

Title	Human Chorionic GonadotropinおよびそのSubunitsの生理化学的研究
Author(s)	奥村, 一
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/32290
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	奥 ^{おく} 村 ^{むら} 一 ^は
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	第 4 4 1 0 号
学位授与の日付	昭和 53 年 10 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	Human Chorionic Gonadotropin およびその Subunits の 生理化学的研究
論文審査委員	(主査) 教授 青 沼 繁 (副査) 教授 上原喜八郎 教授 鎌田 皎 教授 岩田平太郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

性腺機能を支配するホルモンいわゆるゴナドトロピンに関する研究の歴史は古く、過去半世紀にわたってその存在と複数の生理作用および各ホルモンの抽出・精製に関する研究が進められてきた。その過程でこれらの各ホルモンはいずれも、化学的にはよく似た性質をもつ蛋白質であることが明らかにされた。

Human Chorionic Gonadotropin (胎盤性性腺刺激ホルモン、HCG) の純化・精製は Gotら¹⁾、van Hellら²⁾、Bahl³⁾、Bellら⁴⁾ および望月ら⁵⁾ によって妊婦尿から抽出・精製されてきたが、得られた標品の物性は報告者によって必ずしも一致していなかった。その原因としては HCG の化学構造の複雑さに起因する分析値の不一致もあり得るが、また物質自身の不安定さに基づく抽出過程の化学的变化ということも考えられた。このように HCG の化学的解明は遅れていたが、最近に至り HCG も 2 つの subunit により構成され

ていることが明らかになり、化学構造解析のための新しい一つの端緒が得られた。HCGの subunit の化学的研究は主として Bahl ら⁷⁾ および Canfield ら^{8) 9)} によって行われてきた。そして HCG が Human Luteinizing Hormone (HLH) と生物学的、化学的に類似しており免疫学的にも両者は互いに反応するのに対して、HCG- β subunit は HLH とは免疫学的に反応しないことが明らかになってきた。著者は HCG を再現性よく生物学的、化学的、免疫化学的にも高純度に分離・精製することに成功し、それからさらに subunit を単離し、免疫化学的方法によっても精製して十分満足する標品を得ることができた^{10) 11) 12) 13)}。

次に HCG およびその subunit の本能解明の手がかりとなる知見を得るためそれらの物理化学的ならびに化学的性質を比較した。またこれらの免疫化学的性質としては免疫抗原の精製、特異性の高い抗体の作製、radioimmunoassay (RIA) さらには specific HCG- β の RIA 系を確立し、そして HCG 分子の活性中心へのアプローチを行うことにより種々の新しい知見を得ることができた¹⁴⁾。

本 論

1. Human Chorionic Gonadotropin の分離・精製

妊娠 2～3 カ月の妊婦尿を原料とし、Gurin らの方法¹⁵⁾に従って得られた粗 HCG を種々のクロマトグラフィーを組み合わせ、生物学的および免疫学的な効力を指標として精製を行った。

粗 HCG (2,000～4,000 IU/mg) を Amberlite CG-50 カラムで分画した。活性分画 (CG-2) を Sephadex G-75 でゲルろ過して F-1 を得、さらに DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーにより活性分画 (DE-1) を得た。その操作をくりかえして得た DE-1 R をゲルろ過して精製 HCG を得た。各分画の活性と収量を Table 1 に示した。

2 で述べる

Table 1. Biological activity of HCG on purification step and activity recovery.

HCG の
subunit の単離
にはこの精製
HCG を原料
として用いた

Lot No.	HCG potency of each fraction IU/mg			Activity recovered %
	CG-2	F-1	Purified HCG	
20	3,312	5,839	15,215	56.8
21	6,745	8,060	14,534	65.1
27	5,135	9,429	12,759	42.2
28	4,339	5,430	14,760	67.4

が、抗血清の

作製用抗原その他免疫化学的な検討を行うような場合には抗 NHS (ヒト血清) 抗血清および抗尿 B 分画抗血清で吸収精製した。

2. Human Chorionic Gonadotropin の Subunits の単離

精製 HCG 40 mg を 10 M 尿素溶液 (pH 4.5) 1.0 ml に溶解し 40℃ で 60 分間 incubation 後、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラ

フィーにより α subunit と β subunit に分離し、それぞれをさらに Sephadex G-75 カラムで再精製した。HCG- α および HCG- β はそのもの自体では生物活性をもたず、両者を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解し、37°C で incubation することによって活性を回復した。再集合の incubation 時間と活性の関係を Table 2 に示した。生物学的活性は native HCG に対して 60 分で 13.7%、4 時間後 30.0%、8 時間後 48.8%、24 時間後は 75.9% の回復率であった。この再集合の経過は免疫電気泳動 (Fig. 1) およびディスク電気泳動 (Fig. 2) のパターンによっても観察された。

また 24 時間後の再集合サンプルと native HCG の ORD および CD スペクトルには全く差がみられず両者の骨格構造および側鎖の状態には差がないことが認められた。

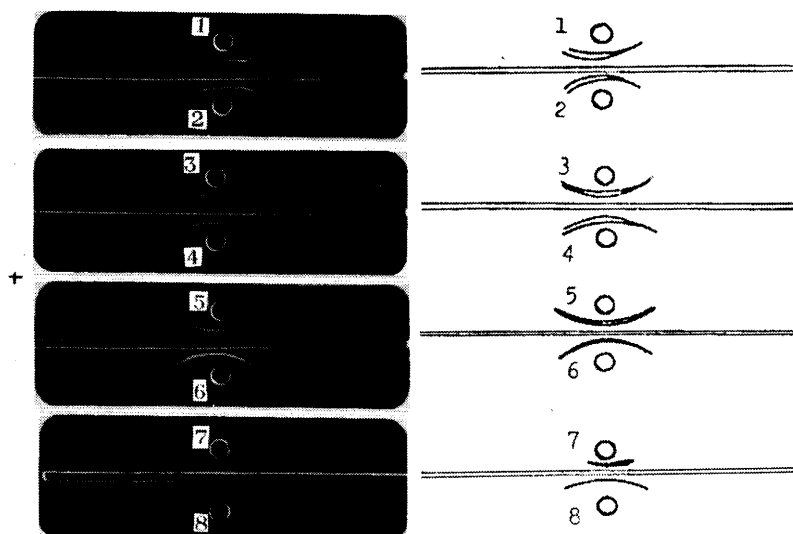


Fig. 1. Immunoelectrophoresis of recombination of HCG- α and HCG- β .
Well (1) 0 min (2) 60 min (3) 4 hr (4) 8 hr
(5) 24 hr (6) native HCG (7) HCG- α
(8) HCG- β
Trough: anti-HCG antiserum.

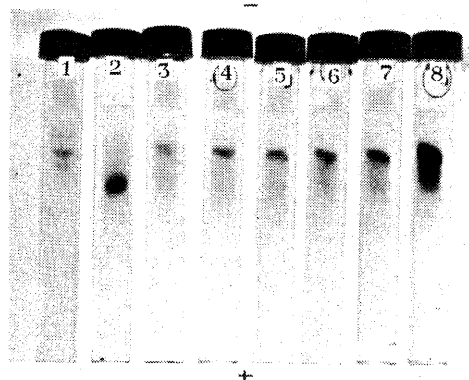


Fig. 2. Disc electrophoresis of recombination of HCG- α and HCG- β on polyacrylamide gel. The anode is at the bottom. (1)HCG- α (2) HCG- β (3)0 min (4)30 min (5)60 min (6)4 hr (7)8 hr (8)24 hr.

Table 2. Biological and immunological activities of recombined HCG- α and HCG- β .

Time after recombination	Biological activity IU/mg	Immunological activity IU/mg*
0 min	804	4,992
30 min	863	4,992
60 min	1,627	4,992
4 hr	3,554	9,984
8 hr	5,786	9,984
24 hr	8,994	7,392
HCG- α	52	120
HCG- β	70	12,820
native HCG	11,846	10,000

* by HI method

HCG- α およびHCG- β はHCG同様吸収操作ることによって免疫化学的にも精製した。

3. 物理化学的、化学的および免疫化学的性質

ディスク電気泳動 HCG、HCG- α およびHCG- β のディスク電気泳動パターンをFig.3に示した。精製HCGは糖蛋白質の特徴である幅広い単一のバンドを示した。またHCG- α は1つのmajorバンドと2つのminorバンドそしてHCG- β は1つのmajorバンドと1つのminorバンドを示した。

分子量測定 HCG、HCG- α 、HCG- β それぞれ0.8、0.6および0.4%の蛋白質濃度で超遠心沈降速度分析を行った。またSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析を行い、これら両測定法によって求めた分子量をTable 3にまとめた。

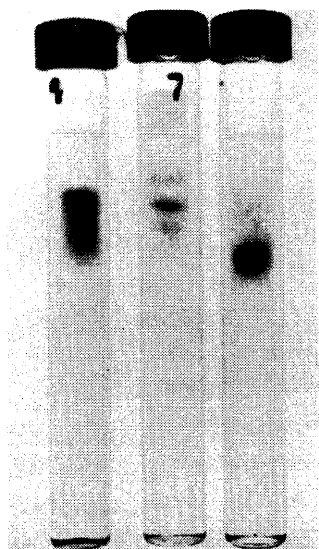


Fig. 3. Analytical polyacrylamide disc gel electrophoresis at pH 8.9. Left: native HCG, center: HCG- α , right: HCG- β . The anode is at the bottom of the figure.

Table 3. Molecular weight of HCG, HCG- α and HCG- β .

Method of determination	HCG	HCG- α	HCG- β
Ultracentrifugation	37,000	14,500	19,500
SDS-gel electrophoresis	35,500	16,000	23,000

アミノ酸分析 HCG、HCG- α 、HCG- β の各分子量を36,000、15,000、21,000とした時の蛋白質1mole中の各アミノ酸の数を100アミノ酸残基当たりとしてTable 4に示した。HCGはPro含量が最も高値でHCG- α はLys、His、Glu、Met、Tyr、Pheの含量が多く、HCG- β はArg、Pro、Ile、Leuの含量が高かった。

Table 4. Amino acid analyses of HCG and its subunits.

Amino acid	HCG	HCG- α	HCG- β
Lysine	4.5	6.6	3.5
Histidine	1.8	3.7	1.1
Arginine	6.1	3.8	7.9
Aspartic acid	8.3	6.9	8.6
Threonine	8.0	9.1	7.2
Serine	9.0	8.8	9.2
Glutamic acid	8.3	10.7	6.9
Proline	12.8	7.5	15.0
Glycine	6.1	5.3	7.0
Alanine	5.9	5.7	6.3
Cystine	2.6	4.1	2.4
Valine	8.1	8.2	7.9
Methionine	1.9	3.4	1.0
Isoleucine	2.8	1.4	3.6
Leucine	7.3	4.7	8.5
Tyrosine	3.7	5.4	2.9
Phenylalanine	2.7	4.8	1.1

* Expressed as residues/100 amino acid residues.

糖分析 ヘキソース(オルシノール硫酸法¹⁶⁾)、ヘキサミン(Blixの変法¹⁷⁾)およびシアル酸(チオバルビツール酸法¹⁸⁾)の含量を100

蛋白質あたりの糖量で Table 5 に示した。

Table 5. Carbohydrate analyses of HCG and its subunits.

Carbohydrate	HCG	HCG- α	HCG- β
Hexose	11.2	13.8	13.8
Hexosamine	10.5	9.7	11.9
Sialic acid	9.0	8.8	10.2

N末端アミノ酸残基分析 DNP法により分析した結果HCGはAla、Val、Ser、HCG- α はAla、HCG- β はSerであることを認めた。

Follicle Stimulating Hormone (FSH) および Thyroid

Stimulating Hormone (TSH) 活性 HCG、HCG- α および HCG- β 1mg 中の FSH および TSH 活性を市販のRIAキットにより求めた結果を Table 6 に示した。いずれの標品についても FSH、TSH の混在は 0.001% Table 6. Content of FSH and TSH in HCG and its subunits.

(w/w) 以下でほとんど無視できる量であった。

Fraction	FSH		TSH
	mIU/mg	ng/mg	μ U/mg
CG-2	43.4-57.8	10.0	6.1-6.7
F-1	36.2-42.5	7.4	7.1-7.8
Purified HCG	14.9-38.3	6.6-7.0	6.2-6.6
HCG- α	21.1-24.7	3.3-3.5	3.2-4.1
HCG- β	1.8-2.9	0.9-1.1	2.6-3.3

4. Radioimmunoassay

抗血清の作製 HCG、HCG- α 、HCG- β それぞれの凍結乾燥品 200 μ g を生理食塩液に溶解し、これに等量の complete Freund's adjuvant を混和し家兎の皮内 100ヶ所以上に multisite injection を行い、60~70日後に十分抗体価が上昇したところでさらに腹腔内あるいは脾臓に 200 μ g 注射後 2~3週間目に全採血をし血清を分離した。

Table 7 および Table 8 に抗HCG、抗HCG- α および抗HCG- β 抗血

清の titer と avidity を示した。

Table 17. Titer and avidity of anti-HCG antisera.

Antibody	Titer		Avidity		
	HA	RIA ^{a)}	K(ass)l./M	Antibody conc M. L ^{b)}	
K515 -1 ^{c)}	1: 3,200	1: 30,000	6.72×10^{10}	4.92×10^{-7}	
	-2 ^{d)}	1: 3,200	8.99×10^{10}	7.00×10^{-7}	
	-3 ^{e)}	1: 12,800	1: 170,000	1.54×10^{11}	1.03×10^{-6}
	-4 ^{f)}	1: 25,600	1: 250,000	1.75×10^{11}	1.48×10^{-6}
	-5 ^{g)}	1: 51,200	1: 450,000	2.36×10^{11}	2.08×10^{-6}
K516 -1	1: 800	1: 8,400	4.07×10^{11}	3.56×10^{-8}	
	-2	1: 800	5.27×10^{11}	5.88×10^{-8}	
	-3	1: 1,600	1: 18,800	6.62×10^{11}	6.32×10^{-8}
	-4	1: 1,600	1: 140,000	3.14×10^{11}	6.11×10^{-7}
	-5	1: 12,800	1: 260,000	7.31×10^{11}	3.64×10^{-7}
K517 -1	1: 6,400	1: 40,000	1.11×10^{11}	1.06×10^{-6}	
	-2	1: 6,400	1: 71,000	4.68×10^{11}	3.35×10^{-7}
	-3	1: 25,600	1: 390,000	5.00×10^{11}	6.20×10^{-7}
	-4	1: 6,400	1: 24,000	9.73×10^{11}	2.27×10^{-8}
	-5	1: 51,200	1: 280,000	4.60×10^{11}	6.76×10^{-7}
K518 -1	1: 6,400	1: 36,500	1.53×10^{11}	4.24×10^{-7}	
	-2	1: 6,400	1: 73,000	3.02×10^{11}	6.18×10^{-7}
	-3	1: 25,600	1: 185,000	2.54×10^{11}	6.98×10^{-7}
	-4	1: 12,800	1: 113,000	4.12×10^{11}	5.66×10^{-7}
	-5	1: 51,200	1: 500,000	4.66×10^{11}	1.03×10^{-6}
K519 -1	1: 3,200	1: 25,000	2.33×10^{11}	1.85×10^{-7}	
	-2	1: 3,200	1: 26,000	2.54×10^{11}	2.00×10^{-7}
	-3	1: 3,200	1: 28,500	4.16×10^{11}	1.66×10^{-7}
	-4	1: 3,200	1: 27,500	8.84×10^{10}	5.31×10^{-7}
	-5	1: 12,800	1: 105,000	2.35×10^{11}	4.27×10^{-7}

a) Serum dilution required for 50% binding of labelled antigen.

b) Undiluted antiserum

c) Blood drawn at 5-week after primary immunization.

d) At 6-week.

e) At 7-week.

f) At 8-week.

g) At 2-or 3-week after booster injection.

Table 8. Titer and avidity of anti-HCG- α and anti-HCG- β antisera.

Lot	After immunization (week)	Titer	Avidity	
		RIA ^{a)}	K value (L/M)	Antibody conc ^{b)} (M/L)
Anti-hCG- α				
K265	6	1: 61,000	4.05×10^{10}	1.78×10^{-6}
	9	1: 39,000	6.59×10^{10}	9.96×10^{-7}
	one week after booster injection	1: 178,000	1.37×10^{11}	9.89×10^{-7}
	2	1: 240,000	1.39×10^{11}	1.56×10^{-6}
K266	3	1: 2,600	8.50×10^9	2.50×10^{-8}
	5	1: 12,000	9.30×10^9	3.30×10^{-8}
	8	1: 30,000	2.14×10^{10}	2.05×10^{-8}
	two weeks after booster injection	1: 100,000	5.60×10^{10}	2.00×10^{-8}
Anti-hCG- β				
K263	4	1: 14,000	5.63×10^{10}	3.53×10^{-7}
	5	1: 153,000	8.81×10^{10}	2.84×10^{-8}
	6	1: 130,000	1.16×10^{11}	1.50×10^{-8}
	one week after booster injection	1: 490,000	3.28×10^{11}	1.32×10^{-8}
	2	1: 370,000	4.91×10^{11}	1.17×10^{-8}
K264	5	1: 1,000	1.17×10^{11}	4.67×10^{-8}
	6	1: 22,000	1.49×10^{11}	1.57×10^{-7}
	8	1: 22,000	2.94×10^{11}	7.08×10^{-8}
	9	1: 20,000	3.59×10^{11}	5.94×10^{-8}
	one week after booster injection	1: 100,000	3.68×10^{11}	2.56×10^{-7}
	2	1: 28,000	2.76×10^{11}	1.15×10^{-8}

a) Serum dilution required for 50% binding of labelled antigen.

b) Undiluted antisera

標準曲線 HCGは10~500 mIU/mlの間で直線性を示し、さらに低濃度2~10 mIU/mlにおいても十分測定が可能であった。またHCG- α 、HCG- β の感度はそれぞれ0.04 ng/ml、0.08 ng/mlであった。

交叉反応曲線 HCG、HCG- α およびHCG- β のhomologousなRIA系における他の蛋白質ホルモンの交叉反応曲線をFig.4(a)、(b)、(c)に示した。HCGのRIA系においてHCG- α との交叉率は0.5~1%、HCG- β とは1.4~2%、K値より交叉率を求めるとHCG- α とは0.89

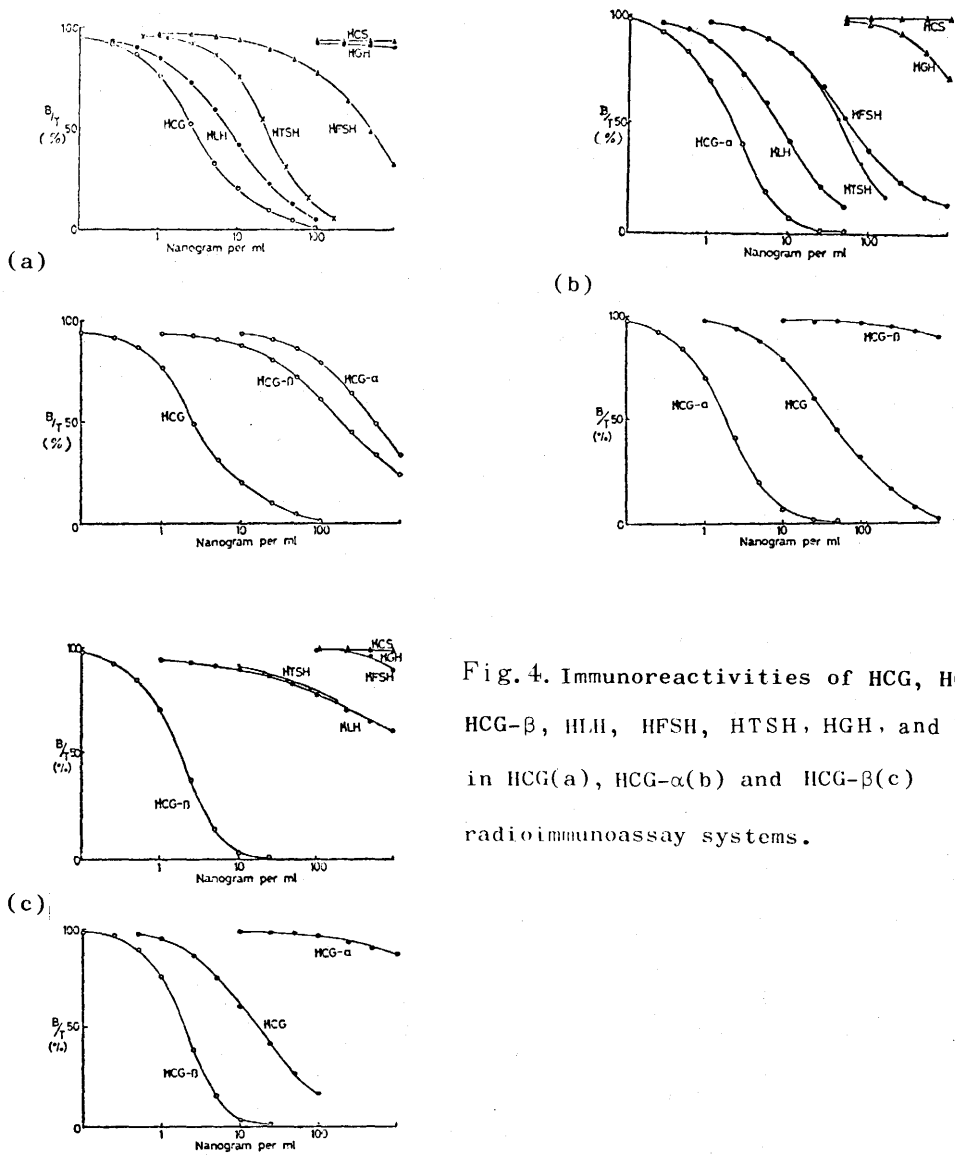


Fig. 4. Immunoreactivities of HCG, HCG- α , HCG- β , HLI, HFSH, HTSH, HGH, and HCS in HCG(a), HCG- α (b) and HCG- β (c) radioimmunoassay systems.

㊦、HCG- β とは2.13㊦で、50㊦ bound とK値から求めた兩交叉率はよく一致した。HLH、HTSH、HFSHとの交叉率はそれぞれ37.8㊦、12.2㊦、0.57㊦であった。HCG- α のRIA系においてはHCG- β とはほとんど反応しなかったが、HCGとは5.0㊦のcrossを示した。またHLHに対しては26.7㊦とかなり強いcrossを示しHTSH、HFSHともかなり反応した。HCG- β のRIA系ではHCG- α とは全く反応しなかったが、HCGとは10.95㊦、K値からは6.30㊦のcrossを示した。HLH、HTSH、HFSHとはごく弱いcrossしか示さず、HGH、HCSおよび β_1 SP₁-glycoproteinとは全く交叉性を示さなかった。これらのことからHCG- α の共通性、HCG- β の特異性が確認された。

回収率および再現性 HCGの回収率 (Table 9) および再現性 (Table 10) の結果を示した。

Table 9. Recovery of HCG added to buffer, urine or serum.

HCG added	mIU/ml								
	Buffer			Urine			Serum		
	250	125	15.6	250	125	15.6	250	125	15.6
No. 1	250	120	18.5	255	115	20.5	240	115	11.5
2	260	130	14.5	240	135	18.5	245	110	17.5
3	255	145	12.5	260	130	16.5	275	115	14.5
4	265	135	13.5	225	125	15.5	245	120	14.5
5	235	120	13.5	225	130	15.5	275	125	10.5
Mean	253	130	14.5	241	127	17.3	256	117	13.7
Recovery (%)	101	104	93	96	102	111	102	94	88
SD	11.5	10.6	2.3	16.3	7.6	2.2	17.5	5.7	2.8
CV	4.5	8.2	16.1	6.8	6.0	12.5	6.8	4.9	20.2

SD Standard deviation
 CV Coefficient of variation

Table 10. Reproducibility of results on urine and serum samples.

Sample	First time \bar{x}	Second time \bar{x}	Third time \bar{x}	Mean		
				\bar{x}	SD	CV
Urine 1	25,560	26,100	21,570	24,410	2,474	10.1
2	11,530	12,270	9,840	11,213	1,245	11.1
3	19,550	21,610	16,420	19,193	2,613	13.6
4	45,040	45,400	37,720	42,720	4,334	10.1
5	51,960	59,160	41,490	50,870	8,885	17.5
Serum 1	52,510	41,770	40,250	44,843	6,683	14.9
2	188,330	198,330	225,510	204,063	19,232	9.4
3	118,900	127,420	110,890	119,070	8,266	6.9
4	135,870	126,380	130,740	130,997	4,750	3.6
5	7,890	7,820	6,890	7,533	558	7.4

\bar{x} Mean HCG-radioimmunopotencies of urine and serum expressed as mIU/ml
SD Standard deviation
CV Coefficient of variation

HCG- α および HCG- β の回収率は Table 11 に、再現性は Table 12 に示した。緩衝液、尿、血清の各系における回収率、再現性共に申し分のない

Table 11. Recovery of HCG- α and HCG- β added to buffer, urine or serum.

HCG- α added	ng/ml								
	Buffer			Urine			Serum		
	5	2.5	1.25	5	2.5	1.25	5	2.5	1.25
No 1	4.35	2.95	1.34	5.69	2.45	1.18	4.55	2.50	1.35
2	6.33	2.35	1.19	4.80	2.95	1.24	4.64	2.72	1.31
3	6.07	2.98	1.25	5.85	2.49	1.03	5.12	2.90	1.48
4	5.65	2.49	1.29	4.84	2.56	0.98	4.44	2.35	1.36
5	4.97	2.75	1.29	5.32	2.01	1.28	4.05	2.19	1.35
Mean	5.47	2.70	1.27	5.30	2.49	1.14	4.56	2.53	1.37
Recovery (%)	109	108	102	106	99.6	91.2	91.2	101	110
SD	0.81	0.28	0.05	0.48	0.33	0.13	0.38	0.28	0.06
CV (%)	14.8	10.4	3.9	9.1	13.2	11.4	8.3	11.1	4.4
HCG- β added	2.5	1.25	0.625	2.5	1.25	0.625	2.5	1.25	0.625
No 1	2.89	1.18	0.61	2.79	1.38	0.70	2.61	1.49	0.72
2	2.87	1.20	0.59	2.58	1.16	0.62	2.59	1.05	0.62
3	2.53	1.21	0.63	1.99	1.10	0.65	2.63	1.15	0.64
4	2.62	1.26	0.64	2.53	1.20	0.60	2.60	1.20	0.56
5	3.02	1.45	0.64	2.05	0.95	0.58	2.60	1.05	0.62
Mean	2.79	1.26	0.62	2.39	1.16	0.63	2.61	1.19	0.63
Recovery (%)	112	101	99.2	95.6	92.8	101	104	95.2	101
SD	0.20	0.11	0.02	0.35	0.16	0.05	0.01	0.18	0.06
CV (%)	7.2	8.7	3.2	14.6	13.8	16.7	0.4	15.1	9.5

SD Standard deviation
CV Coefficient of variation

ものであった。

Table 12. Reproducibility of results on urine and serum samples measured by HCG- α and HCG- β radioimmunoassay.

RIA system	Sample	1st time	2nd time	3rd time	Mean		
		\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	SD	CV
HCG- α	Urine 1	128	135	135	134	5.1	3.8
	2	134	129	136	133	3.6	2.7
	3	128	135	142	135	7.0	5.2
	4	239	262	248	250	11.6	4.6
	5	329	383	351	358	27.1	7.6
	Serum 1	411	389	348	383	32.0	8.3
	2	855	975	946	925	62.6	6.8
	3	711	819	683	738	71.8	9.7
	4	169	147	125	147	22.0	15.0
	5	53	64	72	63	9.5	15.1
HCG- β	Urine 1	454	433	416	434	19.0	4.4
	2	427	391	388	402	21.7	5.4
	3	406	373	365	382	21.4	5.6
	4	711	615	659	672	50.3	7.5
	5	754	694	736	728	30.8	4.2
	Serum 1	481	432	444	452	25.5	5.6
	2	906	890	903	900	8.5	0.9
	3	594	562	642	599	40.3	6.7
	4	286	266	247	266	19.5	7.3
	5	110	98	85	98	12.0	12.2

\bar{x} Mean HCG- α - and HCG- β -radioimmunopotencies of urine and serum expressed as ng/ml.
 SD Standard deviation
 CV Coefficient of variation

血清および尿検体のRIAによる測定結果 男女正常人の血清および尿の正常値をTable 13 (a)(b)に示した。また正常妊婦血中および尿中のHCG、HCG- α 、HCG- β のレベルをFig.5に示した。HCGは妊娠3カ月でpeakをつくり序々に減少した。HCG- α は血中では前期、後期で高値を示し、尿中では後期に著明な増加を示した。HCG- β は血中および尿中で前期に高値を示し、以後漸減する傾向を示した。

Table 13. Normal values of HCG and its subunits in serum(a) and urine(b).

Cycle	HCG		HCG- α		HCG- β		
	n	mIU/ml \pm SD	n	ng/ml \pm SD	n	ng/ml \pm SD	
Men	108	6.38 \pm 4.20					
Women Proliferative	10	17.5 \pm 7.58	51	1.23 \pm 0.59	109	0.25 \pm 0.16	
	Ovulatory	10					28.3 \pm 5.46
	Secretory	10					21.0 \pm 2.29
Menopausal women	5	68.3 \pm 9.75					

(b)

Cycle	HCG		HCG- α		HCG- β	
	n	mIU/ml \pm SD	n	ng/ml \pm SD	n	ng/ml \pm SD
Men	26	7.05 \pm 5.53				
Women Proliferative	21	8.61 \pm 4.13				
Ovulatory	10	48.4 \pm 9.88	72	1.05 \pm 1.94	86	0.41 \pm 0.33
Secretory	28	9.16 \pm 5.48				
Menopausal women	10	44.7 \pm 13.9				

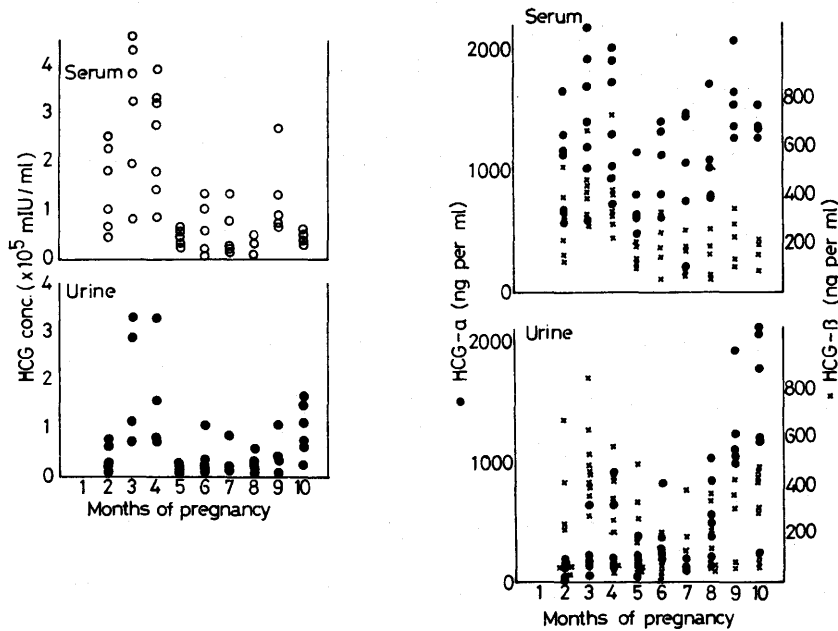


Fig. 5. Serum and urinary HCG, HCG- α and HCG- β levels throughout pregnancy.

5. Specific β Subunit の Radioimmunoassay¹⁴⁾

HCGは尿素処理によって2つの subunit に分離され、subunit 単独ではHCGとしての生物活性を示さず、また免疫化学的には subunit 相互間の反応は全くないが、親分子であるHCGとの反応性は保持されている。それ故臨床的にはHCG産生腫瘍の性質や病態の解明あるいは治療の経過観察に親分子と反応しないHCG- β 、すなわちHCG- β に特異的な反応系の確立が切望されていた。

抗原の精製 Table 14 に示したごとくHCG- β /HCG比が低い、す

Table 14. Avidity of anti-HCG antisera for HCG and HCG- β .

Lot No.	K(ass) \pm S.E. L/N		HCG- β /HCG ($\times 10^{-3}$)
	HCG($\times 10^{10}$)	HCG- β ($\times 10^8$)	
K477(30)	35.70 \pm 13.3	1.80 \pm 0.18	0.50 \pm 0.24
K478(30)	5.99 \pm 0.68	3.06 \pm 0.16	5.11 \pm 0.85
K480(30)	7.62 \pm 1.18	3.05 \pm 0.17	4.00 \pm 0.84
K141	13.20 \pm 3.90	5.20 \pm 0.97	3.94 \pm 1.90

なわちHCGに対する親和性が強く、かつHCG- β に対しては反応性の低いK477(30) 3 ml でHCG- β 3.5 mgを部分吸収精製して免疫抗原として用いた。

抗HCG- β 抗血清 得られた抗HCG- β 抗血清のHCGおよびHCG- β に対する反応性をK値より比較した (Table 15)。抗HCG- β 抗血

Table 15. Avidity of anti-HCG- β antisera for HCG and HCG- β .

Lot No.	K(ass) \pm S.E. L/N		HCG- β /HCG
	HCG($\times 10^{10}$)	HCG- β ($\times 10^{10}$)	
K393(70)	4.63 \pm 0.40	1.54 \pm 0.09	3.33 \pm 0.48
K394(70)	2.20 \pm 0.18	35.00 \pm 6.50	15.91 \pm 4.16
K400(70)	1.35 \pm 0.16	9.84 \pm 0.83	7.29 \pm 1.47
K437(70)	1.35 \pm 0.09	9.88 \pm 1.16	7.32 \pm 1.35

清は、その1mlをさらにHCG-β含有量の少ないHCG 25mgを用いて精製した。その結果従来のHCG-β系でのHCGに対する交叉率はK値では6.3%、50% boundからは10.95%であったが、specific抗HCG-β抗血清を用いた系でHCGに対する交叉率は2.7~3.3%となり、従ってspecific抗HCG-β抗血清は従来の抗HCG-β抗血清より2~3倍程度特異性が上昇した。

Radioimmunoassay

Specific HCG-βのRIAの標準曲線を

Fig.6に示した。また妊娠6週から39週までの同一人の血液および尿を同一時間に採取した検体をHCG、HCG-βおよびspecific HCG-β系にて測定した結果をFig.7に示した。妊婦血清中のspecific HCG-βのレベルは非常に低く、妊娠中を通じてほとんどゼロに近かった。一方妊婦尿中のspecific HCG-βは6週から15週位までかなりの濃度で検出された。

9322.5
Initial: 9322.5 counts

254.0
Blank: 254.0 counts

Standard data

Number	T.Count	Dose	B.ratio	Mean
1	716	1000.00	0.0309	
2	763	1000.00	0.0561	0.0535
3	927	500.00	0.0762	0.0733
4	910	500.00	0.0723	
5	1108	250.00	0.0942	
6	1056	250.00	0.0807	0.0914
7	1194	125.00	0.1037	0.1045
8	1209	125.00	0.1053	
9	1399	62.50	0.1263	0.1255
10	1385	62.50	0.1249	
11	1570	31.25	0.1451	0.1441
12	1552	31.25	0.1431	
13	1747	15.63	0.1701	0.1673
14	1745	15.63	0.1660	
15	1850	7.81	0.1760	0.1754
16	1839	7.81	0.1745	
17	1983	3.91	0.1927	0.1888
18	1950	3.91	0.1870	
19	1945	1.95	0.1865	0.1863
20	2014	1.95	0.1941	

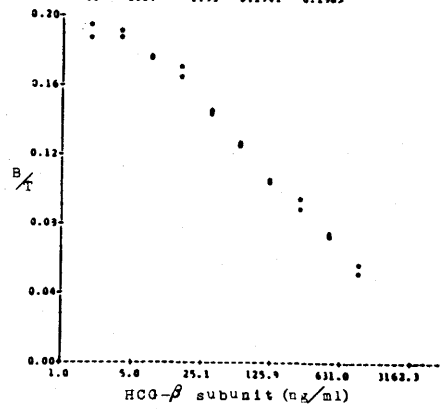


Fig.6. Standard curve of specific HCG-β subunit radioimmunoassay.

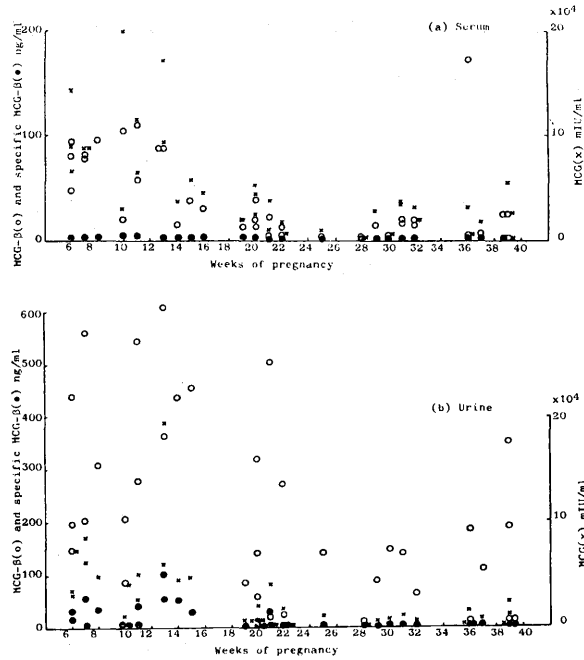


Fig.7. Serum(a) and urinary(b) HCG, HCG-β and specific HCG-β levels throughout pregnancy.

6. 加水分解酵素消化¹⁹⁾

ブラスミンによる消化 HCG 4 mg にヒトブラスミン 4.0 カゼイン単位を加え 37℃ で incubation し、0、30、60分、3、8、24時間および48時間後に一部をサンプリングし、ソイビントリブシンインヒビターとε-アミノカプロン酸を加えて反応を停止させ、ゲル内沈降反応およびディスク電気泳動を行った結果を Fig.8 に示した。Ouchterlony 法では24時間以上の消化で新しい抗原基の出現が認められたが、IEP のパターンからさらに詳細に観察すると、3時間の incubation ですでに新しい抗原基が出現していることが認められた。HCG-α、HCG-β について HCG と同様にヒトブラスミンで消化した時のディスク電気泳動パターンを Fig.9 に示した。

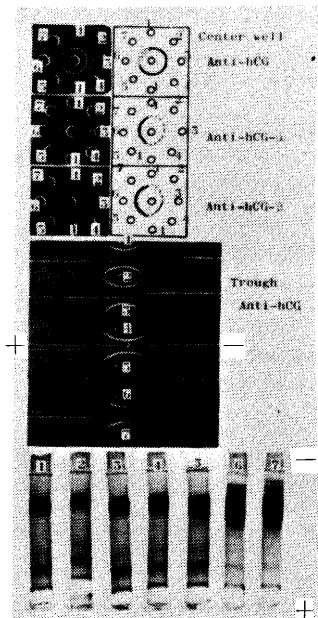


Fig. 8. Immunoelectrophoresis and gel diffusion patterns by Ouchterlony method of plasmin-digested HCG at (1)0 min, (2) 30 min, (3)60 min, (4)5 hr, (5)8 hr, (6) 24 hr and (7)48 hr. Upper column:anti-HCG, anti-HCG- α and anti-HCG- β antisera in the center well from the upper gel. Center column:anti-HCG antiserum in troughs. Bottom column:disc electrophoretic patterns of plasmin-digested HCG. From left to right digestion time elapsed.

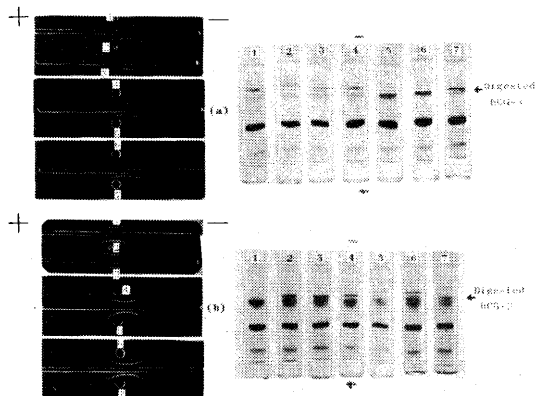


Fig. 9. Immunoelectrophoretic and disc electrophoretic patterns of plasmin-digested HCG- α (a) and HCG- β (b) at (1)0 min, (2)30 min, (3)60 min, (4)3 hr, (5)8 hr, (6) 24 hr and (7)48 hr. Troughs: anti-HCG- α antiserum on (a) and anti-HCG- β antiserum on (b).

HCG- α では大きな変化はみられなかったが、HCG- β ではincubation 30分でかなりの変化が認められ、消化時間の経過と共にそのバンドは不明瞭になった。

トリブシンによる消化 HCG 2.5 mgを1:100量のトリブシンを加え

180分間 incubation した水解物を Sephadex G-50 でゲルろ過したパターンを Fig.10 に示した。

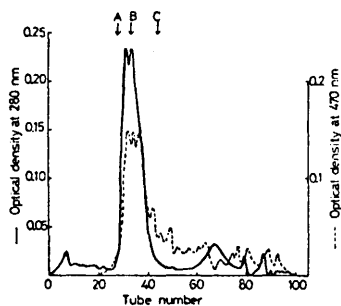


Fig. 10. Gel filtration of trypsin-digested HCG on Sephadex G-50 column. The column (1.5x141 cm) was eluted with 0.05 M NH_4HCO_3 solution of pH 8.6. Fraction volume: 2.8 ml. Flow rate: 10 ml per hr. Two hundred μl aliquot was taken for sugar determination by phenol- H_2SO_4 method. The arrows A, B and C in figure indicate the eluted position of native HCG, HCG- β and HCG- α .

Native HCG- β の溶出位置とほぼ同じ位置に相当する落ちこみのある大きなピークと低分子の小さなピークが出現した。分画ごとに生物活性および免疫活性を測定

Table 16. Biological and immunological activity of eluates from gel filtration of trypsin-digested HCG.

した結果を Table 16 に示した。生物活性は弱いながらも No. 30 および No. 31 に、また免疫活性は No. 33 にそれぞれ

Tube No.	Ovarian weight(mg)*	HI (IU/ml)
28	4.8	200
30	7.3	4,000
31	7.5	5,000
32	3.3	10,000
33	0	20,000
34	0	10,000
36	0	2,000
38	0	200
40	0	0
50	0	0
66	0	0

* Values obtained with 400 μl of specimens were subtracted by those of saline controls.

れ

のピークが認められ、生物活性分画と免疫活性分画の分離を呈した。

結 論

- 1) 妊娠の前期に大量に尿中に排泄されるHCGの分離・精製法について改良を加え、飛躍的に高収率でしかも高純度(10,000~15,000 IU/mg)のHCGを得た。
- 2) HCGより α subunitと β subunitを再現性よく分離・精製した。また両subunitsの再集合による生物活性の発現は24時間以上、免疫活性の発現には4時間以上のincubationを必要としたが、ゲル内沈降反応パターンおよびディスク電気泳動パターンから解析すると24時間以上のincubationを必要とすることを認めた。
- 3) HCG、HCG- α およびHCG- β の物理化学的および化学的な性質を明らかにした。
- 4) HCG、HCG- α およびHCG- β の免疫化学的性質として次の諸点を明らかにした。
 - ① HCG、HCG- α およびHCG- β の免疫化学的な精製、および新しい免疫方法の開発により特異性、力価、親和性共に良好な抗血清を得たこと。
 - ② HCG、HCG- α およびHCG- β のRIA系を作製し、回収率、精度、再現性にすぐれ特異性が極めて高い測定方法の確立。
 - ③ HCGのホルモン固有性を有するHCG- β のspecific抗HCG- β 抗血清を用いたRIA系を作製し、親分子HCGに干渉されずにHCG- β を測定すること。
 - ④ HCG、HCG- α 、HCG- β およびspecific HCG- β のRIA系を用いてヒト尿中および血中の正常値レベルの測定並びに妊娠期間中の推移。

5) 化学的修飾試薬および加水分解酵素による生物活性中心へのアプローチを行つた。以下の諸点を明らかにした。

- ① HCGのプラスミン消化により抗HCG- α 抗血清および抗HCG- β 抗血清との沈降反応性が増強されること。
- ② HCGのトリプシン消化による活性の変化から免疫活性と生物活性の部位が異なること。

参 考 文 献

- 1) R. Got and R. Bourrillon: *Biochim. Biophys. Acta*, 42: 505, 1960.
- 2) H. van Hell, R. Matthijsen and J.D.H. Homan: *Acta Endocrinol.*, 59: 89, 1968.
- 3) O.P. Bahl: *J. Biol. Chem.*, 244: 567, 1969.
- 4) J.J. Bell, R.E. Canfield and J.J. Sciarra: *Endocrinology*, 84: 298, 1969.
- 5) Y. Ashitaka, Y. Tokura, M. Tane, M. Mochizuki and S. Tojo: *Endocrinology*, 87: 233, 1970
- 6) Y. Mochizuki, Y. Ashitaka, Y. Tokura and S. Tojo: *Nippon Sanka-fujinka Gakkai Zasshi*, 20: 550, 1968 (in Japanese).
- 7) O.P. Bahl: *Hormonal Proteins and Peptides*, 1:171, Ed by C.H.Li, New York, Academic Press, 1973.
- 8) R.E. Canfield, F.J. Morgan, S. Kammerman, J.J. Bell and G.M. Agosto: *Rec.Progr. Horm. Res.*, 27: 121, 1971.
- 9) F.J. Morgan, R.E. Canfield, J.L. Vaitukaitis and G.T. Ross: *Endocrinology*, 94: 1601, 1974.
- 10) H. Okumura, S. Namba and S. Matsushima: *Endocrinol. Japon.*, 20: 67, 1973.
- 11) 奥村一, 須藤忠満, 藤沢宗駿, 難波脩一, 松島早苗: *日内分泌会誌*, 52: 105, 1976.

- 12) 奥村一, 須藤忠満, 藤沢宗駿, 沢井政信, 早川秀: ホルモンと臨床, 26: 301, 1978.
- 13) 奥村一, 須藤忠満, 沢井政信, 藤沢宗駿, 早川秀: ホルモンと臨床, 26: 509, 1978.
- 14) 奥村一, 須藤忠満; 沢井政信: 日内分泌会誌, 54(12): in press, 1978.
- 15) S. Gurin, C. Bachman and D.W. Wilson: J. Biol. Chem., 133: 467, 1940.
- 16) C. Francois, R.D. Marshall and A. Neuberger: Biochem., J., 83: 335, 1962.
- 17) G. Blix: Acta Chem. Scand., 2: 467, 1948.
- 18) L. Warren: J. Biol. Chem., 234: 1971, 1959.
- 19) 高橋健治, 安藤鋭郎: 蛋白質, 核酸, 酵素, 10: 210, 1965.

論文の審査結果の要旨

妊娠の前期に大量に尿中に排泄される Human Chorionic Gonadotropin (HCG) の分離・精製法について改良を加え, 飛躍的に高収率でしかも高純度 (10,000~15,000IU/mg) のHCGを得た。

さらにHCGより α subunitと β subunitを再現性よく分離・精製しその物理化学的, 免疫化学的および化学的な性質を明らかにした。

この知見を基にしHCG, HCG- α およびHCG- β の免疫化学的な精製, および新しい免疫方法の開発により特異性, 力価, 親和性共に良好な抗血清を得, 回収率, 精度, 再現性にすぐれ特異性が極めて高い測定方法の確立を行ない併せてヒト尿中および血中の正常値レベルの測定並びに妊娠期間中の推移などにこれを応用した。

よって本論文が薬学博士を与えるにふさわしいものと認めた。