

琉球大学学術リポジトリ

卵胞ホルモンの生物学的検査法について(附. ラットの血中Estrogen値)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農家政工学部 公開日: 2012-02-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡嘉敷, 緩宝, 江藤, 禎一, Tokashiiki, Suiho, Eto, Teiiti メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/23281

卵胞ホルモンの生物学的検査法について

(附. ラットの血中 Estrogen 値)

渡嘉敷 綏宝*・江藤 禎一**

Suiho TOKASHIKI and Teiiti ETO: On the bioassay of Estrogen.
("The amount of Estrogen in the blood stream of rat" is included)

I 緒 言

Estrogen は卵巣から分泌される主要なホルモンで、これが定量法は 1923 年 Allen-Doisy により腔上皮の角化を指標として用いて確立され、その後 Sulman (1952) の腔内注入法等多くの方法が報告されている。しかし血中 Estrogen の測定にはその濃度微量のため、多量の血液を濃縮、抽出する操作を必要とし、その測定は今のところ簡単ではない。

著者らは血中 Estrogen の生物学的測定を実施するにあたり、先ず Estrone を用い皮下注射並びに腔内微量注入法によって腔上皮の変化に関する用量反応曲線を求め、両方法を比較し、更に腔内微量注入法により Rat の血中 Estrogen 値を測定した。血中 Estrogen 値については Rat の性周期の一定時を定めて測定した例は未だないと思われるので、ここにその概要を報告する。

なお本実験は 1960 年 7 月より 1961 年 3 月の間に東大農学部において行なったものである。

II Estrone の腔上皮角化反応

1. 皮下注射法

(1) 方法 正常性周期を示す Wistar 系雌ラット (体重 200~300 g) を選び、卵巣剔除後 5 日以上 Smear の検査を行なって発情を示さぬことを確認した後、2 週間を経てから使用した。

実施方法は結晶 Estrone を適当量のラッカセイ油に溶解、混和して検体を作り、その 0.1 ml を 1 日 1 回 3 日間計 0.3 ml を皮下注射し、初回注射後 48 時間から 100 時間まで朝夕の 2 回計 5 回にわたって Smear を採取した。検査は江藤ら (1958 a) の方法によりスポイトを用いて少量の水を腔内に注入した後吸引し、スライドに滴下して乾燥させ Giemsa 染色を施して鏡検した。

Smear 判定の規準は小林 (1956 a) の方法に準じて行ない、角化上皮細胞が有核上皮細胞や白血球に比し明かに優位を示すものを陽性とし、角化細胞が少ないものを陰性とした。

(2) 成績 各用量について行なった成績は第 1 表第 1 図の如くで、1 群の試験動物の 50% 以上に陽性反応を招来するに要する Estrone の量は概ね $10 \times (3/4)^3 \mu\text{g}$ 即ち $4 \mu\text{g}$ である。

2. 腔内微量注入法

(1) 方法 皮下注射法に使用した去勢 Rat を 1 ヶ月以上休養せしめた後使用した。

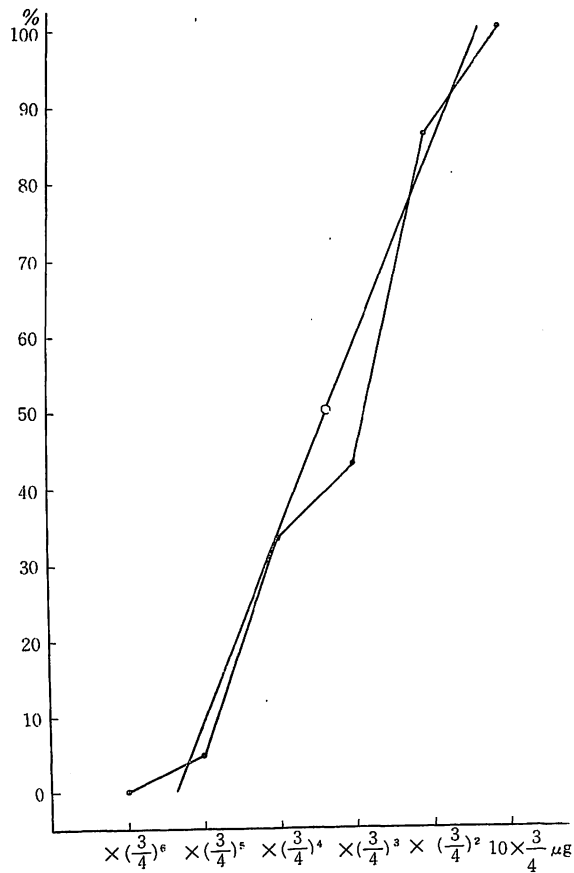
実施方法は結晶 Estrone を Propylenglycol に溶解混和した後、これに等量の水を加えて検体を作

* 琉球大学農家政工学部畜産学科

** 東京大学農学部家畜生理学研究室

第1表 皮下注射による陽性反応

Estrone $\mu\text{g}/0.3\text{ ml}$	例数	陽性数	陽性率	Estrone $\mu\text{g}/0.3\text{ ml}$	例数	陽性数	陽性率
$10 \times \frac{3}{4} \mu\text{g}$	21	21	100	$10 \times \left(\frac{3}{4}\right)^4$	21	7	33.3
$\times \left(\frac{3}{4}\right)^2$	21	18	85.7	$\times \left(\frac{3}{4}\right)^5$	21	1	4.8
$\times \left(\frac{3}{4}\right)^3$	21	9	42.8	$\times \left(\frac{3}{4}\right)^6$	21	0	0



第1図 皮下注射による陽性反応

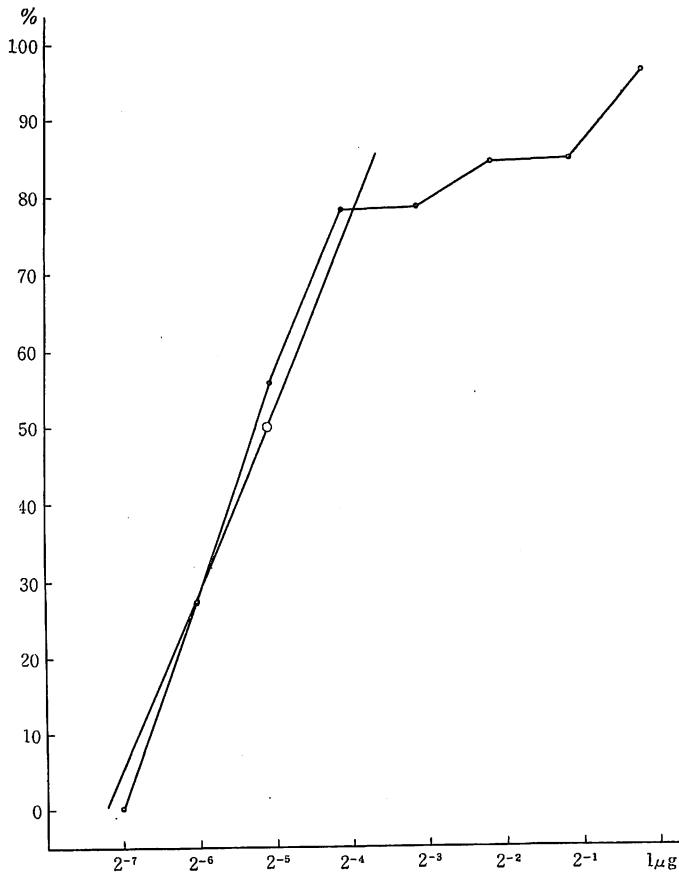
り、 0.01 ml ずつ1日2回2日間計 0.04 ml をあらかじめ水銀によって検定した微量注射装置（使用にあたっては吉永 1961 progesterone 局所投与の方法を参考とした）を用いて腔内に注入した。なお注射針の先は鈍性にした後、ポリエチレンのチューブを装着して腔の損傷を防ぐと共に、針を抜去する際は腔口をおさえて検体の漏出を防止するよう留意した。

初回注入後 65 時間、72 時間、89 時間目の3回 Smear を採取し、乾燥、Giemsa 染色をほどこして鏡検した。判定は皮下注射の場合と同様に行なった。

(2) 成績 各用量について行なった成績は第2表および第2図の如くで、1群の試験動物の50%以上に陽性反応を招来するに要する Estrone の量は $2^{-5}\mu\text{g}$ 即ち $0.03\mu\text{g}$ である。

第2表 腔内微量注入による陽性反応

Estrone $\mu\text{g}/0.04\text{ ml}$	例数	陽性数	陽性率	Estrone $\mu\text{g}/0.04\text{ ml}$	例数	陽性数	陽性率
1 μg	19	18	94.7	$2^{-4}(0.06)$	18	14	77.7
$2^{-1}(0.5\mu\text{g})$	18	15	83.3	$2^{-5}(0.03)$	18	10	55.5
$2^{-2}(0.25)$	18	15	83.3	$2^{-6}(0.015)$	18	5	27.7
$2^{-3}(0.12)$	18	14	77.7	$2^{-7}(0.007)$	17	0	0



第2図 腔内微量注入による陽性反応

3. 考察

(1) 本実験において1群の試験動物の50%以上に陽性反応を招来するに要する Estrone の量は皮下注射の場合は $4\mu\text{g}$ であり、腔内微量注入の場合は $0.03\mu\text{g}$ である。従って腔内微量注入法は皮下注射法に比し約130倍鋭敏であるため、血中 Estrogen の測定法として価値あるものと思料する。

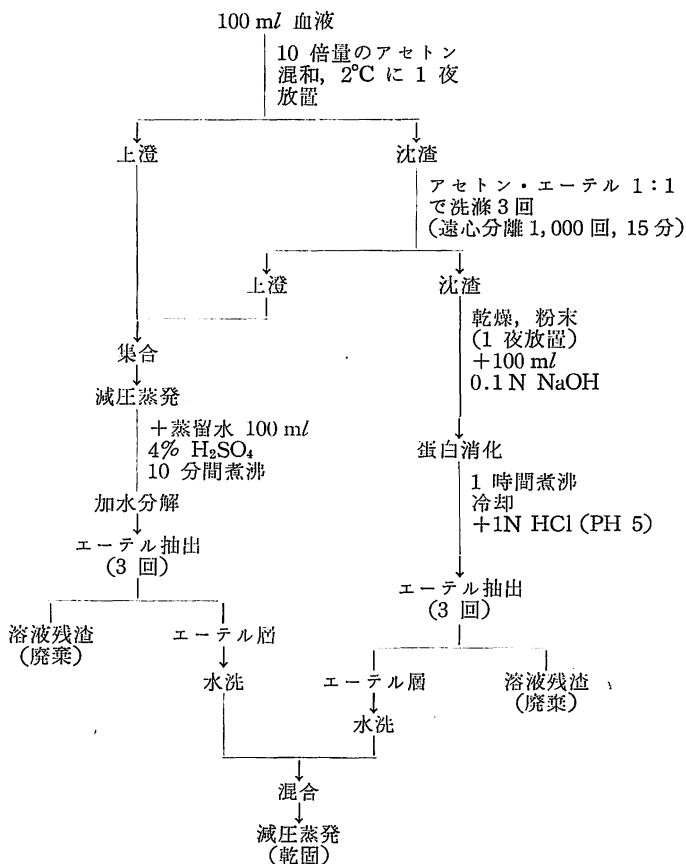
(2) Kahnt-Doisy (1928) は皮下注射法により 1RU が概ね $0.33\mu\text{g}$ の Estrone に相当している

と報告しているが、本実験においては 1 RU は $4 \mu\text{g}$ に相当している。従って本法は Kahnt-Doisy 法に比し概ね 1/10 の感度をもっているが、その差異については明かでない。

(3) 腔内微量注入法による本実験の 50% 陽性反応は $0.03 \mu\text{g}$ の Estrone によって得られたが、一方小林 (1956 b) の報告によれば $0.001 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 以上で 1 群の Rat の 60% 以上に陽性反応を招来している。この場合の検体は Estrone Benzoat にして、実験方法についても相異があるため、両方の感度を比較することは困難である。

III Rat の血中 Estrogen の測定

(1) 方法 日照時間を一定にした環境下で飼育した (江藤ら 1958 b の方法による) 正常性周期を示す成熟 Rat の 1 期 (発情前期) の午前 11 時~12 時に ether 麻酔を施して開腹し、後大静脈に少量のヘパリンを注入してから全採血を行なった。即ち Rat 14 匹から 100 ml の血液を集め、Szego and Robert (1947) の方法によって濃縮抽出を行なった (第 3 図)。濃縮乾固したものは未だ脂肪等の不純物が含まれているため更に次の操作を加えて精製し、腔内微量注入法により測定を行なった。



第 3 図 血液の濃縮抽出法 (Szego and Robert 1947)

脂肪除去の操作 (鈴木)

① 濃縮乾固したものに Methanol 10 ml+水 4 ml (70% Methanol Solution), ② Deep freezer に 1 夜放置, ③ 遠心分離 (3,000 回, 15 分), ④ 沈渣を約 5 ml の冷 70% Methanol で洗い再び遠心分離, ⑤ 上澄を合して 55°C で減圧蒸発→乾固, ⑥ 乾固したものを Propylenglycol で溶解した後, 等量の水を加えて 2 ml とし, 1/50 の濃縮試料とした。

(2) 成績 試料を腔内微量注入法により測定した結果は 19 例中陽性数 13 例で, 68.4% の陽性率を示した。この数値は Estrone $2^{-4}\mu\text{g}$ と $2^{-5}\mu\text{g}$ の中間に相当する。更に倍に希釈して注入 (Rat 1 匹につき血液 1 ml 相当量を注入したことになる) したところ 19 例中陽性数 4 例で 21.0% の陽性率となった。この結果を Estrone の Standard Curve より見た場合凡そ $2^{-6}\mu\text{g}$ 即ち $0.015\mu\text{g}$ となる。従って Rat の血中 Total Estrogen 量は 1 ml 当り $0.015\mu\text{g}$ の数値を示したことになる。

IV 要 約

1. Rat を用いて Estrone の腔上皮角化反応を皮下注射並びに腔内微量注入の方法によって行なつたところ, その 50% 陽性反応を得るには皮下注射の場合は $4\mu\text{g}$ であり, 腔内微量注入の場合は $0.03\mu\text{g}$ である。従って腔内微量注入法は皮下注射法に比し約 130 倍の鋭敏度を持ち, 血中 Estrogen の測定法として価値のあることが知られた。

2. Rat の 1 期 (発情前期) の午前における血中 Estrogen 量を Szego and Robert の方法に更に脂肪を除去する操作を加えて濃縮試料を作り, これを腔内微量注入の方法によって測定した結果, その血中 Total Estrogen 量は 1 ml 当り $0.015\mu\text{g}$ の数値が得られた。

終りに臨み終始懇切なる御指導を賜わった東大星冬四郎教授ならびに血液の濃縮抽出操作に御助言を頂いた鈴木善祐博士に深甚なる謝意を表する。

参 考 文 献

1. 江藤禎一, 豊田 裕, 星冬四郎 1958 a 家畜繁殖誌 3, 113.
2. 江藤禎一, 豊田 裕, 星冬四郎 1958 b 家畜繁殖誌 3, 113.
3. Kahnt, L. C. and E. A. Doisy 1928 Endocrinol. 12, 760.
4. 小林 隆 1956 a 主も新しいホルモン検査法. 379.
5. 小林 隆 1956 b 主も新しいホルモン検査法. 381.
6. Sulman, F. G. 1952 Endocrinol. 50, 61.
7. Szego, C. M. and S. Roberts 1947 Endocrinol. 41, 322.
8. 吉永浩二 1961 家畜繁殖誌. 6, 152.

Résumé

1. The author studied cornified reaction of epithelial cells of vagina of rats, by injecting (1) estrone into subcutaneous tissue of body and (2) small amount of it into vagina. To obtain 50% of possitive reaction, $4\mu\text{g}$ of Estrone was necessary in the case of subcutaneous injection and $0.03\mu\text{g}$ in the case of intravaginal injection. Intravaginal injection was about 130 times more sensible than subcutaneous injection, and it was found that the former is of value as a method of measuring estrogen in the blood stream.

2. The author measured the amount of Estrogen in the blood stream of rat in the morning during the period of proestrus by making extraction samples of blood. The extraction samples was made by removing fat in addition to Szego and Robert method and small amount of it was injected into vagina. As the result of the measurement, the total Estrogen in 1 cc of the blood was 0.015 μ g.