

胎盤性性腺刺戟홀몬에 關한 檢討

淑明女子大學校 藥學大學

朴 婉 熙

=Abstract=

Studies on Placental Chorionic Gonadotropin

Wan Hee Park

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University

Human chorionic gonadotropin hormone(H.C.G.) is secreted from the villus tissues of the placenta and excreted in large amount into the urine. Its isolation is chiefly made from the urine of a pregnant woman. Recently, Matsushima attempted isolation of H.C.G. directly from the placenta itself.

In order to prepare H.C.G. from human placenta, general method of extracting and purifying proteins was applied.

Its way was as follow:

Crude H.C.G. was extracted from placenta with pH 9.0 and pH 5.0 aqua ammonia, and purified with pH 8.0 ammonia and 50% ethanol at pH 4.8.

The purified H.C.G. showed two moving bands on the anode by paper electrophoresis. On the other hand, the H.C.G. from pregnancy urine (Standard. Pharm. Co.) showed same two bands but their moving ratio were different.

The purified H.C.G. showed gonadotropin effect when it was injected young female rats 40r/cc per day for 5 days and weighted the increased ovary weight.

I. 緒 論

纖毛性性腺刺戟 Hormone(Human Chorionic Gonadotropin, 以下는 H.C.G 로 略함)은 胎盤에서 分泌되는 것으로 尿中에 大量으로 排泄되기 때문에 그 分離精製는 妊娠尿를 原料로 行하여 졌다.

Gurin¹⁻³⁾ 은 妊娠尿로 부터 H.C.G 을 均質한 蛋白質로 얻어 그 化學的 組性, 電氣泳動, 沈降定數은 勿論 等電點에 關한 것도 研究 報告하였다. Friedman⁴⁾ 은 妊娠尿의 抽出物을 家兔에 注射時 排卵되는 것을 發見하고 이것이 H.C.G 에 對한 定性的인 生物學的檢定法이 되는 것을 밝혔다. 英國藥局方Ⅶ版에서는 妊娠尿에서 分離한 H.C.G 와 妊馬血清에서 얻어지는 血清 Gonadotropin 을 收載하고 있으며 定量的인 生物學的檢定法으로서는 體重 40~50g 되는 未成熟雌 Rat 에 1日 1

回 5日間 注射하여 그 卵巢重量增加로 力價檢定을 하고 있다.

이와같이 妊娠尿를 原料로한 纖毛性性腺刺戟 Hormone 에 對하여서는 많은 研究發表가 되어 있으나 그 根源이라 生覺되는 胎盤에서 直接 이 Hormone 의 分離精製를 試圖한것은 最近 松島⁵⁻⁷⁾이다. 그는 Causer⁸⁾ 가 Hyflo Super-Cel(Johns Maville 社의 酸化珪酸을 主成分으로 한 珪藻土)를 使用하여 胸下垂體抽出液에서 Growth Hormone 及 他蛋白質을 分離한것을 modify 하여 新鮮한 胎盤에서 一般的인 蛋白抽出操作으로 400Iu/mg 의 粗 H.C.G 를 얻고 다시 Hyflo Super Cel 로 高單位의 蛋白 Hormone 을 分離精製하고 이것과 妊娠尿에서 얻은 것과의 化學的異同을 研究하였다. 이어 菊谷⁹⁾은 이 H.C.G 를 Miami 反應의 定性的 定量的 Amino 酸 組成에 關하여도 實驗을 하였다. 著者는

松島가 H.C.G 를 胎盤에서 抽出精製한 操作에 좇아 蛋白 Hormone 을 分離精製하고 그 效果를 Rat 卵巢重量 增加로 檢定한 結果 良効한 成績을 얻었고 또 濾紙電氣泳動을 하여 文獻上에 記載한 것과 同一한 像을 얻었다.

II. 實驗部

1. 胎盤性性腺刺戟 Hormone 의 製造

(A) 胎盤의 採集及 保存

possible 限 分解를 防止하기 위하여 新鮮한 人胎盤을

3倍量의 冷却한 精製 Actone 中에 投入하여 冷藏庫中에 두었다가 二個씩을 實驗室에 갖어와 그 抽出은 娩出當日에 行하였다.

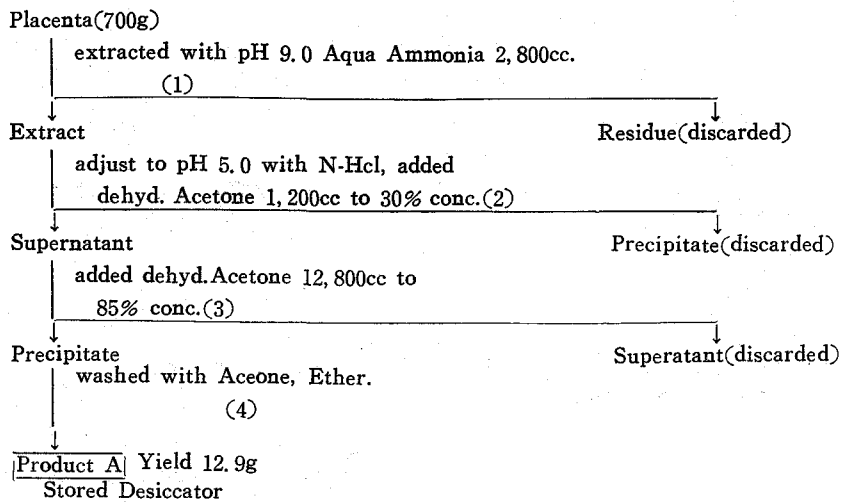
(B) 粗性線刺戟 Hormone 의 分離

胎盤處理個數 4個(1400g)

胎盤處理回數 2回

胎盤을 Acetone 에서 꺼내어 血管及 結締組織을 除去한 纖毛性組織 700g을 濾布에 넣고 壓搾하여 Acetone 을 除去하고 pH 9.0의 Ammonia 水 少量과 함께 氷冷한 Hamozinazar 로 磨碎하고 Table 1 과 같은 操作으로 抽出했다.

Table 1. Extraction of chorionic gonadotropin from human placenta.



(1) pH 9.0의 Ammonia 水 2,800cc를 滴加하여 다시 pH 9.0로 調整하고 6時間 冷却下에 攪拌抽出, 一夜 冷藏庫中에 放置後 濾紙로 濾過한다.

(2) 冷却攪拌下에 Acetone 1,200cc를 Separating Funnel 로 滴加하고 一夜 冷藏庫中에 放置後 遠心 分離하여 不純蛋白質을 除去한다.

(3) 위에서와 같이 Acetone 12,800cc를 滴加하여 蛋白質을 沈澱시킨다.

(4) 赤色~赤褐色 沈澱을 Acetone 3번, Ether 2번 洗滌하고 減壓乾燥하여 Desiccator 中에 貯藏한다. (Product A)

(C) 粗性線刺戟 Hormone 의 精製

위에서 얻은 Product A 25.8g(2回 抽出量)을 Table II, III의 操作으로 精製한다.

(1) Product A 25.8g를 冷却한 Mortar 中에 넣고 粉碎하여 pH 8.0의 Ammonia 水 4,800cc에 溶解시켜 6時間 冷却攪拌後 一夜 冷藏庫中에 放置後 遠心分離

한다.

(2) 殘査를 위와같이 同溶媒로 再抽出하여 前液과 合한다.

(3) Ethanol 4,420cc를 冷却攪拌下에 滴加하여 有效成分을 沈澱시키고 一夜 冷藏庫中에 放置後 遠心分離한다.

(4) Ethanol 3번, Ether 2번 洗滌하고 減壓乾燥하여 淡黃色 沈澱을 얻었다. (Product. B)

(1) Table III과 같이 Product B 10.8g를 Mortar 中에 넣고 粉碎하여 0.3N-醋酸, 醋酸 Soda 緩衝液과 等量의 Ethanal 混合物인 pH 4.8의 50% Ethanal 220cc로 溶解하고 1日 6時間 2日間 冷却下 攪拌, 抽出하고 遠心分離한다.

(2) 위와같이 同液媒로 再抽出한다.

(3) Ethanal 950cc를 徐徐히 滴加하여 蛋白質을 沈澱시킨다.

(4) 白色沈澱을 얻었다(Product C).

Table II. Purification of placental chorionic gonadotropin with pH 8.0 aqua ammonia.

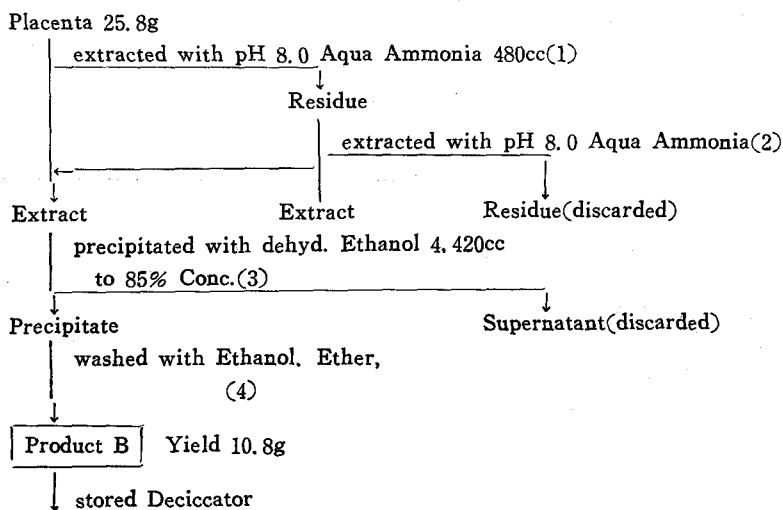
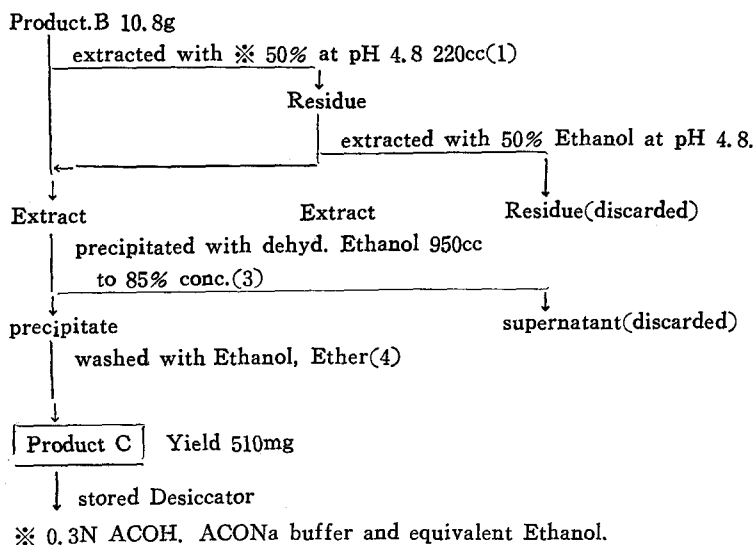


Table III. Purification of product B with 50% Ethanol at pH 4.8.



2. 濾紙電氣泳動

pH 4.8의 50% Ethanol로 精製한 Product C를 後述하는 Veronal Buffer Soln에 溶解하여 0.5%로 하고 pH 8.6 F/2=0.05의 Veronal Veronal Na Buffer를 溶媒로 하고 Spinco part No 300-028 濾紙電氣泳動濾紙上에 電流 0.7mA/cm(電壓 400~200Volt)로 6時間 泳動시키고 濾紙는 100°C에서 10分間, 加熱, 乾燥後, BPB 溶液(Bromphenol blue 0.05g, 昇汞 1.0g 氷醋酸 2cc를 Aqua로 100cc로 한것)中에 5~30分間 담가 呈色시키고 2% 醋酸溶液中에 넣어 濾紙를

움직이면서 씻는 操作을 10~20分間 反復하여 蛋白 以外의 部分을 脫色시켜 다시 100°C에서 10分間 乾燥시킨다. 이때 泳動像은 恒常 陽極便으로 帶가 나타났다.

對照로는 Standard. Pharm. Co.의 Pregnancy Urine Gonadotropin을 같은 條件으로 泳動시킬時 같은 結果를 얻었으나 Fig. I과 같이 移動度는 더 컸다.

3. 効力の 檢定

Product C를 40r/cc, 20r/cc로 하기 위하여 1mg, 0.5mg를 感度 2r의 Torsion Balance로 取하고 各各

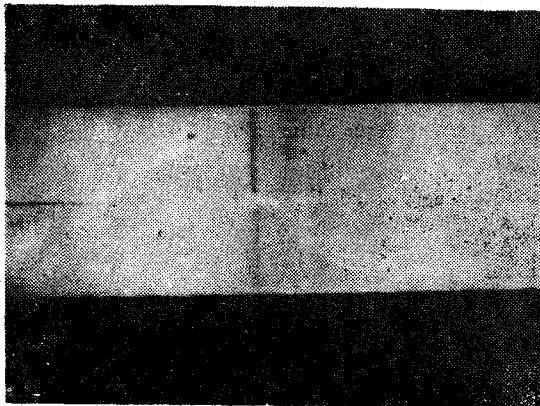


Fig. 1.

Paper Electrophoresis of H.C.G.
 Veronal-veronal Na buffer pH 8.6 : F/2=0.1
 0.7mA/cm. wide: 400~200v.
 6hrs
 spinco No. 300-028. Electrophoresis paper
 upper figure: pregnancy urine Gonadotropin
 (Stan. Pharm. Co.)
 under figure: product C.

生理食均水 25cc로 溶解시킨다.

動物은 體重 40~50g의 未成熟雌 Rat 를 實驗室에
 갖어와 같은 條件으로 一週日 飼育한 後 다음 實驗을
 한다.

(A) 豫試體

3匹를 一羣으로 3群으로 하고 每日 같은 時刻에 一羣
 에는 40r/cc 다른 一羣에는 20r/cc 남어지 一羣은 對照
 團으로 生理食均水 1cc를 5日間 腹腔內에 注射하고 第
 6日째에 解腹하여 卵巢를 摘出하고 卵巢膜과 輸卵管을
 除하고 卵巢를 Bouin 固定液(saturated picric acid
 75cc+37~40w/v formalin 25cc+99% 冰醋酸 5cc)中

에 一夜 浸漬固定하고 다시 70% Ethanol 로 2~4時間
 담근後 꺼내어 Hilum 를 除去하고 濾紙上에서 脫水하
 여 兩側卵巢의 重量으로서 對照團과 比較한 結果 Table
 IV 와 같이 Rat 卵巢重量이 大端히 增加했다.

Table IV. Rat ovary weight increasing by product C.

	Body Wgt (g)	Ovary Wgt (mg)	Ovary Wgt Body Wgt × 100
40r/cc	66	14.6	22.1
	67	25.2	36.5
	71	28.6	40.2
20r/cc	60	11.0	16.7
	65	14.3	22.0
	66	20.5	31.0
Control	89	13.8	15.5
	71	7.7	10.8
	92	9.0	9.8

(B) 本試驗

豫試驗 結果 効力이 있다고 生覺됨으로 8匹를 2群으
 로 나누고 一羣에는 40r/cc 다른群은 對照團으로 生理
 食均水 1cc씩을 豫試驗에서와 같은 方法으로 注射解腹
 하여 卵巢重量을 秤量한 結果 Table V에 表示된 卵巢重
 量과 같으며 効力의 有意性을 統計學的으로 檢討하기
 위하여 T-Tast 를 한 結果 Table V와 같이 顯著한 効
 力이 있다고 斷定할 수 있는 數值를 얻었다.

III. 考 察

위의 實驗에서 原料는 可及의 新鮮한 人胎盤을 使用
 하고 原料燒出當日로 抽出은 했으며 抽出溶媒는 pH
 9.0의 Ammonia 水로 抽出하였더니 收量이 良好했다
 精製는 pH 8.0 及 pH 5.0 水로 抽出하였으나 不純蛋

Table V. Rat ovary weight increasing by product C.

Product C 40r/cc				Control			
Body Wgt (g)	Ovary Wgt (mg)	Ovary Wgt Body Wgt × 100 (x)	x ²	Body Wgt (g)	Ovary Wgt (mg)	Ovary Wgt Body Wgt × 100 (y)	y ²
60	18.4	30.7	942.49	75	9.6	12.8	163.84
60	16.2	27.0	729.00	70	11.2	16.0	256.00
56	15.0	23.2	538.24	78	12.6	16.2	262.44
57	12.3	21.6	466.56	73	10.9	14.9	222.01
Total		102.5	2676.29	Total		59.9	904.29
Mean		25.6		Mean		15.0	

白質少量을 除할 뿐이었다. 가장 適切한 方法 pH 4.8 의 50% Ethanal 로 精製하였더니 不純蛋白質의 大部分이 除去되어 有効成分인 白色의 高純度の 沈澱을 얻을 수 있었다. 또한 冷却한 抽出溶媒를 氷冷却攪拌下에 滴加하고 抽出 放置前에 Toluol 2~3drop 를 加하여 恒常 蛋白質 分解 防止에 努力했다.

濾紙電氣泳動試驗에서는 Product A(粗 Gonadotropin)의 泳動像은 不純蛋白質 含量이 多大하여 깨끗한 泳動像은 아니나 陽極便으로 길으게 移動된 것을 볼수 있었다 Product C는 陽極便에 2帶로 나타난 鮮명한 泳動像^{5,6)}을 보여주었다.

比較로 擇한 Standard. Pharm. Co의 Pregnancy Urine Gonadotropin 의 泳動像⁶⁾도 Product C와 같았으나 Fig. 1 에서와 같이 移動도가 더 컸다.

動物試驗¹⁰⁾에 있어서는 豫試驗 本試驗을 通하여 効力の 有意의 差를 檢定함에 그쳤다. 力價檢定을 하려 했으나 體重 40~50g의 同腹未成熟雌 Rat 가 없어서 못하였음을 遺憾으로 生覺하는 바이다.

IV. 結 論

pH 9.0 及 pH 5.0의 Ammonia 水로 抽出, [pH 8.0

Ammonia 水及 pH 4.8의 50% Ethanol로 精製한 Product C 即 胎盤性性線刺戟 Hormone(Human Chorionic Gonadotropin)는 生物學的檢定에서 卵巢重量 增加에 많은 効力이 있다고 본다.

VI. 文 獻

- 1) S. Gurin., C. Bachman., and D.W. Wilson.: *J. Biol. Chem.* 128, 525(1939).
- 2) S. Gurin., C. Bachman., and D.W. Wilson.: *J. Biol. Chem.* 133, 467(1940).
- 3) S. Gurin., C. Bachman., and D.W. Wilson.: *J. Biol. Chem.* 133, 477,(1940).
- 4) M.H. Friedman.: *J. Pharmacol. Exptl. Therap* 45,7(1932).
- 5) 松島早苗, 難波脩二: 藥學雜誌, 76, 678(1956).
- 6) 松島早苗: 藥學雜誌, 76, 682(1956).
- 7) 松島早苗: 難波脩二, 藥學雜誌, 77, 743,(1957).
- 8) H. Clauser, C.H.L.: *J. Am Chem Soc* 76, 4337, (1954).
- 9) 菊谷元資: 藥學雜誌, 77, 753,(1957).
- 10) 藥學大全書, 補遺(1)