

## 妊婦血清よりの SP<sub>1</sub> の分離精製法およびその過程に 検出された $\gamma$ 分画 SP<sub>1</sub> の検討

三重大学医学部産科婦人科学教室

伊東 雅純 早川 滋彦 今泉 博充  
西山 幸男 杉山 陽一

### The Purification of Pregnancy Specific $\beta_1$ -Glycoprotein (SP<sub>1</sub>) from Third Trimester Serum and the Immunological Identification of $\gamma$ -component of SP<sub>1</sub>

Masazumi ITO, Shigehiko HAYAKAWA, Hiromichi IMAIZUMI,  
Yukio NISHIYAMA and Youichi SUGIYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Mie University, Mie  
(Director : Prof. Youichi Sugiyama)

**概要** 蛋白低濃度迅速測定装置である LA system に SP<sub>1</sub> (pregnancy specific  $\beta_1$ -glycoprotein) を組み込む one step として, 高純度 SP<sub>1</sub> の大量精製法について検討し, その精製過程で検出された  $\gamma$  分画の SP<sub>1</sub> について報告する.

1) SP<sub>1</sub> の分離精製のために, 妊婦血清を材料として40%飽和硫酸アンモニウム塩析を行い, Sephadex G-150 gel filtration, DE-52 cellulose column chromatography, hydroxylapatite column chromatography, SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B column chromatography, FPLC system の mono Q column chromatography の順に精製を行った。できた SP<sub>1</sub> は蒸留水で透析, 凍結乾燥し白色の粉末を得た。

SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B の作製法は, 男子血清を50%飽和硫酸アンモニウムで塩析をし, hydroxylapatite column に通したものを家兎に免疫した。できた抗血清の IgG 分画を CNBr-activated Sepharose 4B と反応させて得た。本法により精製 SP<sub>1</sub> の純度は99%以上, 回収率16%となった。

2) 精製 SP<sub>1</sub> (SP<sub>1</sub>- $\beta$ ) は免疫電気泳動で  $\beta$  分画に属する糖蛋白で, 分子量は72,000等電点3.80~4.55 に band を作り, 特に pI 4.15の所が強く染色された。

DE-52 cellulose を低塩濃度緩衝液で, 素通りしてきた SP<sub>1</sub> (SP<sub>1</sub>- $\gamma$ ) は neuraminidase 処理 SP<sub>1</sub> と等電点分画で全く違つた所に位置し, 少なくとも pI 5.3, 5.5, 5.65, 5.8の4カ所に分布していることが分つた。この SP<sub>1</sub>- $\gamma$  は免疫電気泳動で  $\gamma$  から  $\delta$  分画に位置し, 妊婦血清にも存在することが分つた。

以上, 本法により高純度大量 SP<sub>1</sub> 精製の道が開け, また分離精製途中で新しい複数の SP<sub>1</sub> 抗原物質 SP<sub>1</sub>- $\gamma$  が発見できた。

**Synopsis** This paper describes the SP<sub>1</sub> purification procedures with high recovery from third trimester serum and the finding of a new SP<sub>1</sub> antigen with  $\gamma$ -mobility (tentatively called SP<sub>1</sub>- $\gamma$ ).

1) The serum was salted out at 40% saturation with ammonium sulfate and this was followed by Sephadex G-150, DEAE-cellulose, SP<sub>1</sub>-negative affinity chromatography and the mono-Q column of FPLC system. The anti-serum for the immunoadsorption techniques was made from the fractionated male serum. By these procedures, the final SP<sub>1</sub> preparation was obtained in a yield of 16% and with a purity of 99%.

2) The purified SP<sub>1</sub> (SP<sub>1</sub>- $\beta$ ) had  $\beta$ -mobility and its molecular weight approximated 72,000 in SDS polyacryl-amide gel electrophoresis. The isoelectric points (pI) ranged between 3.80 to 4.55 using isoelectric focusing and the site at pI 4.15 was strongly stained.

3) Another SP<sub>1</sub>, which passed through DEAE-cellulose with a low salt concentration, was detected in the  $\gamma$ -region by means of immunoelectrophoresis using anti-SP<sub>1</sub> serum. It was ascertained that the SP<sub>1</sub>- $\gamma$  was different from the SP<sub>1</sub>- $\beta$  treated with neuraminidase. The SP<sub>1</sub>- $\gamma$  precipitation fusing with SP<sub>1</sub>- $\beta$  could be observed even in pregnant serum by usual immunoelectrophoresis. The SP<sub>1</sub>- $\gamma$  preparation showed at least

four pIs of 5.3, 5.5, 5.65 and 5.8.

**Key words:** Pregnancy specific  $\beta_1$ -glycoprotein (SP<sub>1</sub>) • SP<sub>1</sub>- $\gamma$  • Pregnancy associated protein • Isoelectric focusing • Purification

### 緒 言

胎盤は多くのホルモン、酵素、機能不明蛋白を産生している。このSP<sub>1</sub> (pregnancy specific  $\beta_1$ -glycoprotein)も1971年 Bohn<sup>13)</sup>により胎盤より分離精製された機能不明蛋白の一つである。臨床的にSP<sub>1</sub>は、1) 正常非妊婦血清中では検出されない、2) 他の血清蛋白あるいは妊娠性蛋白と交叉反応しない、3) 妊婦血清濃度が他の妊娠性蛋白と比較して高濃度である、4) 血中半減期も長く日内変動も小さい、などによりhPLとともに胎盤機能検査の指標<sup>5)14)17)</sup>として適している。また、胎状奇胎、破壊性胎状奇胎および絨毛癌との鑑別や、これらのfollow upにhCGとともに利用されている<sup>22)</sup>。非絨毛性腫瘍のうち一部の睾丸腫瘍の腫瘍マーカー<sup>21)</sup>にも有用性が論じられている。さらに、SP<sub>1</sub>は妊娠の極く初期より血清に出現することから、occult pregnancyの診断<sup>7)9)</sup>、切迫流産の予後推定<sup>1)</sup>および子宮外妊娠の診断などの応用も検討されている。

SP<sub>1</sub>の測定法としては感度が1,000ng/mlまでのrocket immunoelectrophoresis (Laurell), single radial immunodiffusion (SRID)<sup>5)</sup>と感度が0.3~10ng/mlのradioimmunoassay (RIA)<sup>4)</sup>, enzyme immunoassay (EIA)<sup>7)</sup>などがある。また、教室で開発したlatex agglutination inhibition reaction (LAIR)<sup>18)</sup>は感度が250ng/mlである。Laurell法, SRID, RIAは測定時間がかかり、RIAは放射性同位元素を使用すること、LAIRは測定時間は短い半定量法であることなど現在までのこれらの測定法は、臨床応用に今一つの問題がある。

最近、これら抗原抗体反応を応用した測定法の中で、直接Latex凝集反応の経時的変化より濃度測定を行い、感度はRIAレベルに達し、測定時間も数分で行うLA system (栄研化学)が他の血清蛋白などの濃度測定に実用化されている<sup>8)</sup>。

今回、SP<sub>1</sub>について上述したような一般臨床応用への実用化を可能にするために、SP<sub>1</sub>をLA sys-

temに組み込むone stepとして、高純度SP<sub>1</sub>の大量精製に成功し、さらに免疫電気泳動でγ分画に属するSP<sub>1</sub>抗原物質をも検出したので報告する。

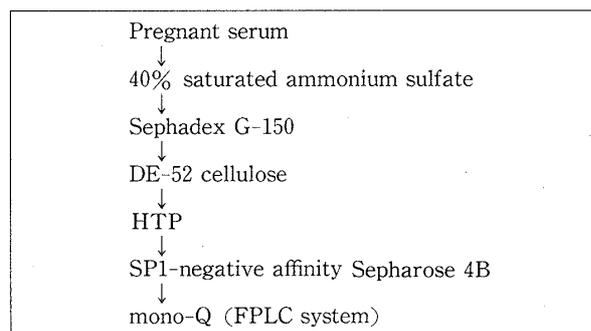
### 研究材料および方法

#### 1) SP<sub>1</sub>の分離精製法

正期産で入院した産婦100人の末梢静脈血10mlを採取し、4℃、2時間放置したのち遠心分離を行い血清を集め-20℃で保存した。この血清400mlをstarting materialとしてSP<sub>1</sub>の精製を行った。

図1に今回のSP<sub>1</sub>の精製方法を示した。始めに血清のalbumin分画の除去を目的で、40%飽和硫酸アンモニウム塩析を行い、沈殿物を10,000r.p.m., 4℃, 30分遠心分離し、これを生理食塩水にて透析した。この検体をSephadex G-150 (Pharmacia)のつまつたcolumn (14×100cm)でgel filtrationを行い、0.2M NaCl+0.05M tris-HCl buffer (pH 8.0)にて流速250ml/h.で溶出した。各分画をSRIDにて30時間反応させSP<sub>1</sub>の多い分画を求めた。このSP<sub>1</sub>分画を前回と同様に40%飽和硫酸アンモニウム塩析を行い、沈殿物を0.3% NaCl+0.01M tris-HCl buffer (pH 7.6)にて透析した。これをDE-52 cellulose (Watt mann)のつまつたcolumn (2.5×40cm)に添加して、0.3% NaCl+0.01M tris-HCl (pH 7.6) 700mlより1.2% NaCl+0.01M tris-HCl (pH 7.6) 700mlの連続濃度勾配で流速40ml/hで溶出させた。Ouchterlony法で12時間で沈降線を作るSP<sub>1</sub>分画を集

図1 The procedure of purified SP<sub>1</sub>

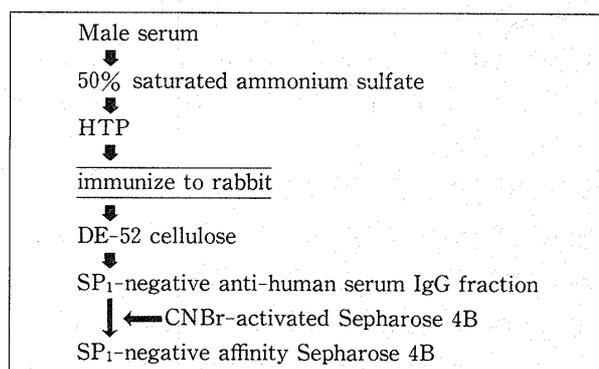


めた。この SP<sub>1</sub>分画を40%飽和硫酸アンモニウム塩析を行い、0.01M phosphate buffer (pH 7.4) にて透析した。これを hydroxylapatite (Bio-Rad) のつまつた column (4.5×50cm) に添加し、0.01M phosphate buffer (pH 7.4) で流速40ml/h で流出させ、SP<sub>1</sub>の多い分画を Ouchterlony 法で求めた。この SP<sub>1</sub>分画を SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B のつまつた column (2.5×50cm) に添加し、0.2M NaCl+0.05M tris-HCl buffer (pH 8.0) にて30ml/h で溶出した。Ouchterlony 法にて SP<sub>1</sub>の多い分画を集め、蒸留水にて透析を行つた。これを A 液0.01M tris-HCl buffer (pH 8.0) B 液0.5M NaCl+0.01M tris-HCl buffer (pH 8.0) に設定した FPLC system (Pharmacia) の mono-Q column に添加し、B 液を20%から50%の連続濃度勾配で流速1ml/min で溶出し、O. D. 280nm が0.7以上の部分を1 fraction 1ml を集めた。Ouchterlony 法で SP<sub>1</sub>の多い分画について、さらに SDS-polyacrylamide gel electrophoresis にて one band であることを確認し、これを蒸留水で透析後凍結乾燥して精製 SP<sub>1</sub>を得た。

## 2) SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B の作成法

図2に SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B の作成法を示した。男子血清を50%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、沈殿物を0.01M phosphate buffer (pH 7.4) で透析した。これを hydroxylapatite column (4.5×30cm) に添加し、透析 buffer で溶出し、O. D. 280nm で0.5以上の分画を

図2 The way of making SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B



集めた。これを蒸留水にて透析したのち凍結乾燥した。これを抗原として Freund's complete adjuvant (Difco) とともに家兎に免疫し、SP<sub>1</sub>-negative 抗ヒト血清を得た。この抗血清を40%飽和硫酸アンモニウム塩析し、沈殿物を0.2%NaCl+0.01M tris-HCl buffer (pH 7.6) で透析し、これを DE-52 cellulose column (4.5×30cm) に添加し、透析 buffer で溶出させた。O. D. 280nm で0.5以上の分画を集め、蒸留水にて透析したのち凍結乾燥して SP<sub>1</sub>-negative 抗ヒト IgG を得た。これを CNBr-activated Sepharose 4B と反応させ、SP<sub>1</sub>-negative affinity Sepharose 4B を作成した。

## 3) 精製 SP<sub>1</sub> の検討法

### a. 免疫電気泳動による検定法

barvital buffer (pH 8.6, イオン強度0.05) を用いて厚さ1mm の1.2% agarose A-37寒天平板を作製し、通常の免疫電気泳動 (100V., 2h.) したあと、室温にて抗体として抗 SP<sub>1</sub>血清、抗ヒト血清と24時間反応させて、生じた沈降線につき検討した。同寒天は Ouchterlony 法にも用いた。

### b. 純度の検定法

検体の総蛋白量は Lowry 法で、SP<sub>1</sub>濃度は single radial immunodiffusion (SRID) で測定し、hydroxylapatite column chromatography までの純度は SP<sub>1</sub>濃度/総蛋白量で求めた。SRID は1.2% agarose A-37, 12ml に抗 SP<sub>1</sub>血清200μl を加え、厚さ1mm の寒天平板を用いた。SP<sub>1</sub>標準血清としては Behringwerke A.G. 製18mg/dl の濃度のものを使用した。SP<sub>1</sub>-negative affinity chromatography 後の純度は、7% polyacrylamide slab gel electrophoresis および SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis を行い、Coomassie brilliant blue で染色し、densitometer を用いて求めた。

### c. 分子量の測定法

分子量の測定は7% SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis で行つた。標準蛋白として分子量測定用標準蛋白 (Bio-Rad) を用いた。これを Coomassie brilliant blue で染色し、densitometer でそれぞれ移動度より分子量を求めた。

### d. 等電点の測定法

Ampholine PAG plate (pH 3.5~9.5)(LKB)を用いて、精製 SP<sub>1</sub>, SP<sub>1</sub>-γ などと等電点標準蛋白 (Pharmacia) を constant power で30W, 20mA, 1500V, 1.5h. で流した。これを蛋白染色し、一部は cellulose acetate 膜に抗 SP<sub>1</sub>血清を浸し、これを Ampholine PAG plate と免疫反応させ蛋白染色をした。

#### e. Amino acid 分析法

精製 SP<sub>1</sub>を少量とり、6N HCl と混合し110°C 減圧下にて22時間加水分解を行い、塩酸を evaporator で除去した後、citric acid buffer に溶解し、高速液体クロマトグラフアミノ酸分析システム (島津) にて分析を行った。

### 結 果

#### 1) SP<sub>1</sub>の分離精製結果

図1にしたがって Sephadex G-150 gel filtration した後に SP<sub>1</sub>の多い分画を DE-52 cellulose column に添加し、図3に SP<sub>1</sub>抗原のある分画を示した。SP<sub>1</sub>の精製には tube No. 38から44を用いた。tube No. 4から8は0.3%NaCl+0.01M tris-HCl buffer では吸着されずに溶出してきた分画である。この tube No. 38から44の分画を hydroxylapatite column chromatography, SP<sub>1</sub>-negative affinity chromatography に添加したところ、ともに single peak を示した。SP<sub>1</sub>はこの peak に一致した。図4はこの SP<sub>1</sub> rich fraction を FPLC system の mono Q column にかけたものである。大きな peak はそれほど sharp なものではないが、ここに SP<sub>1</sub>が含まれており蒸留水にて透析、凍

図3 The DE-52 cellulose column chromatography after Sephadex G-150 gel filtration

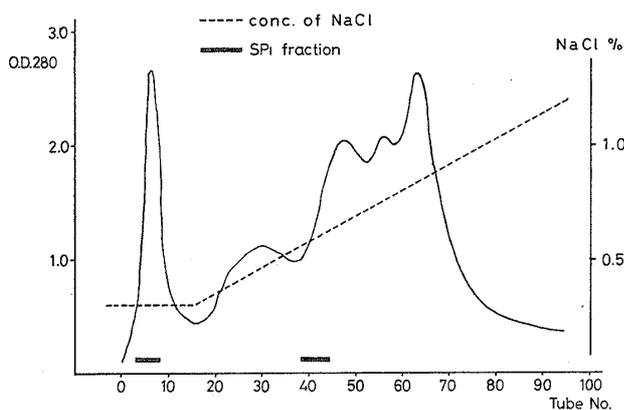


図4 FPLC system (mono-Q column)

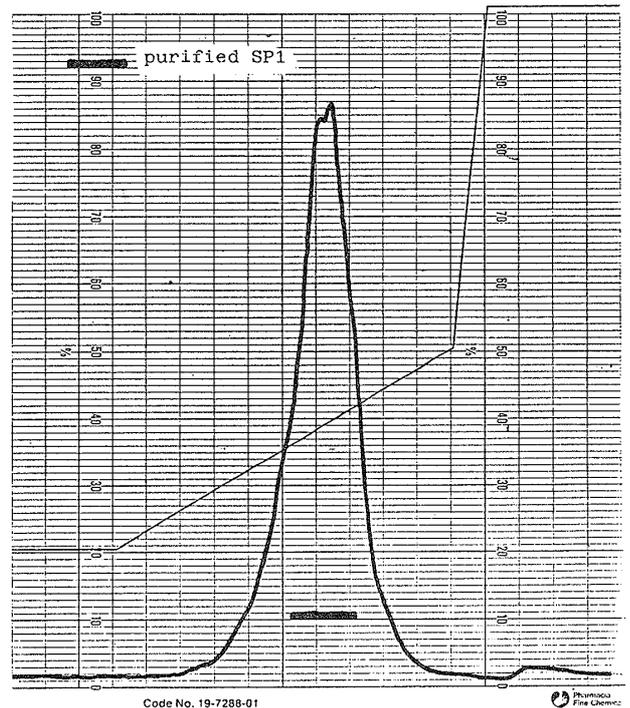


表1 The recovery and purity for the purification of SPI

Step	Total amount (mg)	Recovery (%)	Purity (%)
Preg. serum	70		0.28
Sephadex G-150	37	53	0.83
DE-52 cellulose	31	45	12.5
HTP	23	32	68.2
SP <sub>1</sub> -negative	18	25	95% <*
Mono Q	12	16	99% <*

by 7% SDS polyacrylamide electrophoresis

結乾燥をし白色の粉末を得て、これを精製 SP<sub>1</sub>とした。

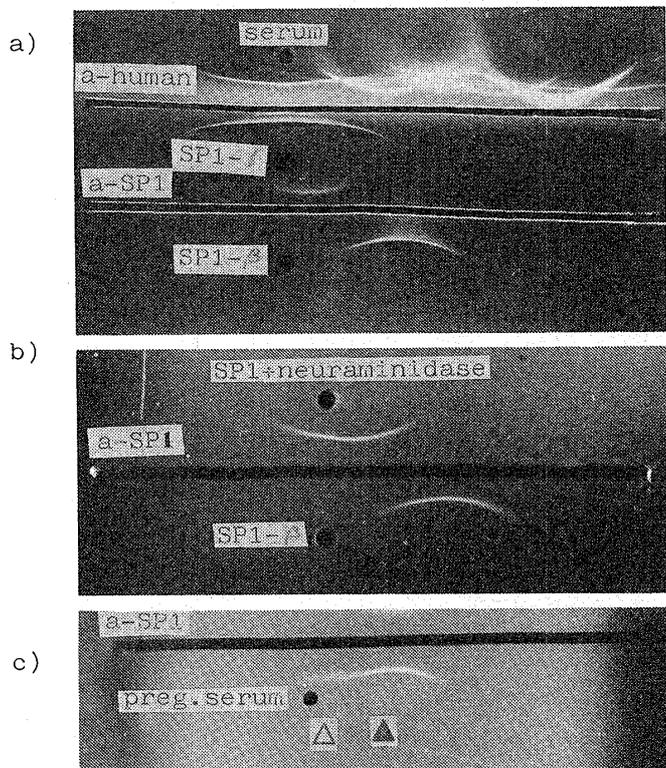
表1は今回行った SP<sub>1</sub>精製法の各 step の回収率と純度を示したものである。最終段階の回収率は16%で純度は99%以上であつた。Ouchterlony 法で精製 SP<sub>1</sub>と抗ヒト血清を反応させたが沈降線は作らなかつた。

#### 2) 精製 SP<sub>1</sub>の物理化学的性質

免疫電気泳動で精製 SP<sub>1</sub>は図5に示すように β 分画に泳動された。上述の DE-52 cellulose column chromatography で開始 buffer で素通りしてきた SP<sub>1</sub>分画を、Ouchterlony 法で抗 SP<sub>1</sub>血清

図5 The comparison of each SP<sub>1</sub> antigen substance by means of immunoelectrophoresis

a) SP<sub>1</sub>- $\gamma$  and SP<sub>1</sub>- $\beta$ , b) SP<sub>1</sub>- $\beta$  treated with neuraminidase, c) pregnant serum,  $\blacktriangle$  is SP<sub>1</sub>- $\beta$  and  $\triangle$  is suspected to be SP<sub>1</sub>- $\gamma$ .



と反応させたところ沈降線を作り，これは妊婦血清を作る沈降線と癒合した。さらにこれを免疫電気泳動したところ  $\gamma$ ~ $\delta$  分画に抗 SP<sub>1</sub> 血清を反応する物質を認めた。これを SP<sub>1</sub>- $\gamma$  と仮称する。精製 SP<sub>1</sub> を neuraminidase で処理したところ， $\gamma$  分画に泳動され SP<sub>1</sub> は糖蛋白であることが分かった。さらに免疫電気泳動で neuraminidase 処理 SP<sub>1</sub> と SP<sub>1</sub>- $\gamma$  とは区別できなかつた。

精製 SP<sub>1</sub> を用いて 7% polyacrylamide gel electrophoresis を行つたところ，以前報告したと同様に single band であつた。精製 SP<sub>1</sub> を用いて通常の 7% SDS-polyacrylamide slab gel electrophoresis を行つたものが図 6 のように single band を示し，また band が多数あるものが分子量測定用標準蛋白である。上部はこれらの densitometer にかけてたものである。精製を mercaptoethanol で処理して，SDS-polyacrylamide electrophoresis で single band ということは，S-

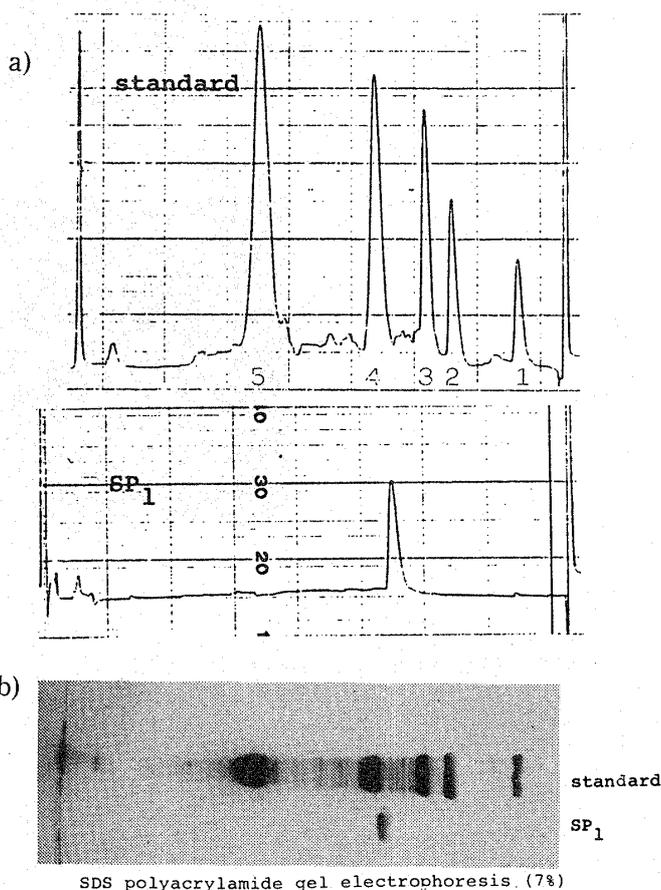
図6 The estimation of the molecular weight of SP<sub>1</sub>- $\beta$

a) analysis of densitometer

standard 1: myosin 200,000,  
2:  $\beta$ -galactosidase 116,250,  
3: phosphorylase B 92,500,  
4: bovine serum albumin 66,200,  
5: ovalbumin 45,000

b) SDS polyacrylamide gel electrophoresis (7%)

M.W. of SP<sub>1</sub>- $\beta$  was calculated to be 72,000 dalton.



S 結合による sub chain をもたないと考えられ，分子量は 72,000 であつた。

精製 SP<sub>1</sub> を等電点電気泳動したところ，図 7 のように pI 3.80~4.55 の所に band が認められ pI 4.15 の所が強く染色されたが，抗 SP<sub>1</sub> 血清を浸した cellulose acetate 膜の反応では，この band の部分が染色された。さらにこの反応を SP<sub>1</sub>- $\gamma$  で行つたところ band が少なくとも 4 本 pI 5.3, 5.5, 5.65, 5.8, の所に認められた neuraminidase 処理 SP<sub>1</sub> は pI 6.4~8.1 と広い幅で反応し，明らかに

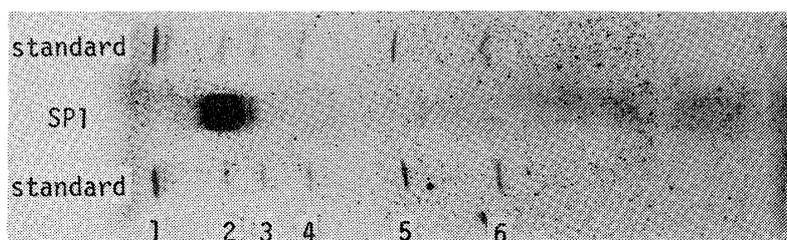
図7 The examination of SP<sub>1</sub> antigens by means of isoelectric focusing

a) isoelectric point of purified SP<sub>1</sub>: pI 3.80~4.55, peak pI 4.15

standard 1: amyloglucosidase 3.50, 2: glucose oxidase 4.15,  
3: soybean trypsin inhibitor 4.55, 4: β-lactoglobulin A 5.20,  
5: bovine carbonic anhydrase B 5.85, 6: human carbonic anhydrase B 6.55

b) the comparison of each SP<sub>1</sub> antigen substance by immunofixation technic of isoelectric focusing neuraminidase: SP<sub>1</sub>-β treated with neuraminidase

a)



b)

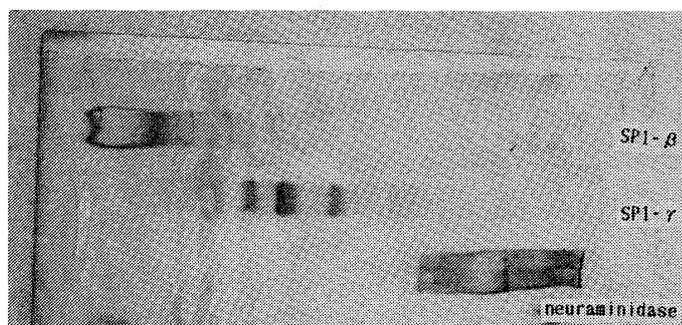


表2 Amino acid analysis of SP<sub>1</sub> (mol %)

Amino acid	SP <sub>1</sub> -mie	SP <sub>1</sub> (Bohn)
Lys.	5.6	4.4
His.	6.5	1.8
Arg.	7.8	5.1
Asp.	9.9	9.9
Thr.	8.2	8.2
Ser.	8.6	9.1
Glu.	9.5	9.0
Pro.	8.5	8.0
Gly.	7.3	7.1
Ala.	3.9	3.7
Cys.	—	1.6
Val.	5.9	5.8
Met.	0.0	0.9
Ileu.	5.2	5.8
Leu.	10.3	9.6
Tyr.	0.8	5.8
Phe.	1.9	2.1
Try.	—	2.4

SP<sub>1</sub>-γと違っていた。

アミノ酸分析では表2に示すようにBohnの報告<sup>11)</sup>と比較してtyrosineが少なく、histidineが多かった。methionineは検出できなかった。

#### 考案

SP<sub>1</sub>の測定法として一般的にLaurell法, SRID, EIAなどがあるが, 病的妊娠などの変化をcheckする目的には測定方法, 感度あるいは時間などの点で必ずしも臨床的に有用なものとはいえない。妊娠関連物質では血清hPL(感度5ng/ml)血清あるいは尿hCG(感度0.2IU/ml), 血清AFP(感度10ng/ml)などが, 1分前後で測定可能なLA system<sup>8)</sup>(栄研化学)に組み込まれている。SP<sub>1</sub>の臨床応用実用化をはかるためにLA systemの組み込みで市販の抗SP<sub>1</sub>血清について検討したが, 抗体力価などに問題があった。そこで力価の高い抗体を得るために, 大量の高純度SP<sub>1</sub>抗原精製法を検討した。

Bohn は胎盤抽出液より DEAE-cellulose, Sephadex G-150, Zone electrophoresis, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-150 を行い純度95%以上, 回収率5%で  $SP_1$  を得ており<sup>12)</sup>, また immunoadsorption, hydroxylapatite を行い純度99%以上, 回収率50%で精製  $SP_1$  を得ている<sup>11)</sup>. Sokolov et al.<sup>19)</sup> は胎盤後血腫より DEAE-cellulose, Sephadex G-200, hydroxylapatite, CM-cellulose, isoelectric focusing にて純度90~95%の  $SP_1$  を得ている. さらに Sorensen et al.<sup>20)</sup> は妊婦血清より anion exchange chromatography, positive affinity chromatography, negative affinity chromatography, anion exchange chromatography にて回収率4.5%, 純度98~99%で  $SP_1$  を得ている. 我々は以前より能勢の方法<sup>6)</sup>, 伊東の方法<sup>3)</sup>で胎盤より  $SP_1$  の精製を行ってきたが, 前者は精製過程に非常に時間のかかること, また後者は微量精製にはよいが, 大量精製には適していないなどの問題があつた. 胎盤抽出液は非常に多種にわたる可溶性蛋白が存在し, また  $SP_1$  の胎盤組織内濃度は4.3mg/dl である. しかし, 血清では存在する蛋白の種類も限られ, また血清  $SP_1$  濃度は19.2mg/dl であり, それらの点から  $SP_1$  の精製材料としては血清のほうが妥当であることが分つている<sup>2)</sup>.  $SP_1$ -negative 用抗血清も比較的容易に作成でき, hydroxylapatite に少なくとも  $SP_1$ - $\beta$  は吸着されないことなどを考え合わせ, 今回の精製法に至つた. この方法は回収率, 純度とも満足のいくものであり, 胎盤後血腫について同方法を行えばほぼ同じ純度, 回収率で大量の  $SP_1$  を得ている. 現在この  $SP_1$  を家兎に免疫して抗体を作成中である.

今回精製した精製  $SP_1$  は免疫電気泳動で  $\beta$  分画に属し Bohn<sup>13)</sup> のものと同じであつた. 分子量は Lin<sup>15)</sup> が gel filtration で110,000, Bohn<sup>13)</sup> が SDS polyacrylamide gel electrophoresis で90,000といい, 我々の精製  $SP_1$  は SDS-polyacrylamide gel electrophoresis で72,000であつた.  $SP_1$  を塩酸グアニジンで処理し, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis を行くと, 分子量約60,000, 40,000および10,000, の分画に分けら

れるという報告もある<sup>16)</sup>. 分子量に関しては  $SP_1$ - $\gamma$ ,  $SP_1$ - $\beta$  とともに標準血清, 測定法などについて再検する必要がある. 等電点は Bohn<sup>11)</sup> が pI 4.15, Lin<sup>15)</sup> が major peak 3.9, minor peak 6.0, 我々の精製  $SP_1$  の pI は3.8~4.55の範囲で peak は4.15であつた. アミノ酸分析の結果も Bohn<sup>11)</sup> のものとほぼ同じであつて, 今回精製した  $SP_1$  の物理化学的性質は諸家の報告とほぼ同じであつた.

$SP_1$ - $\gamma$  の存在については Sorenson et al.<sup>20)</sup> の報告があり, radioimmunoassay で  $SP_1$ - $\gamma$  は他の  $SP_1$ - $\beta$ ,  $SP_1$ - $\alpha_1$ ,  $SP_1$ - $\alpha_2$  と dose-response curve が違うと述べている. さらに今回 DE-52 cellulose を素通りしてきた  $SP_1$ - $\gamma$  は, 細菌に多数含まれる neuraminidase と反応させた  $SP_1$  と等電点移動度で全く違つていた. この  $SP_1$ - $\gamma$  は等電点の違い, 少なくとも4種の  $SP_1$  抗原をもつ集合体で, 正常妊娠血清にも含まれることが判明した. また, 他の  $SP_1$  亜型蛋白として  $SP_1$ - $\alpha$ <sup>23)</sup> があるが, これは電気泳動で  $\alpha_2$  分画に属し, 分子量が400,000である.  $SP_1$ - $\alpha$  の検出方法は rocket immunoelectrophoresis あるいは crossed immunoelectrophoresis で行うが, 電氣的に  $SP_1$ - $\gamma$  は IgG と同じ方向に流れるため同方法では一般的には検出できない. 妊婦血清では  $SP_1$ - $\alpha$  と  $SP_1$ - $\gamma$  に分けて臨床的に検討されている<sup>9)10)</sup>.  $SP_1$  亜型あるいは  $SP_1$  抗原蛋白としては, これで妊婦体内において  $SP_1$ - $\alpha$ ,  $SP_1$ - $\beta$ ,  $SP_1$ - $\gamma$ ,  $SP_1$ -B, と4種類のものが存在することになる. 今後この  $SP_1$ - $\gamma$  の妊娠経過に伴う動態, 病的妊娠による変化などについて検討する予定である.

本研究は文部省科学研究助成金によつた. また, 本論文の要旨は第56回日本内分泌学会, 第74回東海産婦人科学会において発表した.

## 文 献

1. 早川滋彦, 今泉博充, 伊東雅純, 沢木泰仁, 能勢義正, 西山幸男, 杉山陽一: RIA-gnost  $SP_1$  による血清低濃度  $SP_1$  値の検討とその臨床的意義. 産と婦, 48: 1689, 1981.
2. 伊東雅純, 今泉博充, 早川滋彦, 加藤公弘, 西山幸男, 能勢義正, 杉山陽一: 各種妊娠性蛋白の妊娠初期および末期の絨毛組織内濃度に関する検討. 日内分泌誌, 59: 993, 1983.
3. 伊東雅純: Pregnancy Specific  $\beta_1$ -Glycoprotein

- (SP<sub>1</sub>)の代謝経路に関する研究. 第2報. SP<sub>1</sub>の精製と<sup>125</sup>I標識SP<sub>1</sub>のマウス生体内分布および排泄に関する検討. 日内分泌誌, 58: 963, 1982.
4. 前田一範, 西山幸男, 村田和, 能勢義正, 山口博司, 伊東雅純, 早川滋彦, 今泉博充, 杉山陽一: 妊娠性蛋白SP<sub>1</sub> ( $\beta_1$ -SP<sub>1</sub>-glycoprotein)のRadioimmunoassayに関する基礎的臨床的研究. 日内分泌誌, 56: 945, 1979.
  5. 西山幸男, 能勢義正, 山口博司, 二井 栄, 杉山陽一: 妊娠血清および尿中のSP<sub>1</sub> ( $\beta_1$ -SP<sub>1</sub>-glycoprotein), SP<sub>3</sub> ( $\alpha_2$ -AP-glycoprotein)およびHPLの消長と胎盤機能に関する研究. 日産婦誌, 29: 593, 1977.
  6. 能勢義正:  $\beta_1$ -SP<sub>1</sub>-glycoprotein (SP<sub>1</sub>)に関する基礎的, 臨床的研究. 第2編.  $\beta_1$ -SP<sub>1</sub>-glycoprotein (SP<sub>1</sub>)の分離精製. 三重医学, 24: 74, 1980.
  7. 沢木泰仁, 西山幸男, 伊東雅純, 早川滋彦, 今泉博充, 能勢義正, 杉山陽一: 妊娠性蛋白SP<sub>1</sub>のEnzymeimmunoassay法による研究. 日産婦誌, 34: 52, 1982.
  8. 坪田宜之: 「LA-system」について. 新医療, 10: 130, 1983.
  9. Ahmed, A.G. and Klopper, A.: Diagnosis of early pregnancy by assay of placental proteins. Br. J. Obstet. Gynecol., 90: 604, 1983.
  10. Ahmed, A.G. and Klopper, A.: A method for the separate measurement of the  $\beta$ - and  $\alpha$ -components of SP<sub>1</sub> in pregnancy serum. Arch. Gynecol., 231: 307, 1982.
  11. Bohn, H., Schmidberger, R. and Zilg, H.: Isolierung des schwangerschafts-spezifischen  $\beta_1$ -Glykoproteins (SP<sub>1</sub>) und antigeneverwandter Protein durch Immunadsorption. Blut, 32: 103, 1976.
  12. Bohn, H.: Isolierung und Charakterisierung des schwangerschaftsspezifischen  $\beta_1$ -Glykoproteins. Blut, 24: 292, 1972.
  13. Bohn, H.: Detection and characterization of pregnancy proteins in the human placenta and their quantitative immunochemical determination in sera from pregnant women. Arch. Gynak., 210: 440, 1971.
  14. Grudzinskas, J.G., Gordon, Y.B., Menabawey, M., Lee, J.N., Wadsworth, J. and Chard, T.: Identification of high-risk pregnancy by the routine measurement of pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein. Am. J. Obstet. Gynecol., 147: 430, 1983.
  15. Lin, T.M., Halbert, S.P., Kiefer, D. and Spelacy, W.N.: Three pregnancy-associated human plasma proteins: Purification, monospecific antisera and immunological identification. Int. Arch. Allergy & Appl. Immunol., 47: 35, 1974.
  16. Luis, A.A., Miguel, A.V., Alfredo, F. and Luis, C.P.: Molecular characterization of pregnancy specific  $\beta_1$ -glycoprotein synthesized from human placenta. Cell Molec. Biol., 27: 97, 1981.
  17. MacDonald, D.J., Scott, J.M., Gemmell, R.S. and Mack, D.S.: A prospective study of three biochemical lactogen, pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein, and urinary estrogens, and their relationship to placental insufficiency. Am. J. Obstet. Gynecol., 147: 430, 1983.
  18. Nishiyama, Y., Nose, Y., Ito, M., Hayakawa, S., Imaizumi, H., Sawaki, V. and Sugiyama, Y.: A simple method for the measurement of pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein (SP<sub>1</sub>) using a latex agglutination inhibition technique. Placenta, 3: 137, 1982.
  19. Sokolov, A.V., Kozlyayeva, G.A., Mesnyankina, N.V. and Tatarinov, Y.S.: Isolation and purification of specific  $\beta_1$ -G globulin. Vopr. Med. Chim., 24: 240, 1978.
  20. Sorensen, S. and Trentemoller, S.: Purification of the major component of the pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein (SP<sub>1</sub>) by affinity chromatography, and application to a highly sensitive radioimmunoassay. Oncodev. Biol. Med., 4: 351, 1983.
  21. Szymendera, J.J., Zborzil, J., Sikorowa, L., Lenko, J., Kaminska, J.A. and Gadek, A.: Evaluation of five tumor marker (AFP, CEA, hCG, hPL and SP<sub>1</sub>) in monitoring therapy and follow-up of patients with testicular germ cell tumor. Oncology, 40: 1, 1983.
  22. Tsakok, F.H., Koh, S., Chua, S.E., Ratnam, S. S., Teisner, B., Jones, G.R., Sinosich, M. and Grudzinskas, J.G.: Prognostic significance of the new placental proteins in trophoblastic disease. Br. J. Obstet. Gynaecol., 90: 493, 1983.
  23. Teisner, B., Folkersen, J., Hindersson, P., Jensenius, J.C. and Westergaard, J.G.: Quantification of the pregnancy-specific  $\beta_1$ -glycoprotein (SP<sub>1</sub>) by immunoprecipitation techniques: The influence of a cross-reacting high molecular weight  $\alpha_2$ -protein. Scand. J. Immunol., 9: 409, 1979.

(特別掲載 No. 5541 昭59・7・16受付)