

放射性同位元素を用いた estrogen 測定法について

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任 鈴木雅洲教授）

堤 志 津

概要 尿中 estrogen の測定については estrogen が特異な呈色反応を示すことが見出されて以来古くから化学定量がなされている。しかし estrogen が微量であるとき、呈色液は尿の不純物により影響されやすいため、これを取除かねばならない。Ittrich, Salakangas, Bradshaw の方法はこの呈色液より estrogen 呈色のみを抽出するもので特性をますことができる。

最近 C^{14} 又は H^3 にて標識された steroid hormone が合成され、臨床的に応用されるようになり、steroid hormone の測定が正確に行なえるようになった。

こゝでは尿中 estrogen を Ittrich の方法に3つの操作を加えて不純物を取り除き、更に放射性同位元素の使用により従来に比して正確な値を得ることができた。不純物を除くために加えた3つの操作とは silicagel column による Chromatography と Saponification と alumina column による chromatography である。estrogen の分画は Bush system の paperchromatography を用いた。この system における Rf 値は Bush B₁ では estrone, estradiol, estriol は各々 0.77, 0.43, 0.02 であり、Bush C では 0.90, 0.87, 0.27 であつた。estrogen color の p-nitrophenol-chloroform 抽出液では 537m μ , 517m μ , 557m μ の吸収度をみればよい。この方法の回収率は estrone, estradiol, estriol で $44.8 \pm 3.4\%$, $58.8 \pm 5.9\%$, $30.1 \pm 1.5\%$ であり、再現性試験では、 $6.3 \pm 0.34 \mu\text{g/day}$, $5.8 \pm 0.60 \mu\text{g/day}$, $9.8 \pm 0.48 \mu\text{g/day}$ で誤差は少なかった。放射能の測定は Tri Carb loquid scintillation spectrometer で行なつた。scintillator は PPO (2,5-Diphenyloxazole) と Dimethyl POPOP [1,4-bis-2 (4-methyl-5-phenyl-oxazole) benzene] の toluene 溶液である。

I. 緒 言

尿中 estrogen の測定については、estrogen が特異な呈色反応を示すことが見出されて以来古くから比色定量がなされている。しかし estrogen が微量であるとき、呈色液は尿の不純物に影響されやすいため、これを取除かねばならない。Ittrich¹⁾, Salakangas²⁾, Bradshaw³⁾ はこの呈色液から estrogen 呈色のみを抽出することによつて特性をますことがわかつた。

最近、 C^{14} または H^3 にて標識された steroid hormone が合成され、臨床的に応用されるようになり、steroid hormone の測定が正確に行なえるようになった。

ここでは尿中 estrogen 測定は Ittrich の方法に3つの操作を加えて不純物を取除き、更に放射性同位元素の使用により、従来に比して正確な値を得ることができたので報告する。

II. 実験方法

1 試薬

ether: 1 級. 5% $\text{FeSO}_4 \cdot 2\%$ H_2SO_4 $1/10$ 量 2 回洗浄. 水 $1/10$ 量 1 回洗浄. 5% NaHCO_3 $1/10$ 量 2 回洗浄. 水 $1/10$ 量 2 回洗浄. CaCl_2 で乾燥させ、34~36°C 蒸溜部分をとる. この操作で鉄分を取除く. petroleum ether: 1 級. 40~60°C 蒸溜部分をとる. toluene: 1 級. 110~112°C 蒸溜部分. benzene, ethylacetate, methanol, chloroform, acetone, ethanol, H_2SO_4 , HCl , Na_2SO_4 , NaOH , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , p-nitrophenol, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 以上特級(関東化学製). ligroin: 1 級. 80~100°C 蒸溜部分(日本石油製). hydroquinone: 1 級(関東化学製). 2%-hydroquinone- H_2SO_4 液: estradiol, estrone, estriol 各々 54%, 64%, 68% H_2SO_4 溶液で 2% hydroquinone 液をつくる. 1% NaOH : 特級 NaOH 使用. 8% NaHCO_3 : 特級 NaHCO_3 使用.

昭和42年10月1日

堤

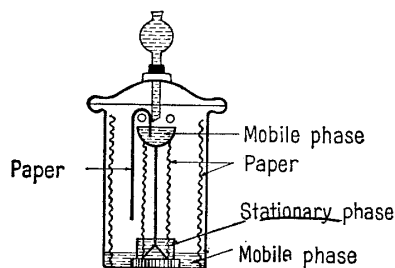
1245—59

carbonate buffer: $\frac{1}{10}$ N の Na_2CO_3 と NaHCO_3 より pH 10.5 に作成. alumina: Brockmann II ~ III 度とする (Merk 製). silicagel: 100 mesh 以上のもの (関東化学製). paperchromatography 用濾紙: 東洋濾紙 No. 51A. scintillator: toluene 500ml 中に P P O (2,5-Diphenoloxazole) 2 g と Dimethyl POPOP [1,4-bis-2-(4-methyl 5-phenyl oxazolyl)-benzene] 25mg (いずれも Packard 社製) を入れ 溶かしたもの. radioisotope: estradiol-6,7- H^3 (specific activity 0.95 mc/mg), estrone-6,7- H^3 (specific activity 1.86 mc/mg), estradiol-4- C^{14} (specific activity 8.18 mc/mg) いずれも Radiochemical Centre 製. estriol-15- H^3 (specific activity 11 mc/mg) Dr. Levitz (New York) の提供による.

2. 実験器具

column chromatography 用 tube 内径 8 mm 長さ 15 cm のもの. Soxhlet 装置: benzene-ethanol 等量液中に paperchromatography 用濾紙を入れ, 4 ~ 5 日放置. 脱脂を行なうもの. rotary evaporator: 有機溶媒の乾固に用いる. paperchromatographys 用 tank: Bush 系のもので恒温槽に入れ, $31 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持する (図 1).

図 1 Tank for paperchromatography



paperchromatogram scanner; Aloca Model PCS 2. 放射能測定装置: Packard 製 Tri Carb liquid scintillation spectrometer. 比色計: 日立分光光度比色計. N_2 -gas: 乾固に用いる. paperchromatography 用 paper: 図 2.

3 実験操作

実験操作の過程は図 3 に示す如く, Ittrich⁴⁾ の方法に更に不純物を除く目的で種々の操作を加えたものである.

加水分解: 尿 (isotope dilution method を行なうため, estradiol-6,7- H^3 , estrone-6,7- H^3 , estriol-15- H^3 を各々 $0.5 \mu\text{C}$ 加える) 15 Vol % に conc. HCl を加え, 100°C 1 時間加水分解する. 抽出, 精製: 加水分解終了後冷却し, ether にて 3 回抽出. carbonate buffer で洗浄 1 回,

図 2 Paper for paperchromatography

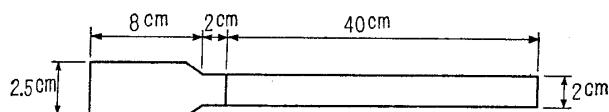
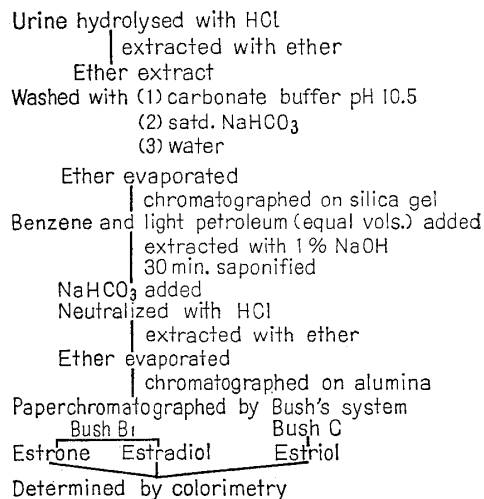


図 3 Flow Sheet for the Separation of Estrone, Estradiol and Estriol by the Modification of Ittrich's Method



8 % NaHCO_3 液 1 回, 水 1 回洗浄. Na_2SO_4 を少量加えて, ether 部より水分を除き, ether を rotary evaporator で蒸発乾固させる. この中には色素, 脂肪等の不純物が含まれているため, silicagel column を通した. silicagel 1 g を benzene にとおして column に詰め, benzene が silicagel の上 1 ~ 3 cm に来たとき, 抽出乾固した estrogen を benzene 2 ml で温め溶かし, 冷やした後, column に入れ, 吸着させる. 更に benzene 2 ml で容器を洗い, column に加える. それを再び silicagel の上 1 cm に来たとき, ethanol: benzene (5 : 95) 溶液 10 ml を検体の容器に入れてから, これを column に入れ, 溶出されたものは捨て, 次に ethyl acetate を 10 ml 容器に入れ, column から溶出されたものをとる. この fraction はそのまま, N_2 -Gas で乾固させる. column を通つたものは phenolic fraction を得るため, benzene 25 ml, petroleum ether 25 ml 等量液で溶かし, 1 % NaOH 25 ml 3 回で抽出する. しかしこの抽出物にまだ脂肪等が残っているから, 30 分煮沸することによつて鹸化を行なつた. 終了後 NaHCO_3 4 g を入れ conc HCl で pH 7.0 に中和させる. 冷却後 ether 25 ml 3 回で抽出, 水 2 ml 2 回洗浄, Na_2SO_4 を少量加え水を切り, rotary evaporator で乾固させる. 次いで再び不

純物を除くため, alumina column を通した. alumina 1.6 g を水飽和 benzene にとかし, column をつくり, 30% methanol-benzene 2 ml にとかした検体を benzene が column の上 0.5 cm にきたとき, column に入れ, 吸着及び溶出させ, それを試験管にとり, 再び 30% methanol-benzene 10 ml で容器を溶かし, column に入れ, 溶出したものは全部とる. paperchromatography: 不純物を幾分取除いたものは次いで estrone, estradiol, estriol の3分画にするため, Bush 系⁹⁾の paperchromatography を用いた. 検体を methanol 0.05 ml にとかし, あらかじめ脱脂を行なつた濾紙の start line の部に 0.5 cm 以下の巾で線状にキャピラールでつける. 次いで容器は methanol 各々 0.05 ml で3回洗いながら spotting を行なう. spotting 終了後, 図1の如き, tank に入れ, 恒温槽の中で, 24時間移動相と固定相を飽和させた後, 上部の液槽に分液ロートから移動相を流し展開する. Bush B₁ では5時間, Bush C では4時間で分離できる. 検体はまず Bush B₁ 系に入れ, クロマト終了後乾燥させ, Scanner で scanning を行なう. estrone, estradiol 部分は分離されるが estriol は start line に残るため, この部を再び methanol でとかし, Bush C 系で chromatography 行なう. 分離された estrone, estradiol, estriol の濾紙を 0.5 × 0.5 cm の大きさに切り, methanol で溶解乾固さす. これを既知の量の methanol で溶かし, 各々2つに分け, 一部は放射能の測定, 一部は化学定量に用いる. 放射能を用いないときは paper を 1% FeCl₃ と 1% K₃Fe (CN)₆ の等量液に浸し, 次いで 5% HCl 液で洗い, 呈色反応を行なうと estrogen のある部が青色となる. 化学的測定: Ittrich 法に基づき, 検体に 2% hydroquinone H₂SO₄ 液 1 ml 加え, 40分 100°C 加熱, 冷却させた後, 水 1.4 ml 加えたものに 2% -p-nitrophenol-chloroform, 1% ethanol 溶液 2.5 ml 加えて, Kober color のみを抽出する. Kober color は比色計にて測定する. 放射能の測定: 検体を liquid scintillation 用 vial に入れ乾固させ, scintillator 10 ml を入れ, liquid scintillation spectrometer で測定する. isotope dilution method で尿中 estrogen は次式で計算する.

$$A = a \left(\frac{I_0}{I} - 1 \right)$$

A: 未知の estrogen

a: 加えた estrogen の量

I₀: 加えた estrogen の specific activity

I: 測定しようとする estrogen の specific Activity

色素等の quenching は internal standard で補正した.

III. 実験成績

paperchromatography を行なつたものを scan したものは図4の如く, Bush B₁ で estrone と estradiol を, Bush C で estriol が分けられることがわかる. 各々の Rf 値は表1の如くである. estrogen を p-nitrophenol-chloroform 溶液で抽出したものの吸収曲線は図5の如く, 537mμ で最大吸収となり, 517mμ から 557mμ が直線をえがくので, この3点を取り, Allen⁹⁾の補正式で補正值を出した. estrogen の検量曲線は図6の如くで estrone, estradiol, estriol は平行線をえがき, estrogen の量が 0.5~5.0 μg の部で直線を示すのでこの部分で読むとよい. この方法による recovery は表2の如く, 同一条件のもとでは値は大体一致することを示す. paperchromatography を行なつたときの paper

図4 Scan of Radioactive Estrogens Separated by Paperchromatography

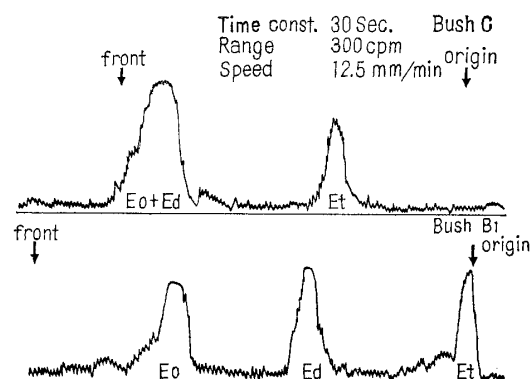


表1 Rf Values of Estrogens (Bush's paperchromatography)

		Estrone	Estradiol	Estriol
B ₁	1	0.80	0.39	0.01
	2	0.77	0.40	0.01
	3	0.70	0.45	0.04
	4	0.76	0.50	0.03
	5	0.78	0.44	0.02
	6	0.74	0.40	0.01
	mean	0.77	0.43	0.02
C	1	0.88	0.85	0.25
	2	0.92	0.90	0.18
	3	0.98	0.95	0.35
	4	0.97	0.82	0.25
	5	0.85	0.80	0.29
	6	0.80	0.90	0.30
	mean	0.90	0.87	0.27

昭和42年10月1日

堤

1247—61

図5 Wavelength/Absorption curves of Estrogen-Color in p-Nitrophenol-Chloroform Solution

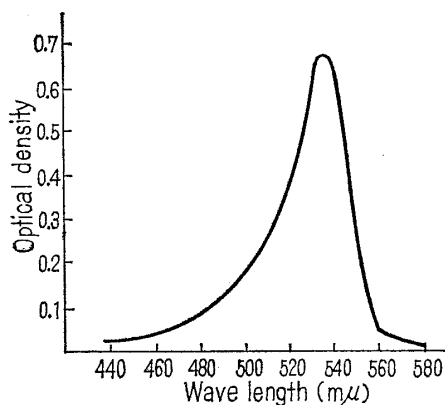


図6 Relationships between Corrected Spectrophotometer Readings and Amounts of Estrogens

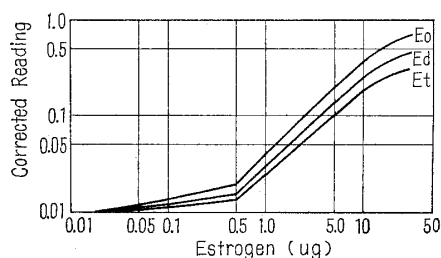


表2 Recovery (%)

No.	Estrone	Estradiol	Estriol
1	45.6	62.0	28.0
2	32.0	68.0	24.8
3	47.9	77.2	30.5
4	56.6	40.9	28.2
5	46.7	38.2	36.3
6	40.0	66.7	33.0
Mean	44.8±3.4	58.8±5.9	30.1±1.5

表3 Reproducibility μg/day

No.	Estrone	Estradiol	Estriol
1	6.4	5.2	10.0
2	6.6	6.4	9.6
3	6.4	6.2	10.5
4	5.7	5.4	9.2
Mean	6.3±0.34	5.8±0.60	9.8±0.48

を1 ml fractionとし、各々の放射能と化学定量値を同時に示すと図7, 8の如く、Bush B₁に於てもCに於ても一致することがわかる。

図7 Paperchromatogram (Bush B₁) of Normal Woman Urine

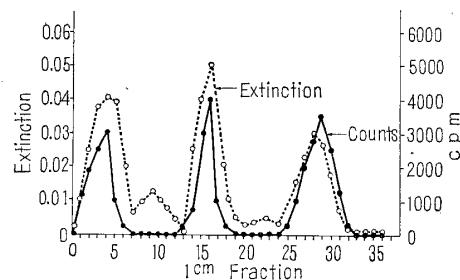
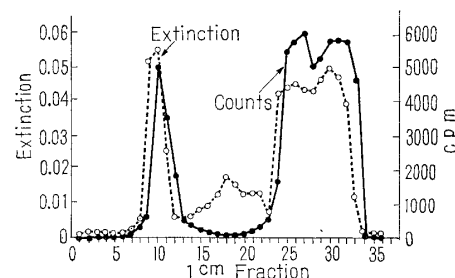


図8 Paperchromatogram (Bush C) of Normal Woman Urine



IV. 考 按

尿中 estrogen の測定については古くから、estrogen は特異な呈色反応ありといわれ⁷⁾⁸⁾、中でも Kober が estrogen に濃硫酸を加え、熱することによつて、green-fluorescing orange となり、それを水で稀釈するとpinkに変色することが出現されて以来、比色定量ができることがわかつた⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾。又硫酸及び磷酸で 螢光を発生させて測ることもできる。更に Kober 反応を改良して、hydroquinone-H₂SO₄を用いると感度、特性、安定性が増すという¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。estrogen が微量のとき、Kober呈色液は尿の不純物により影響されやすいため、これを取除くため、Ittrich¹⁾は p-nitrophenol-chloroform, Salakangas²⁾は p-nitrophenol tetrachloroethane, Bradshaw³⁾は trichloroacetic acid chloroform でこの呈色液から、estrogen Kober color のみを特異的に抽出する方法を報告している。Ittrich は加水分解、抽出、精製は Brown に準じているが、Kober color のみを p-nitrophenol-chloroform で抽出測定を行なつて微量検出されるといつている。ここでも Ittrich の方法を用い、更に不純物を除く目的で silicagel column, saponification, alumina

column, paperchromatography の操作を加えた, silica-gel column は Goldzieher¹⁵⁾ による column で脱色, 脱脂の目的で使用するものである. 原法は n-hexane, benzene-ether (95 : 5), ethyl acetate の順に展開し, n-hexane で脱コレステロールと脱色素が行なわれ, ethyl acetate で steroid をとり出すものであるが, ここでは脂肪は次の saponification でとることにし, 脱色を主としたので n-hexane は用いなかつた. saponification は Bauld¹³⁾, Brown¹¹⁾により行なわれ, 不純物は鹼化され, estrogen fraction に不純物のくる率を減少せしめること及びこれにより estrogen の損失は認められないことがわかつている. alumina column は Stimmel¹⁶⁾ が 2%, 5%, 30% methanol-benzene で estrone, estradiol, estriol を分画して以来, 多くの人がこれを応用しているが又このことから 30% methanol-benzene のみで total estrogen としてとり出すことも可能である. しかし他の chromogen を全部除去することは不可能であつた. paperchromatography で estrogen を分画することは古くから多くの報告がある. Burton, Zafforani 及び Keutman¹⁷⁾ は paper に propylen glycol や foramid を浸した後, 試料をつける方法を報告した. Bush⁵⁾ は移動相と固定相の飽和したところで試料をつけた paper に展開させる方法を用いた. 前者は大量の試料がのせられるが, 展開や展開終了後の乾燥に長時間を要し, Rf が得られないという欠点がある. 後者は大量の試料の検出が出来なく, 展開中の温度を一定に保たなければならないが, 展開や乾燥には短時間でよく, Rf も得られ, 誤差は少ないという利点がある. Bush は温度を 30~38° ± 0.5°C に一定にして操作を行ない, 0.5~20 µg までの量の定性可能であつた. Axelrod¹⁸⁾¹⁹⁾ は Zafforani system に従い, o-dichlorobenzene-foramid 系で estrone, estradiol の分離, methylen-chloride-foramid 系で, estriol を分離した. 又 methyl-cyclohexano-propylen-glycol で estrone, estradiol を分離す. Zafforani system を用いた報告は多い²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾. Mitchell²⁶⁾²⁷⁾ は placenta の抽出物を Bush system で petroleum ether-methanol (1 : 1) で estrone, estradiol を benzene-methanol-water (2 : 1 : 1) で estriol を分離している. Rf は estrone, estradiol, estriol は各々 0.2, 0.07, 0.13 である. Dao²⁸⁾ は Bush B₅ 系で estriol と 16-epiestriol の分離, n-hexane-methanol (1 : 1) で estrone, estradiol の分離をし, これを bioassay した. Dao と同じ方法で Porter²⁹⁾ 等は Rf は estrone 0.54, estradiol

0.18 を得た. 又 bioassay を行なわず, spot の面積と estrogen の濃度との関係から簡単に検体の estrogen の定量をした. Bush 系のもののみを使つたもので Barlow³⁰⁾ は Bush B₁ で estrone, estradiol, Bush C で estriol を分け, Rf は各々 0.8, 0.38, 0.33 であつた. Czeizel³¹⁾ 等によれば Bush B₃ で estrone, estradiol, B₅ で estriol を分け, Rf は各々 0.58, 0.29, 0.14 であつた. 血中, 尿中の estrogen を Mahesh³²⁾ は Bush B₃ と B₅ を使い, Rf は 0.56, 0.17, 0.08 を得た. Bush system で estrogen を分離する方法はその他多くみられる³³⁾³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾.

C¹⁴ 又は H³ にて標識された steroid hormone が臨床的に応用されるようになり, steroid hormone の測定が正確に行なえるようになった. 放射能を用いる測定法には種々の方法があるが最も簡単なものは isotope dilution method である. この方法はすでに 1939 年 Rittenberg 等⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾ が H³ 標識アミノ酸を用いてアミノ酸の微量定量を行なつた. その後 Peterson⁴³⁾ が血漿の corticosterone の定量を行ない, 同様の方法で Ayres⁴⁴⁾ は尿中の cortisol と aldosterone を測定した. その他多数の報告がある⁴⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾⁵²⁾⁵³⁾.

estrogen では一井等⁵⁴⁾ が estrone-6,7-H³, estradiol-6,7-H³ を用いて, 血漿中の estrone, estradiol を Bush system の paperchromatography で Finkelstein の磷酸螢光法により測定した. Barlow³⁰⁾ は尿中の estrogen を estrone-6,7-H³, estradiol-6,7-H³ と副腎卵巢摘除婦人に estrone-6,7-H³ を静注し, その尿から精製した estriol-6,7-H³ を用いて, Bush system の paperchromatography と alumina column chromatography で精製分画し, 硫酸螢光法で測定した. Oakey 等⁵⁵⁾ は C¹⁴ を用いて partition column chromatography と Bush system の paper chromatography で estrone, estradiol-17α, estradiol-17β, estriol-16β, 17β, estriol-16α, 17β を分けた. Hobkirk 等⁵⁶⁾ は estrone-16-C¹⁴, estriol-16-C¹⁴, estradiol-17β-6,7-H³, 16-ketoestradiol-17β-16-C¹⁴ を用いて Bauld の変法で column partition chromatography で男子と更年期婦人の尿中 estrogen を測定した. reverse chiltution method で測定したものでは Gallagher 等⁵⁷⁾ の実験がある. 即ち副腎卵巢摘除婦人に estradiol-16-C¹⁴ を静注して, その尿を集め, carrier として既知の量である estrone, estradiol, estriol を比較的大量加えてからそれを Brown 法で比色定量したものである.

又 estrogen の metabolism の研究で Beer, Gallagher⁵⁸⁾⁵⁹⁾, Levitz 等³²⁾²³⁾ この方法を用いている.

isotope dilution method よりももつと精密に測れる方法として、1946年 Udenfriend等⁶⁰⁾はアミノ酸を I^{131} , S^{35} -pipsyl derivative を用い、double isotope dilution derivative method を試みた。1954年 Avivi⁶¹⁾ が H^3 及び C^{14} で標識された acetic anhydride を steroid に応用することに至り、Kliman と Peterson⁶²⁾ が aldosterone をこの方法で測ることに成功した。その後 Riondet等⁶³⁾ は血漿中の testosterone と progesterone を S^{35} -thiosemicarbazide と H^3 -steroid を用いて測り、Bojesen, Degn⁶⁴⁾ は aldosterone を S^{35} -p-iodobenzene sulfonic acid anhydride derivative と I^{131} -p-iodobenzene sulfate acid anhydride steroid より求めた。Hudson 等⁶⁵⁾ は testosterone-4- C^{14} と acetate- H^3 により血漿中の testosterone を測定す。estrogen は Svendsen⁶⁶⁾ が血漿中の estrone と estradiol を p-iodobenzene sulphonyl chloride- S^{35} で ester 化し、既知量の estrone, estradiol-3-p-iodobenzene sulphonyl- I^{131} を加え、 S^{35}/I^{131} の測定から、estrone, estradiol を定量する方法である。操作がかなり困難である。Siiteri⁶⁷⁾ は妊婦に estradiol-6,7- H^3 と dehydroepiandrosterone-4- C^{14} -sulfate を静注してその尿中の estrone, estradiol, estriol を非放射能測定 H^3 -acetic anhydride で acetyl 化したものより H^3/C^{14} を specific activity を求め計算した。

我国では1960年神戸川⁶⁸⁾ が dimethyl sulfate- H^3 と estrone- C^{14} 及び estradiol- C^{14} より double isotope dilution derivative method を報告しており、相沢⁶⁹⁾ が estrogen を p-iodophenyl-sulphonyl chloride- S^{35} (pipsyl chloride- S^{35}) で ester 化し、estrogen pipsylate として UVlight と autoradiography により確認し、検量曲線を求めたところ、 $0.001\mu g$ 以上の estrogen を測定しえたといっており、稲葉⁷⁰⁾ は相沢の estrogen pipsylate を用いて H^3 -acetic anhydride より double isotope dilution derivative method を考え、 $0.005\mu g$ のものを測定したと報告している。放射能を用いたその他の方法は Raliffson⁷¹⁾, Berliner⁷²⁾ の isotope derivative method があり、相沢の方法もこれに準ずる。Karman⁷³⁾ の testosterone に Gas-chromatography を用いた derivative ratio analysis があるがこれはあまり用いられていない。

V. 結 論

- 1) isotope dilution method を用い、Ittrich の方法に基づいて、尿中 estrogen を測定した。
- 2) Ittrich の方法そのものでは不純物が多いので、

silicagel column で脱脂、脱色を行ない、saponification でも残りの脂肪をとり、alumina column で estrogen のみを取り出し、Bush system の paperchromatography で estrone, estradiol, estriol の3分画を行なつた。

3) paperchromatography の R_f は Bush B_1 で estrone 0.77, estradiol 0.43, estriol 0.02, Bush C で estrone 0.90, estradiol 0.87, estriol 0.27であつた。

4) p-nitrophenol-chloroform で抽出した estrogen の吸収曲線は $537m\mu$ で最大吸収となり、 $517m\mu$ から $557m\mu$ までは直線をえがくのでこの3点を取り、Allen の補正式で補正值を出した。

5) 検量曲線で estrone, estradiol, estriol 共 $0.5\sim 5\mu g$ で直線をえがいた。

6) この方法による回収率は estrone $44.8\pm 3.4\%$, estradiol 58.8 ± 5.9 , estriol $30.1\pm 1.5\%$ であり、再現性試験では大体一致することがわかつた。

estrogen の測定は他の steroid に比して微量であるため、操作が長く、そのため回収率も悪くなり、満足した値が得られないことが多い。従つて放射能を標識した、estrogen を用いれば、回収率の補正ができるので正確な値が得られる。

以上の方法は精製を充分行なつたため、回収率は悪くなつたが、色素が除去されて正確な値を得ることが出来たと思う。

稿を終るに当たり、終始御懇篤なる御指導御校閲を戴いた恩師鈴木雅洲教授に深く感謝の捧げると共に、本研究に当り御助言を戴いた新潟大学医学部生化学教室緒方規矩雄教授、新潟大学医学部アイソトープ研究室清水泰二教授、放射線医学総合研究所一井昭五博士並びにアイソトープを提供して下さつた New York 大学 Dr. Levitz に深謝いたします。また御指導、御援助を賜つた当教室広井正彦先生、阿部稷先生、北条泰輔先生に感謝いたします。

尚本論文の一部要旨は第18回日本産科婦人科学会総会、第14回日本内分泌学会東部部会並びに第4回日本産科婦人科学会内分泌懇話会に発表した。

主要文献

- 1) Ittrich, G.: Acta endocrinol., 35 : 34, 1960.
- 2) Salakangas, A.A. and Bulbrook, R.D.: J. Endocrinol., 22 : 47, 1961.
- 3) Bradshaw, L.: Nature, 190 : 801, 1961.
- 4) Ittrich, G.: Hoppe-Seyler Z. physiol. chem., 312 : 1, 1958.
- 5) Bush, I.E.: Biochem. J., 50 : 370, 1952.
- 6) Allen, W.M.: J. Clin. Endocrinol., 10 : 71, 1950.

- 7) Kober, S.: *Biochem. Z.*, 239 : 209, 1931. — 8) Marrian, G.F.: *Biochem. J.*, 24 : 435, 1930. — 9) Cohen, H., and Bates, R.H.: *Endocrinol.*, 45 : 86, 1949. — 10) Venning, E.H.: *J. Biochem.*, 120 : 225, 1937. — 11) Brown, J.B.: *J. Endocrinol.*, 8 : 196, 1952. — 12) Finkelstein, M.: *Acta endocrinol.*, 10 : 149, 1952. — 13) Bauld, W.S.: *Biochem. J.*, 63 : 488, 1956. — 14) Furuhielm, M. and Wallen, R.: *Acta endocrinol.*, 27 : 482, 1958. — 15) Goldzieher, J.W., Baker, R.A., and Riha, E.C.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21 : 62, 1961. — 16) Stimmel, B.F.: *J. Biol. Chem.*, 162 : 99, 1946. — 17) Burton, R.B., Zafforani, A. and Keutmann, E.H.: *J. Biol. Chem.*, 188 : 763, 1951. — 18) Axelrod, L.R.: *J. Biol. Chem.*, 201 : 509, 1953. — 19) Axelrod, L.R.: *Recent Progress in Hormone Research*, 9 : 69, 1954. — 20) Breuer, H., and Nockel, L.: *Acta endocrinol.*, 29 : 489, 1958. — 21) Dancis, J., Money, W.L., Condon, G.P. and Levitz, M.: *J. Chin. Invest.*, 37 : 1373, 1958. — 22) Levitz, M., Condon, G.P. and Dancis, J.: *Endocrinol.*, 58 : 376, 1956. — 23) Levitz, M., Spitzer, J.R., and Twombly, G.H.: *J. Biol. Chem.*, 222 : 981, 1956. — 24) Levitz, M., Spitzer, J.R. and Twombly, G.H.: *J. Biol. Chem.*, 231 : 787, 1958. — 25) Thewalt, K. and Zimmermann, W.: *Acta endocrinol.*, 38 : 121, 1961. — 26) Mitchell, F.L. and Davis, R.E.: *Biochem. J.*, 56 : 690, 1954. — 27) Mitchell, F.L.: *Nature*, 170 : 621, 1952. — 28) Dao, J.L.: *Endocrinol.*, 61 : 242, 1957. — 29) Porter, C.W., Clark, E.L. and Block, G.E.: *J. Lab. and Clin. Med.*, 54 : 471, 1959. — 30) Barlow, J.J.: *Anal. Biochem.*, 6 : 435, 1963. — 31) Czeizel, E., and Palkovich, I.: *Zbl. Gynäk.*, 86 : 403, 1964. — 32) Mahesh, V.B.: *Steroids*, 3 : 647, 1964. — 33) Helfman, E.: *Science*, 111 : 571, 1950. — 34) Helfman, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, 73 : 851, 1951. — 35) Heughe, C.: *Nature*, 171 : 42, 1953. — 36) Roy, E.: *Acta endocrinol.*, 38 : 56, 1958. — 37) Slaunwhite, W.R. and Saunberg, A.A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 63 : 478, 1956. — 38) Migeon, C.J., Wall, P.E. and Bertrand, J.: *J. Clin. Invest.*, 38 : 619, 1959. — 39) Kecske's, L., Mutschler, F., Glós, I., Thán, E., Farkas, I., Coglèdi, J., and Kober, J.: *Acta endocrinol.*, 38 : 545, 1961. — 40) Rittenberg, D., and Foster, G.L.: *J. Biol. Chem.*, 133 : 737, 1940. — 41) Graff, S., Rittenberg, D., and Foster, G.L.: *J. Biol. Chem.*, 133 : 745, 1940. — 42) Schoenheimer, R., Ratner, S., and Rittenberg, D.: *J. Biol. Chem.*, 130 : 703, 1939. — 43) Peterson, R.E.: *J. Biol. Chem.*, 225 : 25, 1957. — 44) Ayres, P.J., Garrod, O., Simpson, S.A., and Tait, J.F.: *Biochem. J.*, 65 : 639, 1957. — 45) Dominguez, O.V., Francois, G.D., Watanabe, M., and Solomon, S.: *Proc. Endocrine Soc. 44th Meeting*, 35 : 17, 1962. — 46) Ayres, P.J., Garrod, O., Tait, S.A.S., Tait, J.F., Walker, G. and Pearlman, W.H.: *Ciba Foundation Colloq. Endocrinol.*, 11 : 309, 1957. — 47) Jones, K.M., Lloyd-Jones, R., Riindel, A., Tait, J.F., Tait, S.A.S., Bulbrook, R.D., and Greenwood, F.A.: *Acta endocrinol.*, 30 : 321, 1959. — 48) Venning, E.H. and Dyrenfurth, I.: *Acta endocrinol. Suppl.*, 51 : 665, 1960. — 49) Hurter, R. and Nabarro, J.D.N.: *Acta endocrinol.*, 33 : 168, 1960. — 50) Coppage, W.S., Island, D.P., Cooner, A.E., and Liddle, G.W.: *J. Clin. Invest.*, 41 : 1072, 1962. — 51) Cope, G.L. and Black, E.G.: *Clin. Sci.*, 17 : 147, 1958. — 52) Cope, G.L. and Black, E.G.: *Brit. Med. J.*, 1 : 1020, 1958. — 53) Ulick, S., Laragh, J.H., and Liebermann, S.: *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 71 : 225, 1958. — 54) Ichii, S., Forchiell, I.E., Perloff, W.H. and Dorfman, R.I.: *Anal. Biochem.*, 5 : 422, 1963. — 55) Oakey, R.E., Stitch, S.R., and Eccles, S.S.: *J. Chromatog.*, 11 : 355, 1963. — 56) Hoblirk, R. and Nilsen, M.: *Steroids*, 3 : 453, 1964. — 57) Gallagher, J.F., Krachy, S., Fishman, J., Brown, J.B. and Marrian, G.F.: *J. Biol. Chem.*, 233 : 1093, 1958. — 58) Beer, C. and Gallagher, T.F.: *J. Biol. Chem.*, 214 : 335, 1955. — 59) Beer, C., and Gallagher, T.F.: *J. Biol. Chem.*, 214 : 351, 1955. — 60) Keston, A.S., Udenfriend, S. and Cannon, R.K.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 68 : 1390, 1946. — 61) Avioli, P., Simpson, S.A., Tait, J.F. and Whiethead, J.K.: *Radioisotope Conf.*, 1 : 313, 1954, Oxford. — 62) Kliman, B. and Petesom, R.E.: *J. Biol. Chem.*, 235 : 1639, 1960. — 63) Riindel, A.M., Tait, J.F., Tait, S.A.S., Little, B. and Gut, M.: *Abstract*, 33 : 44th. Annual Meeting, Endocrine Society, Chicago, 1962. — 64) Bojesen, E. and Degn, H.: *Acta endocrinol.*, 37 : 541, 1961. — 65) Hudson, B., Cochlan, J., Dulmanis, A., Wintour, M. and Ekkel, I.: *Austral. J. exp. Biol.*, 41 : 235, 1963. — 66) Svendsen, R.: *Acta endocrinol.*, 35 : 161, 1960. — 67) Siiteri, P.K.: *Steroids*, 2 : 687, 1963. — 68) 神戸川明 : 日本内分泌学会誌, 42 : 756, 1966. — 69) 相沢義雄 : 日本内分泌学会誌, 42 : 776, 1966. — 70) 稲葉稔第14回日本内分泌学会東部学会講演要旨. — 71) Ruliffson, W.S.: *J. Biol. Chem.*, 201 : 839, 1953. — 72) Berliner, D.L.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94 : 126, 1957. — 73) Karman, A., McCaffrey, I. and Kliman, B.: *Anal. Biochem.*, 6 : 31, 1963.

(No. 2018 昭42・2・6 受付)