

ヒト Prolactin の免疫学的知見補遺

東京医科歯科大学医学部産科婦人科学教室(主任:藤井久四郎教授)

浜 口 治 雄

概要 (1)ヒト下垂体(合計 240個)から, Li の方法によつて Prolactin (PL), Growth hormone (HGH), Gonadotropin (G) を, 更にヒト胎盤からは所謂 Human Placental Lactogen (HPL) を中野渡等の方法を用いて抽出した. 各抽出物については生物学的活性を確認した. 抽出物には特に Chromatography などによる純化の操作は加えなかつたが, 各々によつて作製した抗ヒトホルモン免疫家兎血清を検討したところ, 抗体としての特異性は充分であつた. そこでこの抗ヒトホルモン免疫家兎血清の夫々について免疫学的吟味を行なつた.

(2) PLとHGHとの関係は最も問題になつている点であるが, 特に抽出物の純化を行なわなかつたにも拘らず, 各々に免疫学的特異性のある程度認めることが出来た. しかし免疫学的に両者を分離することは出来なかつた.

(3) ヒト血清 Acetone 抽出物質, 尿 Kaolin 抽出物質は妊娠後期より産褥期に至るまで抗PLと沈降反応を示した. しかし抗HGHとは反応を示さなかつた.

(4) 抗HPL血清は HGH, Apostolakis 法による PL Extract と沈降反応を示した. 無抽出の婦人血清は妊娠3ヵ月から抗HPL血清と沈降反応を示し, 分娩後には最大3時間まで同じ反応を起した. 抗HPL血清と臍帯血清とは全く反応しなかつた.

(5) 以上の結果から, ヒトのPLとHGHとHPLとを完全に免疫学的に分離することは出来なかつた. しかし, PLはHGH及びHPLとはちがつて授乳婦人血中及び尿中物質と免疫反応する特性をもつことが認められた.

緒 言

ヒツジやウシに於いては, Prolactin (PL), Growth Hormone (GH) は下垂体から分離抽出が出来るが, ヒト下垂体からは分離抽出は困難であり, そのPL活性は Human growth hormone (HGH)の中に含まれる(Li & Liu, 1964), 即ちPL活性とGH活性とは生物学的にも免疫学的にも同一の分子の性質であるとする説, Irie & Barrett (1962), 又一方 Chen & Wilhermi (1964) は Chromatography で pastels, Brauman & Brauman (1963) はヒト下垂体の Tissue Culture によつてHGHとPLを分離できるとした. また Apostolakis (1964) はAcetoneを大量に用いる抽出法によつて, 活性比(PL:HGH)が(8:2)になるまでに分離し得たと報告している. 今回は Li (1959) の方法を用いて下垂体から Proteo hormone PL, HGH, G を抽出し, 特に純化の過程を経ないで各 Proteo hormone の抗体を作製, 免疫学的な面から, それぞれの沈降反応, 婦人血清及び尿中のPL様物質との沈降反応, 更に問題

となつている Human Placental Lactogen(HPL)をも抽出してその関連性についても実験した.

実験材料

2-1) ヒト下垂体

凍結保存した, 総計(A) 100個, (B) 140個のヒト下垂体を使用した.

2-2) ヒト胎盤

分娩後直ちに凍結保存し実験に供した. 約1,000gの胎盤から 3.6gのHPL収量があつた.

2-3) ヒト血清及びヒト24時間尿

血清は正常人, 妊娠及び褥婦(泌乳婦を含む)の肘静脈より採血後, Acetone 抽出に供するものは直ちに冷 Acetone 中に滴下して処理し, 無抽出のまま実験に供するものは5~10分室温放置後, 低温遠心機にて血清を分離した.

実験方法

3-1) 各 hormone 及びPL様物質の抽出法及びその生物学的活性

3-1-1) ヒト下垂体からのPL, HGH, Gの抽出は表(1)に示した如く, 主としてGHを

表1 Biological Activity of hormones

Hormones	Extract method	PL Activity	HGH Activity	G Activity
		Pigeoncrop	Tibia test	Mouse uterine weight method
(A) P L	Li	30 iu/mg	0.4mg (—) 0.2mg (+)	notdetected
(B) P L	Li	10 iu/mg	0.4mg	notdetected
(A) HGH	Li	10 iu/mg	0.025mg	notdetected
(B) HGH	Li	53 iu/mg	0.05mg	notdetected
G	Li	0.83iu/mg	0.4mg (—) 0.025mg (+)	0.3mg (+) 0.1mg (—)
H P L	Nakano, Okamoto, Otsuka,	3.6 iu/mg	(±) +	notdetected

+ significant difference with $P < 0.05$

抽出する, Liの方法に従った. P L及びHGHは前後2回に分けて抽出した. 即ち表に示す(A)は100個から, (B)は140個の下垂体から抽出したものである.

3-1-2) ヒト血清中のP L様物質抽出はSimkin (1958) のAceton 抽出法に従った.

3-1-3) ヒト尿中P L様物質抽出はFujii & Shimizu, (1958) のKaolinを用いる方法に従った.

3-1-4) ヒト胎盤中催乳物質, 即ちH P Lは中野渡, 岡本等の方法で抽出したものを使用した.

3-1-5) 各抽出物質の生物学的活性

表(1)に示した如く, Liの抽出法によるHGHのP L活性がむしろP Lよりも高かったことは抽出の何等かの条件によるものであろうが, 十分な量がないために特に純化して吟味することは出来なかった. また特に問題となるH P LのGH活性は5%の危険率で有意でなかった.

3-1-6) 免疫抗体作成法

各Hormoneの免疫家兎血清作製には成熟家兎2.5-3kgで, 家兎の趾間に各抽出物5mgを生理的食塩水2mlに溶解し, Complete-Freund's Adjuvant 2mlを加えたもので, 14日間隔で6回, 総計30mgを各々の家兎に注射した. 最後の注射後7日目に頸動脈より全採血して血清を分離, 56°C, 30分で非働化し, 0.1%の割合にマーズンを加え, -20°Cで凍結保存した.

3-2) 沈降反応 Precipitation

3-2-1) 重層沈降輪反応 Precipitin ring test

内径3mm長さ8cmの小試験管に, 正常家兎血清(Normal Rabbit Serum以下NRS)で倍数稀釈した各抗血清をそれぞれ0.1ml宛分注して各々に1mg/mlのhormone標品0.1mlを重層した後室温で5時間後まで観察し接触境界の白色輪の有無によつて抗原価及び抗体価を測定した.

3-2-2) 寒天Gel内沈降反応 (Ouchterlony法)

Difcobaocto-agar Standardを生理的食塩水に1.2%の濃度に加熱溶解後pH7.0に調成し, この1lに対して細菌の発生を防ぐために, マーズン1滴と, 色素のScaret red 0.02gを加えて加熱濾過する. これを直径90mmのシャーレに10ml宛注入して第1層を作成し, 凝固させた後に中心部とその周囲とに真鍮製の四角形の枠をたて, 更に寒天15mlを注加した. 冷却後枠を抜き去り, 中心部には抗血清を, 周囲には抗原液を入れ37°Cで14日沈降帯を観察した.

3-2-3) Ouchterlony-Elek: Kohnの変法

OxoidのCellulose Acetate膜を使用した. 膜は緩衝液pH8.6(0.07M)湿らせた後に膜の乾燥を防ぎながら中心部に抗血清を, 周囲には抗原液を塗付し, 次に流動パラフィン中に膜を固定して, その膜を水洗後エーテルでパラフィンを除去し大量の緩衝液で4時間脱蛋白の処理を加えた後

に、ボンソー 3 R で染色、次に 1% 冰酢酸で弁色した後、沈降帯を 12, 24, 48 および 72 時間の各時間に観察した。

3-3) 補体結合反応 Complement fixation test Kolmer 法の変法により、抗原系列には 200, 50, 12, 3, 0.8, 0.2, 0.05, 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の HPL 食塩水溶液 0.5ml を用い、抗体系列には生理的食塩水で 16, 32, 64, 128, 256 倍に稀釈した抗 HPL 溶液 0.5 を用いた。抗原及び抗体系列は二次元的に組合せて試験管内で混和して更に 2 full unit の補体を加え、4°C 18 時間放置後、溶血素と感作羊赤血球を加えて 37°C, 1 時間保温した後、溶血状態を観察した。対照には生理的食塩水に各濃度の HPL 溶液を加えたものを用いた。

3-4) 赤血球凝集反応 Hemagglutination Stavitsky (1954) の変法と Read (1960) の方法を参考にした。抗 PL 血清及び抗 HGH 血清は 56°C, 30 分間加熱して非動化した後、洗滌したヒト O 型赤血球で異種赤血球凝集素を吸収した。吸収はヒト O 型赤血球と抗血清との間に凝集が起らなくなるまで行なつた。PL, HGH 結合タンニン酸処理赤血球は 0.85% 食塩水で 3 回洗滌したヒト O 型赤血球 0.1ml を 4.9ml の pH 7.2 磷酸緩衝液生理的食塩水 (pH 7.2 phosphate Buffered-Saline, 以下 7.2-PB-S) に浮遊して 50×10^4 倍に pH 7.2 PB-S で薄めたタンニン酸溶液 5ml を加え、37°C 15 分間処理した後 pH 7.2 PB-S で 1 回洗滌したものを 4.9ml の pH 7.2 PB-S に浮遊せしめた。次に pH 7.2 PB-S 5ml に 600 μg の PL, 或は pH 7.2 PB-S 5ml に 200 μg の HGH を溶した溶液をタンニン酸処理血球浮遊酸液に加えて 37°C, 30 分間放置し、PL, HGH をそれぞれ結合させた後、生理的食塩水 100 倍稀釈、NRS で 3 回洗滌して 1,000 倍稀釈 NRS 6.9 ml に浮遊させ 1.4% 浮遊感作赤血球とした PL 或は HGH タンニン酸処理赤血球は 4°C で保存し、20 時間以内に使用した。

測定には内径 10mm 長さ 100mm の試験管に 50 倍 NRS で倍数稀釈した抗 PL 血清、抗 HGH 血清を

0.2ml 宛分注し、これに 1.4% 感作赤血球浮遊液 0.013ml を加え、4 時間室温で凝集像を判定した。対照は 50 倍稀釈 NRS 生理的食塩水を用いた。

3-5) 赤血球凝集阻止反応 Hamagglutination inhibition test 抗原系列として 512, 256, 128, 4, 2, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のように倍数稀釈した溶液の 0.1ml に対し、抗体系列としては抗体価 8 倍の抗 PL, 或は抗 HGH を倍数稀釈し、その 0.1ml を用いて各々を 2 次元系列で反応させて 30 分後に 1.4% 感作赤血球浮遊液 0.2ml を加えて 4 時間後に凝集阻止を観察した。

4. 実験成績

4-1) 各抗血清の抗体価及び各抽出物との沈降反応

4-1-1) 抗体価

表 2 に示す如く、抗 PL, 抗 HGH は重層沈降

表 2 Preciptin ringtest of varing concentrations of Anti-PL with PL

PL 1mg/ml	"	"	"	"	"	Control
Anti-PL	" 2X	" 4X	" 8X	" 16X	" 32X	
(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)

表 3 Haemagglutination inhibition of varing concentrations of Anti-PL by PL

Anti-Serum	(SBC)	hor-mone	Dilutions of Antigen							
			4	8	16	32	64	128	256	512
Anti-PL Serum absorbed with human-serum	PL-SBC	PL	—	—	—	—	—	—	±	+
		HGH	—	—	—	—	—	—	±	+

表4 Interreaction of each Anti-Pituitary hormones serum with pituitary hormones, postpartum serum, urine extract, Albumin, Globulin and Bovine PL as determined by ouchterlony test.

Hormone	ANTI-Serum	Anti-PL			Anti-HGH			Anti-G		
		Reac-tion	dose	Time	Reac-tion	dose	Time	Reac-tion	dose	Time
PL		+	1 mg/ml (0.2ml) 0.1mg/ml (0.2ml)	120h	+	1mg/ml (0.2ml) 0.5mg/ml (0.2ml)	120h	—		
HGH		+	1mg/ml (0.2ml) 0.5mg/ml (0.2ml)	120h	+	0.125mg/ml (0.2ml) 0.1mg/ml (0.2ml)	120h	—		
G		—			—			+	1mg/ml (0.2ml) 0.2mg/ml (0.2ml)	120h
Albumin		—			—			—		
Globulin		—			—			—		
HARN-PL (Kaolin. Ext)		+	0.5mg/ml (0.2ml)	120h	—			—		
Women serum (PL)		+	5ml	168h	—			—		
Bovine (PL)		—			—			—		

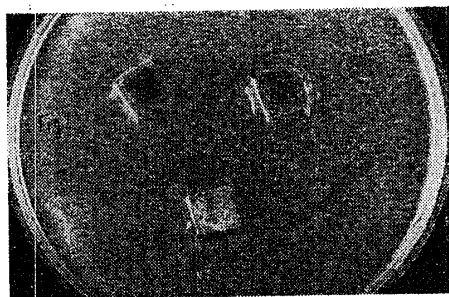
輪反応で抗原価 512倍, 抗体価 8 倍であつた. 抗 G は 256倍, 抗体価は 4 倍であつた.

表 3 に示す如く, 赤血球凝集阻止反応で PL 或は HGH 128倍 (約20 μ g/ml) まで凝集反応阻止の判定が可能であつた.

4-1-2) Ouchterlony 及び Ouchterlony-Elek: Kohn の変法による PL, HGH, G間の沈降反応

表 4 及び 5, 写真 1, 2, 3, 4 に示す様に抗 PL と PL との沈降反応線 (写真 1, 2) をみる

写真1 Precipitation lines in agar plate between upper wells containing human pituitary prolactin (PL) and the lower well containing rabbit antiserum to PL: reaction of antigenic identity.



と, Ouchterlony, Ouchterlony-Elek: Kohn 変法ともに, 鮮明な単一の反応線である. 更に抗 PL は HGH とも反応するが, それは不鮮明で, しかも巾広く, 図. 3 にみる様に中心部で HG

写真2 The precipitation reaction designating antigenic partial identity upper left well, HGH: upper right well, HGH. lower well, Rabbit antiserum to HGH. Note that the lines are single, symmetrically placed and join end to end at the midline, denoting identity of the antigens in the upper 2 wells.

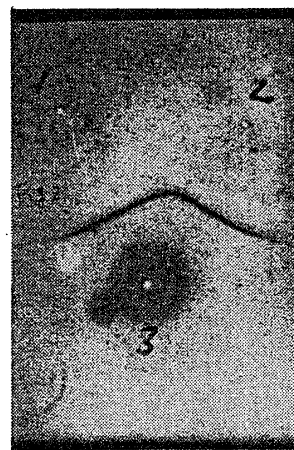
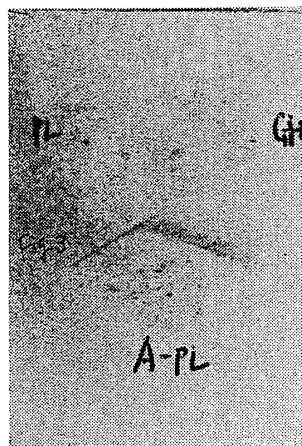


写真3 The precipitation reaction designating antigenic identity between two substances. upper left well, PL: upper right well, HGH: lower well, Rabbit antiserum to PL.

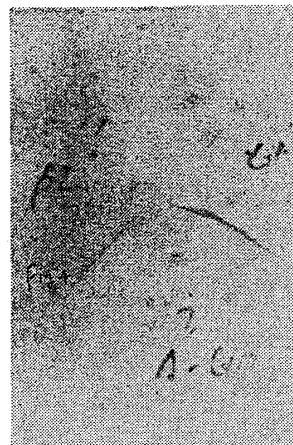


Hの沈降帯と部分交叉している。

抗HGHとHGHとの沈降帯(図. 2, 4)は鮮明ではあるが, 2本の沈降帯が重なった形である。また抗HGHは抗PLがHGHと反応すると同じく, PLと反応する。その沈降帯は図4の様に抗PLとPLのそれに比較して淡いが同様に鮮明であり中心部でPLの沈降帯と融合していた。

抗PL, 抗HGHともにGとは反応線を全く形

写真4 The precipitation reaction designating antigenic identity between two substances. upper left well, PL: upper right well, HGH: lower well, Rabbit antiserum to HGH.



成しなかつた。

抗GはGと鮮明な沈降帯を示すが, PL, HGHとは反応しなかつた。

抗PL及び抗HGHに対するPL, HGHの最小反応時間は, Ouchterlony 法で5日目, Elek: Kohn の変法では48時間, 抗原量 0.1mg/ml × 2, 抗体量は Ouchterlony 法で 0.2ml, Elek: Kohn 変法では 0.02ml であつた。抗原量 0.01mg/ml × 5, 抗体量 0.2ml 或は 0.02ml では反応線

表5 Interreaction of each Anti-pituitary hormones with pituitary hormones, human serum Extract, Urine Extract and Albumin as determined by Ouchterlony-Elek: Kohn test

Hormone	ANTI-serum	Anti-PL			Anti-HGH			Anti-G		
		Reac-tion	dose	Time	Reac-tion	dose	Time	Reac-tion	dose	Time
PL		+	0.1mg/ml (0.02ml) 0.05mg/ml (0.02ml)	48~ 72h	+	0.1mg/ml (0.02ml)	48~ 72h	—		
HGH		+	0.05mg/ml (0.02ml)	48~ 72h	+	0.05mg/ml (0.02ml)	48~ 72h	—		
G		—			—			+	0.5mg/ml (0.02ml)	48~ 72h
Albumin		—			—			—		
Globulin		—			—			—		
HARN-PL (Kaolin. Ext)		+	0.5mg/ml (0.02ml)	48~ 72h	—			—		
Women serum (PL) (Aceton. Ext)		+	0.05ml	72h	—			—		

表6 Interreaction of Anti-PL with human serum extract as determined by Ouchterlony-Elek: Kohn test.

	Normal men	Normal women	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Postpartum
Positiv	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	2/5	1/5 1/5

形成はみられなかつた。

4-2) 抗PLとヒト血清 Acetone 抽出物質、尿中 Kaolin 抽出物質との沈降反応

以下全て、Ouchterlony-Elek: Kohn の変法により検討を加えた。

正常男子、正常婦人、妊娠中、産褥期婦人、各群5列につき、血清 Acetone 抽出を用いて実験を行なつた。表6の如く正常男子、正常婦人（卵胞期、黄体期ともに）では、全て沈降反応はみられず、妊娠9カ月になつてはじめて1例が反応を示し、10カ月で2例、産褥期で2例が反応した。産褥期では1例は産褥3日目、1例は5日目であり、泌乳良好な婦人であつた。

尿中 Kaolin 抽出物質は、産褥第5日目、すべて泌乳良好な婦人尿を用いたが、16倍から256倍まで沈降反応を示した。更に無抽出尿（原尿）4例では全く沈降反応は起らなかつた。

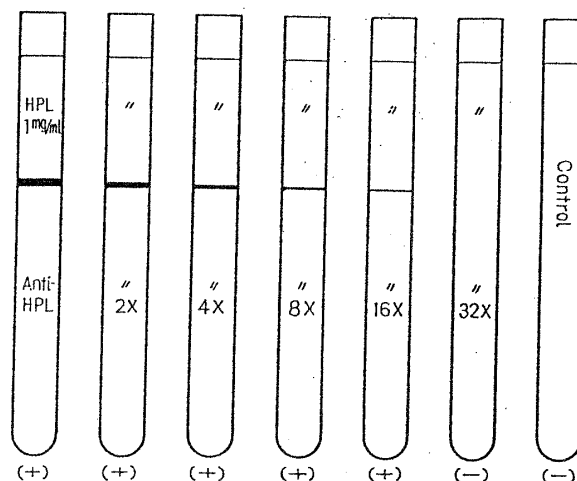
4-3) HPLの免疫学的検討

4-3-1) 抗体価

表7に示す如く、抗HPL中には重層沈降輪反応でHPLと反応する沈降素が認められ、その沈降素量（抗体価）は16倍であつた。

表8に示す如く補体結合反応での抗体価は1:

表7 Preciptin ring test of varing concentrations of Anti-HPL with HPL



128, 抗原価は3 $\mu\text{g/ml}$ であつた。16倍稀釈、抗HPLで0.2 $\mu\text{g/ml}$ のHPLまで反応を起こした。

4-3-2) 抗HPLと各抽出物及び婦人血清との反応

表9に示した様に、抗HPLとHPLとは沈降反応を起こし、HGH, Apostolakis PL Extractとも反応したが、PL及びGとは反応を示さなかつた。また、Simkinの抽出法による血中PL様物質とは全く沈降反応を示さなかつた。

表8 Copmlement fixation reaction of Anti-HPL

Anti-HPL \ HPL $\mu\text{g/ml}$	200	50	12	3	0.8	0.2	0.05	0.01	Saline
1 : 16	4	4	4	4	4	4	1	0	0
1 : 32	4	4	4	4	4	0	0	0	0
1 : 64	4	4	4	4	2	0	0	0	0
1 : 128	4	4	4	4	0	0	0	0	0
1 : 256	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Saline	0	0	0	0	0	0	0	0	

0 : Complete hemolysis

1.2 : Incomplete hemolysis

4 : Non-hemolysis

Antibody titer 1 : 128

Antigen titer 3 $\mu\text{g/ml}$

表9 Interraction of Anti-HPL with HPL, humanpituitary hormones, human serum Extract and purehuman Albumin as determined by Ouchterlony Elek: Kohn test.

Hor-mone	Anti-HPL serum	Anti-HPL (0.02ml)		Time
		reac-tion	precipitation line dose	
H P L		+	0.1mg/ml (0.02ml) 0.01mg/ml (0.02ml) 0.001mg/ml (—)	48~ 72h
HGH		+	0.05mg/ml (0.02ml) 0.02mg/ml (—)	48~ 72h
Apostolakis Ext		+	0.05mg/ml (0.02ml) 0.03mg/ml (—) (0.02ml)	48~ 72h
P L		—		
HCG		—		
HMG		—		
Woman blood serum		+	0.08ml 0.04ml (—)	72h
human * blood serum PL Ext		—		
Albumin		—		
Globulin		—		

* Simkin

表10に示す如く血清を用いて正常婦人、妊娠中、産褥婦人、すべて5例ずつ観察した結果、妊娠3カ月で2例、4カ月で1例、5カ月から8カ月までは2例、9カ月、10カ月は3例と増加の傾向がみられた。産褥期では、同一患者で分娩時から0、0.5、1、3、6、12、24時間と反応を観察したが、5例中2例は反応を全く起さず、1例は1時間まで、2例は3時間まで沈降反応を示した。

写真5、6に示す如く抗HPLとHPLは鮮明な単一な反応線であつた。HGHとの反応をみると中心部で部分交叉反応を示した。PLとは反応

写真5 The precipitation reaction designating antigenic partial identity upper left well, HPL: upper right well, HPL. lower well, Rabbit antiserum to HPL. Note that the lines are single, symmetrically placed and join end to end at the midline, denoting identity of the antigens in the upper 2 wells.

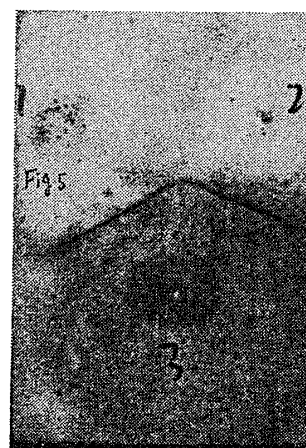


写真6 The precipitation reaction designating antigenic partial identity. Upper left well, HGH: upper right well, HPL: lower well, Rabbit antiserum to HGH. Note that the right-hand precipitation line joins end to side, resulting in a spur of the end of the left-hand line.

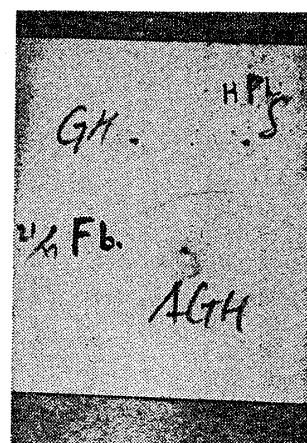
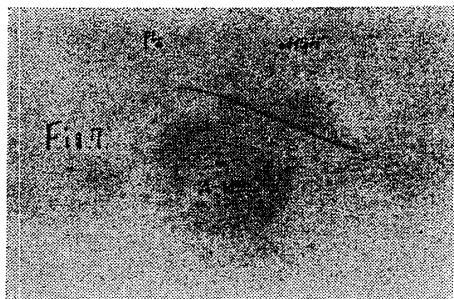


表10 Interreaction of Anti-HPL with sera from normal, pregnant and post partum women as determined by Ouchterlony-Elek-Kohn test.

positive No.	Normal	pregnancy										postpartum		
	0/5	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	1 hr	3 hrs	6 hrs
		0/5	0/5	2/5	1/5	2/5	2/5	2/5	2/5	3/5	3/5	1/5	2/5	0/5

写真7 The precipitation reaction designating antigenic partial identity upper left well, PL: upper right well, HGH. lower well, Rabbit antiserum to HPL.



線を形成しなかつた (写真7)。

特に興味ある結果は無抽出のままの妊娠末期から産褥, 3時間までの婦人血清と反応し Acetone 抽出による血清中 PL 様物質とは反応しないことである。これは PL と沈降反応しないことと符合する。

考 案

Ouchterlony 法及び Ouchterlony-Elek-Kohn の変法による各下垂体抽出物間の沈降反応を観察すると, 表4, 5の如くであるが興味ある反応は, 抗 $PL < \frac{HGH}{PL}$, 抗 $HGH < \frac{PL}{HGH}$ の沈降帯である。即ち図1, 2, 3, 4の如く, 抗 PL と PL の沈降帯は鮮明な単一の反応である。抗 HGH と HGH との沈降帯は鮮明ではあるが, 2本の反応線が重なった形である。更に抗 PL は HGH ととも反応するが, それは不鮮明でしかも巾広く中心部で HGH の沈降帯と部分交叉している。また抗 HGH は PL ととも反応する。その沈降帯は抗 PL と PL のそれに比較して淡いが, 同様に鮮明であり中心部で PL の沈降帯と交叉反応を示している。以上の結果は, 抗 PL には混入物が殆んどなく, 抗 HGH には混入物の存在を思わせる。Hayashida (1962), Irie & Barrett (1962), Laron & Assa (1962) Apostolakis (1965) 等はヒト血清, ヒト Albumin が抗 HGH と反応を起すと述べ, また一方, Grumbach & Kaplan (1960) はこの様な混入物はないと主張している。今回の実験でも, 後者と同様にヒト血清, ヒト Albumin, ヒト Globulin とは Ouchterlony 法, Ouchterlony-Elek-Kohn の変法では全く沈降帯を形成しなかつた。このことは混入物の量が非常に少なく, 混入

物に対する抗血清は, 抗 HGH 抗 PL に比して抗体価が低いと思われる。この場合抗血清を稀釈するか, 抗血清に少量のヒト血清を加えることによつて除去出来ると Greenspan (1962), Boucher (1960), Irie & Barrett (1962), Laron (1962) 等は述べているが, 今回の実験でも同様であつた。抗 HGH を稀釈しても PL, HGH に対する2本の沈降帯が重複している様に観察されたのは, Li (1959) の抽出法が主として, HGH を抽出する方法であるため, 生物活性の項でも述べた如く, HGH が PL の分画を多量に含んでおり, しかも Column Chromatography 等による純化の過程を行なわなかつたために抗 HGH には抗 PL が多量に含まれていた影響とも推察される。HGH はサル GH と免疫学的に沈降反応を形成するが他の動物の GH とは全く反応しないことは Grumbach & Kaplan (1960), Li (1961) 等が報告しているが, 更に Hayashida (1962), Irie & Barrett (1962) 等も下垂体性ホルモンのうちで, PL と HGH とは沈降反応を起こすことを述べている。また HGH と PL とが生物学的作用の上でも共通部分を有するという結果も, Lyons, Li (1960), Ferguson (1963), Chadwick (1961) によつて報告されている。著者も同様の結果を観察したが, Levy & Sampliner (1961) は HGH とヒト PL との類似性の程度について決定的結論は下せないとしている。今回の実験結果から考えると, HGH 分画に PL が多量に混入したまま抽出されたためとも言えよう。しかし免疫学的には HGH と PL が反応を異にする事実を明らかにし得たと考えられる。ヒト下垂体から PL を抽出する試みは数多くみられるけど, ヒツジあるいはウシから得た標品に匹敵する生物学的活性を有するものは, いまだ得られていないようである。Apostolakis (1965) は1200個以上のヒト下垂体から PL 活性が GH 活性よりも明らかに (8:2) 強い分画を分離することに成功し, Laron & Assa (1962) は免疫学的方法でその分離を確認したと報告している。今回の実験では, 特に純化の過程を行ないえなかつたのは遺憾である。

ヒト尿中 PL 様物質の存在については, 藤井, 清水 (1958), Lyons, Li (1960), Meites & Turner

(1941)等の文献をみることが出来る。著者は産褥第3, 5日目の無抽出尿(原尿)及び Kaolin 抽出物と抗 P L との沈降反応を観察したが、無抽出尿は全く反応を起こさなかつたにも拘らず Kaolin 抽出物と抗 P L とは沈降反応を示した。P L の代謝物質が免疫特性をもつたまま尿中に排泄された可能性がある。この点に関しては更に検討の必要があろう。

血中 P L 様物質は、無抽出のままの血漿を用いるとハト嚙嚢テストで、月経周期では見られないが、妊娠では月数とともに上昇 (1.2—2.4 iu/ml) し、分娩後10日迄の授乳期には泌乳良好の場合は8~32pcu/mlであつた。これは大塚 (1968) の報告した血中 P L 様物質の動向と略一致している。

Simkin & Goodart (1960) は月経周期の黄体期に上昇し、授乳期には更に高値を示すことを報告している。今回の実験では妊娠後期(9カ月, 10カ月)及び産褥3, 5日目の婦人血清と抗 P L との間に沈降反応を示したが、月経周期には証明出来なかつた。また抗 HGH とは全く反応が起こらなかつたことから、授乳期においてウシ、ヤギについて血中 P L が上昇するように、ヒトにおいても泌乳に関係のある hormone すなわち P L が血中に増してくるはずであつて、しかもこれは H P L, HGH ではなく下垂体に由来する P L であることが推定される。これも更に検討を要するが興味ある事実であり、尿中物質を対象とした Fujii & Uruta (1965) の推定に一致する。

ヒト胎盤中の催乳物質、いわゆる H P L の存在は確認されて Cohen, Grumbach, Kaplan (1964), Friesen (1965), Josimovich & Maclaren (1962) はいるが、その物質の詳細については未だ明らかにされていない点が多い。

われわれは前に、伊藤, 東 (1961), 黒崎 (1961), Josimovich (1962), 等の各抽出物を用いてハトテストを行ない。そのハト嚙嚢腺の Sudan III 染色, 潤田 (1964), RNA/DNA 比, 石田 (1965), 及び中性脂肪酸の Gas chromatography, 川島 (1965) による分析などを試みた。その結果各抽出物が下垂体性の P L とは性状を異にする点を認めて報告している。すなわち H P L は存在するとしても、少な

くとも下垂体性の P L と同一の物質とは考え難い結果を得た (岡本 1969)。今回の Kaplan & Cohen (1964) の方法を基本とした抽出法, 岡本, 中野, 等 (1969) による H P L を用いて免疫学的考察を試みた。抽出した H P L は更に DEAE Cellulose Column 及び Sephadex-G-100 によつて純化した結果、その生物学的活性は 4 mg, 筋注, 0.1 mg 筋注でハトテスト陽性であつた。

実験成績 (表10) の如く, Ouchterlony-Elek: Kohn の変法によつて沈降反応をみると H P L は HGH, 妊娠3カ月以降及び産褥3時間迄の産褥婦血清と免疫学的に沈降反応を示した。抗 HGH と HGH 及び H P L の反応を観察すると H P L と HGH とは写真6の如く部分的に交叉し、免疫学的に共通な部分を有していることを示している。これは Josimovich の Ouchterlony 法による沈降線と全く一致している。このことから H P L は少なくとも免疫学的には Prolactin-Like Substance と言うよりもむしろ GH-Like Substance と云つた方が妥当であらう。なお、抗 HGH と妊娠中、及び産褥婦人血清とは全く反応線を形成しなかつた。妊婦血清の HGH については、妊娠中に増量しないとする Kaplan & Grumbach (1964), Yen et al. (1967), また授乳期に於いて、やや高値を示すと言う Greenwood et al. (1964), Ehrlich & Randle (1961) 等の報告はあるが未だ明らかにされていない。今回の実験の結果だけから妊娠、授乳期に於ける H P L と HGH との共同作用等に言及することは無理である。

次に妊婦血清及び産褥婦血清中の H P L であるが、実験成績の如く妊娠2カ月迄は抗 H P L と沈降線を形成しなかつた。この結果も Josimovich & Astwood (1964) の Ouchterlony agar gel plate assay の妊娠第12~15週までの母血清には H P L を証明しないと言う結果に一致するが、Kaplan (1964), person (1967), Friesen (1964) 等の Radioimmunoassay によると妊娠5~8週に血漿中に出現し、月数と共に上昇する。これは明らかに Ouchterlony 法と Radioimmunoassay との量的敏感度の差であり、これだけで、妊娠時の H P L の現われはじめる時期に差のあるのは当然である。今回の結果でも例数は非常に少ないものであ

るが、やや増量の傾向を認め得た。

次に血中のHPLは分娩後は多くの報告者 Samman, et al. (1966), Saxena, et al. (1968), Spellacy, et al. (1966), と一致してすみやかに (3時間) で消失した。以上の結果はHPLの half life が非常に短いことを示し、胎盤機能検査法としての可能性があるとも考えられる。

すでに述べた如く、抗HPLは無抽出の妊産婦血清とは反応するが、Acetoneによる抽出物 (Simkin) とは全く反応しなかつた。それに反して下垂体性PLはAcetone抽出物と反応を示した。下垂体性のPLとHGH及びHPLについては未だ確認されない点が多い。生物学的活性をみると、家兎乳管内注入法及びハトテストの結果量的な差は認められたけれど、質的には3者の間に差を認めなかつた。しかし今回の実験の結果からHPLは少なくとも下垂体性のPLと免疫学的には全く異なつた物質であることが言えよう。

稿を終わるに臨み、御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師藤井久四郎教授に深甚なる謝意を捧げると共に種々御教示下さつた岡本良平講師、大塚晴久博士に深謝し、御協力下さつた教室員各位に感謝致します。また材料を提供下さつた東京都監察医務院、各ホルモンの抽出に御協力をいただいた帝国臓器松島早苗博士に深謝致します。尚本論文の一部要旨は昭和44年第17回日本内分泌学会東部部会総会において発表した。

文 献

- 石田雅己 (1966) : ホと臨, 14, 729.
 潤田嘉朗 (1961) : 日内分泌雑誌, 37, 268.
 潤田嘉朗 (1964) : 日内分泌雑誌, 39, 952.
 岡本良平 (1969) : ホと臨, 17, 79.
 大塚晴久 (1968) : ホと臨, 16 : 454.
 川島利哉 (1965) : 日内分泌雑誌, 41, 900.
 進藤寅二 (1956) : 血清反応とその実際, 96.
 Apostolakis, M. (1965) : Acta Endocr, 49, 1.
 Apostolakis, M. (1964) : Proc., 2nd Intern Congr. Endocr., 1257.
 Boucher, B.J. (1960) : Nature, 188: 1025.
 Chen, H.C. and Wilhermi, A.E. (1964) : Proc. 46th annual meeting of the Endocr. society, San Francisco, 18—20 June.
 Cohen, H., Grumbach, M.M. and Kaplan, S.L. (1964) : Proc. Soc. Exper. & Med. 117, 438.
 Chadwick, A. Folley, S.J. and Gemzell, C. (1961) : Lancet, 2, 241.
 Damm, H.L., Dominguez, J.M., Pensky, J. and Pearson, O.H. (1964) : Endocr, 74, 66.
 Ehrlich, R.M. and Randle, P.J. (1961) : Lancet, 2, 230.

- Ferguson, K.A. and Wallace, A.L. (1963) : Recent prog. Hormone Res., 1911.
 Friesen, H. (1965) : Endocr, 76: 369.
 Fujii, K. and Shimizu, A. (1958) : Bull. Tokyo Med. & Dent. Univ. 5, 33.
 Fujii, K. and Uruta, Y. (1965) : ibid, 12, 109.
 Grumbach, M.M., Kaplan, S.L. et al. (1960) : Nature, 185, 170.
 Greenwood, F.C. J.A. Cotell, W. Lew and Gemzell, C. (1964) : Brit. Med. J.
 Greenspan, F.S. J.A. Cotell, W. Lew and Gemzell, C. (1962) : J. Labclin. Med., 59, 520.
 Hayashida, T. (1962) : Endocr, 70, 846.
 Higashi, K. (1962) : Endocr. Japon, 9, 1.
 Ito, Y. and Higashi, K. (1961) : Ibid., 8, 279.
 Irie, M. and Barrett (1962) : Endocr, 71, 277.
 Josimovich, J.B. and Maclareh, J.A. (1962) : Endocr. 71, 209.
 Josimovich, J.B. and Astwood, B.L. (1964) : Am. J. Obst. and Gynec. 88, 867.
 Josimovich, J.B. and Bandle, B.L. (1964) : Trans. N.Y. Acad. sci 27.
 Kurosaki, M. (1961) : Tohoku. J. Exper Med. 75, 122.
 Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M. (1964) : J. Clin. Endocr. Metab.
 Li, C.H. and Liu, W.K. (1964) : Experientia, 20, 169.
 Lyon, W.R., C.H. Li. (1960) : 1st International Cong. Endocr Copenhagen. Abst. No. 577.
 Laron, Z. and Assa, S. (1962) : Nature, Lond. 491, 492.
 Levy, R.P. and Sampliner, J. (1961) : Proc. Soc. exp. Biol. Med. 106, 214.
 Meites, J.M. and Tuner, V.E. (1941) : J. Clin. Endocr. 1, 918.
 Moudgal, N.R. and C.H. Li. (1961). Endocr. 68, 704.
 Pasteels, J.L., Brauman, H. and Brauman, J. (1963) : c.r. hebdom. Seanc, Acad. Sci., Paris, 256, 2031, 2033.
 Simkin, B. (1958) : Clin. Res. Proc. 4, 215.
 Simkin, B. and Goodart, D. (1960) : J. Endocr. 20, 1095.
 Stavitsky, A.B. (1954) : J. Immunol., 72, 360.
 Read, C.H. and Bryan, J.T. (1960) : Recent Progress Hormone, Research, 16, 187.
 Samaan, N., S.C.C. and Friesen, H. (1966) : J. Clin. Endocr 26, 1303.
 Saxena B., Goldstein, D.P. Emdrson, K. and Selenkow, H. (1968) : Am. J. Obst. Gynec. 102, 115.
 Spellacy, W.N., Carlson, K.L. and Birk, S.A. (1966) : Am. J. Obst. Gynec. 95, 118.
 Wilhelmi, A.E. (1961) : Canad. J. Biochem, 39, 1659.
 Wallace, A.C.C. and Ferguson, K.A. (1961) : J. Endocr, 23, 285.
 Yen, S.C.C., Sawaan, N. and Pearson, O.H. (1967) : J. Clin. Endocr. 27, 1341.

(No. 2324昭45・1・12受付)