

〔綜 説〕

生殖腺刺激ホルモン I. 抽出と純化*

Gonadotropins I. Purification

吉田高志・石居 進

(Takashi YOSHIDA AND Susumu ISHII)

東京都・早稲田大学教育学部生物学教室

昭和48年1月1日 受領

1. ま え が き

生殖腺刺激ホルモン**の脳下垂体前葉からの分離、抽出は、1930年代から、多くの研究者によってすすめられてきた。しかし、初期の硫酸、エタノール等を用いた沈殿分画法によっては、均質な物質を得ることは、とうてい不可能であった。その為に、生殖腺刺激ホルモンの分子量、化学組成等に関して、当時の研究のあいだでは、一致した結果が得られなかった (Geschwind, 1963 綜説参照)。ところが1950年代以降の研究においては、ゲル濾過法、イオン交換法、電気泳動法などの方法を用いたため、純度の高い試料を得ることができるようになり、分子量、糖組成、アミノ酸組成などに、比較的一定した値が報告されるようになった。そして、現在に至って、黄体形成ホルモン LH、卵泡刺激ホルモン FSH は、ともにふたつの単量体 subunit からかたちづけられていること、そしてそのアミノ酸配列さえ、明らかになった。しかし、これらの結果を導いたホルモン精製物の純度の検討、ホルモン比活性の詳細な比較をおこなってみると、研究者間に、必らずしも明確な意見の一致は見られない。さらに、それらの精製物の化学的な性質についても、まだまだ不可解な問題が残されている (Hellema, 1971 綜説参照)。

そこで、この綜説では、ホルモン抽出過程におけ

る問題点、抽出されたホルモンの生物学的、化学的、物理学的性質について、1950年代以降に報告された主要な研究を中心にして、整理した。そして生殖腺刺激ホルモンについて、今後明らかにしなければならぬ問題を探ろうとしたが、前半では、生殖腺刺激ホルモンの抽出と純化の方法の紹介に重点をおき、この方面の研究者に役立つようにした。

2. 生殖腺刺激ホルモンの分離

生殖腺刺激ホルモンの抽出、純化は、多くの研究者によってすすめられているが、その方法は、他のタンパク質の抽出、純化の方法と、何ら異なることはない。強いて言うならば、FSH と LH とは糖タンパクであるので、他の単純タンパクのホルモンと、いくらかちがった方法をとることがある程度であろう。しかし、個々の具体的な方法となると、研究者によって、かなりのかたよりが見られる。例えば、後にくわしくのべることではあるが、Hartree 達は、脳下垂体の、酢酸アンモニウムとエタノールの混液による抽出物を、イオン交換体 CM セルロース、DEAE セルロースのカラムにかけることによって精製しているのに対し、Wilhelmi や Reichert らは、主に硫酸分画による粗抽出物を、初期には、イオン交換体 アンバーライト IRC-50 を用い、あとでは、それに DEAE セルロース、およびセファデックス G100 によるゲル濾過法を組み合わせている。また C. H. Li らは、上記のゲル濾過法、イオン交換法に加え、電気泳動法による分離をおこなっている。このように、多くの研究者によって、

* 本綜説の作製には Population Council, New York の補助金の一部が用いられた。

** この論文では、黄体形成ホルモンと、卵泡刺激ホルモンの両者をさし、プロラクチンは含めない。

それぞれ異なった操作の組み合わせが用いられ、それぞれ独自の成果が得られている。そこで、ホルモンの抽出、分離の過程をいくつかの段階に分け、その各段階について、どのような結果が得られているかを、まず眺めてみよう。

2-1. 採取された試料の保存法

摘出された脳下垂体は、アセトン粉末にされ貯蔵される例が多かったが、最近では、生のまま冷凍保存されている例が多い。組織のアセトン保存と、冷凍保存との、ホルモン収率のちがいについては、Oliner *et al.* (1968) および Parlow *et al.* (1965a) の研究があるが、彼らの結果からみてこのふたつの方法に明瞭なちがいがあるとは言えない。アセトン粉末は、かなり長期の保存が可能であると古くから言われているが、冷凍保存の場合も、半年ぐらいたっても、ホルモン活性については、ほとんど変化がないようである。したがって、冷凍庫の普及した現在では、冷凍保存のほうが簡単ですぐれていると

思われるが、停電や故障のことを考慮すれば、アセトン粉末保存もまた捨て難い。

2-2. 沈殿分画法

どの研究者も、上記の試料から、まず常法どおりに、水または塩溶液で、タンパクを抽出し、それをいろいろな塩濃度や、pH、または有機溶媒を用いた沈殿法で分画し、FSH や LH の粗抽出物をつくっている。そしてこの段階で、糖タンパクである FSH, LH および 甲状腺刺激ホルモン TSH の三つを、他の単純タンパクのホルモン (成長ホルモン GH, プロラクチン LTH, 副腎皮質刺激ホルモン ACTH) から分離することを試みたり、あるいはさらに、FSH と LH との分離を試みたりしている。

まずはじめに、代表的な硫酸分画法についてみてみよう。ヒトの脳下垂体から生殖腺刺激ホルモンの粗抽出物を作るために、Wilhelmi (1961) の用いた方法がかなりひろく用いられている。この方法によると、まず、1.25 M 硫酸 (pH4) で、単純タン

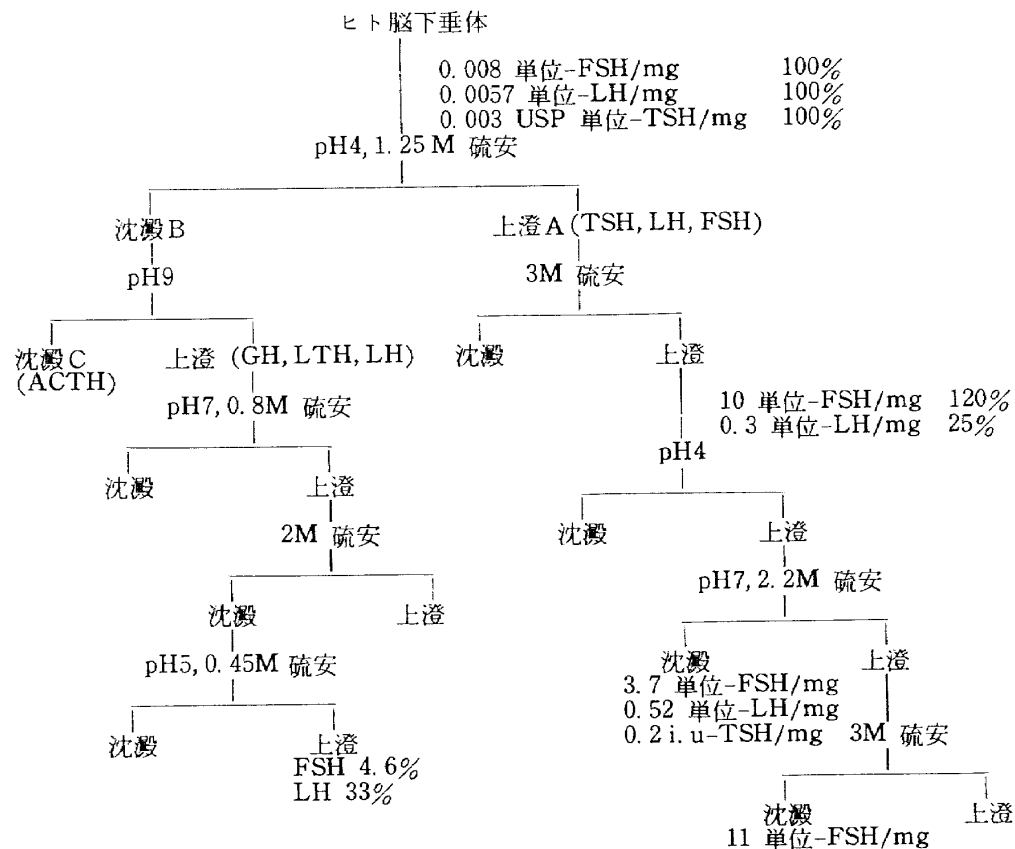


図 1. Wilhelmi 硫酸分画法

Wilhelmi (1961); Reichert and Parlow (1964a and b) Parlow *et al.* (1965a) より作成。比活性の表示は、5 頁脚注参照。パーセントはホルモン活性の回収率を示す。

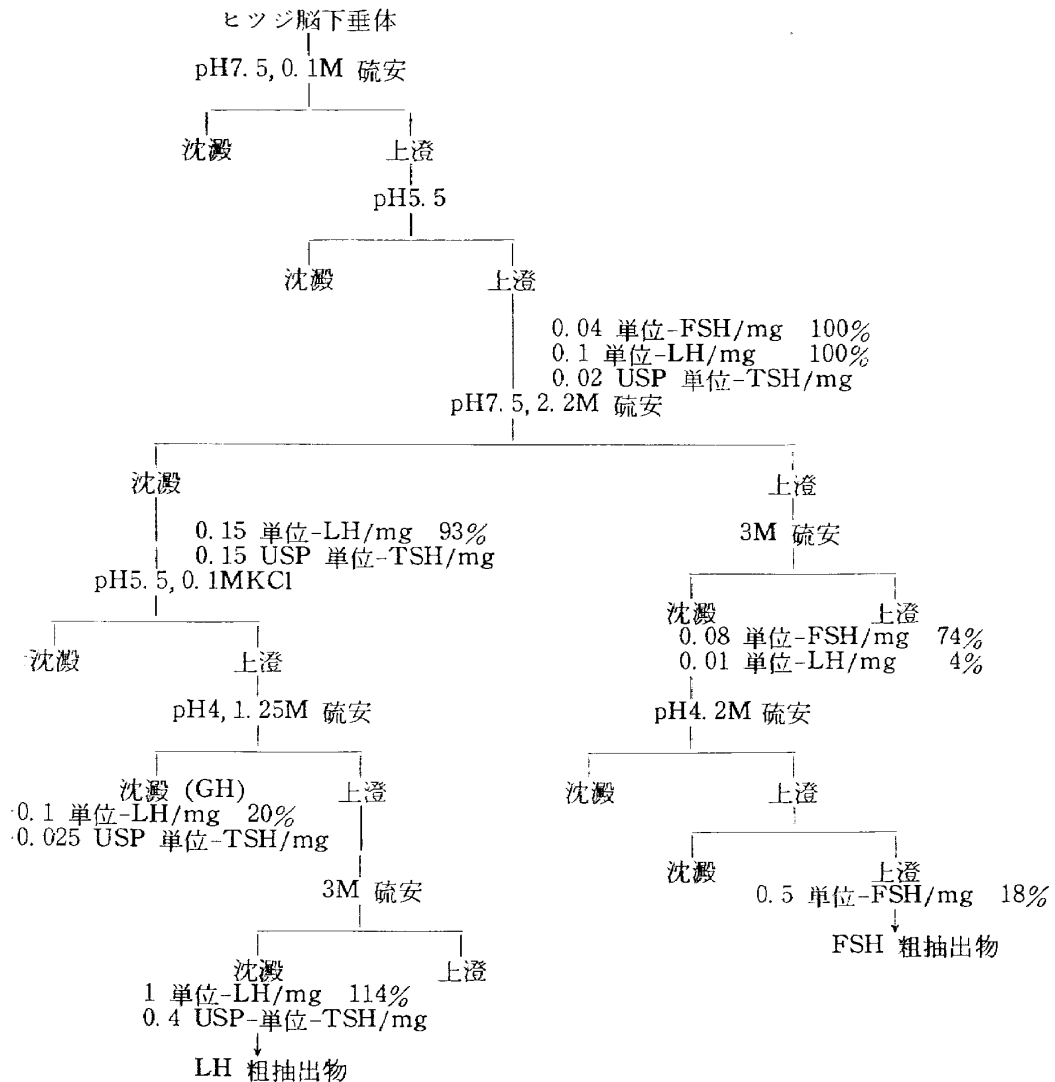


図 2. Ellis の硫安分画法

Ellis (1958) より作成・比活性の表示は、5 頁脚注参照。

パーセントはホルモン活性の回収率を示す。

ペクホルモン (GH, ACTH, LTH) を沈殿させ糖タンパクホルモン (FSH, LH, TSH) を、うわずみに残す。そして、pH や、硫安濃度をかえることにより、FSH を多く含む分画と、LH の多い分画をつくってゆくのであるが、GH, ACTH, LTH を含むはじめの沈殿の方に、LH の 30% 以上が移ってしまう (Palrow *et al.*, 1965)。また LH と FSH の分離を、pH7, 2.2 M 硫安でおこなっているが、あまり分離はよくない。そしてこのようにして得られた LH, FSH の分画は、TSH をも含んでいる。その他の動物に対しては、Ellis (1958) の硫安分画法がしばしば用いられている。それによると、LH, TSH は、pH7.5, 2.2 M 硫安沈殿分画にはいり、

FSH は、pH7.5, 3.0 M 硫安沈殿分画にあつまられるという。前法に比較して、FSH と LH の分離は、良いようであるが、しかし、LH と TSH は分離することができない。

FSH は、2.2~3.0 M 硫安での沈殿分画にあつまるといふ (Saxena and Rathnam, 1967; Roos *et al.*, 1963; Jutisz *et al.*, 1960; Woods and Simpson, 1960)。そして、細かくみると 2.2 M 硫安の沈殿に、20%、3 M 硫安の上ずみに 30% が去ってゆき、2.2~3 M 硫安沈殿分画に 50% の活性がみられるという (Jutisz *et al.*, 1961)。

LH は、脳下垂体を、蒸留水でホモジェナイズすると沈殿に残るといふが、この条件では FSH は、

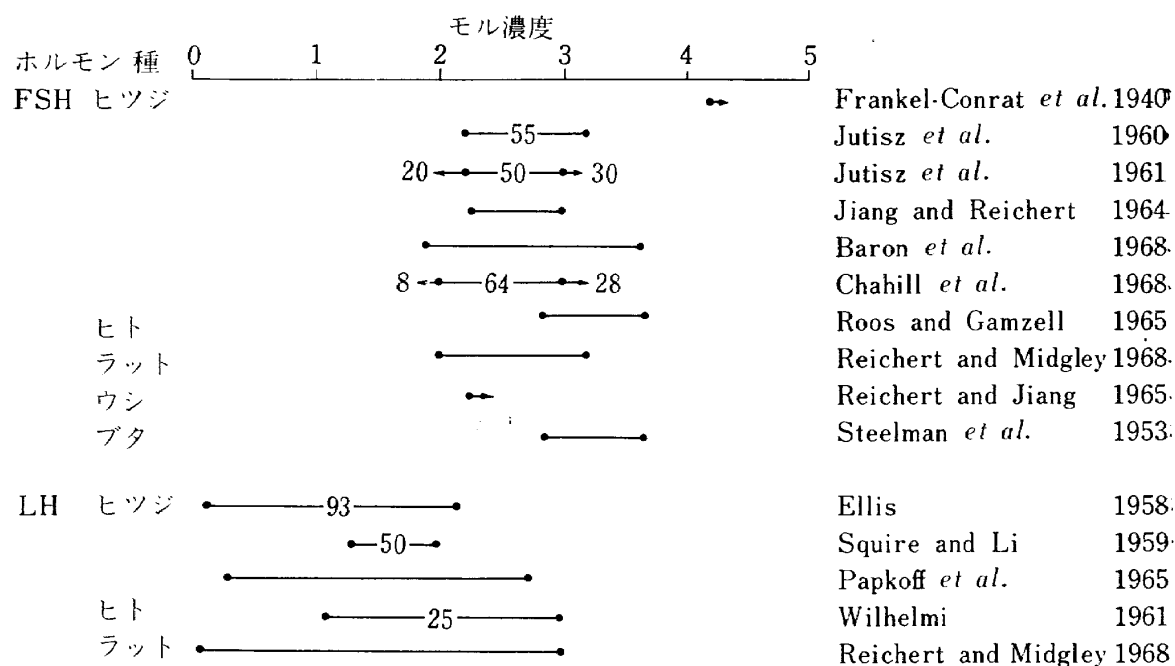


図 3. 生殖腺刺激ホルモンの硫酸分画法生殖腺刺激ホルモンの沈澱した硫酸濃度を直線で示した。

数字は、回収されたホルモン活性の割合を示す。

← は、その濃度での沈澱分画

→ は、その濃度での上澄分画。

うわずみにうつり、LH と FSH とを分離することができるという。そして、LH は、3.0 M 硫酸で沈澱させられるが (Reichert, 1961; Reichert and Midgley, 1968; Papkov and Gan, 1970) 1.3~2.1 M 硫酸沈澱分画にその 50% が、見られる (Squire and Li, 1958)。

このように、LH は、比較的低濃度の硫酸溶液で沈澱するが、FSH は、2 M 以上の濃度になければ、沈澱しないことが、一般論として言えよう (図 3)。しかし、結論的には硫酸分画法によっては、FSH と LH、さらに LH と TSH とを完全に分離することができず、さらに、このようにして調整された生殖腺刺激ホルモンでは、かなりの量の活性が、他の分画として捨てられてしまう。

一方、エタノールによる分画法をしらべてみよう。生殖腺刺激ホルモンは、6% 酢酸アンモニウムを含む 40% エタノールで抽出される (Hartree, 1962; Segaloff and Steelman, 1959)。この抽出条件を検討してみると、pH4.5、イオン強度 0.5 の 40% エタノールによる抽出が、いちばん抽出率が良いという (Koenig and King, 1950)。この方法では、そのあとエタノール濃度を 80% 程度に増加させ、糖タンパク分画を得ている (Hartree, 1966; Har-

tree *et al.*, 1968; Hartree and Cunningham, 1969; Segaloff and Steelman, 1959; Ward *et al.*, 1968; Yamazaki and Donaldson, 1968)。すなわち、LH, FSH, TSH を含む分画が得られるわけである。この方法では、脱塩、かつ脱水された粉末が簡単に得られる点で便利であるが、収率は必ずしも高くない。また、エタノール分画法によって、LH と FSH を分けようという試みはなされていない。ただ、LH 粗抽出物を調整する試みとして、30% エタノールのうわずみを、中性から酸性に変化させることにより、pH4.5、30% エタノールのうわずみに LH をあつめるという試みがある (Reichert and Wilhelmi, 1965)。しかし、この分画に、どの程度の FSH が混入しているかは、明らかではない。

また、メタリン酸も、生殖腺刺激ホルモンの分画のために用いられており、LH, FSH は、0.2 M メタリン酸において、うわずみにあつまる (Papkov *et al.*, 1967a)。0.035 M メタリン酸においても、87% の FSH, 96% の LH が、うわずみに回収される (Braseltan and McShan, 1970) ので、回収率のみを問題にする場合には、0.035 M 程度のうすいメタリン酸によって抽出をおこなう方がよい。また、0.2 M 程度の濃いメタリン酸抽出をおこなって

も、抽出物の比活性は、必ずしも増加するとはいえない。

また、生殖腺刺激ホルモンは、 $0.02\text{ M Zn (C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ で抽出される (Steelman *et al.*, 1953) ことや、 3 M 尿素で沈殿する (Cahill *et al.*, 1968) ことを利用している例もある。さらに $1:1$ クロロホルム-ブタノール (v/v) 混液を用いることによって、FSH の比活性を $3\sim4$ 倍に増加させるとともに、LH の混入を低下させている例もある (Jiang and Reichert, 1964; Reichert and Jiang, 1965)。

このようにして、塩溶液、有機溶媒による分画法によって比活性を増加させようとすれば、ある程度までは可能であり、ヒトの LH では、 $0.3\sim0.4$ 単位/ mg 程度に、FSH では、 $4\sim8$ 単位/ mg 程度にまで増加させることが可能である。しかし、その結果、回収率は、LH では 40% 、FSH では 20% ほどになってしまう (Bettendorf *et al.*, 1968; Reichert and Parlow, 1964a and b)。そして、比活性の増大にともなう、急速に回収率は低下し、ブタの LH の例では、比活性 0.037 単位/ mg の粗抽出物を、メタリン酸とエタノールとで分画することによって、比活性を約 3.5 倍 (0.13 単位/ mg) に増加させた結果、回収率は、 40% も低下している (Reichert, 1964)。FSH についても、同様の結果が報告されている (Hartree and Cunningham, 1969; Ellis, 1958)。

それ故に、全体的にみて、抽出の効率は、はなはだよくない。そこで、上記のような方法を用いた抽出、精製は、なるべく簡単なものにとどめておくか、あるいは、アセトン粉末からの抽出物を、そのままクロマトグラフィーや、ゲル濾過にもって行く方がよいかも知れない。

2-3. クロマトグラフィーおよび電気泳動法

他のタンパクの分離と同じように、生殖腺刺激ホルモンの分離にも、いろいろな基材によるクロマトグラフィー法や、電気泳動法が用いられている。そして、これらの方法は、現在では、ほとんどの場合、単独では用いられずそのいくつかが組み合わされて用いられている。ここでは、まず、その個々の方法について、概要と特徴を述べてみる。

* 以下すべて LH については NIH-LH-S1, 1 mg の活性を 1 単位, FSH については NIH-FSH-S1, 1 mg の活性を 1 単位として換算して表現してある。

2-3-1. クロマトグラフィー法

FSH や LH の物理化学的性質が明らかになる以前から、いく種類かのイオン交換クロマトグラフィーが、これらの物質の分離に用いられてきている。したがって、次ぎに述べる分離方法は、もともと理論的というよりもむしろ、試行錯誤から経験的に用いられてきたものである。

現在のところ FSH と LH とを分離するためには、カルボキシメチル (CM) セルロース、あるいは、ジエチルアミノエチル (DEAE) セルロースが用いられているし、LH から TSH を分離するには、DEAE セルロースが有効であるとされている。一方、FSH や LH を他の物質から分離して、比活性を上昇させるには、アンバーライト IRC-50 によるイオン交換法が用いられたが比較的最近になって普及したゲル濾過法がすぐれていて、よく用いられている。しかし、これらの方法は、そのいずれをとっても完全なものではなく、さらに使用条件によって、また研究者によって、かなり結果に差があることが、以下の記述によって、わかっていただけることと思う。

2-3-1-1. 陽イオン交換体 アンバーライト IRC-50 の使用

このイオン交換体は、Reichert (1961) によって、LH の精製に用いられて以来、しばらくのあいだ、何人かの研究者によって用いられた。

Reichert は、ヒトあるいはヒツジの LH は、 $\text{pH}8.0$, 0.007 M リン酸- 0.003 M ホウ酸緩衝液で、アンバーライト IRC-50 のカラムにかけられたとき、 50% 程度の LH 活性がカラムに保持される。この LH は、 0.5 M NaCl で溶出される。この操作によって、 $3\sim8$ 倍の LH 比活性の増加が得られるとともに、クロマトグラフィーによるホルモンの失活現象は、認められない。しかし、このようにして得られた LH 分画に全体の $30\sim60\%$ の TSH が、 $1.8\sim3.3$ 倍に濃縮されて混在してしまう (Reichert, 1961; Reichert, 1964; Reichert and Parlow, 1964c)。

そこで、溶出液の塩濃度を段階的にかえて、TSH の混入が、全 TSH の 2.2% にしかすぎない分画を得たが、その分画における LH の回収率は 50% 程度であった。このようにして調整された LH 試料は、ウシで、 1.7 単位/ mg (0.05 USP 単位-TSH/ mg)、ヒツジで、 2.2 単位/ mg (0.02 USP 単位-TSH/ mg , 0.012 単位 FSH/ mg) の比活性を持っている (Reichert, 1962; Reichert and

Parlow, 1963)。

また LH のカラムへの吸着* を、pH7.5, 0.05 M リン酸緩衝液でおこない、NaCl で溶出させている例もある (Hartree *et al.*, 1964; Butt *et al.*, 1964)。

以上の実験では、塩の濃度勾配で、カラムから LH を溶出させているが、pH の勾配によって LH を溶出させている例もある。

pH5.9, 0.2 M リン酸緩衝液でカラムに保持されたヒツジの LH は、pH6.9 緩衝液で溶出され、比活性は 2.7 倍に増加し、ホルモン回収率は 80% 程度であった (Squire and Li, 1958; 1959)。他方、ヒトの LH は、pH5.5 リン酸緩衝液でカラムに保持され、pH6.9 緩衝液で溶出されるが、この操作による比活性の増加は、1.8 倍であり、回収率は 30% 程度にとどまった。またこの試料から FSH 様の活性が検出されている (Li *et al.*, 1960)。

以上にのべたように、陽イオン交換体アンバーライト IRC-50 を用いることにより、LH の比活性は、2~8 倍に増加する。この場合、塩の濃度勾配による溶出法では、TSH の混入を防ぐことはできない。また pH の勾配による溶出法では、TSH の混入を防げるか、否か、明らかではない。

アンバーライト IRC-50 は、FSH の精製にも、稀ではあるが用いられている。ヒツジの FSH は、pH5, 0.2 M 酢酸緩衝液でカラムに保持され、pH9.3, 0.2 N グリココール-NaOH 緩衝液で、溶出される (Jutisz *et al.*, 1960; 1961)。また、pH8.0, 0.07 M リン酸 0.003 M ホウ酸緩衝液で、ラットの LH を溶出させている例もある (Reichert and Midgley, 1968)。

一般的に言うならば、LH と TSH は、アンバーライト IRC-50 カラムにおいて、非常によく似た行動を示し、両者を完全に分離することは、困難である。あえて分離を試みるならば、前に述べたように、LH の回収率は大きく低下してしまう (Reichert and Parlow, 1964c)。また、FSH と LH も、互いによく似た行動をとるので両者を完全に分離することはできない。したがって、最近では、この方法はあまり使用されていないようである。

2-3-1-2. 陽イオン交換体 CM セルロースの使用

このカラムは、主として LH の純化、および、

FSH と LH の分離を目的として用いられている。LH をこのカラムに吸着させるには、多くの条件が用いられている。pH6.1, 0.01 M 酢酸アンモニウムでは、ヒトの LH の全体の約 60% がカラムに保持され、約 40% は、そのまま流出する (Squire *et al.*, 1962; Peckham and Parlow, 1969b)。しかし pH6.0, 5 mM 酢酸アンモニウムでは、73% の LH が、カラムに保持される (Ward *et al.*, 1959)。

Hartree (1966) は、ヒトの LH の吸着最適条件を知るために、pH6.0, 10 mM, および、pH6.3, 4 mM; pH5.5, 4 mM の三種の酢酸アンモニウムを用い、その比較を行なった。その結果、カラムに保持される LH の割合は、pH5.5, 4 mM 酢酸アンモニウムで、80~90%、他の二条件では、それぞれ約 50% であることがわかった。以上のことから、これらの三条件のうちでは、pH5.5, 4 mM 酢酸アンモニウムが最もよいという結論を得ている。しかし、同時にカラムに保持される LH は、全体の 4% にすぎないが、TSH は、99% がカラムに保持される。彼女らは、同じ方法を、ウマとニワトリの FSH の精製に用いている (Hartree *et al.*, 1968; Hartree and Cunningham, 1969)。

Hartree and Cunningham (1969) および、Peckham and Parlow (1969b) のように 1 M 酢酸アンモニウムを用い、CM セルロースから LH を溶出している例もあるが、Squire *et al.* (1962) のように酢酸アンモニウムの濃度勾配を用い、0.04~0.08 M の分画にヒトの LH を溶出させている例もある。この分画で LH の比活性は 9 倍に増加するが、その回収率は、全体の 8% にすぎなかった。

Ward *et al.*, (1959) は、ヒツジの LH を、0.04 M ホウ酸緩衝液 (pH8.2) に NaCl を加え、NaCl の 0.2 M までの濃度勾配によって、溶出を試みた。その結果、LH 活性は、LH₁ と LH₂ のふたつの分画に回収され、前者に全体の 11~20%、後者に 21~27% の活性が回収された。比活性は、LH₂ のほうが高く、LH₁ の約 4 倍 (約 1 単位-LH/mg) であった。また LH₁ を同じ条件で、CM セルロース・カラムに再びかけると、LH₁ は、LH₁ と LH₂ とに再び分かれてくる。このことから彼らは、LH₁ は、LH₂ と他のタンパクとが結合したものである、と推測している。

以上のように、CM セルロースを利用することによって、LH と FSH とを能率よく分離することができる。したがって、その目的で CM セルロースを使用している例は多い (Hartree, 1966; Hartree

* 吸着という用語はイオン交換のばあいには物理化学的に正しい用い方ではないが、この論文ではばあいにより便宜上この言葉を用いてある。

et al., 1968; Hartree and Cunningham, 1969; Steelman *et al.*, 1959; Saxena and Rathnam, 1967; Papkoff *et al.*, 1967a; Peckham and Parlow, 1969b)。しかし、LH と TSH とは、この方法ではほとんど分離することができない。またこの方法による回収率は、LH でも、FSH でも非常に良好である。しかし、LH の比活性の増加は、通常 2~3 倍にとどまる。これは、LH の動きが、必ずしも均質ではなく、かなり広い塩濃度にわたって溶出されるためであろうと思われる。

2-3-1-3. 陰イオン交換体 DEAE セルロースの使用

DEAE セルロースによるカラムクロマトグラフィーは、LH、FSH 両者の精製にも、また両者の分離のためにも用いられている。まず、LH の精製についてみてみよう。

pH8.0, 0.007 M リン酸-0.003 M ホウ酸緩衝液、でかけられたヒト、ブタおよびウマの脳下垂体粗抽出物は 80% 以上の LH がカラムから流出し、流出液中の LH の比活性は、2~3 倍に増加する (Reichert, 1964; Reichert and Parlow, 1964a; Reichert and Wilhelmi, 1965)。このさい、95% 以上の FSH および 70% の TSH が、カラムに保持されて残る (Reichert and Parlow, 1964a)。

他方、グリシン緩衝液を用いた例では、pH8.5, 0.1 M 緩衝液でカラムにかけられたヒト LH は、全活性の 60% が流出し、比活性は 10 倍以上に (0.35 から 3.6 単位/mg) に増加する。この流出液中の混入ホルモンは、0.021 単位-FSH/mg, 0.015 国際単位-TSH/mg であった (Hartree, 1966)。また、もっと低濃度 (pH9.5, 5 mM) のグリシン緩衝液では、当然 LH は、カラムに保持される。この場合、0.2~

0.25 M 緩衝液で溶出され、その比活性は、ニワトリにおいて、14 単位/mg から、48 単位/mg に (Hartree and Cunningham, 1969)、ヒトにおいては、0.4 単位/mg から、2 単位/mg に、と、2~6 倍の増加がみられる (Butt *et al.*, 1964; Parlow *et al.*, 1965b)。また、pH 9.5, 0.2 M 緩衝液によって溶出される分画に、ヒト LH では、80% 以上が回収され、比活性は、2.6 倍に増加し、TSH の混入は、0.03% 以下である、という報告もある (Hartree *et al.*, 1964)。

グリコール-NaOH 緩衝液を用い、TSH をカラムに吸着させ、LH から分離しようという試みも、ヒツジでなされている (Jutisz et Courte, 1968) が、十分な検討はなされていない。

FSH の精製に、DEAE セルロースが用いられている例を、つぎに述べよう。pH7.0 リン酸緩衝液によるクロマトグラフィーをおこなっている例が多い。ヒツジ・ヒトの FSH の場合、FSH は 0.005~0.02 M リン酸緩衝液でカラムに保持される。

溶出には、図 4. に示すように、いろいろな濃度範囲のリン酸緩衝液が用いられているが、ヒツジでは、比活性、回収率ともに Woods and Simpson (1960) の報告がもっとも高かった。また 0.075~0.1 M の分画に FSH の 36% があつまり、その分画での比活性の増加は、20 倍にもいたる、という報告もある (Hashimoto *et al.*, 1965)。

しかし、図 4. からわかるように、DEAE セルロースカラムを用いた場合、FSH は、必ずしも同じような分画に回収されてはいない。

LH のところで一部述べたように、Reichert (1964) は、pH8.0, 0.007 M リン酸-0.003 M ホウ酸緩衝液でカラムにかけられたブタの脳下垂体粗抽

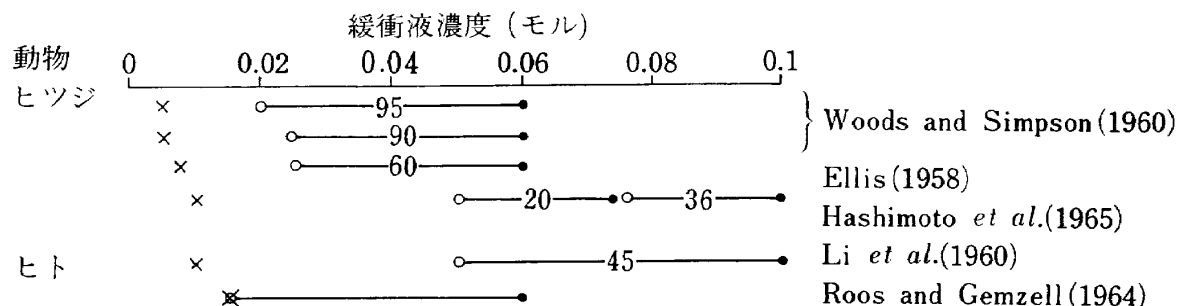


図 4. DEAE セルロースに吸着された FSH の解離のための条件 (pH7.0 リン酸緩衝液による)

× カラムにかけられた時の緩衝液濃度

○—● 溶出された時の緩衝液濃度

数字は回収された FSH の活性の割合 (%) を示す。

出物のうち、FSH の 95% が、カラムに保持され、1 M NaCl を含む緩衡液で溶出されるが、FSH の比活性の増加は 2 倍程度であった。またこの分画への LH の混入は 20% であった。

また、pH7.0, 0.01 M 酢酸 アンモニウムを用い、0.75 M に至る連続的濃度勾配によって溶出されたヒトの FSH は、比活性の増加 4.5~5.4 倍、5 単位/mg から、27 単位/mg に致っているが、LH の混入は防げなかった (Steelman *et al.*, 1969)。

このようにして、FSH の精製のために、DEAE セルロースは、いろいろな条件で用いられているが、LH の混入を完全に防ぐことはできない (Li *et al.*, 1960; Roos and Gemzell, 1965; Hashimoto *et al.*, 1965)。この意味で、FSH の精製のための DEAE セルロースの使用は、あまり有効とは言えないが、LH から TSH を除く目的には、利用できる。

2-3-1-4. リン酸カルシウムゲル (Hydroxylapatite) によるクロマトグラフィー

LH および FSH の精製に、このゲルによるクロマトグラフィーが比較的最近用いられている。

Ward *et al.*, (1959) は、pH6.8, 0.005 M リン酸緩衡液で、ヒツジの LH をカラム中に吸着させ、緩衡液の濃度勾配 (0.2~0.5 M) によって、LH を溶出させている。しかし、Jutisz and Squire (1961) によると、ヒツジの LH の 23% が 0.11 M の分画に、20% が 0.15 M の分画に、30% が 0.2 M の分画に分散して溶出される。そして、おのおのの LH 分画を、同じ条件で再びクロマトグラフィーにかけてみると、やはり LH 活性は、0.11 M から 0.2 M に致るすべての分画に分散してしまう。そして LH の回収率は全分画を併せても、80% 程度であり、比活性の顕著な増加は認められないという。このようなことから Jutisz らは、リン酸カルシウムゲルの利用を、あきらめたようである。

FSH の精製にも、リン酸カルシウムゲルは用いられている。1 mM Na_2HPO_4 溶液でカラムにかけられたヒトの試料で、カラムに吸着されず流出してくる分画の、FSH をあつめる試みがあるが、比活性は、それほど増加していない (Butt *et al.*, 1964; Amir and Barker, 1966)。pH6.8, 1~10 mM リン酸緩衡液でブタの FSH をカラムに吸着させ、40 mM 緩衡液で溶出させた場合、比活性は 5 単位/mg から、25 単位/mg になるが回収率は 40~50% 程度であった (Steelman, 1958)。しかし、緩衡液の連続的濃度勾配で溶出させ、比活性を 22 単位/

mg から、86 単位/mg に、4 倍増加させ、回収率 73%、というヒツジにおける例もある (Sherwood *et al.*, 1970)。

このように見てみると、リン酸カルシウムゲル・クロマトグラフィーは、LH の精製には有効であると言えないが、FSH の場合には、比活性を高める目的に利用され、回収率も、それほど悪くない、と考えられる。しかし、この操作によって得られた FSH が、超遠心による分析の結果、均一ではなかった、という報告もある (Steelman, 1958)。

3-1-5. ゲル汙過法 (セファデックス) の使用

セファデックスによるゲル汙過法は、多くの研究者によって、LH および FSH の精製に利用されている。Jutisz *et al.* (1963) は、FSH の精製のために、どのような種類のセファデックスが有効であるか、を調べ、セファデックス G75, G100, G200 の三種が、適している、と報告した。事実、ほとんどの研究者が、セファデックス G100 を用いている。

100 cm 程度のセファデックス G100 カラムによるゲル汙過で、LH 比活性は 3~5 倍程度増加している (Reichert and Parlow, 1963; Reichert and Parlow, 1964b; Peckham and Parlow, 1969b; Braselton and McShan, 1970)。このばあい pH 6~8 程度に調整された緩衡液が瀬用されている。

また FSH も同様にして精製されており、比活性は 2.3~3.2 倍程度増加し、80~90% 以上の回収率が、報告されている (Jutisz *et al.*, 1963; Reichert and Parlow, 1964b; Reichert and Jiang, 1965; Reichert and Midgley, 1968; Papkoff *et al.*, 1967a and b)。

このように、生殖腺刺激ホルモンを、ゲル汙過する場合、中性附近で、0.1~0.5 M 程度の NaCl を加えた緩衡液によっておこなうならば、操作中の失活現象は認められないようである (Roos and Gemzell, 1964 and 1965; Ward *et al.*, 1967; Ward *et al.*, 1968; Peckham and Parlow, 1969b)。

しかし、このようなセファデックス G100 による 100~200 cm のゲル汙過では、FSH, LH, TSH の三者相互の分離は困難である (Roos and Gemzell, 1964 and 1965; Hashimoto *et al.*, 1966; Saxena and Rathnam, 1968; Jutisz *et al.*, 1968; Bettendorf *et al.*, 1968)。

ところが、最近、Hermire and Jutisz (1969) は、100 cm カラムを 2 本連結したうえ、数回のリサイクリングをおこない、ヒツジの LH と FSH と

を、充分満足される程度に分離した。FSH 中における LH の混入は 0.001 単位/mg であり、FSH の回収率は、低下していない、という。

以上のほかに、少数ではあるが、精製の目的で、セファデックス G50 (Parlow *et al.*, 1965b), セファデックス G75 (Rathnam and Saxena, 1970), セファデックス G200 (Papkoff *et al.*, 1965) を用いている例もある。

2-3-1-6. イオン交換セファデックスの使用

分子篩効果と、イオン交換作用の両者の性質を持つ陰イオン交換体 DEAE セファデックス A50 を使用している例もある。

pH7.0, 0.01 M 以下の濃度のリン酸緩衝液でカラムにかけられたヒトおよびヒツジの FSH は、カラムに保持され、0.1 M 緩衝液によって溶出される。その結果、比活性は、2.5 倍程度に増加するが、回収率は 20-40% であった (Amir and Barker, 1966; Hashimoto *et al.*, 1966)。このようにして得られた FSH は、アクリルアミドゲル電気泳動により、移動度の異なる FSH I と FSH II に分けることができる (Peckham and Parlow, 1969a)。

また、ヒト LH は、pH6.8, 0.05 M 以下の濃度のリン酸緩衝液によっては、カラムにとらえられないので FSH と分けることができる。流出液中の LH の比活性は、2.6 単位/mg から 5 単位/mg へと、2 倍の増加がみられ、その回収率は、60% であった (Peckham and Parlow, 1969b)。

しかしこの結果を、先きに述べた DEAE セルロースの使用結果と比較してみると、DEAE セファデックスが、DEAE セルロースよりも明らかに有効であるとはいえないようである。

他方、陽イオン交換体をかねるゲル濾過材 CM セファデックス C50 は、LH の精製に関しては、CM セルロースよりも有効であることを示す実験がある (Braserton and McShan, 1970)。0.02 M リン酸緩衝液の pH6.0~8.0 の pH の勾配により精製されたウマの LH は、比活性 5.8 単位/mg、比活性の増加 6 倍、となり回収率は 60% であった。

またヒツジ FSH を、pH6.9, 0.02 M 酢酸アンモニウム-水酸化アンモニウム緩衝液、もしくは 4 mM 酢酸アンモニウムでカラムに保持させ、緩衝液の pH を増加させて溶出させる例もあるが、その比活性増加は、7 単位/mg から 22 単位/mg、と 3 倍程度であり、回収率は 70% 以上であった (Sherwood *et al.*, 1970)。またアクリルアミドゲル・ディスク電気泳動によって、12 以上のバンドに

わかれるヒトの FSH 試料を、CM セファデックス C50 にかけることによって、5 程度にまで、バンド数を減少させている報告もある (Saxena and Rathnam, 1968)。

また、陽イオン交換体をかねている SE セファデックス C50 を使用する例もあるが、比活性の増大、LH と FSH の分離、TSH の除去に関して、必ずしも他の方法より有効であるとは言えないようである (Papkoff *et al.*, 1965, 1967a and 1967b; Papkoff and Gan, 1970)。

2-3-2. 電気泳動法

電気泳動による方法は、生殖腺刺激ホルモンの場合、ホルモンの失活現象によって、回収率の大幅な低下がみられる点に問題があるが、イオン交換クロマトグラフィー等で、ある程度精製したものを、さらに製精し、より純度および、比活性の高い物質を得る目的に使用されている例が多い。

2-3-2-1. デンブングル電気泳動法

デンブングル電気泳動法による生殖腺刺激ホルモンの精製の試みは、比較的にはやい時期から、いくつかなされている。

pH4 附近の酸性条件 (酢酸緩衝液) では、ヒツジの LH は陰極側に移動するが、FSH はほとんど移動しない (Ellis, 1958; Squire and Li, 1958 and 1959)。そして、FSH 活性の 40% 程度が回収され、比活性も、11 単位/mg から 20 単位/mg 程度に、増加する (Ellis, 1958)。一方、pH4.0 (Tris-クエン酸緩衝液) では、ヒツジの FSH は、不活性化されてしまう、という報告もある (Duraishwami *et al.*, 1964)。

また逆に、アルカリ側条件 (pH8-9) で電気泳動をおこなうと、マウスの LH はほとんど移動せず、FSH は陽極側に移動するが、移動しやすい分画と、しにくい分画とに FSH は分けられる (TEB 緩衝液)* (Lloyd and Meares, 1962)。また、FSH の移動しにくい分画に FSH 活性の 80% が回収される (ヴェロナール緩衝液) (Li *et al.*, 1960)。他方、ヒツジ LH も陽極側に移動しにくい主たる分画と、移動しやすい従たる分画とに分かれ、FSH は、その LH のふたつの分画にはさまれて存在する (TEB 緩衝液) という報告もある (Lloyd *et al.*, 1968)。そして、pH7.7 (ホウ酸緩衝液) の条件では、LH と FSH はうまく分離されないことも、ウマの試料で報告されている (Saxena and Hen-

* Tris-EDTA-Boric acid Buffer

neman, 1965)。

このように、電気泳動の結果については詳細にみると、研究者によって、必ずしも一致した結果が得られていない。その理由として、生殖腺刺激ホルモンの特定 pH 値における荷電状況は、使用される緩衝液のイオン組成によってかなり異なる (Ward, *et al.*, 1961) ことが、理由のひとつに考えられる。デンブングル電気泳動法による FSH と LH との分離、および活性の回収という点に関して、その利点をはっきりと認められるまでには致っていない。

2-3-2-2. セルロース電気泳動法

ヒッジの LH を pH5.2 酸性条件 (0.11 M 酢酸緩衝液) で、セルロース・カラム電気泳動をおこなっても、活性は、カラム内にひろく分散し、その比活性もそれほど増加しない。そのことから、この方法は LH の精製には適さないという (Jutisz and Squire, 1961)。ところが pH3.6 (蟻酸緩衝液または酢酸緩衝液) でのカラム電気泳動では、ヒトの LH の比活性は増加した。これは LH と結合しているタンパクが、電気泳動によって除かれたためである、と述べている (Squire *et al.*, 1962)。

pH7.7 (リン酸緩衝液) で、セルロース薄層電気泳動をおこなっている例が、ウマやヒッジの生殖腺刺激ホルモンの精製にある。しかしこの条件では、LH と FSH とを分離することはできない (Saxena *et al.*, 1962; Saxena and Henneman, 1965; Duraiswami *et al.*, 1964)。

一方、pH8.6 (炭酸緩衝液) のアルカリ側条件では、ヒトの LH は、他のタンパク質とかなり良く分離され、比活性増加は約 2.4 倍、回収率は 80% である (Squire *et al.*, 1962; Li *et al.*, 1960)。

これらの報告を信頼するかぎり、アルカリ側におけるセルロース電気泳動は、デンブングル電気泳動よりも、LH の精製という目的に関しては、効果的であろう。しかし、セルロース電気泳動においても、生殖腺刺激ホルモンの精製は、常に一定した良好な結果が、得られているとはいえない。

2-3-2-3. 蔗糖密度勾配電気泳動法

Peckham らは、pH8.6 (0.025 M Tris-HCl 緩衝液) による蔗糖密度勾配電気泳動法を用い、ヒトの生殖腺刺激ホルモンの精製をおこなって好結果を得ている (Peckham and Parlow 1969a, b)。彼らによると、LH は、移動度の異なる LH I, II, III の三種に分けられ、それぞれのホルモン活性は、7.6 単位/mg, 10.7 単位/mg, 8.5 単位/mg であった。しかし、これらの LH 調製物が純粋であるかどうか

かは、TSH 活性がおおきいことから疑問が持たれている。他方、ヒトの FSH は、DEAE セファデックス A50 によって、FSH I と II に分けられるが、さらにこれらの比活性を、蔗糖密度勾配電気泳動 (pH8.0, 0.025 M Tris-HCl 緩衝液) によって、250 単位/mg から、395 単位/mg にまで高めている。

2-3-2-4. 調製用アクリルアミド電気泳動

アクリルアミドゲルによる電気泳動、いわゆる調製用 DISC 電気泳動による生殖腺刺激ホルモンの精製が、近年とくに盛んになった。

Roos and Gemzell (1964) は、ヒトの FSH の DISC 電気泳動による精製を試み、pH8.7, 5% ゲルを用いて、電気泳動をおこなった。そして単一の分画として FSH をとり出したが、泳動による比活性の顕著な増加は見られなかった。その原因として、純粋な FSH は変性しやすいからであろう、と述べている。しかし、Saxena らは、ヒトを試料とし、pH8.1 の DISC 電気泳動を試み、比活性を 63 単位/mg から 185 単位/mg まで、3 倍に増加させ、回収率 60% の結果を得た。この条件では、FSH のほうが LH にくらべて速く移動するために、FSH 調製物中の LH の混入はかなり防ぐことができる (185 単位-FSH/mg, 0.02 単位-LH/mg 以下および 105-160 単位-FSH/mg, 0.05 単位-LH/mg 以下)。このように調製された FSH は、pH4.3 および pH8.6 の分析用 DISC 電気泳動で均質であることが確かめられている (Saxena and Rathnam 1967, 1968)。

また同様に pH8.9, 10% ゲルを用いて、ヒッジの FSH を精製している例もあるが、この調製物を分析用 DISC 電気泳動にかけると、pH4.3 では、単一のバンドを示し均質であるが、pH8.9 では、ゲル中に広くひろがってしまった (Sherwood *et al.*, 1970)。一方、上記の pH8.9, 10% ゲルという条件では、ウマにおいて、FSH と LH とを完全に分離することができなかった、という報告もある (Braserton and McShan, 1970)。

以上のように、調製用アクリルアミドゲル電気泳動を用いることによって、FSH と LH とをかなりうまく分離することができる。しかし、完全に分離することは困難である。また、純化という意味においても、この方法はかなり効果のあることは確かであるが、FSH については、少し疑問が残る。

なを、Saxena and Rathnam (1967) は、調製用アクリルアミド電気泳動では、1 回に精製できる

試料量が限られているので、前もって、pH7.7 のセルロースカラム電気泳動をおこなっておくことをすすめている。

2-3-2-5. その他の調製用電気泳動

以上に述べた以外に, Cahill *et al.* (1968) は, セファデックス G25 のカラムで, pH8.6 リン酸緩衝液を用い, ヒツジの FSH の電気泳動をおこなった。この方法により, 比活性 43 単位/mg の試料を得た。回収率は 60% 程度である。また LH の混入は, 非常に少なかったという。

3-4. 各種の精製方法の組合せ

これまで諸種の精製方法について述べてきたわけであるが, 実際の研究では, これらの諸方法を, 何種類か組合せて用いているのが普通である。そして, その組合せ方は, 研究者ないし研究グループによって特色があり, また同一の研究者でも, 材料によって, また時代によって異なった方法の組合せをとっている。極端に言えば, 論文のひとつひとつで, その方法が異なるとさえ言える。

この章では, ある程度まとまった数の論文を続けて発表しているいくつかの研究グループを選んで, 彼らの用いている方法の組合せを紹介したい。

2-4-1. Reichert らの方法

2-4-1-1. LH の分離

Reichert (1961) は, ウシの脳下垂体の 1.5-3.0 M 硫酸沈殿分画を, アンバーライト IRC-50 のカラムに通し, LH を分離しようとした。しかし, この方法では, TSH の混入が避けられないことから, DEAE セルロースを使用するようになった (Reichert, 1964; Reichert and Parlow, 1964a and b)。そして最終的には, DEAE セルロースを通したものを, さらにセファデックス G100 に通すことによって, 非常にすぐれた分離結果を得た (Reichert and Parlow, 1964b; Parlow *et al.*, 1965b)。この組合せによって得られた試料は, 比活性の上昇にも著しいものがあった (Reichert and Midgley, 1968)。

彼らは上記の方法によって得た試料を, さらに蔗糖密度勾配電気泳動法によって, 比活性を最高 10.7 単位/mg にまで高めているが, その均質性は, いぜんとして TSH の混入があること (0.4 USP 単位 TSH/mg), 分析用 DISC 電気泳動法で, 複数のバンドに分かれることなどから, 疑問が持たれている (Peckham and Parlow, 1969b)。

2-4-1-2. FSH の分離

Reichert らは FSH の分離にも LH と同じ方法を適用している。彼らは通常, 他の多くの研究者と同じように, ヒツジの脳下垂体の硫酸分画をカラムクロマトグラフィーにかけているが, 硫酸分画をカラムにかける前に, クロロフォルム・ブタノール混液 (1:1) によって精製し, FSH の比活性をある程度 (数単位/mg) 高めておいた例もある (Jiang and Reichert, 1964; Reichert and Jiang, 1965)。しかし必ずしもこの種の前処理が特に有効であるかどうかは, 疑問である。さて, 彼ら (Reichert and Parlow, 1964a and b) は, FSH についても, LH と同様に, 硫酸分画を DEAE セルロースのカラムにかけ, 比活性を 2.9 単位/mg にあげ, 次にセファデックス G100 を通し, 94 単位/mg という比活性の高いものを得ている。また彼らは, 後には, この順序を逆にし, セファデックス G100 を通し, FSH, LH 以外の物質をなるべく除いておいてから, CM セルロース, DEAE セルロースを通して, FSH と LH とを分離している (Reichert and Jiang, 1965; Reichert and Midgley, 1968; Parlow *et al.*, 1965b)。Peckham and Parlow (1969b) も, これと似た組合せを用いた。すなわちヒトの脳下垂体を試料とし, はじめに CM セルロースで LH を除き, 次に DEAE セルロース, セファデックス G100 を用い, さらに蔗糖密度勾配電気泳動法によって精製したところ 395 単位/mg という高い比活性の FSH を得た。この試料の LH 活性は, 0.008 単位/mg であった。

2-4-2. Li とその協同者による方法

2-4-2-1. LH の精製

Li らは, ヒツジの脳下垂体の 1.3-2.0 M 硫酸 (pH6.9) 沈殿分画を, アンバーライト IRC-50 のカラムに通し (比活性増加 2.7 倍, 回収率 80%), これをさらにデンプンゲル電気泳動 (pH4.2, イオン強度 0.10, リン酸緩衝液) にかけたが, 最終回収率は 30% 以下となった (Squire and Li, 1958, 1959)。また, デンプンゲルのかわりに, エタノライズドセルロースのカラム電気泳動を用いた例も報告しているが, 17% の活性が, この泳動によって失われてしまったと述べている (Li *et al.*, 1960)。

2-4-2-2. FSH の精製

Li ら (1960) は, デンプンゲル電気泳動と, DEAE セルロースを用い, ヒトの FSH の比活性を, はじめの約 10 倍にあげることに成功したが, LH 活性を除くことはできなかった。また彼らは,

表 1. 生殖腺刺激ホルモンの精製法

a. FSH の精製法

種	研 究 者	洗滌分画法 ¹⁾	クロマトグラフィー 及び電気泳動 ²⁾	FSH 比活性 ³⁾	FSH 回収率	LH 比活性 ⁴⁾	TSH 比活性 ⁵⁾
ヒト	Reichert and Parlow	1964a	W 硫酸分画	DEAEC	94		
	Reichert and Parlow	1964a	W 硫酸分画	G100	85		
	Butt <i>et al.</i>	1964	酢酸・エタノール	CMC, DEAEC, Ca Pi	22	0.3	
	Roos and Gamzell	1965	硫酸	DEAEC, G100, DISC	428	10%	
	Papkoff <i>et al.</i>	1967b	硫酸・メタリン酸	SE C50, G100, CM C50	40 60		
	Saxena and Rathnam	1967	エタノール・硫酸	G100, CMC, DISC	185	30%以下	0.02以下 検出不能
	Saxena and Rathnam	1968	エタノール	G100, CM-C50, DISC	105-160	0.05以下	
	Wilhelmi	1961	W 硫酸分画	CMC, DEAEC, G100, DEAEC-C50	395		
	Peckham and Parlow	1969a	エタノール・硫酸	蔗糖密度勾配電気泳動 DEAEC	20 30	45%	
	Woods and Simpson	1960	エタノール	G100, DEAEC-C50	79	0.06	
ウシ	Hashimoto <i>et al.</i>	1965		G100	58	0.001	
	Hermire and Jutisz	1969			188	32%	0.04
	Sherwood <i>et al.</i>	1970	メタノール・メタリン酸	G100, CM C50, Ca Pi, DISC	3.1		
	Reichert and Jiang	1965	E 硫酸分画, クロマトグラフ・ブタノール	G100	0.56	3%以下	
	Reichert and Midgley	1968	硫酸	G100, DEAEC, IRC 50	90	26%	0.16
	Braselton and McShan	1970	エタノール・メタリン酸	G100, CM-C50, DISC	20	40-50%	
	Steelman	1958	Zn(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ , エタノール・硫酸	DEAEC, Ca-Pi			
	Hartree and Cunningham	1969	酢酸・エタノール, 硫酸	CMC, Ca Pi, DEAEC			

b. LH の精製法

種	研 究 者	洗滌分画法 ¹⁾	クロマトグラフィー 及び電気泳動 ²⁾	LH 比活性 ⁴⁾	LH 回収率	FSH 比活性 ³⁾	TSH 比活性 ⁵⁾
ヒト	Reichert and Parlow	1964b	W 硫酸分画	DEAEC, G100, DEAEC	2.9		
	Reichert and Parlow	1964c	W 硫酸分画	DEAEC, IRC-50	3.2	0.11	0.18 USP 単位
	Butt <i>et al.</i>	1964	エタノール	CMC, DEAEC, Ca-Pi, IRC-50	2		
	Hartree	1966	エタノール	CMC, DEAEC	3.6	55%	0.021 国際 単位
	Peckham and Parlow	1969b	エタノール・酢酸	CMC, G100, DEAEC-C50	10.7		0.4 USP単位
			蔗糖密度勾配電気泳動				

ヒンジ	Reichert and Parlow	1963	硫安, メタリン酸	IRC-50, G100	8.5	0.2 USP 単位
	Papkoff <i>et al.</i>	1965	硫安, メタリン酸	SE-C50, G200	7.6	0.2 USP 単位
	Jutisz and Courte	1968	硫安	DEAEC, G100	4.1~4.6 2以上	
					1.83	0.034 USP 単位
					35%	
ウシ	Reichert	1961	硫安, メタリン酸	IRC-50	1.7	0.05 USP 単位
	Papkoff and Gan	1970	硫安	SE-C50, G100	1.5	0.075 0.1 USP 単位
ウマ	Brasetton and McShan	1970	エタノール, メタリン酸	G100, CM-C50, DISC, G100	9.1	0.1 USP 単位

1) W 硫安分画: Wilhelmi (1961) 硫安分画法

E 硫安分画: Ellis (1958) 硫安分画法

2) DEAC: DEAE-セルロース

CMC: CM セルロース

Ca-Pi: リン酸カルシウムゲル (ハイドロキシアルパタイト)

DEAE-C50: DEAE セフアデックス C50

CM-C50: CM セフエデックス C50

SE-C50: SE セフアデックス C50

G100: セファデックス G100

G200: セファデックス G200

IRC-50: アンバーライト IRC-50

DISC: 急救用 DISC 緊急泳動

FSH 比活性：單位/mg
DISC：調定用 DISC 電

TSH 比活性: 单位/mg
LH 比活性: 单位/mg

HST 比價別表

TSP 車位/mg

USP 單位: 美國藥局萬單位.

TSH 比活性: USP 单位: 米国薬局方单位.

ヒトやヒツジの FSH を、SE セファデックス C50、セファデックス G100、ついで CM セファデックス C50 を通すことにより、LH の混入の少ない試料を得ようとしたが、必ずしも成功していない (Pap-koff *et al.*, 1967a and b)。

比活性も高く (100 単位/ mg 以上), LH の混入も, あったとしても 0.05 単位/ mg 以下の, きわめて純度の高い FSH は, ヒトにおいては, セファデックス G100, ついで CM セルロースもしくは CM セファデックス, そして最終段階で, 調製用 DISC 電気泳動法によって得られている (Saxena and Rathnam 1967, 1968)。ヒツジにおいても, セファデックス G100, CM セファデックス C50, ついでリン酸カルシウムゲルを通し, 最後にやはり, DISC 電気泳動によって高純度の FSH が得られている (Sherwood *et al.*, 1970)。

2-3-4. Jutisz らの方法

Jutisz らも、初期には硫酸分画法、アルコール沈殿法で調製したヒツジの脳下垂体抽出物をアンバーライト IRC50 やリン酸カルシウムゲルを使用して、FSH や LH を精製しようとしたが、あまり良好な結果は得られなかった (Jutisz and Squire, 1961)。そこで、ヒツジの前葉抽出物を、まず DEAE セルロースに通した後、セファデックス G100 の長いカラムに繰り返し、数度通す、という方法を用いて、比活性が、1.8 単位/mg の試料、および 20-30 単位/mg の試料を得た (Jutisz and Courte, 1968; Jutisz *et al.*, 1965; Baron *et al.*, 1968)。その後、このゲル透過の部分で改良しカラムを 2 本連絡することにより、比活性が 58 単位/mg、LH の混在が、0.001 単位/mg 以下という高純度の FSH を得ることに成功した (Hermire and Jutisz, 1969)。この方法では、回収率が非常によいのが、その特徴である。

2-4-4. その他の組合せ

以上に述べた以外にも、リン酸カルシウムゲル、CM セルロース、DEAE セルロースを、Steelman らが、ヒトやブタの脳下垂体抽出物に対して用いているし (Steelman 1958; Steelman *et al.*, 1959), DEAE セルロースとゲル 濾過法の組合せを、Hashimoto *et al.* (1965, 1966) が、ヒツジにおいて用いている。Bettendorf *et al.* (1968) も、ウマの生殖腺刺激ホルモンの精製に、ゲル濾過をくり返し用いている。また Hartree らも、これまで述べてきた諸方法を用いて、ヒトにおいてかなりの成果を報告した (Hartree, 1966; Hartree *et al.*, 1964

and 1968; Hartree and Cunningham, 1969)。

以上の諸方法をまとめてみたのが、表1である。

文 献

- AMIR, S. M. AND S. A. BARKER (1966) *Nature* **299**: 1092-1093.
- BARON, G., M. KAMINSKY ET M. JUTISZ (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **168**: 555-563.
- BETTENDORF, G., M. BRECKWOLDT, P. J. CZYGAN, A. FOCK AND T. KUMASAKA (1968) In: *Gonadotropins*, pp. 13-23, Geron-X, Los Altos.
- BRASELTON, W. E., JR. AND W. H. MCSHAN (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* **139**: 45-58.
- BUTT, W. R., F. J. CUNNINGHAM AND A. S. HARTREE (1964) *Proc. Roy. Soc. Med.* **57**: 107-108.
- CAHILL, C. L., M. R. SHETLAR, R. W. DAYNE, B. ENDECOTT AND Y-T. LI (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **15**: 40-52.
- DURAIWAMI, S., W. H. MCSHAN AND R. Y. MEYER (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **86**: 156-168.
- ELLIS, S. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**: 63068.
- FRANKEL-CONRAT, H. L., M. E. SIMPSON AND H. M. EVANS (1940) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **45**: 627-630.
- GESCHWIND, I. I. (1963) In: *Gonadotropins, Their chemical and biological properties and secretory control*, Freeman, San Francisco and London, pp. 1-39.
- HARTREE, A. S. (1962) *Biochem. J.* **85**: 6p.
- (1966) *Biochem. J.* **100**: 754-761.
- AND F. J. CUNNINGHAM (1969) *J. Endocr.* **43**: 609-616.
- , W. R. BUTT AND K. E. KIRKHAM (1964) *J. Endocr.* **29**: 61-69.
- , J. B. MILLS, R. A. S. WELCH AND M. THOMAS (1968) *J. Reprod. Fert.* **17**: 281-303.
- HASHIMOTO, C., W. H. MCSHAN AND R. K. MEYER (1965) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **21**: 120-125.
- , ——— AND ——— (1966) *Biochemistry* **5**: 3419-3425.
- HELLEMA, M. J. S. (1971) *J. Endocr.* **49**: 393-402.
- HERMIRE, C. ET M. JUTISZ (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **175**: 402-408.
- JIANG, N. S. AND L. E. REICHERT, JR. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **93**: 436-438.
- JUTISZ, M. ET C. COURTE (1968) *Gen. Comp. Endocr.* **11**: 562-574.
- AND B. G. SQUIRE (1961) *Acta Endocr.* **37**: 96-102.
- , C. HERMIRE, A. COLONGE ET R. COURRIER (1960) *Compt. Rend. Acad. Sci.* **250**: 431-435.
- , ———, ——— ET ——— (1961) *Compt. Rend. Acad. Sci.* **252**: 3922-3927.
- , ———, ——— ET ——— (1963) *Compt. Rend. Acad. Sci.* **256**: 3922-3926.
- , ———, ——— ET ——— (1965) *Ann. Endocr., (Paris)*. **26**: 670-682.
- KOENIG, V. L. AND E. KING (1950) *Acta Biochem.* **26**: 219-229.
- LI, C. H., P. G. SQUIRE AND U. GRÖSCHEL (1960) *Arch. Biochem. Biophys.* **86**: 110-116.
- LLOYD, H. M. AND J. D. MEARES (1962) *Acta Endocr.* **39**: 163-174.
- , B. M. BINDON, D. R. LAMOND AND J. D. MEARES (1968) *J. Endocr.* **40**: 313-323.
- OLINER, L., E. GOLD, A. F. PARLOE, C. R. MORGAN AND A. LEPP (1968) *Endocrinology* **83**: 1370-1374.
- PARLOW, A. F., A. E. WILHELMI AND L. E. REICHERT, JR. (1965a) *Endocrinology* **77**: 1126-1134.
- PARLOW, A., P. G. CONDLIFFE, L. E. REICHERT AND A. E. WILHELMI (1965b) *Endocrinology* **76**: 27-34.
- PAPKOFF, H. AND J. GAN (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* **136**: 522-528.
- , D. GOSPODAROWICZ, A. CANDIOTTI AND C. H. LI (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 431-438.
- , ——— AND C. H. LI (1967a) *Arch. Biochem. Biophys.* **120**: 434-439.
- , L. MAHLMANN AND C. H. LI (1967b) *Biochemistry* **6**: 3976-3982.
- PECKHAM, W. P. AND A. F. PARLOW (1969a) *Endocrinology* **84**: 953-957.
- PECKHAM, W. D. AND A. F. PARLOW (1969b) *Endocrinology* **85**: 618-622.
- RATHNAM, P. AND B. B. SAXENA (1970) *J. Biol. Chem.* **245**: 3725-3731.
- REICHERT, L. E., JR. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **53**: 584-586.
- (1962) *Endocrinology* **71**: 729-733.

- (1964) *Endocrinology* **75**: 970-972.
- AND N. S. JIANG (1965) *Endocrinology* **77**: 124-127.
- AND A. R. MIDGLEY JR. (1968) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **128**: 1001-1004.
- AND A. F. PARLOW (1963) *Endocrinology* **73**: 285-293.
- AND ——— (1964a) *Endocrinology* **74**: 236-243.
- AND ——— (1964b) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **115**: 286-288.
- AND ——— (1964c) *Endocrinology* **75**: 815-817.
- AND A. E. WILHELMI (1965) *Endocrinology* **76**: 762-765.
- ROOS, P. AND C. A. GEMZELL (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **82**: 218-220.
- AND ——— (1965) In: *Gonadotropins, Physicochemical and Immunological Properties*, pp. 11-25, Churchill, London.
- , H. R. FEVOLD AND C. A. GEMZELL (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **74**: 525-531.
- SAXENA, B. B. AND P. H. HENNEMAN (1965) *Biochim. Biophys. Acta* **104**: 496-502.
- AND P. RATHNAM (1967) *J. Biol. Chem.* **242**: 3769-3775.
- SAXENA, B. A. AND P. RATHNAM (1968) In: *Gonadotropins*, pp. 3-12, Geron-X, Los Altos.
- SEXENA, B. B., W. H. MCSHAN AND P. K. MEYER (1962) *Biochim. Biophys. Acta* **65**: 394-402.
- SEGALOFF, A. AND S. L. STEELMAN (1959) *Recent Prog. Hormone Res.* **15**: 127-134.
- SHERWOOD, O. D., H. J. GRINEK AND W. H. MCSHAN (1970) *J. Biol. Chem.* **245**: 2328-2336.
- SQUIRE, P. G. AND C. H. LI (1958) *Science* **127**: 32.
- AND ——— (1959) *J. Biol. Chem.* **234**: 520-525.
- , ——— AND R. N. ANDERSEN (1962) *Biochemistry* **1**: 412-418.
- STEELMAN, S. L. (1958) *Biochim. Biophys. Acta*, **27**: 405-406.
- , W. A. LAMONT, W. A. DITTMAN AND E. J. HAWRYLEWICZ (1953) *Proc. Soc. Biol. Med.* **82**: 645-647.
- , A. SEGALOFF AND R. N. ANDERSEN (1959) *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **101**: 452-454.
- WARD, D. N., R. F. MCGREGOR AND A. C. GRIFFIN (1959) *Biochim. Biophys. Acta* **32**: 305-314.
- , E. F. WALBORG JR. AND M. ADAMS-MAYNE (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **50**: 224-232.
- , M. ADAMS-MAYNE, N. RAY, D. E. BALKE, J. COFFEY AND M. SHOWALTER (1967) *Gen. Comp. Endocr.* **8**: 44-53.
- , M. AMOSS, C. M. SWEENEY, W. VALE, J. W. KLEBER AND A. R. GUILLEMIN (1968) In: *Gonadotropins*, pp. 43-49, Geron-X, Los Altos.
- WILHELMI, A. E. (1961) *Canad. J. Biochem. Physiol.* **39**: 1659-1668.
- WOODS, M. C. AND M. E. SIMPSON (1960) *Endocrinology* **66**: 575-584.
- YAMAZAKI, F. AND E. M. DONALDSON (1968) *Gen. Comp. Endocr.* **11**: 292-299.