Comparative Study on the Biochemical Character of HCGs from Trophoblastic Tumor and Normal Pregnancy

**Natsuto MOCHIZUKI, Yoshihiko ASHIDAKA,
Yasumasa TOKURA and Shimpei TOJO**

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kobe University, Kobe, Japan
(Director : Professor Shimpei Tojo, M.D.)

Recent endocrinological knowledge on proteohormone producing tumor has drawn attention to the comparison of the hormone secreted from normal cells with that from tumor cells. But, reports on a comparative study of the biochemical character of gonadotropins from normal chorionic tissue and chorionic tumor tissue are still scarce.

In the present study, HCGs from chorionic tumor and normal pregnancy were purified by Sephadex gelfiltration and ion-exchange cellulose column chromatography. For a strict comparison between these HCGs, identical procedures were employed for the purification of every preparation. Urinary gonadotropin was extracted by alcohol precipitation method and Kaolin-Adsorption method. Biological activity of HCG was assayed by ovarian weight method referring to 2nd international standard HCG. Immunological activity was assayed by hemoagglutination inhibition reaction.

1) Comparison of HCGs on CM-C column chromatography.

Both HCGs were eluted in two fractions on Sephadex gelfiltration. The retarded fractions were biologically inactive but the unretarded fractions were biologically active. These unretarded fractions were further separated into non-adsorbed part and adsorbed part on CM-C column chromatography. Only the non-adsorbed part was biologically active in both HCGs.

This is an interesting difference from the pituitary gonadotropins, since biological activity of pituitary gonadotropin is observed in the adsorbed part but not in the non-adsorbed part when it is fractionated on CM-C column chromatography.

2) Comparison of HCGs on DEAE-C column chromatography.

In both HCGs, biological activity was present in adsorbed fraction but not in non-adsorbed fraction. In other words, the biologically active protein is adsorbed on DEAE-C but not adsorbed on CM-C. The activity was as high as 20,000 IU/mg in the preparation from normal pregnancy and 8,000 IU/mg from chorionic tumor patient.

When HCG activity of adsorbed protein was seen in connection with conductivity, most of the HCG activity from normal pregnancy was eluted between 3.0 and 5.0 m mho, but that from chorionic tumor was eluted in two parts at more than 5.0 and less than 2.0 m mho but it was not eluted at the conductivity between 3.0 and 5.0 m mho at which normal HCG activity was eluted. On the other hand, when such biologically active adsorbed

protein was subjected to linear gradient elution, the amount of eluted protein from normal pregnancy showed a monophasic peak, whereas, the amount of protein from chorionic HCG was much larger at very low and high conductivity at which a very little amount of the protein from normal pregnancy was eluted.

These facts suggest that chorionic tumor HCG is composed of two kinds of protein (acidic and basic) with complexed constitution which differs from that of normal HCG, and they further suggest the difference of the biochemical character of both HCGs.

Recovery of biological activity and the amount of protein were calculated as follows. In normal pregnancy, recovery ratio of protein was 42.5% by CM-C column chromatography and 9.8% by the final DEAE-C column chromatography as to the fraction having 20,000 IU/mg of biological activity, the recovery ratio of protein was 2.2% and that of biological activity was about 50%. In chorionic tumor HCG, the recovery of protein was 30.6% by CM-C column chromatography and 4.3% by DEAE-C column chromatography, but final recovery of biological activity was 42%.

In both HCGs, immunological activity was high in the fractions with low conductivity. In such fractions of normal pregnancy, both activities were almost parallel, but they were not so in chorionic tumor HCG. And, in general, the fractions having high biological activity were eluted at high conductivity and showed very low immunological activity. Such tendency of dissociation of biological activity and immunological activity was more evident in chorionic tumor HCG, and HCG with biological activity and HCG with immunological activity were eluted at different conductivity. Further, comparison of HCGs from normal pregnancy and chorionic tumor at every step of purification also revealed that in both HCGs, HCG with biological activity and HCG with immunological activity were eluted at a different conductivity. The HCGs from normal pregnancy and chorionic tumor were also different in their potency of being adsorbed by ion-exchange cellulose.

As a conclusion all the above findings strongly suggest that the molecular structure of HCG from normal pregnancy differs from that of HCG from trophoblastic tumor.

(pp. 482~485)

腫瘍性 HCG と正常絨毛性 HCG の精製とその性状の比較

神戸大学医学部産科婦人科学教室 (主任 東条伸平教授)

望 月 真 人, 足 高 善 彦
都 倉 康 正, 東 条 伸 平

(昭和43年 4 月 10 日 受付)

絨毛性腫瘍の正確な診断及び予後の観察の為に、腫瘍性 HCG と正常絨毛性 HCG の性状を比較解明する事を目的とし、同一の精製過程で両 HCG の純化を行ない、特に conductivity と生物活性及び免疫活性の相関から両 HCG を比較したところ、活性分画の溶出される conductivity は両 HCG で異なり、cellulose に対する吸着態度にも明らかな差を認めた。この事から腫瘍性 HCG は正常絨毛性 HCG とかなりの性状の差があり、両者を同一視する事は出来ない。

緒 論

最近、蛋白系ホルモンを分泌する腫瘍に関する内分泌学的知見が報告されはじめ、正常細胞から分泌されるホルモンと腫瘍細胞から分泌されるそれとの比較検討成績が多くの興味を惹くようになり、とりわけ ACTH や TSH 産生腫瘍については、その生物学的、免疫学的、あるいは生化学的性状がかなり詳細に追究されているのに反し、研究の歴史が古いものにも拘らず、正常絨毛性ゴナドトロピンと腫瘍性ゴナドトロピンの生化学的性状を比較検討した報告は少ない。我々は従来よりこれらの HCG について、生化学的性質の比較検討を行なつて来たが、今回、両 HCG を同一方法で純化精製し、高い specific activity を持った HCG を採取し得、純化精製過程における両者の態度について比較検討を行ない、興味ある成績を得たのでその概要を報告する。

I 実験材料並びに実験方法

A. 実験材料

正常妊娠初期妊婦尿よりアルコール沈澱法で抽出された粗 HCG (2130 IU/mg, 友田製薬), および絨腫患者尿より, Bradbury 法—松島変法で抽出し、乾燥粉末の状態でアンプルに封入し、2年間冷凍保存されていた粗 HCG を使用した。

B. 実験方法

1. 生物活性の測定

生物学的活性は標準品に 2nd international standard HCG を用い、幼若ラット卵巣重量法 ($\lambda=0.176$) で測定した。なお HCG の生物学的活性は精製過程での各段階毎に測定した。

2. 免疫活性の測定

免疫活性の測定は 0.5 IU/ml の感度を持つ様に調整された赤血球凝集阻止反応によつた。各精製過程での免疫活性測定は生物活性測定の場合と同様である。

3. 精製方法

我々の行なつた精製方法の詳細は別に報告してあるので¹⁾ それを参照されたい。cellulose column からの蛋白質の溶出は linear gradient elution 法で行ない、溶出分画の蛋白濃度は O.D. 280m μ で測定した。また溶出分画の conductivity (milli mhos) は conductivity meter type CDM 2d にて各溶出量毎に測定した。

II 実験成績

A CM-C chromato. における両者の比較

Sephadex gel filtration による粗 HCG の unretarded fraction は CM-C chromato. で非吸着蛋白と吸着蛋白とに分離した。絨腫 HCG および正常妊娠初期 HCG の CM-C 吸着蛋白は 1M-NH₄ Ac buffer (pH 7.0, 22.0 m·mhos) で linear gradient 法で溶出すると, Fig. 1 の如く, O.D. 280m μ の上からほぼ3つの分画に分離される。溶出分画の conductivity から見ると3分画は両者ともに一致しているが, 正常妊娠 HCG では第1分画, 絨腫 HCG では第2分画の占める割合が高かった。なお生物活性は両者とも CM-C 吸着蛋白のいずれの分画にも認められず, 非吸着蛋白部分のみにこれを認めた。

B DEAE-C chromato. における両者の比較

生物活性を示す CM-C 非吸着蛋白はさらに DEAE-C chromato. で非吸着部分と吸着部分に分離するが, このうち生物活性を示すのは吸着部分のみである (Fig. 2)。

1. 蛋白濃度と conductivity の相関について

吸着部分の溶出 pattern は, Fig. 3 に示してあるように絨腫 HCG では conductivity 8 以上の塩類濃度の高い分画にも溶出蛋白を認めるが, conductivity 8 以下の分画について両者を比較すると, 同じように

Fig. 1. Relationship between O.D. and conductivity

Fig. 3. Relationship between O.D. and conductivity

Fig. 2. Chromatography of purified HCG from chorioepithelioma on DEAE-C

Fig. 4. Relationship between specific activity and conductivity

ほぼ3分画に分れている。しかしながら conductivity からみると、第2, 第3分画はほぼ一致しているのに反し、第1分画は正常妊娠 HCG と絨腫 HCG では一致していない。

2. HCG 活性と conductivity の相関について

正常妊娠 HCG の溶出 pattern を Fig. 4 のように5分画に分けて夫々の HCG 活性を測定すると、生物活性はB分画で 10,000IU/mg, C分画で 20,000IU/mg, D分画で 6,000IU/mg の値を得たが、免疫活性はB分画で 10,000IU/mg, C分画で 3,000IU/mg, D分画で 3,000IU/mg となった。主に生物活性を認める分画の conductivity は 3.0-4.5 m·mhos の範囲にある。

絨腫 HCG では生物活性は 2.66 m·mhos の分画で 6,000IU/mg, 4.92 m·mhos の分画で 8,000IU/mg であったが、その他の分画では低値で、明らかな2峰性を示し、一方免疫活性は 3.26m·mhos と 4.00m·mhos でその活性を認め、両活性は明らかに解離している。

3. 生物活性ならびに蛋白質の回収率

正常妊娠 HCG の場合、CM-C chromato. を行なった段階での活性分画の蛋白回収率は42.5%になり、DEAE-C chromato. では9.8%に減少した。なお 20,000IU/mg の生物活性をもつたC分画の蛋白量は2.2%であつた。最終段階の生物活性の回収率は42.0%であつた。

絨腫 HCG の場合、CM-C chromato. での蛋白回収率は 30.6%, DEAE-C chromato. では conductivity 8 以下の活性分画について 4.3%であつた。

III 考 按

腫瘍細胞から分泌される蛋白系ホルモンと、本来の内分泌細胞から分泌されるホルモンが同一であるか否かという問題の解明は、そのホルモン産生腫瘍担体の予後を分泌されるホルモンの動態から推察する場合には重大な意味をもつ。とりわけ異所性ホルモン分泌腫瘍の代表である ACTH 産生腫瘍については比較的詳細な検討がなされており、現在のところ腫瘍より抽出された ACTH は下垂体性 ACTH と生物学的作用、生化学的、免疫学的特性についてほとんど差が認められないという報告が多い²⁾。ところがゴナドトロピンと同様に glycoprotein である TSH を分泌する腫瘍については、その TSH は、Condcliffe, 望月ら³⁾の研究によれば、生理的 TSH とアミノ酸組成、糖成分等の面で差がみられるという。

ところで婦人に発生する悪性度の高いホルモン産生腫瘍としては絨毛性腫瘍があり、このものの HCG 分泌に関する研究は古くから活発に行なわれているが、本症の診断、ならびにその予後の観察に用いられるゴナドトロピン検出法の成績を、正常妊娠 HCG の概念から判断してよいかどうかという大きな問題があり、この為にも当然 HCG の性格を比較検討してみる必要が生じる。

ところで蛋白精製の手段として専ら使用されるイオン交換クロマトグラフィーでは、deamidation によつて conformational change を惹起する恐れがあるので⁴⁾、我々はこの様な変化を起こさないで不安定な物質の分離精製に最適といわれる molecular sieving method を用いて、正常 HCG ならびに腫瘍性 HCG の性状の比較検討を行ない、1) 絨毛性腫瘍患者尿中 HCG には、正常妊婦尿中 HCG に認められない Kd 値の小さな、即ち分子量の大きな HCG が存在すること、2) 生物活性にも差があり、その性状は奇胎では FSH 的であり、絨腫ではより LH 的性格の強いこと、3) 腫瘍性 HCG では生物活性と免疫活性とがより解離すること、4) 腫瘍性 HCG は正常妊娠 HCG よりもより basic な蛋白体から構成されているが、絨腫においては生物活性をあまり示さない acidic な蛋白体の contamination が非常に強い事を従来より報告して来た⁵⁾。また Hertz と Reisfeld ら⁶⁾も1960年に絨毛性腫瘍患者尿より DEAE-C chromato. によつて精製した HCG と、Got らの精製した正常妊婦尿中 HCG についてその物理化学的性状を比較し、両者の間にかなりの差がみられる事を発表しているがこの報告は両者の精製方法が異つている為に、精製手段の異なる両 HCG を比較すること自体に多くの問題を含んでいるものと考えられる。そこで今回我々は両者の粗 HCG を同一条件で純化精製を試み、精製過程におけるその態度から両者を比較検討した。

HCG の純化には一般に DEAE-C chromato. が主として使用され、CM-C は用いられていない。その主

な理由は、等電点の低い HCG が弱酸性カチオン交換セルローズである CM-C に吸着しない為であると考えられる。我々が Sephadex gel filtration, DEAE-C chromat. に加えて CM-C chromat. を採用したのは、CM-C に吸着する夾雑蛋白体を HCG から除外する為である。また cellulose に吸着した蛋白体を溶出させる方法として、一般には step wise elution 法が用いられている。この方法は操作が簡単で再現性に富んでいるが、一定モル濃度の溶媒で種々の conductivity の吸着能を持つ蛋白体を溶出させる為に、溶出された蛋白体が homogeneity でないと共に、イオン交換体に吸着する蛋白固有の吸着能の比較が出来ない。そこで我々はその溶出 pattern から conductivity と活性の関係を詳細に検討する為に linear gradient elution 法を採用し、また操作中に deamidation を起さない様に考えて終始一貫して NH_4Ac buffer を使用した。

一般に妊娠中には negative feed back mechanism によつて下垂体性ゴナドトロピンの分泌は抑制されているものと考えられているが、steroid hormone 分泌の少い絨毛性腫瘍の場合、下垂体性ゴナドトロピンの contamination も否定はできない。Condliffe ら⁹⁾ の下垂体性ゴナドトロピンの精製に関する報告によると、下垂体性ゴナドトロピンは CM-C に吸着されており、それからみると我々の条件下では、下垂体性ゴナドトロピンは CM-C に吸着するものと考えられる。しかしながら CM-C 吸着蛋白体に HCG 活性を確認できなかつた事は、少くとも我々の精製している腫瘍性 HCG には下垂体性ゴナドトロピンの contamination は否定されるものと思われるが、粗 HCG に contamination していた吸着蛋白体は、正常妊娠 HCG と腫瘍性 HCG とで異つており、後者はとくに acidic な蛋白体が多い。

次に DEAE-C chromat. では両 HCG とも非吸着蛋白体には HCG 活性を認めなかつたが、吸着蛋白体の HCG 活性と conductivity の関係からみると、正常 HCG では大体 conductivity 3.0-5.0 m-mhos でほとんどの HCG 活性が溶出されたのに反し、絨腫 HCG では conductivity 2.0 以下 5.0 と以上とに分離して HCG 活性が溶出され、正常 HCG の溶出される分画には溶出されていないという全く異つた吸着態度を示した。この事は絨腫 HCG を構成する蛋白体は basic なものと acidic なものとから成り、正常妊娠 HCG にみられない複雑な構成を示すものと考えられるとともに、両者の生化学的性状の差を示唆するものと思われる。免疫活性はいずれの HCG においても conductivity の低いところで溶出される HCG 分画に一致して高値であるが、conductivity の高い所で溶出され、しかも高度の HCG 活性をもつ分画ではその活性が非常に低く、生物活性と明らかに分離している。このような傾向は絨腫 HCG で著明であり、生物活性を示す HCG と免疫活性を示す HCG とは conductivity が異つている。

現在我々は正常妊娠 HCG から赤血球凝集阻止反応で免疫活性を示さない高度の HCG 活性 (24,000 IU/mg) の HCG を採取しこのものの生化学的性状の検討を行なつているが後日報告したい。

結 語

各種精製過程で腫瘍性 HCG と正常 HCG を比較検討した結果、両者の間では生物活性、免疫活性、その溶出される conductivity が異つており、イオン交換セルローズに対する吸着能にも差のある事が判明した。この事は少くとも両 HCG の生化学的性状にかなりの差があることを示唆するものと考えられる。

参 考 文 献

- 1) 望月真人, 足高善彦, 都倉康正, 東条伸平: 日産婦誌, 20: 550, (1968).
- 2) 山路徹: ホと臨, 15: 791, (1967).
- 3) CONDLIFFE, P.G. and MOCHIZUKI, M.: Endocrinology, (in press)
- 4) CONDLIFFE, P.G. and MOCHIZUKI, M.: Current Topics in Thyroid Research, (1966), 415, Academic Press, N.Y.
- 5) 植田安雄, 他: 産婦の世思, 18: 230, (1966).
- 6) 望月真人, 他: 産婦の世思, 18: 526, (1966).
- 7) REISFELD, R.A. and HERTZ, R.: Biochim. Biophys. Acta, 43: 540, (1960).
- 8) PARLOW, A.F., CONDLIFFE, P.G., REICHERT, L.E. and WILHELM, A. E.: Endocrinology, 76: 27, (1965).