Low Voltage Paper Electrophoretic Studies on Gonadotropin

Kenji YAGO

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Tokyo Medical & Dental University, Tokyo, Japan
(Director : Professor Kyushiro Fujii, M.D.)

There are two kinds of gonadotropin excreted in the urine, viz., pituitary gonadotropin and chorionic gonadotropin, both of which are proteohormones. The present study was designed to investigate the electrophoretic characteristics of the two proteohormones by separating the two compounds by means of paper electrophoresis, and determining the position of the gonadotropically active component on the electrophoretic pattern by bio-assay. The gonadotropin materials used in this study were as follows: Hypohorin, a freeze-dried anterior pituitary preparation, powdered desiccated anterior pituitary preparation, and HCG powder, a placental preparation extracted from placenta taken during the early stage of pregnancy and also from the latter stage of pregnancy. Gonadotropin in the urine was extracted by the carbowax concentration method as previously reported.

Kobayashi's method of paper electrophoresis was employed in this study. Simultaneously and parallel to the gonadotropin preparation, human blood plasma of known electrophoretic characteristics was also run in order to determine the relative mobilities (R-Alb) of each fraction of gonadotropin in relation to albumin of blood plasma. The gonadotropic activity of each fraction was determined by the uterine weight method using young mice.

Pituitary gonadotropin exhibited 5 staining zones and the gonadotropic active fraction was detected in the R-Alb VI and VII fractions, i.e., in the zone corresponding to the α_2 aspect of β -globulin fraction of human blood serum. Chorionic and placental gonadotropin also exhibited 5 staining zones. The gonadotropin active fraction was detected in the R-Alb V and VI fractions, i.e., in the zone corresponding to β -globulin and γ -globulin fractions of human blood serum.

Samples taken from the urine of pregnant women both during the first and third trimesters exhibited 4 staining zones, and gonadotropin active zone was detected in the R-Alb VI fraction, i.e., in the region corresponding to β -globulin of human blood serum. Samples taken from the urine of climacteric women by the carbowax method alone did not exhibit any staining zone; however, when the ammonia alcohol precipitation method was also used, a gonadotropin active zone was detected in the region corresponding to the β - and γ -globulin fractions of human blood serum.

From the aforementioned data, it is evident that the electrophoretic of pituitary gonadotropin and chorionic gonadotropin differ with each other, i.e., they have different mobilities. The active zone of the pituitary gonadotropin lies mostly in the region

corresponding to α -globulin fraction of human blood serum, and the placental gonadotropin in the region corresponding to β - and γ -globulin fractions of human blood serum. It is assumed that the gonadotropin excreted in the urine has an active core with conjugated protein.

(pp. 1204~1216)

低電圧濾紙電気泳動法による Gonadotropin の研究

東京医科歯科大学医学部産婦人科学教室 (主任 藤井久四郎教授)

矢 後 謙 次

(昭和41年5月24日受付)

I 緒 言

尿中に排泄されるG¹⁾には脳下垂体前葉を分泌源とする下垂体性Gと、胎盤絨毛組織を分泌源とする絨毛性Gとの二種類があり、それぞれ生物学的作用の上から下垂体前葉性GはFSH作用、LH作用及びLuteotropic作用を有し、絨毛性Gは主としてLH作用を有することは衆知の事である。之等のGは他の脳下垂体ホルモンと共にいずれも蛋白性ホルモン(Proteohormone)²⁾³⁾である事からその化学的研究は主として蛋白質化学の進歩によつて支えられて来た。近年に於ける蛋白質化学の急速な進歩に伴い、Proteohormoneに関する研究方法も著しく開拓されGの抽出法や測定法についても化学的分野から多くの研究改良が加えられて来たがGの化学的性質に関してはまだ充分な解明が得られていない現状である。

著者は生化学的立場から尿中GをCarbowax法⁴⁾⁵⁾により抽出し低電圧濾紙電気泳動法により分離し、各分画を幼若マウス子宮重量法⁶⁾によつてその生物学的活性を測定しGの泳動特性の検討を行つた。即ち従来濾紙電気泳動法によるGの泳動に関しては幾多の報告があり泳動像に表われた分画の比較やその部位の生物学的、化学的研究が加えられているが、電気泳動によつて規定されるこれらの物質の性格は、それらの示す易動度(mobility)の検討にあるべきにも拘らず此の観点に立つてGの泳動を吟味した報告は見られなかつた。この見地から著者は既知の泳動特性を有するStandardとして健常人血清を選び、之とG製剤及び尿中Gとを同時平行泳動を行い、下垂体性Gと絨毛性Gとが泳動学的に如何なる特性を示すかを検討し考察を加えたので報告する。

II 実験材料並びに実験方法

1 実験材料

i) G 製 剤

実験に使用したG製剤は五種類であり下垂体性Gとしては哺乳動物の下垂体前葉から抽出したHypohorin(帝臓)及び同精製末(三全)を、絨毛性Gとしては妊娠初期絨毛及び満期胎盤から抽出したHCG末(Human chorionic Gonadotropin)(帝臓)を、更に両者の混合性GとしてSynahorin(帝臓)を用いた。

ii) 採尿

約1%の割合にmarfamin液を入れた蓄尿瓶に妊娠尿及び更年期尿を24時間貯え、Gの抽出にはこの中から200mlを使用した。

2 実験方法

尿中Gの抽出には種々の方法が行なわれているが、原尿そのままではGの含有量が少く又生物学的検定

に際しても毒性が強いので不適当であり、尿中Gの収量を上げる為には如何にしてG有効成分の損失を少くして尿を濃縮するかが問題となっていた。著者は本学生化学教室共同研究者が考案したFig. 1の如き装置により低蛋白体液の迅速濃縮を行うCarbowax法を応用して尿の濃縮を試みた。これはCarbowaxの有する強力な吸水作用を利用して尿を透析濃縮を行う方法で、本法によれば尿中の塩類や残余窒素等の小分子の物質は透析の過程で除かれ、加圧気化法や凍結乾燥等の如く同時に塩類その他の不要物質の濃縮を行う心配がなく、又蛋白の変性を来す恐れもなく且つ、簡単な装置で容易に短時間にGの収量をあげる事が出来る等の諸特長を有するので尿中Gの抽出には優れた方法として応用することが出来た。尿の濃縮には平均分子量6000の Carbowax をFig. 1の如く底の扁平なる濾斗にガーゼを敷きその上に入れ、その上にセロファン膜を底にした円筒に尿を入れて接触させると尿中の小分子のものは水分と共にセロファン膜外の Carbowax の方へ滲出し、200mlの尿は平均48時間でほぼ糊状に濃縮することが出来た。

Fig. 1. Extraction of urinary gonadotropin carbowax-concentration method (Fujii-Miyamoto, 1960)

ii) 低電圧濾紙電気泳動装置

1) 濾紙電気泳動装置

小林式濾紙電気泳動装置 (Fig. 2) を用い⁷⁾緩衝槽は4個使用して図の如く同時に3枚の泳動が出来る様に直列に接続した。左右の両極槽には1%の塩化カリ寒天ブリッジにて連絡した。緩衝液及び塩化カリ溶液は通電中にpHの変化を来すのを防ぐ為、使用の都度新たに調製したものをを使用した。

2) 緩衝液

Michaelis によつて系列的にpHを記載した Veronal-Veronal Na Buffer のうち pH8.6と規定された原液 (Veronal 1.84g veronal Na 10.3g を Aq destにて1lにしたもの)を使用した。

3) 濾紙及び試料の添加

Whattman No. 1 の濾紙を幅12cm長さ24cmに切り、その幅を4等分にしてその一つに健常人血清を、他の3つに試料をマイクロピペットにて原線に線状に添加した。添加量は本実験では主として定性を目的とし

Fig. 2. Kobayashi's low voltage paper electrophoresis apparatus structure of cell inside

たので1回の添加量は略原線上に飽和するまでとし、又添加の際血清と試料の混合するのを防ぐ為に各境界に幅1 mmの溝を切りとつて泳動した。

4) 泳動条件及び通電時間

泳動に際して通電量を一定に保つ場合、定電流方式をとるか定電圧方式をとるかはまだ確定した結論は出ていないが、本実験では荷電粒子のイオン活性度から考えて定電流条件で泳動した。即ち濾紙幅12cmに対して6mA (0.5mA/cm)の定電流で泳動し、時間は同時に平行泳動した人血清のAlbuminが原線より約6～7 cm泳動した時に電流を断つた。これに要する時間は約5～6時間であつた。

5) 染色及び固定

電流を断つた後濾紙を100℃の乾燥器中に約5分間入れて乾燥し、B.P.B. (Brom-Phenol-Blue) 染色液に20分間つけて染色した。脱色は0.5%醋酸水溶液で数回とりかへ洗滌し、Background が白くなるまで行い室温にて風乾後泳動像の濃度を一定に固定する為、BPBをアンモニア蒸気で発色させた。更に加熱融解したパラフィン液に通して固定し濾紙の透明化を行つた。

6) 易動比及び分画濃度の測定

R-Albumin の概念に基き、原線と血清アルブミンの泳動せる距離を基準にこれに対する各泳動物質の泳動距離の比、即ち R-Alb を決定しこれを易動度とした。各泳動像の濃度は小林式光電光度計にて測定した。

iii) 生物学的検定法

i) 濾紙分画法

各泳動物質の濾紙からの抽出法はFig. 5の如く濾紙の上下の両側を切り取りBPB染色を行い、残りの未染色の部分について原線とアルブミンとの距離を10等分し、各区画濾紙を小試験管に入れた生食水につけて攪拌圧出しGを溶出させた。この際1枚の区画濾紙ではGの有効成分が微量の為、1回の生物学的検定には同様の条件の区画濾紙を15枚使用した。

2) 幼若マウス子宮重量法

生物学的検定に使用した幼若マウスは生後21日目の体重7～9gのメスD.D.系マウスで、1検体につき1群3匹を使用した。即ち検体を3 mlに溶出したものを1日1回1 ml宛3日間連日皮注射し、最後の注射後24時間目に開腹し子宮を剔出し濾紙上で子宮内容を圧出し周囲の結合織を取除いた後Torsion Balanceで秤量した。G活性の単位は1群の平均子宮重量を求め、閉経期婦人尿から抽出したG力価のHMG (Human menopausal Gonadotropin) 単位をStandardとして換算したHMG単位で表わした。

III 実験成績

1. G製剤試料の泳動像

i) 下垂体性Gの泳動像

Hypohorin 及び下垂体前葉から抽出したG精製末では BPB 染色による泳動像は稍不鮮明な分画を含めて共に略3つの Fraction を認めた. (Fig. 4). 即ち Hypohorin では同時平行泳動した人血清の Albumin 位(R-Alb 10, 11分画)と α_2 位(R-Alb 7分画)及び β と γ の中間位(R-Alb 3分画)に認め, 下垂体性G末(三全)では α_1 位(R-Alb 8分画)と α_2 位の稍 β 位寄り(R-Alb 6分画)及び γ 位(R-Alb 3分画)に相当して泳動する事がわかった.

ii) 絨毛性Gの泳動像

妊娠初期絨毛から精製したG末の試料は, 生食水に対する溶解が悪く, 泳動後原線に残る蛋白成分の混入があり, 染色上の分画は下垂性Gに比して多数の分画からなっていた.

Fig. 4. Biological activity of gonadotropin fractionated by paper electrophoresis

各分画の分離はよくないがFig. 5の如く原線に残る分画を含めて略5つの Fraction がみられた. 即ち同時平行泳動の人血清の Albumin 位(R-Alb 10分画) α_2 位(R-Alb 7分画) β 位(R-Alb 5分画) γ 位(R-Alb 3分画)及び原線に相当していた. これに対して満期胎盤性G末では生食水に対する溶解がよく, 原線には殆んど残らず, 可染分画も略5つの Fraction を認めた. 即ち Albumin 位(R-Alb 10分画) α_1 位(R-Alb 8分画)及び γ から原線の間に不明瞭ながら3つの分画像を認めた.

iii) 混合性Gの泳動像

下垂体性Gと絨毛性Gとを9:1の割合に混合した協力性Gである Synahorin の泳動像はFig. 6の如く, Hypohorin の泳動像とよく似ており, 2つの分画を示した. 之は同時平行泳動の人血清の Albumin 位及

Fig. 5. Biological activity of gonadotropin fractionated by paper electrophoresis

Fig. 6. Electrophoresis of gonadotropin preparations

びβ位に相当していた。これは大部分が下垂体性Gを含む為であると考えられた。

2 G製剤の泳動像に対する生物学的検定

泳動分画を前述の10等分法で分割溶出した検体を幼若マウス子宮重量法で生物学的に検定した結果、G活性の部位は泳動像で認めた各分画とは必ずしも一致せず B.P.B の可染分画のすべてがGの有効成分ではなかった。

i) 下垂体性Gの生物学的検定

Hypohorin 及び下垂体性G末の生物学的検定の結果、G活性の有効部位はFig. 4の如く Hypohorinでは第7分画に集中して著しい活性を認め、その前後にも若干の活性を認めた。之に対して下垂体性G末(三全)

でも Hypohorin と略同様にG有効部位は第6分画に集中しており第7, 第8分画にも若干の活性を認めた。これは人血清の α_2 位に略一致していた。

iii) 絨毛性Gの生物学的検定

初期絨毛性Gの泳動像に対する生物学的検定では、G活性の部位はFig. 5の如く下垂体性Gに比べて明らかなピークを示さないが、非常に強くG活性の反応を示し、これは略 β 位(R-Alb 5-6分画)に最も強く表われ、 $\alpha_1\alpha_2$ 位及び γ 位にもかなりの活性を有していた。これに対して満期胎盤から抽出精製したG末では初期絨毛性に比して反応は弱いG活性の部位の分離は可なり明瞭で、同時平行泳動した人血清の β 位(R-Alb 第5, 6分画)に相当しており、これは初期絨毛性Gの活性部位と同じピークに存在していた。

3. 更年期尿中Gの泳動と生物学的検定

去勢婦人尿及び既に卵巣機能の低下した更年期後の婦人尿では下垂体性Gが非常に増加している事から、尿中の下垂体性Gの泳動には之等の婦人尿を用いて検討した。即ち更年期婦人尿を24時間防腐蓄尿し、その中の200mlを前述の Carbowax 法によつて透析濃縮し、Decicater 中に保存した試料を0.02mlの生食水に溶解してマイクロピペットにて濾紙に線状に添加し泳動を行つた。その結果Fig. 7の右に示す如く検体は殆んど泳動されず原線に残つており、又生物学的検定によるG活性はいづれも1HMG単位以下であつた。そ

Fig. 7. Biological activity of femal menopausal urine fractionated by electrophoresis

こで試みに Carbowax で透析濃縮した試料を更にアンモニアで再抽出し、アルコールで沈澱させたものを試料として泳動してみるとFig. 7の中央に示す如く、同時平行泳動した人血清の β 位から γ 位にかけて泳像分画像が得られ、生物学的活性の測定でもこの可染分画に一致してG活性の存在する事がわかつた。即ち下垂体性G末と更年期尿中Gとを比較検討すると前者では β から α 位寄りに存在するのにに対して後者の尿中Gでは逆に β から γ 位寄りに存在しており、これは下垂体から直接抽出したGと尿中Gとは泳動学的にも異なる態度を示し又アンモニア・アルコール法で再抽出した後に初めて生物学的活性が認められた事はアンモニアによつて尿中Gの抱合型蛋白が分解された結果活性を発現する様になつた事と考えられた。

Fig. 8. Biological activity of gonadotropin from the urine of pregnant women

Fig. 9. Biological activity of gonadotropin from the urine of pregnant women

4. 妊婦尿中Gの泳動と生物学的検定

妊娠時には絨毛組織及び胎盤に由来する絨毛性Gが尿中に多量に排泄され、妊娠初期と末期の尿中Gは泳動学的に如何なる態度を示すかを検討した。

i) 妊娠初期尿中Gの泳動と生物学的検定

妊娠初期尿から Carbowax 法により抽出した試料ではFig. 8 に示す如く、更年期尿とは異つてCarbowax 法の場合でも泳動された。即ち可染分画は多数見られ殊に Albumin 位及び β 位に相当して強く染色され、之を各区画について活性を測定した結果、G活性は絨毛から直接抽出した絨毛性G末に比して反応は弱い、初期絨毛性G末及び満期胎盤性G末と殆んど一致した部位即ち、R-Alb 5分画の β 位に相当してG活性が認められた。更に妊娠2カ月尿についても Carbowax 濃縮後アンモニア・アルコール沈澱法を併用した結果は、Fig. 9 右の如く、アンモニア・アルコール再沈澱法をしない場合と殆んど同じ泳動像を示し、ただ可染分画の濃度が強くなり、生物学的活性部位も同時平行泳動した人血清の β 位に存在していた。その

Fig. 10. Biological activity of serum gonadotropin in pregnant women

力価についてもアンモニア・アルコール沈澱法を併用した場合、全体的に高値を示していた。即ち更年期尿中Gがその蛋白構成に於いて抱合型を想定させるのに対して妊婦尿中Gでは遊離型のGが混在している事が考えられた。

ii) 妊娠末期尿中Gの泳動と生物学的検定

妊娠10カ月尿についても同様に Carbowax 濃縮のみの試料と、更にアンモニア・アルコール再抽出後の試料と比較して泳動した結果は図の左の如く、Carbowax 濃縮のみでは妊娠初期尿に比して可染分画の濃度が低く、泳動分画も不鮮明であるが、略 β 位に相当して最も強い泳動像がみられ、生物学的活性でも同じく

Fig. 11. Recovery of urinary gonadotropin

β 位に一致してG活性の存在を認めた。又更にアンモニア・アルコール再抽出した場合についても、泳動像は再抽出しない時と殆んど差がなく、鮮明な泳動像はみられないが生物学的活性は再抽出前と略同様に同時平行泳動の血清の β 位にピークが存在することがわかった。即ち妊婦尿では更年期尿と異つて初期及び末期共にアンモニア・アルコール再抽出による泳動像及び活性に変化はみられなかつた。これは絨毛性Gに関しては絨毛組織から抽出した試料を尿中から抽出した試料とは泳動学的に相異は認められず尿中Gはその蛋白構成について絨毛組織性のGに近いものであることが考えられた。

5. 妊婦血清中Gの泳動と生物学的検定

妊娠初期及び末期血清におけるGの泳動と生物学的検定を行つた結果はFig. 10の如く、妊娠2カ月及び10カ月の各分画移動度は勿論一定しているが Electrophotometer で測定した結果では妊娠2カ月の血清は10カ月の血清に比べて γ -Globulinが多く、逆に妊娠10カ月の血清は2カ月の血清に比べて β -Globulinの方が多かつた。又生物学的G活性の部位は妊娠2カ月の血清ではR-Alb第4分画即ち β 位に相当して存在しており、これは初期絨毛性G及び満期胎盤性Gと一致しており、これに対して妊娠10カ月の血清は各分画のすべてが1HMG単位以下で生物学的にG有効成分が認められなかつた。これは妊婦尿中HCGの消長と同様に妊娠初期血清中でも可なりのHCGの増加があると考えられた。妊娠末期では特にGの抽出操作を

加えない限りでは血清そのものを試料とした場合はG有効成分の存在を表わさない結果となるものと考えられる。

IV 考案並びに総括

脳下垂前葉に由来するGが尿中に排泄されることは既に Zondek¹⁾ (1930) によつて報告されているが、その排泄量は極めて少く、更にGが高分子の蛋白性ホルモン Proteohormone²⁾³⁾であることがその単離に大きな障害となつて生化学的な研究は他の Steroidhormon 系に比して著しく遅れていた。しかし近年の蛋白質化学のめざましい発展に伴い尿中Gを高純度に分離しようとする試みは1950年以後非常な進歩をとげ、極めて多くの研究が多方面にわたつて行なわれる様になつた。

尿中からGを抽出する操作に関しては最も古くから用いられている方法としてアルコール沈澱法があるが、これは Zondek が初めて尿中にGを発見した際に用いられたもので、濾過した弱酸性尿に4倍量のアルコールを加え、Gを蛋白成分と共に沈澱させる容易な方法である。この方法は抽出に際し多量のアルコールを必要とし更にGと共にアルコール不溶性のG以外の不純物を同時に沈澱させる為、得られたGは極めて純度が悪く、毒性も強いので生物学的検定には不都合な事が多い欠点があつた。これを改良する為にその後種々の方法が考えられ、アルコール沈澱物を更に透析する方法⁹⁾、アルコールに代つてアセトンを溶媒とする方法¹⁰⁾¹¹⁾が考えられた。これらの方法は操作が容易でGの抽出法としては回収率も可なり高く再現性も良好である点古典的な Standard として現在でも他の抽出法と比較検討する際に用いられる事もあるが routine な臨床的手段としては前述の様な難点が多い。

この観点に立つて更に蛋白沈澱剤にタンゲスラン酸¹²⁾又はタンニン酸¹³⁾を使用したり、又蛋白吸着法として安息香酸法¹³⁾や最近に至りカオリン¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾や水酸化アルミニウム¹⁹⁾等でGを吸着抽出する方法等が行われる様になつた。この他飽和硫酸アンモニウムによる塩析法⁴⁴⁾や尿中Gを物理化学的に濃縮する方法として限外濾過法²⁰⁾²¹⁾や超遠心分離法が報告されている。これらの抽出法の優劣に関しては一定の見解がなく、Gの収量、毒性、操作の難易性や費用等の点からそれぞれ一長一短があり、アルコール・アセトン沈澱法と安息香酸吸着法及び水酸化アルミニウム吸着法及びカオリン吸着法を比較し検討した実験²⁴⁾ではカオリン吸着法が最も優れ、現在でも広く用いられ Lorcaine²⁵⁾等も同様な見解を述べている。しかしながらこのカオリン吸着法に於いても種々な難点があり、特にカオリンが天然性のものである事からカオリン自体の品質の差による収量の変動は検定の際に生物学的反応に大きな影響を及ぼし、又操作も幾分煩雑である事等が欠点となつていた。この点を改良した方法としてタンゲステン酸、タンニン酸法があり最近に至つてカオリンに代つて合成イオン交換樹脂や更にイオン交換セルローズを用いて下垂体中のGの分離²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾や尿中Gの分離³¹⁾³²⁾が行われる様になつたが、尚収量の点からその後余り普及されていない現状である。

著者は今回カオリン法にかわるものとしてCarbowax 6000 (Polyethylen Glycohol)を用いてGの濃縮を試み、これをカオリンアルコール法¹⁵⁾及びカオリン・アセトン法³³⁾及びイオン交換樹脂である Amberlite 法²⁴⁾²⁷⁾及び古典的なアルコール沈澱法を比較検討した結果、Fig. 11の如く生物学的検定法でも又、化学的GAGB 法³⁴⁾でも Carbowax 濃縮法では収量が約2倍以上にあり、又原尿200ccに対する抽出所要時間も可なり短縮することが出来た。又 Carbowax の代りに安価な PVM/Ma²⁹⁾ (Polyvinylmethylether Maleic acid の共重合体)を使用した結果でも所要時間の短縮が出来た。この Carbowax 濃縮法の原理は先に述べた如く Carbowax の有する強力な吸水能を利用して尿中の水分と共に Estrogen の如き低分子の物質及び塩類等の毒性物質をセロファン膜外に排除する方法で、アルコール沈澱法に比して生物学的検定に際しての毒性が少なく、又濃縮尿について Estrogen の混入の有無を藤井、藤山法³⁵⁾で検討した実験でも Estrogen の活性は認められなかつた。Carbowax は分子量の大きい程吸水能力が強く Carbowax 300及び1500では吸水能力が低下し濃縮時間が延長し、特に300を使用した場合は Estrogen の如き Steroid の混入の恐れがあり実用に供し得ない。又 Carbowax の代りに PVM/Ma を使用した実験では吸水能力は Carbowax より劣り、且つこの物質は水に不溶性の為吸水膨化した後の処理に不便を感じた。結果 Carbowax 6000 によ

る濃縮法は臨床応用に当つて抽出所要時間の短縮, 操作の簡易化及び収量の増大等の点から最もすぐれた方法として応用することが出来た。

Gの濾紙電気泳動に関しては, 近年になつて漸く盛んとなり, 各方面で研究され1954年 Stran & Seeger³⁶⁾等はGを含む物質を泳動し更にカオリン吸着後の尿中 HCG の泳動像から妊娠に特有な Fraction を認めた事を報じており, 又 Schneider & Frahn³⁷⁾ (1957)は濾紙電気泳動法による絨毛性Gが五つの分画に分かれることを認めその生物学的活性は第3第4分画に表われたと報告している。又妊馬血清Gについてもその生物学的反応から FSH作用の他に ICSH 作用も認められたと報じている。我国に於いても絨毛性Gの泳動について梶原(1954)³⁸⁾, 小西(1956)⁴⁹⁾⁴⁰⁾等の発表があり絨毛性Gの Fraction について検討を加え, 更に1960年古谷岸浪⁴¹⁾の発表では HCG の Fraction は電気泳動学的特異性に関してはまだ不充分であることを報じている。又, Winzler⁴²⁾ (1958)は Muco 蛋白体としてのGを泳動し, 血清の α -Globulin に一致して存在すると述べている。

更に連続濾紙電気泳動法で脳下垂体性Gを FSH と LH に分離し, 外来的に Anteron を下垂体剔出ラッテに投与しその血清を泳動した結果 γ -Globulin 位に明瞭なG活性を認めたと望月⁴³⁾の報告がある。

従来Gの如き高分子の Proteohormone を電気泳動学的に追求しその泳動特性を検討する場合, 単に染色上に表われた Fraction の比較やその部分の活性検定では不充分であり再現性に乏しく, 試料を常に既知の易動度を有する物質と同時に平行泳動を行つてそのものに対する易動比を定めることが必要である。この見知から既知の泳動特性を有する Standard として健常人血清を選び, 之を同時平行泳動したGについてその泳動特性を検討した。即ち人血清の Albumin に対し同じ条件で泳動した試料の泳動距離の相対的部位即ち R-Alb の概念を導入し, 生物学的検定は表われた Fraction に限らず Albumin と原線との距離を10等分した各区画のすべてについて活性の有無を測定した。

先づG製剤についてみるとその泳動像は幾つかの分画に分かれるが, これらの可染分画のすべてが有効分画とは考えられないので泳動濾紙のすべてについて生物学的検定を行つた結果, 有効分画と考えられるものと無効分画と考えられるものとを明瞭に区別することが出来た。即ち可染分画の位置と生物学的活性を有する分画とは必ずしも完全に重いていない様に考えられるが, G有効分画が生物学的検定によつて決定されるG活性の位置は略一定しており, 大体同時平行泳動した血清の β 位を中心に泳動されることがわかつた。

更に各試料について示した結果を詳しく比較考察してみると次の問題が提起される。

1. 下垂体性と胎盤性Gとは果して異なる R-Alb をもつものであるか, 即ちこの両者が物理化学的にも異なる性格をもつものであるれば電気泳動学的にも異なる特性を示すと考えられるのでこの点から比較検討した結果, 今までの成績からみると下垂体Gの有効分画は人血清の β 位より若干 α_2 位の方に位置し, これに対して胎盤性Gは β 位及び若干 γ 位側にズレて存在した。勿論この推定は例数も少く又製剤試料の Lott も限られているのでこの結果のみから下垂体性Gと胎盤性Gとが電気泳動学に異つた特性を示すかどうか断定することは出来ないが今回の結果を一つの示唆として今後の検討に期待したいと思う。

2 次に今度の実験から上述の如くG製剤の泳動像の可染分画とG有効分画とが大体に於いて重疊していたが, 必ずしもすべての有効分画が完全に可染分画と一致していないで多少のズレがある様に思えた事は既に述べたが, この結果から考えると有効分画は寧ろ染色度が弱いのではなからうかを言う事も可能であると考えられた。即ち泳動像に表われた可染分画としての β 位分画も或いは無効成分であり, その β 位に重なり或いはその前後に極めて染色性の悪い Fraction が有効分画として存在するのではなからうか, 換言すれば真の有効分画は或は蛋白成分の少い, 染色性の悪いものであるか又は上述の染色法では表われず他の特殊の染色法によつてのみ表われるのであるかと言う可能性も推定される。

3. 次に Carbowax 濃縮法による妊婦尿中Gについて考察してみると, 妊娠初期及び末期共に生物学的検定では R-Alb 5分画即ち β -Globulin 位に活性がみられた。これはG製剤としての絨毛性及び胎盤性Gの有効分画の存在する部位と略一致しており, 尿中Gと臓器抽出性Gとは泳動学的に略一致した易動度をもつものであると考えられた。

4. 主として下垂体性Gを含む更年期尿については、Carbowax 濃縮のみでは明瞭な分画はみられず、又生物学的活性も認められなかつたが、Caobowax 濃縮試料を更にアンモニア・アルコールで再抽出、再沈澱を加えた結果では、G活性は R-Alb の第4第5分画即ち β -Globulin 位に一致して可染分画があり、それに重畳してG活性も認められた。即ち下垂体性Gに関しては更年期尿から抽出したGでは β -Globulin 位にG活性が存在し、下垂体臓器抽出性Gでは α -Globulin 位にG活性が存在する結果が得られたが、これは種族も異り、尿中から抽出したものと下垂体臓器から抽出したものの相違から易動度も異つて表われたものと考えられた。又妊婦尿についても Carbowax 抽出のみの場合と Carbowax 抽出後アンモニア・アルコール再抽出法を併用した場合とを比較してみると、両者共に β -Globulin 位に一致しており、ただアンモニア・アルコール法を併用した場合の方が HMG 単位で高値を示す結果が得られた。

以上の結果から考察してみると尿中の下垂体性Gは主としてG活性型の蛋白体を有し、妊婦尿中のGは不活性型のみならず活性型の蛋白体も有している結果、Crrbowax 濃縮のみでもG活性が表われるものと考えられた。換言すれば、不活性型のG蛋白体がおそらくアンモニア・アルコール法によつて分解される為の不活性因子が除かれる結果Gの活性が表われる様になつたと考えられた。

V 結 語

下垂体性Gと胎盤性G及び妊婦と更年期婦人尿中のGを濾紙電気泳動法によりその泳動特性を比較検討した結果次の推定を得た。

1. 下垂体性Gについて

電気泳動像は略五つの Fraction が認められたがその中生物学的活性を有す分画は R-Alb 第6第7分画にあり、これは同時平行泳動した人血清の β -Globulin 位より若干 α_2 位寄りに相当して存在していた。

2. 胎盤性Gについて

妊娠初期絨毛性G及び満期胎盤性Gは共に泳動像では五つの可染分画に分れ、その生物学的活性は R-Alb の第5第6分画に認められ、これは同時平行泳動した人血清の略 β -Globulin 位に相当していたが若干 γ -Globulin 位にも存在していた。尚初期絨毛性Gはその活性が非常に強く β -Globulin 位をピークとして若干その前後にも及んでいた。

3. 妊婦尿及び更年期婦人尿中Gについて

妊娠2カ月及び10カ月尿ではG製剤に比して不鮮明であるが略四つの Fraction がみられ、生物学的活性の存在したのは R-Alb の第6分画でありこれは血清の略 β 位に相当していた。更年期尿では Carbowax濃縮法にアンモニア・アルコール法を併用した後始めて可染分画及びG有効分画が認められた。即ち泳動像では β から γ -Globulin 位にかけて可染分画がみられ、生物学的活性もその Fraction に一致して存在していた。

4. 以上各種の Gonadotropin を電気泳動により比較検討した結果、下垂体性Gと胎盤性Gとの間に泳動学的に易動度の点があることを認め、下垂体性Gは主として血清の α -Globulin に附随して泳動し、胎盤性Gは β から γ -Globulin に附随して泳動していると考えられ又尿中Gに関しては活性・不活性型の蛋白構造を示す Active core の概念が想像された。

5. 妊婦血清のGについて

妊娠2カ月の血清では β 位に生物学的活性を認め、妊娠10カ月の血清では血清そのままを試料とした場合では生物学活性は、どの分画にも認められなかつた。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導御鞭撻並びに御校閲を賜つた恩師藤井久四郎教授並びに前生化学教室宮本暉教授に衷心より謝意を表すると共に、種々御協力並びに助言を戴いた助川幡夫博士、熊坂高弘博士、根岸駿夫学士をはじめ教員各位並に帝国臓器、三全製薬に深謝致します。

尚本研究は第34回日本内分泌学会総会シンポジュームの一部をなすものであり、又この要旨は第24回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会に於て発表した。

文 献

- 1) ZONDEK, B. : Klin. Wochenschr 2:964, (1930). 2) JOHNSEN, S.G. : Acta Endocrinol., 20: 106, (1955).
- 3) SEGALOFF, A. : Year Book of Endocrinol., 266 (1955). 4) 宮本, 藤井, 坂岸, 野見山 : 生物物理化学, 3 : 56, (1956).
- 5) 藤井, 宮本他 : 臨産婦, 14 : 1071, (1960).
- 6) 熊坂 : 臨産婦, 15 : 203, (1961). 7) 藤井 : 臨産婦 28 : 441, (1961). 8) 宮本, 杉本 : 濾紙電気泳動シンポジウム, 文光堂, (1958).
- 9) HELLER, C.G. HELLER, E.J. : Endocrinol., 24:319, (1939). 10) DRIPS, D.G. & OTERBERG, A.E. : Endocrinol., 23:703, (1938).
- 11) 松島 : ホと臨, 3 : 796, (1955). 12) KATMAN, P.A. & DOISY, E.A. : Proc. Soc. Exp. Biol & Med., 30 : 1188, (1933).
- 13) LEVINE, L. : Endocrinol., 28:378, (1941). 14) KATMAN, P.A. & DOISY, E.A. : J. Biol. Chem., 106:125, (1934).
- 15) BRADBURY, J.T. BROWN, E.S. & BROWN, W.E. : Proc. Soc. Exper. Biol & Med., 71:228, (1947).
- 16) LORAIN, J.A. & BROWN, J.B. : J. Clin. Endocrinol., 16:1180, (1956). 17) ALBERT, A. : Recent Prog. Horm. Rec., 12:227, (1956).
- 18) BROWN, P.S. : J. Endocrinol., 17:329, (1958). 19) MALBURG, R.F. & GOODMAN, J.R. : J. Clin. Endocr. & Met., 14:666, (1945).
- 20) GORBMAN, A. : Endocrinol., 37:177, (1945). 21) VAN GILSE, H.A. : Acta Endocrinol., 21:19, (1956).
- 22) 松本 : 日本内分泌誌, 37 : 616, (1961). 23) JOHNSEN, S.G. : Acta Endocrinol., 20:106, (1955).
- 24) 松島 : ホと臨, 8 : 749, (1960). 25) LORAIN, V.A. : Vitam & Horm., 14:305, (1956).
- 26) BUTT, W.R. CROOK, A.C. & CUNINGHAM, F.J. Acta. Endocrinol., 30:378, (1959). 27) JOHNSEN, S.G. : Acta Endocrinol., 20:101, (1955).
- 28) STEELMAN, S.L. & SEGALOFF, A. : Abst. Endoc. Soc. 39th Meeting., 158:104, (1957).
- 29) 藤井, 熊坂, 矢後 : ホと臨, 11 : 856, (1963).
- 30) WOODS, M.C. & SIMPSON, M.E. : J. Clin. Endocr. & Met., 68:647, (1961). 31) STEELMAN, S.L. SEGALOFF, A. ALBERT, A. & ANDERSON, R.N. : Proc. Soc. Exper. Biol & Med., 452, (1959).
- 32) ALBERT, A. KOB, J. LEIFERMAN, J.R. DERNER, I. : J. Clin. Endocr. & Met., 21:1, (1961).
- 33) BROWN, J.B. LORAIN, J.A. : J. Clin. Endocr., 16:1180 (1956).
- 34) 助川 : 日産婦誌, 11 : 1769, (1959). 35) 藤井 : 第9回日産婦総会宿題報告要旨, (1957).
- 36) STRAN, H.M. SCHNEIDER, W.G. : Acta Endocrinol., 95 : 162, (1954).
- 37) FRAHM, H. & SCHNEIDER, W.G. : Acta Endocrinol., 24:106, (1957). 38) 梶原 : 臨産婦, 8 : 863, (1954).
- 39) 小西 : 産婦の世界, 9 : 1451, (1957). 40) 同 : 〃, 10 : 214, (1958).
- 41) 古谷, 岸浪 : 日本不妊誌, 5 : 500, (1960). 42) WINZLER, R.J. : Chem. & Biol. of Mycopolysac., (1958).
- 43) 望月 : 日本内分泌誌, 37 : 780, (1961). 44) JONES, G.E.S. & BUCHER, N.I.R. : Endocrinol., 32:46, (1943).