



## 絨毛性疾患患者尿中のimmunoreactive-human Chorionic Gonadotropinにおけるthyrotropic activityに関する研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小林, 浩 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1301">http://hdl.handle.net/10271/1301</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 24号	学位授与年月日	昭和62年 3月18日
氏名	小林 浩		
論文題目	絨毛性疾患患者尿中の immunoreactive-human Chorionic Gonadotropin における thyrotropic activity に関する研究		

## 論文題目

絨毛性疾患患者尿中の immunoreactive-human Chorionic Gonadotropin における thyrotropic activity に関する研究

## 論文の内容の要旨

研究目的：絨毛性疾患患者には、甲状腺機能亢進症を合併することが多いと報告されているが、この甲状腺刺激活性が絨毛細胞より産生される human Chorionic Gonadotropin (hCG) 自体の内因作用なのか、あるいは hCG 以外の物質によるのかは結論に達していない。そこで、甲状腺機能亢進症を呈した絨毛性疾患患者尿中に存在する immunoreactive-hCG (IR-hCG) を抽出・精製し、正常甲状腺機能を呈した患者尿中 IR-hCG とその生化学的性質を比較検討し、甲状腺スライス実験により、その生物活性としての甲状腺刺激活性につき検討した。

方法：患者尿よりの IR-hCG の抽出はカオリン、アセトン法にアルコール沈殿法を用い、DEAE セルロースカラム、セファデックス G-100 ゲルろ過、DEAE セファセルカラムクロマトグラフィーにて精製した。そのなかで甲状腺刺激活性を有する画分、すなわち、human Chorionic Thyrotropin (hCT) を抽出し、尿素によりサブユニットに分離し、hCG  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニットとの再構成実験を行い、その生物活性を検討した。甲状腺刺激活性は甲状腺スライス実験を行い、培養上清中および組織中サイクリック AMP の増加量 ( $\Delta$ cAMP)、培養上清中トリヨードサイロニン ( $T_3$ )、サイロキシン ( $T_4$ ) の増加量の積 ( $\Delta T_3 \times \Delta T_4$ ) を測定した。hCT と hCG の C 末端のアミノ酸組成の相違を検討するため酵素処理を行い、遊離アミノ酸を測定した。

結果：IR-hCG の最終標品としての免疫活性と収率はそれぞれ、6,739 ~ 9,200 IU/mg および 1.1 ~ 6.9% であった。hCT の分子量は 35,000 で、hCG と同様に  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットに分離でき、 $\alpha$  サブユニットは 15,000、 $\beta$  サブユニットは 20,000 であった。hCG と比較すると、 $\alpha$  サブユニットは分子的にも免疫学的にも一致したが、 $\beta$  サブユニットは免疫学的には同一であるが、分子量は hCT の方が小さかった。また、hCT は免疫学的にヒト甲状腺刺激ホルモン (TSH) とは異なっていた。そこで hCT の C 末端のアミノ酸組成を検討するため、カルボキシペプチダーゼによる酵素処理を行ったが、hCG の場合に遊離してくるイソロイシン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸はほとんど遊離せず、hCG の C 末端とは異なっていることが判明した。生物活性の検討では、hCG の性腺刺激活性が  $4,850 \pm 380$  IU/mg であるのに対し、hCT には性腺刺激活性は存在しなかった。一方、甲状腺刺激活性は、hCG には存在しなかったが、hCT には培養上清中  $\Delta$ cAMP、組織中  $\Delta$ cAMP および培養上清中  $\Delta T_3 \times \Delta T_4$  値はそれぞれ、 $8.9 \pm 3.0$  p mole/ml、 $314 \pm 68$  p mole/g および  $25.2 \pm 9.0$  となり、甲状腺刺激活性を認めた。hCG と hCT の各サブユニットの再構成実験による甲状腺刺激活性の検討では、hCG  $\alpha$  サブユニットと hCT  $\beta$  サブユニットを再構成した場合にのみ甲状腺刺激活性が出現した。しかし、hCT  $\beta$  サブユニット単独では存在しなかった。

考察：ヒトの甲状腺組織を使ったスライス実験により、hCT を抽出・精製し、その生物活性および生化学的性質について、はじめて検討した。すなわち、hCT は免疫学的に hCG に非常に近いものであり、2 つのサブユニットより構成されていた。しかし、hCT  $\beta$  サブユニットは hCG  $\beta$  サブユニットより分子量が小さく、これは hCT には hCG  $\beta$  サブユニットの C 末端のうち、少なくとも、イソロイシン-ロイシン-プロリン-グルタミン酸残基が欠如しているか、分子の立体構造の変化のため hCT にはカルボキシペプチダーゼが作用しにくい構造になっている可能性がある。また、hCT  $\beta$  サブユニット単独では甲状腺刺激活性がないが、hCG  $\alpha$  サブユニットと再構成すると甲状腺刺激活性が出現することもはじめて証明した。以上より、絨毛性疾患に合併する甲状腺機能亢進状態は、hCT の作用によるものである。

## 論文審査の結果の要旨

絨毛性疾患には、甲状腺機能亢進症を呈するものがあることが知られている。その原因として、絨毛細胞から産生される human Chorionic Gonadotropin (HCG) に甲状腺刺激作用があるという説と、HCG 以外の甲状腺刺激物質が存在するという二通りの説がある。

申請者は、絨毛性疾患患者の尿から甲状腺刺激物質を抽出し、これを DEAE セルローズカラム、セファデックス G-100 ゲル濾過、DEAE セファセルカラムクロマトグラフィーなどを用いて精製し、その生物活性と化学的性状を検索した。その結果、甲状腺刺激活性を有する物質 human Chorionic Thyrotropin (HCT) は分子量 35,000 の糖鎖を有するペプチドで  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットからなり、 $\alpha$  サブユニットは分子量 15,000 で、HCG の  $\alpha$  サブユニットと同一物質であるが、 $\beta$  サブユニットは、HCG の  $\beta$  サブユニットと異なることを示唆するデータを得た。すなわち、HCT の  $\beta$  サブユニットは HCG の  $\beta$  サブユニット抗体と免疫学的にクロスするが分子量 20,000 と HCG のそれよりも小さく、カルボキシペプチダーゼによる酵素処理により、イソロイシン、ロイシン、プロリン、グルタミン酸などの遊離がみられないことから、C 端の構造が HCG とは異なる事が判明した。また、HCT  $\beta$  サブユニット単独では甲状腺刺激作用は認められないが、HCG の  $\alpha$  サブユニットまたは HCT  $\alpha$  サブユニットと再構成すると、甲状腺刺激活性が出現すること、HCT は HCG 抗体と免疫学的にクロスするが、性腺刺激活性は認められないこと、TSH 抗体とはクロスしないこと、HCG には甲状腺刺激活性は認められないことなどから、絨毛性疾患患者が甲状腺機能亢進症を呈する原因として、HCG 以外の甲状腺刺激物質が存在することを証明し、さらにその物質の化学的性状を明らかにした。

審査会ではこの論文に対し、次のような質問がなされた。

- 1) HCG、HCT の純化精製法
- 2) Kaolin-Acetone-Alcohol 沈澱法の有用性
- 3) 抽出各段階クロマトグラフィーの回収率
- 4) TSH の分離効果
- 5) カルボキシペプチダーゼの特性
- 6) cyclic AMP の反応曲線
- 7) HCT の収量とその純度
- 8) HCT のアミノ酸 sequence 分析
- 9) HCT の構造と生物活性発現機構
- 10) HCT 以外の甲状腺刺激物質
- 11) 尿中 HCT 測定の意味

これらの質問に対し、申請者はすべて適格に回答し、本論分が学位授与に値する充分の内容を備えているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者	主査	教授	吉見輝也		
	副査	教授	五十嵐良雄	副査	教授 川島吉良
	副査	教授	市山新	副査	教授 菅野剛史