこれ等 H.C.G. の電気泳動的な性質には差がある事を述べているが, 著者の成績からは抗原性に差異を見出す事は出来なかった。

免疫学的妊娠反応について

著者は H.I.T. の高い鋭敏度 (0.03 I.U./cc) を 500~1000 I.U./l 程度に押え, 更に被験尿の方も P.B.S. で4倍に稀釈して後用いる事により, 尿中 H.C.G. 1200~2400 I.U./l で阻止反応が起る様に調整した所, 先に明ら

かにした夾雑蛋白質を全く顧慮しなくとも的中率99.6%と云う高い特異性を得た。本反応の false positiv に関係する 2, 3 の因子に考察を加えると, 先ず蛋白尿の場合 H.I.T. が陽性とならなかったのは passive haemagglutination の反応系内に於ける量的なものに原因するのであろう。次に多少反応条件を異にする Southam³⁵⁾, Salzberger³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾等の成績が的中率95%以下に止り, 先に著者の行つた Stavitsky 原法による方法では僅か80%程度の的中率にすぎなかった事実より夾雑蛋白質よりはむしろ H.C.G. 感作血球の状態がより強く false positiv に関係するものと思われる。尚, 子宮癌患者 (術前及び術後) に最も多くの false positiv があらわれたが, これは卵巢剔除後に増量すると云われる下垂体性 L.H. が交叉反応的に作用する事¹¹⁾²²⁾によるものか, あるいは子宮癌患者尿中には正常妊娠時と共通して増量する或る種の蛋白質が存在する為の何れかと考えられる。

本法を定量的に用いた場合 Friedman 反応による測定値とよく平行し, 10 I.U./l (H.I.T.) $\div$ 1 Rab. U./l (Friedman) として臨床的には充分その目的を達しうる事がわかった。こうした簡易定量法を用いれば, (a)流産の予後に関する診断, (b)子宮外妊娠の補助診断, (c)絨腫の診断と経過観察に資し得るのみならず, (d)切迫流産あるいは習慣性流産の際に於ける胎盤機能の指標として利用しうるものと考えられる。

生物学的妊娠反応は H.C.G. の生物学的活性そのものを測定し, 高い特異性を有する点では秀れているが, 動物を使用するための煩雑さが欠点となっている。これに対し H.I.T. による妊娠反応は抗血清及び感作血球の調製に若干の準備を必要とするものゝ, 実際の測定は Bioassay に比較し極めて簡易であり判定も2時間で完了する。しかも定量的にも応用でき, 正常妊娠の診断はもとより各種の異常診断にも利用できることから従来の Bioassay よりはむしろ更に広範囲に活用し得るので, その臨床的意義は大きいと期待される。

V. 結 論

免疫学的妊娠反応 (H.I.T.) を実用化する為の基礎的検討と臨床実験により次の結果を得た。

(1) 免疫方法として complete Freund's adjuvant 及び booster injection を適宜用いることによつて少量抗原 (5000 I.U. 以下) で抗体価の高い血清を得る事が出来た。

(2) 抗 H.C.G. 血清 0.1cc は H.C.G. 200 I.U. の幼若ラット卵巢重量増加作用を中和した。

(3) 市販 H.C.G. 製剤 Primogonyl 及び抽出 H.C.G. (Gurin 法) は gel 内沈降反応により数種類の抗原活性物質を認めた。後者 (3000~4000 I.U./mg) の夾雑蛋白質は Albumin を主とする血清蛋白質である。

(4) 絨腫尿中 Gonadotropin は正常妊婦の H.C.G. と免疫学的にはその間に質的な差異を認めなかった。

(5) H.I.T. では H.C.G.-G 0.03 I.U./cc (mg level) の微量を検出できた。

(6) H.I.T. の鋭敏度を 600 I.U./l になる様に調整し、被験尿を予め pH 6.4 P.B.S. で 4 倍に稀釈して用いる事により尿中 H.C.G. 1200~2400 I.U./l で陽性となる様にすると妊娠反応的中率は最も高くなり、正常妊娠 515 例、非妊娠 339 例、合計 854 例に於ける中率 99.6 % を示した。

(7) 蛋白尿は著者の用いた抗血清では H.I.T. に於ける false positiv の原因にはならなかった。

(8) 妊娠各時期の妊婦尿 (随時尿) 227 例について H.C.G. 量を測定したところ妊娠第 5 週以後急激に増量し、9~14 週迄 80000~320000 I.U./l の高値を示し、15 週から下降し、第 6 カ月以後は 14000~28000 I.U./l の平均値を分娩迄持続した。

(9) 本実験に於ては妊娠第 33 日目に初めて尿中 H.C.G. を証明する事が出来た。

(10) 流早産、稽留流産等の H.C.G. 量は正常妊娠に比して一般に著しく低いか又は全く陰性を示すものが多かった。

(11) 子宮外妊娠 26 例は 24 例陽性を示し、特に判定迄 2 時間で行いうるのと、定量値が同時に得られる事から術前の補助診断に大いに役立った。

(12) 絨腫の尿中 H.C.G. も本法により同様に測定が可能であり、Friedman 反応とは 105 例中 95 例の一致した成績を得た。

(13) H.I.T. の測定値と Friedman 反応の測定値の間には次の関係が認められた。10 I.U./l (H.I.T.) $\equiv$ 1 Rab. U./l (Friedman)。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師足高善雄教授並びに御校閲を賜った本学細菌学教室天野恒久教授に深甚なる謝意を捧げると共に H.C.G. 抽出精製に関して帝国臓器、松島早苗博士、免疫電気泳動法に関して本学細菌学教室田辺鎮雄博士の御教示に厚く感謝いたします。尚本実験に際して直接御教示いただいた本教室磯島晋三博士並びに種々御助言・御援助いただいた竹村喬講師、滝一郎講師、教室員各位に衷心より

感謝いたします。

本論文の要旨は昭和 36 年 5 月第 24 回・昭和 37 年 11 月第 27 回近畿産婦人科学会総会、昭和 38 年 4 月第 36 回日本内分泌学会総会宿題シンポジウム参加、昭和 38 年 10 月西日本産婦人科学会総会に於て発表した。

文 献

- 1) Zondek, B.: Die Hormone des Ovariums und des Hypophysen vorderlappens, Berlin 1931. —
- 2) Collip, J.B. et al.: Am. J. Phys. 109: 22, 1934. —3) Collip, J.B. et al.: Lancet. 1: 76, 1934. —4) Bachman, C. et al.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med. 36: 712, 1937. —5) Collip, J.B.: Trans. Amer. Neurol. Ass. 7, 1935. —6) Arquilla, E.R. & Stavitsky, A.B.: J. Clin. Invest., 35: 458, 1956. —7) Read, C.H. & Stone, D.B.: Amer. J. Dis. Child., 96: 538, 1959. —8) L. Wide & C.A. Gemzell: Acta Endocrinol., 35: 261, 1960. —9) L. Wide: Acta Endocrinol., 41, Suppl., 70, 1962. —10) Swierczynska, Z. & Samochowiec, E.: Cited from 9). —11) W.R. Butt et al.: CIBA Found. Coll. Endocrinol. Vol. 14: 310, 1962. —12) Brody, S. & Carlström, G.: Lancet, II: 99, 1960. —13) McKean, C.M.: Am. J. Obst. & Gynec., 80: 596, 1960. —14) Keel, D.K. et al.: J. Clin. Endocrinol., 22: 287, 1962. —15) Robbins, J.L. et al.: Proc. Soc. exp. Biol., 109: 321, 1962. —16) Gurin, S. et al.: J. Biol. Chem., 128: 525, 1939. —17) Freund, J. & McDermott, K.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 49: 548, 1942. —18) 松島他: 薬学雑誌, 79: 1529, 1959. —19) Ouchterlony, O.: Acta Path. Microbiol. Scand., 26: 507, 1949. —20) Grabar, P. & Williams, C.A.: Biochem. Biophys. Acta, 10: 193, 1953. —21) 右田: 日本臨床, 17, 1959. —22) L. Wide et al.: Acta Endocrinol., 37: 445, 1961. —23) Stavitsky, A.B.: J. Immunol., 72: 360, 1954. —24) 古賀: 生物学的妊娠反応 (医学書院), 1954. —25) Friedman, M.H.: Am. J. Physiol., 90: 617, 1929. —26) Lunenfeld, B. et al.: J. Clin. Endocrinol. Met., 22: 555, 1962. —27) Rao, S.S. et al.: Immunol., 4: 1, 1961. —28) Midgley, A.R. et al.: Proc. Soc. exp. Biol., 108: 85, 1961. —29) Brody, S. & Carlström, G.: J. Clin. Endocrinol. Met., 22: 564, 1962. —30) 谷沢, 磯島: 日内分泌誌, 39: 908, 1964. —31) G.H. Jwombly: Endocrinology, 20: 311, 1936. —32) 柴生田: 日産婦誌, 8: 677, 1956. —33) H.A. Sober et al.: Federation Proc., 17: 1116, 1958. —34) R.A. Reisfeld et al.: Arch. Biochem. & Biophys., 81: 456, 1959. —35) A.L. Southam et al.: Am. J. Obst. & Gynec., 85: 495, 1963. —36) M. Salzberger et al.: Am. J. Obst. & Gynec., 86: 899, 1963. —37) 石塚他: 産婦の進歩, 13: 359, 1961. —38) 古賀他: 日内分泌誌, 38: 105, 1963. —39) 谷沢: 産婦の進歩, 13: 359, 1961.

(No. 1733 昭 39・5・11 受付)