

氏 名 かく 福 しま 島 みね 峰 こ 子

授 与 学 位 医 学 博 士

学 位 授 与 年 月 日 昭 和 3 6 年 3 月 2 4 日

学 位 授 与 の 根 拠 法 規 学 位 規 則 才 5 条 才 1 項

研 究 科 ， 専 攻 の 名 称 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
外 科 学 系

学 位 論 文 題 目 Studies on Somatotropic Hormone
Secretion in Gynaecology
and Obstetrics.

指 導 教 官 東 北 大 学 教 授 九 嶋 勝 司

論 文 審 査 委 員 東 北 大 学 教 授 九 嶋 勝 司

東 北 大 学 教 授 鳥 飼 龍 生

東 北 大 学 教 授 菊 地 吾 郎

論文内容要旨

I 緒 言

1944年Evans等が人間以外の動物の下垂体からsomatotropic hormone (以下STH)の純粋分離に成功したのは画期的研究であつたが、種特異性の問題、被験動物側の感受性の相異、各動物毎にhormoneそのもの化学的性状の相異等あつて臨床効果が期待出来ない為、人の下垂体から抽出精製を試みる研究に発展した。然し、下垂体は臓器が小さ過ぎ材料が得難い。それで他の組織や体液から抽出することが望ましいことになる。著者は妊娠に依り生ずる重要な内分泌器官即ち胎盤に注目した。現在胎盤中にchorionic gonadotropinは勿論estrogen, progesteron,各種corticoid更にはACTH, prolactinやTSH様物質の存在については立証されてきたが、STHに関しては不明であつた。更にもし胎盤中に存在する場合、妊娠という特殊な生理的狀態での変動及びその意義を知ること、又非妊時でもSTH分泌の影響の下にある各疾患の診断、治療の為にSTH測定が出来ねばならず、その為には血液や尿中からの測定が最も要望される。これらの意味で妊娠初期、中期、末期の人胎盤、妊娠及び産褥期婦人の血漿、臍帯血、羊水、新生児尿、其の他糖尿病婦人の血漿等からSTH様物質の抽出を試みた。

II 実験材料及び方法

(1) 実験材料：

I] 実験動物：当教室で飼育繁殖しているWistar系雌性白鼠に於て約10日間体重の増減を示さぬことを確かめた‘plateaued rat’を用いた。飼料はOriental固形飼料NMC7に青菜と水を飽食させた。II] STH標準物質はEmory大学Wilhelmi博士から寄贈されたものを用い、各量のSTHを0.9%生理的食塩水に溶解し0.5ccとなる様にして筋注した。III] 抽出材料：東北大学医学部産婦人科に入院せる妊婦で中絶又は自然分娩せる各期の胎盤、妊娠中、分娩期及び産褥期婦人の血漿、臍帯動静脈混合血、腹壁を通じ穿刺により採取せる羊水、生後5日以内の男児尿等を用いた。

(2) 実験方法：1] 測定法の検討

著者等の綜説に述べた如く、形態学的方法及び生化学的方法共に各種測定法が考案されてきたが、各方法はそれぞれ異なつた研究室で異なつた条件、異なつたSTHの力価と純度をもつた検体で行われているので直接比較検討は困難である。従つて利用価値が高いと考えられる数種の方法、即ち(a) 腎摘出白鼠にamino acid投与後、血中尿素窒素生成率の減少をみる方法、(b) 脛骨近側端骨軟骨部の成長に対するGreenspan et alの脛骨試験、(c) 醋酸鉛時刻描記超生体染色法を応用する歯牙成長試験、(d) 体重測定法、(e) 尾長測定法の比較検討を可及的同一条件で施行した。その各測定方法及び結果の詳細は前回の著者の論文に発表した。要するに感度、測定期間、操作の簡単さ等も脛骨試験が優れ、99%信頼限界の範囲も0.91で比較的バラツキが少なく、相関係数も他の方法に比し最も1に近くSTH量に対し反応差が有意である。この結論はGreenspanと一致している。特異性の問題も多く論じられているが、STH以外の要因では、用量を増加していつでも骨軟骨端の巾を20~30μ以上には増大させない。たゞ骨軟骨の巾をmicrometerで測る時に石灰化の部分の数箇所測定して平均しないと誤差が非常に大となる。以下簡単に脛骨試験を説明する。生理的食塩水に溶解した検体を毎夕刻0.5ccずつ4日連日筋注後24時間して屠殺、たゞ

ちに脛骨骨端をとり出し正中面にそい巾1~2mmの薄板にし、それを鍍金染色する。即ち一昼夜1% formalin 固定後水洗する。acetone浸水後水洗。調整直後の2% AgNO₃溶液に2時間浸し再度水洗。水中に投じたまゝ強力な光線下で石灰化部が黒褐色になる迄曝す。次いで10% Na₂S₂O₃に浸し流水中で水洗し80% ethanolにつけ保存、この標本を弱拡大で鏡検しmicro-meterで測定する。然しこの様な標本では切片がどうしても厚くなることや、標本の保存に耐えない欠点があるが、といつて普通の硬組織の標本だと脱灰に時間を要する。そこでもつと簡単にすぐ出来る方法を施行した。即ち剔出した骨を各濃度のalcohol, acetone脱水後スイスCiba社のEpoxy Resin "Araldite" type DとHardner 95を使用し樹脂を作り、真空ポンプ吸引による陰圧下に更に脱水脱気をはかり樹脂を注入し、包埋後約20℃位の温度で14~24時間で自然硬化させる。それを前田・鈴木式自動切断器で薄片にし、片面を'Araldite' Type 10でガラス板に接着さし他面を砥石で研磨し、その後鍍金染色を施す。かくしてSTH標準物質の0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 10.0mg総量を使用し脛骨試験で骨軟骨端の巾を測定し、用量と反応の間に $\log y = 0.019x - 3.66 \pm 0.91$ (x:骨軟骨の巾(μ) y:STH用量(μ))なる一定の相関関係が得られた。以後の抽出物質の生物学的検定は脛骨試験で行い、得られた標準曲線を利用しその活性度を算定した。

II) 抽出法の検討

脳下垂体からのSTHを含む抽出液は食塩水或はNaOH, Ba(OH)₂, NH₄OH, Ca(OH)₂等のalkaline液で得られ、此等の抽出液からSTHは硫酸により沈殿する。更にcysteinで処理すると、特にthyrotropic hormone, gonadotropic hormoneを不活性化することが知られている。現在優れた抽出法としてWilhelmi等のCa(OH)₂溶液抽出後ethanol分割沈殿を行う方法があり、得られた結晶の均質性はultracentrifugation, zone electrophoresis, adsorption chromatography, ion exchange chromatography, counter current distribution等に依つても確認された。血中尿中からの抽出分離も感度の点、毒性の点等で困難を極めたが最近Gemzellが血中から、回収率の非常に良好なethanol抽出法を発表した。著者はWilhelmiの下垂体からの抽出法を胎盤に応用し、acetoneに溶けるlipoid類を除き、Ca(OH)₂溶液を加えて攪拌抽出を行い、20,000回転で遠心分離後上澄に固形硫酸を加えて半飽和にし、沈殿形成されればそれを水に溶解し16~20時間流水中で透析する。透析後再び飽和硫酸を加えて0.2飽和としpH6.8で遠沈する。上澄に更に飽和硫酸を加えて0.4飽和とし、塩類の無くなる迄流水中で透析、このglobulin分層中にSTHが存在する。それに1M HClを添加し200ccの水に溶解、1M NaOHを添加しpH5.3に調整、遠沈してその上清をpH6.8として生じた沈殿を1M NaOHでpH10.5に調整した水に溶解、1M HClでpH8.7に調整、其の後更にpH4.0にし、NaCl飽和溶液を0.016飽和迄滴下する。遠沈して上清にそれと等量のNaCl飽和溶液を徐々に添加しNaCl分層を得る。それを1M NaOHでpH10.0に調整した水に溶解し6時間水中で透析す。透析後透析液をpH8.7にし、もし沈殿形成されれば除去しpH6.8とす。遠心分離し沈殿物は1M NaOHでpH9.0に調整した水にとかして後、凍結乾燥し、上清の方は40% ethanolを徐々に滴下しethanol濃度が20%になる迄追加、生じた沈殿物は同様1M NaOHでpH9.0にした水に溶した後、凍結乾燥して結晶を得る

次に血中、羊水、尿中からの抽出法はGemzellのethanol抽出法を改良し1.00:4の割合にcitrat加血液を冷却遠心し血漿をたゞちに10% trichloroacetic acid (TCA)を同量加え、生じた沈殿を5% TCAで3度洗い。最後の遠沈後TCA沈殿を水に溶き充分冷却しつつ攪拌しつつ50% ethanolを極めて徐々に滴下し20%濃度とす。生じた沈殿を0.1N KOHで溶解しpH11.0とす。この際STHは殆ど溶解する。HClでpH5.0とし生じた沈殿を除去し上清に1N KOHを加えてpH

8. 6 とし同様に冷却攪拌しつゝ 50% ethanol を更に徐々に滴下し 5% 濃度にし、沈澱が形成されれば除去し、更に 20% 濃度に ethanol を加え、沈澱を水に溶解し、透析し、凍結乾燥により結晶を得る。

いずれの方法でも操作中 0°C に近い低温で行い、遠心分離は 0°C で冷凍遠心機を使用した。

抽出物は外觀が淡褐色又は淡黄色粉末で Biuret 及び Ninhydrin 反応で陽性を示した。

III 実験成績

〔I〕血漿中からの標準物質回収試験：STH 標準物質 0.5, 1.0, 10.0 μ g を少量の生理的食塩水に溶かし、正常婦人血漿に極めて徐々に低温下で混合し、たゞちに上記方法で分割し、active fraction を実験動物に注射して回収試験を試みた。その回収率は 84 ~ 100% の間を変動した。加えられた STH の比較的高い検出率は STH と協同的に作用し、又それだけでは脛骨試験に陽性にならない血漿中の thyrotropic hormone の如き物質も加わっているかもしれないことが考えられる。

〔II〕血漿中 STH 様物質の変動：妊娠初期、中期、分娩直前、直後、産褥 10 日以内の母体の血漿、成長遅延を伴える若年性重症糖尿病患者血漿、対照として正常婦人の血漿から STH 様物質の抽出を行った。妊娠才 10 週迄はどの例も tibial epiphysis の巾の平均は 160 μ を越えなかつた。14 ~ 16 週になるとやゝ増加している。分娩直前に非常に増加し、分娩後は比較的急速に減少する様に思える。しかし同一個体を経過を追つて測定出来ないで、この結果をたゞちに妊娠各時期の STH 様物質の変動と結びつけてよいか問題である。非妊時正常婦人血漿から STH 様物質を抽出出来なかつたが、意外に 18 才の若年性重症糖尿病患者に 3 μ g 相当その上昇を認めた。

〔III〕胎盤中 STH 様物質の変動：中絶又は自然分娩せる妊娠各期の胎盤を採取後たゞちに冷凍し血液、卵膜等は可及的に除去した。妊娠初期のものは各例毎に抽出するには材料が少ないので 5 例をまとめて行った。妊娠時期を大きく 3 期に分けて分離すると、初期に於て骨軟骨端の巾を増大させる力価が高く、中期も中等度に認められるが、末期になると特殊な例を除いて殆ど 160 μ を越えなかつた。胎盤の重量との関係はなく、末期胎盤は胎児体重の比較的大なるものを選んだが、特に体重との関係を思わしめるものはなかつた。

〔IV〕臍帯血、新生児尿、羊水中の STH 様物質：新生児娩出後たゞちに求めた臍帯動静脈混合血から血漿を分離して同様に抽出した。一般に実験動物 1 匹につき血漿分層の総量は 200 μ g を越えず大体全血の 20 cc に相当する。臍帯血中からも僅かに STH 様物質を認める。羊水は腹壁を通じ羊水穿刺針で 100 cc 採取した。又男児尿も採尿器で 1 日尿を得たが共に分離抽出は不能であつた。羊水中に認められるには胎児尿に STH 様物質が排出されることが必要と思われるが、尿中からの STH 抽出方法そのものが考案されねばならぬであろう。

IV 考 按

抑々血中に STH が存するという事は Westman & Jacobson の parabiotic rat の実験で脳下垂体摘出ラットの成長が生ずる事実からも想像に難くない。従来血液中の STH 測定には凍結乾燥血漿で行われ、例えば Kinsell et al は gigantism の患者から凍結乾燥血漿 3 ~ 10 μ g をとり下垂体摘出雌性ラットに注射し脛骨試験で効果を認めた。然し種々化学的操作を加えて血中から抽出を試み成功したと発表した者は少ない。胎盤からは池田等が白鼠胎盤 3 個を同種 plateaued rat の背部筋膜下に 5 日間埋没せしめ、顎骨其の他の顔面骨に骨質の新生を認め、又妊娠中期から得た人胎盤に STH 様物質を認めた論文があるに過ぎない。著者も下垂体から STH を結晶性に得る方

法に準じて抽出を行つたが、acid及びalkali抽出を比較するとその活性はalkali抽出の方が安定度が高い様であり、Ca(OH)₂溶液でalkali抽出を行つた。この様に抽出した液に中性塩を加え分畫沈澱を行うとSTHはglobulin分層に沈澱として得られる。硫酸を使つた場合その0.2と0.5飽和の間の濃度で沈澱する。ここに得られる沈澱にはSTHの効力ばかりでなく、その他各種の前葉tropic hormoneの効力及び無効蛋白も含まれているので、それを精製してSTH蛋白だけ純粹に分離しなければならぬ。今回著者等の認めた抽出物質もあく迄STH様生物活性を示す物質であつて、STHそのものであるという証明に至つていない。この際他のhormoneとのinteractionをどの程度迄除去出来るか今後の研究にまたねばならぬ。妊娠中のSTH様物質分泌の変動を脛骨試験の結果からみると、胎盤中からは妊娠前半期に高く、血漿中では分娩直前に高値を示しその後急速に値が低下する様である。従つて前者はchorionic gonadotropinの動き、後者はsteroid hormoneの動きとの間に共通したものがある。これは妊娠初期にてSTHがsyncytiumよりLaing's cellから分泌されるのではないかと思しめる。

一方組織学的には妊娠時の脳下垂体前葉に主細胞或はα細胞の増加が認められることについてはComteの1898年の研究以来一般に認められて来た。この酸好性細胞は妊娠中期以後に増加してくる。これはprolactinやSTHの分泌細胞と考えられている。著者の結果に於て妊娠後期血漿中に認めるものは下垂体酸好性細胞に由来するのかもしれない。更に見方を変えれば、胎生期に於ける下垂体の発生は、胎芽でRathke嚢形成が始り、2.8mmで下垂体前葉が完成し、胎生中期から後期にかけて酸好性顆粒が明らかに出現する。Smith & Dortzbachは豚の胎児の9cm以上のものの脳下垂体は、それを除去されたネズミの成長を促し得ることを明らかにした。即ちこの様な胎児の脳下垂体前葉が既にいわゆるSTHを含むことが証明された。だからといつてSTHが胎児の成長に関与するか否かは不明である。むしろ胎児期の發育に関しては遺傳的要因を重視する人が多い。胎児脳下垂体に既に証明されるSTHが実際に胎児の物質代謝に何らかの影響を及ぼすとか、胎盤を介して母体血中に流入し、妊娠に役立つ等は全然証明されてない。形態的完成と機能とは自ら別個の問題である。それに胎盤通過性ということに関しては、既に胎盤に於けるsteroid hormoneの場合は認められており、又蛋白も選択的に通過し得る。然し数少い脳下垂体hormoneの胎盤通過性の研究からすればgonadotropinもthyrotropic hormoneもそれを否定する人が多い。gonadotropinは羊水中に認められる様であるが、これは羊膜の機能に依るか、母体から胎児へ移行した結果かという、むしろ前者と考えられている。著者は臍帯血中にSTH様物質を僅かに認めたが、胎児尿及び羊水中に認めない。これは抽出法にも問題がある。著者の実験で妊婦ではないが、若年性糖尿病患者の血漿にSTH様物質の上昇を認めた。同じ様な症例をForsman & Gemzellも記載している。彼等は糖尿病40例中24例にSTH血漿値の上昇を認め、特に若年性糖尿病にその頻度が大で(17例中13例)、これらの中逆に成長遅延を示した者2例を報告した。この所見は時々若年性糖尿病でみられる成長遅延が、下垂体性STHの分泌減少に依るのではなく、insulin分泌欠乏によることを示すものゝ様である。この様な糖尿病ではinsulin欠乏が強く、更にinsulin耐性を示す如くである。STH血漿値とinsulin生成の間に逆の相関関係がある。産婦人科領域で、糖尿病の母体から巨大児の生れる頻度が大であるが、その機構にSTHが関与しているか否か問題である。従来からSTHはdiabetogenic factorと考えられているが、もし若年性糖尿病が常にpituitary diabetogenic factor(PDF)の分泌過剰を来し、しかもpituitary growth factor(PGF)とそのPDFが同一ならば、むしろ若年性糖尿病にacromegalyやgigantismの高度の発生も期待し得ることになるが、事實は然らざる点に両要因の同一性が問題で今後の課

題である。妊娠中、胎盤から種々のhormoneが新たに活動を始めるが、その生理的意義は混頓としている。妊娠時の脂肪蓄積減少、蛋白蓄積増加、その他血中尿素やamino acid、肝のalanin glutamic transaminase等の生化学的变化を、非妊時でもSTH投与により再現出来、それはestrogen progesteronの同時投与で一層妊時と同様の生化学的变化を来し得る。更に妊娠中に下垂体摘出を行うと、妊娠中絶はさせないが、その生化学的狀態が変る等は、STH妊娠中少くとも単なる成長促進hormoneであるに止まらず、或物質代謝に影響をもち、生物学的活性賦与hormoneとして重要であると思える。

V 結 論

1) 胎盤中のSTH様物質は妊娠初期に於て骨軟骨端の巾を増加させる力価が高く、末期になると殆どの例で巾の平均は160 μ を越えなかつた。2) 母体血漿中では分娩直前に力価が高く、産褥期には比較的急速に減少した。3) 臍帯血からも僅かながら分離し得たが、羊水及び新生児尿中には共に認めなかつた。4) chorionic gonadotropinと胎盤中STH様物質の動き、及びsteroid hormoneと血漿中STH様物質との動きの間に共通したものがあつた。5) 非妊時正常婦人血漿中にはSTH様物質を認めないが、18才重症糖尿病を伴える発育障碍患者血漿に意外にSTH様物質の上昇を認めた。即ち初期胎盤及び末期血漿にSTH様物質が比較的多く存在することを著者により初めて発見された。このことは今後STHの臨床的応用の可能性を拡大させるものである。

審 査 結 果 要 旨

成長ホルモンは1944年に Evans等によつて、動物の下垂体から純粋分離されたにも拘らず、このホルモンには種特異性があつたり、動物によつて成長ホルモンの化学的性状に差異があつたりするために、臨床応用の段階に進めることが出来ずに、今日に至つている。著者は、人間の材料から得た成長ホルモンによつて臨床応用を可能にしようと言ふ意図の下に、以下の実験を行なつてゐる。

1) 先ず、成長ホルモンの生物学的測定法を種々検討し、脛骨試験が確實性及比較的容易であることなどから、最も好適であることを確めた。

2) 臓器からの成長ホルモン抽出は WeltheImi 等の下垂体から抽出する法、体液からの抽出は Gemzell の方法によつて行なつた。

3) 妊娠初期の人胎盤には可成り多量の成長ホルモンを証明し得たが、末期胎盤では殆んど認められなかつた。

4) 分娩直前の母血漿中にも成長ホルモンが多かつた。

5) 臍帯血にも僅かに存在したが羊水や新生児尿中には認められなかつた。

6) 重症糖尿病を合併せる発育障害患者血漿中に多量の成長ホルモンを認めた。

このように人間の材料(下垂体を除く)から成長ホルモンを抽出し得たのは筆者が最初であり、之によつて、臨床応用の可能性が生じたことになる。