

# Lithospermum の Gonadotropin 不活化作用 物質に関する知見補遺

## 第 1 編 C 物質の試験管内 Gonadotropin 不活化作用

昭和 34 年 11 月 28 日 受付

信州大学医学部産婦人科学教室 (主任: 岩井正二教授)

研 究 生 伊 藤 寛 治

### Supplementary Studies on the Substance inactivates the Gonadotropic Hormone in the Lithospermum

#### Part I. Action inactivates the the Gonadotropic Homone in Vitro, by the C-Substance

Hiroji Ito

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,  
Shinshu University  
(Director: Prof. S. Iwai)

#### 緒 言

脳下垂体分泌ホルモンのなかでその歴史の最も古い Gonadotropin (以下 G と略称す) は, Long & Evans (1922) の古典的な脳下垂体前葉エキスをを用いての向性腺作用の証明から, 1940 年前後における Li, Evans, Simpson, Greep らの FSH, LH の純化精製, 1949 年 C-laesson の絨毛性 G の結晶化等目醒ましい発展をとげ, 今日では G の生理作用及び化学的組織についてはほぼ解明しつくされたかの感がある<sup>①</sup>。一方, 前立腺癌, 乳癌等の悪性腫瘍の治療, 経口避妊薬としての応用及び更年期障害の治療等の目的で近年 G 抑制物質が注目を浴びてきた。エストロゲンが強力な G 抑制物質として生理的脳下垂体除去効果のあることはすでに Meyer (1930) により知られているが, 最近の注目すべき発見は Lithospermum (以下 L と略称す) の G 効果抑制への応用であろう<sup>②</sup>。

L に属する植物の根, 茎部に G 抑制効果のある物質を含有することは Cranston (1945)<sup>③</sup>により知られ, L. ruderales の浸出液を投与すると動物の性周期は抑制され, 性腺及び附属性器の重量低下を来たと発表した。この作用機転について Cranston (1945)<sup>③</sup> Drasher ら (1946)<sup>④</sup>はおそらく下垂体における G の産生を抑制するのであろうとしたが, Zahl (1948)<sup>⑤</sup>, Plunkett (1950)<sup>⑥</sup>は血中を循環する G を直接不活化するためであろうとした。その後 Noble (1954)<sup>⑦</sup>, Loeser (1955)<sup>⑧</sup>, Graham ら (1955)<sup>⑨</sup>は, in vitro に L 浸出液と G とを直接作用せしめて動物に注射した結果 G 作用のあらわれぬことより, 後者の見解を支持し, 最近 Kemper ら (1958)<sup>⑩</sup>も L 抽出液が in vitro,

in vivo で G 及び Thyrotropin の働きを遮断することを認め, その作用機序は前葉ホルモン自身の影響なしに下垂体からの分泌後に上記ホルモンを不活化するにあるとし, 同様の見解を発表している。しかし, いずれも L の粗抽出液を使つての実験であり, L の試験管内 G 不活化作用の本体に関してはまだ明らかでなく, 従つて生体内における L の G 抑制効果の機序についても不明の域を脱していない。吾が教室では数年前から L の有効成分につき研究し<sup>⑪-⑭</sup>, ① L にはフマル酸, 無水コハク酸及び所謂 C 物質が存在し, ② 長期投与の際にみられる性腺・副性器の萎縮はフマル酸によるものであり, ③ 試験管内での G 不活化作用は C 物質によることがわかつたが, ④ L の生体内抗 G 有効物質はなお不明である。著者は, L の抗 G 効果が血中循環 G に対する直接不活化作用であるとの最近の支配的見解に鑑み, その有効物質と考えられる C 物質の試験管内 G 不活化作用に関して, 更に深く研究する必要を認め先づ不活化作用に際しての G と C 物質の量的関係及び対生体作用等を Mainini 反応によつて実験し, またラツテ子宮重量法, Friedman 反応及び濾紙電気泳動を応用した場合の成績とトリプシリン, チステイン等既知 G 不活化作用物質による成績と比較して, 従来 Mainini 反応によつて C 物質が示す試験管内 G 不活化作用の作用本体を究明すべく本編の実験を行つた。

#### 第 1 章 Mainini 反応による実験

##### 第 1 節 不活化作用の温度との関係

実験方法: PuG 100iu と C 物質 1.0mg を試験管内に混合した溶液を 50°C, 37°C, 21°C, 4°C におき, Mainini 反応で C 物質が PuG を不活化するに要する

時間を追求した。すなわち、1群2～3正のγを用い、各温度5群につき、10分、20分、30分、40分、60分間作用せしめたものについて排精の有無を観察した。

実験成績：成績は表1のごとく、50°Cでは20分、37°Cでは40分、21°C及び4°Cでは60分間の作用でPuG 100iuによる排精は認められなくなる。

表1. 不活作用の温度と作用時間との関係

作用時間	10分	20分	30分	40分	60分
50°C	3/3	0/3	0/2	0/2	0/2
37°C	3/3	3/3	1/3	0/3	0/3
21°C	3/3	3/3	2/3	1/3	0/3
4°C	2/2	3/3	3/3	2/3	0/2

PuG 100iu.+C 1.0mgの排精匹数

従つて以後の実験には37°C、1時間作用せしめることとした。

#### 第2節 不活化に対するGとC物質の量的関係

実験方法：GとC物質を混合し、一定時間作用せしめるとGの排精作用が消失することは事実であるが、その場合Gが悉無律的に不活されるかまたはG量とC量との間に相関関係があるかをみるため、PuG, Synahorinの一定単位（前者50, 100, 200, 300, 500iu, 後者30, 50, 100, 200, 300KE）の夫々に対してC物質の一定量（0.125～10.0mg）を混合した場合のMainini反応に於ける排精の状態を観察した。

実験成績：PuGに対して行つた実験成績は表2のごとく、またSynahorinにおける成績は表3の通りで、Gの単位が増大するにつれて、これを不活化するに要するC量もほぼ一定の割合に増大し、両者の間に相関性がみとめられる。

#### 第3節 妊婦尿・血清G不活化に要するC量と妊娠月数との関係

実験方法：前節の実験により、Gの量と比例してこれを不活化するC物質の量も増大することがわかつたが、不活化に要するC物質の最小量から逆にGの定量が可能であると考えられるので、各妊娠月数の妊婦の尿、血清（数名分混合）中のG量の変動をみるため、1群3正のγの各群にC物質の一定量（1～15mg）を混合し37°C 1時間おいた材料を注射し、排精が阻止されるC物質の量を求めた。

実験成績：成績は表4, 5の如くこれを図示すると図1の如くで、血清中G不活化に要するC量は妊娠10カ月を除く他の妊娠月では尿中Gに対する量より少い

表2. 不活化に対するPuGとC物質の量的関係

PuG (iu)	50	100	200	300	500
C量 (mg)					
0.25	+++				
0.5	---	+++	++++	++++	
1.0	---	---	+++	++++	++++
2.0	---	---	++	+++	
3.0		---	---		
4.0				+-	+++
5.0	---	---	---	---	+++
6.0				---	+++
7.0				---	++
8.0					---
10.0					---

表3. 不活化に対するSynahorinとC物質の量的関係

Syn. (K.E.)	30	50	100	200	300
C量 (mg)					
0.125	+++	+++	++		
0.25	++	++	++		
0.5	---	++	++		
1.0	---	---	++	++	++
2.0	---	---	++		
3.0		---	++	+++	+++
4.0			+++		
5.0	---	---	---	+++	+++
6.0				+++	
7.0				++	+++
8.0				---	+++
10.0				---	---

が、大体妊娠2, 3, 4カ月頃にはG最も高単位を示し、妊娠10カ月にまた多小増大する傾向は従来の知見とほぼ一致する。

#### 第4節 C物質の対生体（精巣）作用

C物質はGを不活化してMainini反応による排精作用を消失せしめ、また不活化に要するC量はG量に比例することは前節の実験から明らかであるが、この場合Gと混合されて注射されたC物質が生体特にγ精巣に対して作用し造精乃至精子の排泄を阻害することと考えられないことはない。またC物質混合G注射によつて排精をみなかつた精巣の状態を組織学的に検索することは不活化の程度をも明かにし得て興味あるところである。

#### 第1項 C物質投与後G注射時Mainini反応

実験方法：C物質がγ精巣等に作用してMainini

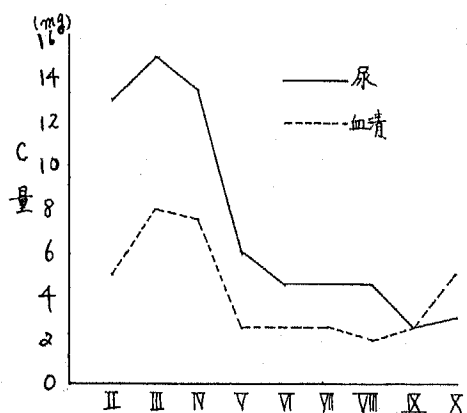
表 4. 妊婦尿中G不活化に要するC量と妊婦月数との関係

妊娠月数 排精(1群3正)	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
2/3以上無排精 (mg)	13	15	14(〜13)	2	3	1	3(〜2)	1	1(〜4)
全部無排精 (mg)	13	15	14(〜13)	6	5(〜4)	5(〜4)	5(〜4)	3(〜2)	1〜5

表 5. 妊婦血清中G不活化に要するC量と妊婦月数との関係

妊娠月数 排精(1群3正)	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
2/3以上無排精 (mg)	5	7	8(〜7)	1	1	3(〜2)	2	2	5
全部無排精 (mg)	5	8	8(〜7)	3(〜2)	3(〜2)	3(〜2)	2	3(〜2)	5

図 1. 尿・血清中G不活化に要するC量と妊婦月数との関係



反応による排精を阻止するものか否かをみるため、先ず予めC物質を1mg及び10mg注射し、その直後、10分後、30分後、60分後及び120分後にPuG 100iuを注射して排精の有無を検した。なお室温にて試験管内混合60分後のものを対照においた。

実験成績：成績は表6の如く、対照を除き1群3正中2正以上排精が阻止されたものはなかった。

#### 第2項 アドレナリン排精に対する作用

神保・竹内ら(1948)<sup>17)</sup>は、トノサマ蛙は微量のアドレナリンにより妊娠反応と同様の排精作用をあらわすことを発見し、その機序としてアドレナリンが主として体液性に精巣に働いて排精を起させるもので、副腎皮質は関係があるが脳下垂体はアドレナリン排精に関与しないことを立証した<sup>18)</sup>。著者はC物質の対精巣作用究明の一助としてC物質のアドレナリン排精に対する作用につき実験した。

実験方法：予備実験によりトノサマ蛙に対するアドレナリン使用量を10,000倍液0.8ccと決め、Gを用い

表 6. C物質投与後 PuG (100iu) 注射による Mainini 反応

C 量	注射間隔	排 精		
1mg	直 後	+	+	-
	10 分	+	+	+
	30 分	+	+	+
	60 分	+	+	+
	120 分	+	-	+
	対 照	-	-	-
10mg	直 後	+	+	+
	10 分	+	-	+
	30 分	+	+	+
	60 分	+	-	+
	120 分	+	+	+
	対 照	-	-	-

対照は試験管内混合、室温60分後

た実験の場合と同様、アドレナリンをC物質(3mg及び5mg)と混合し37°Cに1時間おいた後注射して排精の有無をみ、またC物質(5mg)注射直後、10分後、20分後にアドレナリンを注射して排精の有無を観察した。

実験成績：成績は表7、8の如く、混合投与した場合も、別々に投与した場合もすべて排精がみられ、C物質の精巣に対する直接作用は除外できると考えられる。

#### 第3項 精巣の組織学的所見

実験方法：上記によりC物質は精巣に作用するものではなく、試験管内にてGに直接作用して不活化せしめ、Gによる排精を阻止せしめると考えられるが、不活化の程度を探究するため、C物質混合G注射により排精の認められなかったガマ精巣について、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し組織学的に検索を行った。

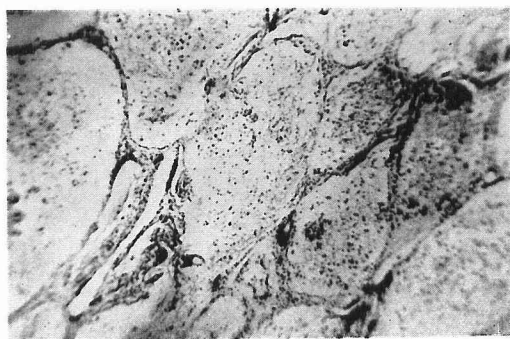
表 7. C物質混合アドレナリン注射による Mainini 反応

混合C量	カエル番号	排 精		
		1 時 間	2 時 間	3 時 間
3mg	1	++	++	++
	2	++	++	++
	3	++	++	+
	4	+	+	+
	5	++	++	++
5mg	6	+	+	+
	7	++	++	++
	8	++	++	++
	9	+	++	++
	10	++	++	++
	11	+	+	++
	12	++	++	++

表 8. C物質 (5mg) 注射後アドレナリン注射による Mainini 反応

注射間隔	排 精		
	1 時 間	2 時 間	3 時 間
直 後	+	++	+
	++	++	+
	++	++	+
10 分	++	++	++
	++	++	++
	+	++	++
20 分	+	+	++
	++	++	+
	++	++	++

図 2. 無処置のガマ精巢



実験成績：無処置ガマ精巢にはわずかに精子の散乱的存在を認め (図2)，PuG 100iu により排精した精

巢でも精子はほとんど認められないか或は数個の存在を認める (図3) に対して，PuG 100iu とC物質 1mg，或は Synahorin 100KE とC物質 5mg とを混合し 37°C 1時間後に注射して排精の認められなかつた精巢組織には未だ排精されない精子の充満がみられ (図4, 5)，C混合注射ガマでは，排精はないが造精は強く認められる。G排精作用不活化に要するC物質の最小量を用いた成績ではあるが，これらの量ではな

図 3. PuG 100iu により排精せるガマ精巢

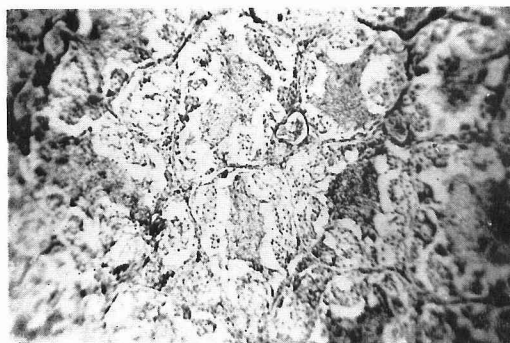


図 4. PuC 100iu+C物質 1mg による非排精ガマ精巢

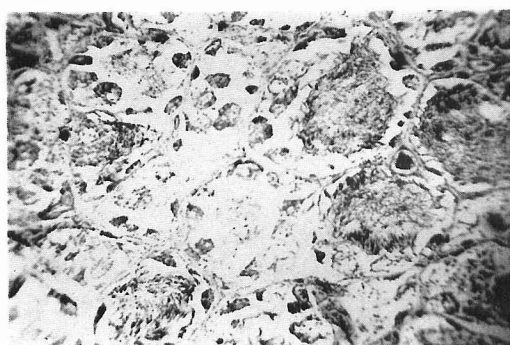


図 5. Synahorin 100KE+C物質 5mg による非排精ガマ精巢

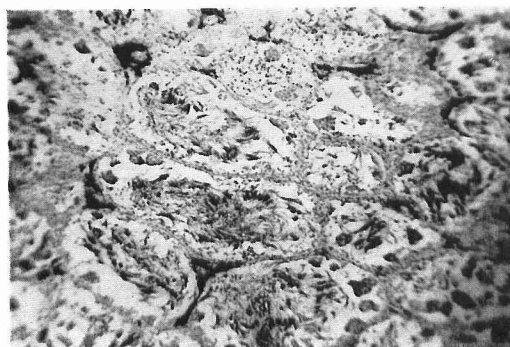


表 9.

ヨモギ抽出物混合 G による Mainini 反応

G 種 類	PuG 50i. u.						Synahorin 30 K E.					
混 合 量 (mg)	10	20	30	50	100	対照	10	20	30	50	100	対照
陽 性 疋 数	4/5	3/5	3/5	2/5	3/5	5/5	4/5	2/5	3/5	4/5	2/5	5/5

G 作用が残っており、C 物質によつて完全に不活化されるまでに至っていないことがわかる。

#### 第5節 ヨモギ抽出物混合 G による Mainini 反応

実験方法：C 物質が Lithospermum (ムラサキ草) に特異的に存在するか否かを知るためには多種の植物について実験せねばわからぬが、Lithospermum に比較的類似した植物ヨモギを用いて、Lithospermum からの C 物質の抽出と同様の抽出過程で得た黒褐色物質について G (50iu, Synahorin 30KE) 不活化作用の有無を検した。

実験成績：成績は表 9 の通りで、G に対する不活化作用は認められない。

#### 第6節 小 括

以上の成績を小括すると、(1) Mainini 反応を指標とする C 物質の PuG 100iu に対する試験管内不活化に要する作用時間は 50°C では 20 分、37°C では 40 分、21°C 及び 4°C では 60 分であつた。(2) G 単位が増大するに比例して、これを不活化するに要する C 量も増大し、所謂 C 量から逆に G の定量が可能であると考えられるところから、これによつて妊娠各月数の妊婦尿及び血清中の G 量をしらべたところ従来の知見とはほぼ一致する成績が得られた。(3) G 注射前に C 物質を投与しても排精は阻止されず、またトノサマ蛙のアドレナリン排精に対して C 物質はほとんど影響しない。従つて G 及び C 物質混合注射により排精が認められないことには C 物質の生体 (精巣) への直接作用は関与せず、試験管内にて C 物質が G 作用を不活化せしめるためと推測される。(4) G 及び最小量の C 物質混合注射にて排精をあらわさなかつたガマ精巣を組織学的に検索し、排精は認められないが造精が強くみられるところから、排精阻止が必ずしも G に対する完全不活化を意味するものでないことがわかる。(5)

Lithospermum に類似したヨモギ成分中には C 物質と同じ作用をもつ物質は存在せず、C 物質は Lithospermum に特有な物質であるように考えられる。

#### 第2章 ラツテ子宮重量法による実験

C 物質が、Mainini 反応を指標とした場合、G との混合注射により排精を認めず、試験管内で G を不活化すると考えられるが、次に FSH 検定を主とするラツテ子宮重量法を指標として同様の実験を行つた。

実験方法：体重 6-8gr の幼若雌マウスを使用し、1 群 3 疋として、一定量の G (Synahorin, PuG) または G と C 物質の一定量を混合したものを 37°C 1 時間おき、これを 1 日 1 回 0.5cc ずつ 3 日間注射し、第 1 日目から 4 日目に屠殺、子宮を摘出後食塩水にて洗い、周囲の結合組織を十分剥離除去した後濾紙で乾燥させ、化学天秤で秤量した<sup>19)</sup>。

実験成績：先づ Synahorin (2-9KE) 単独注射による子宮重量変化は表 10 の如く、また Mainini 反応にて排精の起らない Synahorin と C 物質の混合量 (3 KE+C 0.05mg, 5KE+C 0.1mg, 10KE+C 0.5mg) を注射した場合の子宮重量は表 11 の如くで、図 6 にみ

表 10. Synahorin 注射によるラツテ子宮重量の変化

Syn. (KE)	子 宮 重 量 (mg)			
2	5.5	4.5	8.5	平均 6.06
3	6.5	6.0	8.5	7.00
4	6.0	8.5	16.5	10.33
5	7.0	10.0	17.5	11.50
6	14.0	12.5	11.5	12.66
7	11.0	19.0	16.2	15.40
8	22.5	20.5	16.5	19.66
9	22.0	20.0	18.5	20.16
対 照	5.5	5.0	4.5	5.0

表 11. C 物質の試験管内 Synahorin 不活作用のラツテ子宮重量法における成績

混 合 注 射 量	子 宮 重 量 (mg)	平 均 値	無処置対照	Syn 単独対照
Syn 3KE + C 0.05mg	(4.5) (5.5) (5.5)	5.16	5.5	7.83
Syn 5KE + C 0.1mg	(5.5) (8.5) (6.0)	6.66	5.5	12.00
Syn 10KE + C 0.5mg	(8.5) (7.0) (5.5)	7.00	5.0	21.00

るように, Synahorin 単独では, 単位の増加とともに子宮重量は大体直線的に急上昇を示すが, C物質混合の場合にはその混合量が微量なるにもかかわらず子宮重量の増大は緩かな上昇曲線を示している。又 PuG を使つて同様に実験を行つた成績は表12, 13及び図7にみるごとくで, C物質によつて PuG の FSH作用が

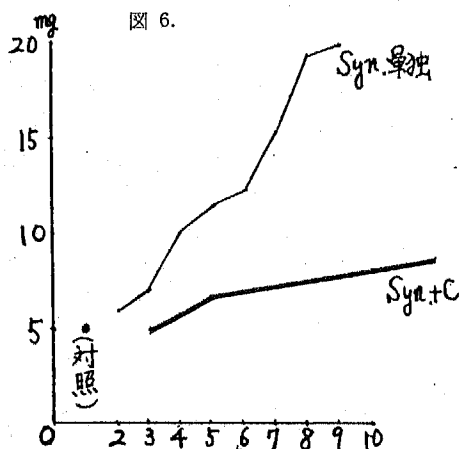
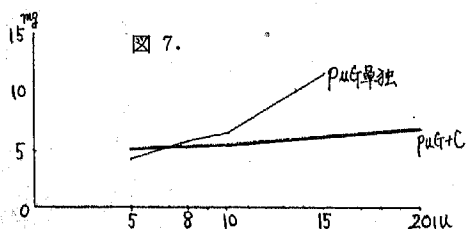


表 12. PuG 注射によるラッテ子宮重量の変化

PuG (iu)	子宮重量 (mg)			
2	7.0	5.5	4.0	平均5.50
5	4.0	4.0	5.0	4.33
8	7.0	5.0	6.0	6.00
10	7.0	6.0	7.0	6.66
15	13.0	12.0	10.0	11.66
対 照	5.0	5.5	5.0	5.17

表 13. C物質の試験管内 PuG 不活化作用ラッテ子宮重量法の成績

混合注射量	子宮重量 (mg)	平均値
PuG 5iu + C 0.05mg	(6.0) (5.0) (5.0)	5.33
PuG 10iu + C 0.1mg	(7.0) (5.5) (4.0)	5.50
PuG 20iu + C 0.3mg	(8.5) (5.0) (7.0)	6.83



抑制されていることがわかる。

以上は Mainini 反応にて排精をあらわさない C物質の最小量を用いた実験であるが, これによつて C物質は FSH に対してかなり強力な不活化作用のあることが推測される。

### 第3章 Friedman 反応による実験

#### 第1節 不活化作用の Friedman 反応における実験

実験方法: G に対して, Mainini 反応にて排精を阻止する C物質の最小量, すなわち, PuG 50iu: C 0.5 mg, 100iu: 1mg, 200iu: 2mg, 300iu: 5mg, 500iu: 8mg, Synahorin 30KE: 0.5mg, 50KE: 1mg, 100 KE: 5mg を混合 37°C, 1時間おいたもの, 及び C量を更に増加して PuG 50iu に対して 2mg, 5mg, 8mg, 10mg, Synahorin 30KE に対して 2mg, 5mg, 8mg, 10mg を混合 37°C, 1時間おいたものについて Friedman 反応を実施し, 24時間後排卵の状態を検した。検体はすべて Mainini 反応を行つて排精を起さぬことを確めた。

実験成績: 成績は表14, 15の如くで Mainini 反応では排精のあらわれぬ最小量の C物質を Gに混合作用せしめた場合も, C量を更に 4~20倍に増量して作用せしめた場合も, いずれにもほとんど全部に排卵が認められ, 家兎排卵を指標とする限り, 37°C, 1時間の作用では Gonadotropin の不活化は証明されない。

Mainini 反応では陰性を示すものが Friedman 反応では何故陽性にあらわれるかについては, 現今両者とも発現機序は LH の性巣に対する直接作用<sup>20)</sup>と考えら

表14. C物質の試験管内 G 不活化作用の Friedman 反応における成績 (その1)

G種類	単位	混合C量	Mainini 反応	出血点 左	出血点 右	Friedman 反応
PuG	50iu	0.5mg	(-)	+	+	+
	100iu	1mg	(-)	+	+	+
	200iu	2mg	(-)	+	+	+
	300iu	5mg	(-)	+	+	+
	500iu	8mg	(-)	+	+	+
				+	+	+
Syn.	30KE	0.5mg	(-)	+	+	+
	50KE	1mg	(-)	-	-	-
	100KE	5mg	(-)	+	+	+

表15. C物質の試験管内G不活化作用の  
Friedman 反応における成績 (その2)

G種類	単位	混合 C量	マイニ 反応	出血点		フリードマ ン反応
				左	右	
PuG	50iu	2mg	(-)	+	+	+
		5mg	(-)	+	+	+
		8mg	(-)	-	+	+
		10mg	(-)	+	+	+
Syn.	30KE	2mg	(-)	+	+	+
		5mg	(-)	+	+	+
		8mg	(-)	+	+	+
		10mg	(-)	+	-	+

れているが、Friedman 反応をあらわさぬ下垂体、妊馬血清Gでも Mainini 反応では排精し(古賀)<sup>21</sup>、排卵作用と排精作用とは全く異つた生物学的反応であるためと解され、また卵巣と精巣の感受性の相違<sup>22,23</sup>も関係するものと考えられる。

### 第2節 排卵時間に及ぼす影響

実験方法: 前節の実験で Friedman 反応による排卵は陰性化されなかつたが、これだけではGに対する量的影響は不明であるので、本節では排卵を示すまでの時間に変化があるか否かを観察してその影響を覗うべく実験した。すなわち、PuG 500iu水溶液を静注した家兎と、これにC物質 8mgを混合 37°C 1時間おいたものを静注した家兎について排卵までの時間を観察し、また、PuG 500iuの局方ゼラチン溶液を筋注した家兎と、これにC物質 8mgを作用せしめたものを筋注した家兎の排卵時間を比較した。なお、卵巣所見は腹窓法<sup>24,25</sup>すなわち、脊部皮膚の中央を切開し切開部より左右側方に各 4cm 平方の皮膚を切除して卵巣を露出せしめ、皮膚切除部に写真フィルムを皮部に縫合して卵巣が外からみえるようにしておいて、家兎は固定器に固定したままとし、8, 16, 20, 24, 28, 36, 40, 44, 48時間目に観察し排卵の有無をみた。

実験成績: 成績は表16のとおりで、PuG 500iu単独静注例では24~28時間、C物質混合静注例では36~40時間で排卵し、後者は前者よりかなり遅延して排卵が認められ、また PuG 500iuゼラチン液筋注例では40時間後に排卵を認めたが、同じくC物質混合注射例では48時間後にもなお排卵は認められなかつた。すなわ

ち、GにC物質を混合し 37°C 1時間おいた場合には、C物質は Friedman 反応で排卵を阻止する程に強力でGを不活化するまでには至らないが、試験管内で或る程度の不活化作用をあらはしているものと考えることができる。

表 16. C物質混合注射の家兎 PuG 排卵時間に及ぼす影響

時間	注射法	水溶液静注		ゼラチン溶液筋注	
		PuG 500iu		PuG 500iu	
		+	+	+	+
8	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
24	±	-	-	-	-
28	+	-	-	-	-
36	+	±	-	-	-
40	+	+	+	-	-
44	+	+	+	-	-
48	+	+	+	-	-

### 第3節 小括

以上の成績を小括すると、(1) 37°C, 1時間におけるC物質の試験管内G不活化作用は、Mainini 反応では著明に証明されるが Friedman 反応による排卵は阻止されない。これには両反応の生物学的相異と性巢の感受性の相異が関係していると考えられる。(2) しかしC物質を作用せしめたG注射例ではG単独注射例にくらべて排卵時間が延長することから、37°C, 1時間の作用の間に或る程度Gを不活化しているといふことができる。

作用時間を延長せしめた場合については次章第2節の実験に譲る。

### 第4章 トリプシン、チステインの試験管内G不活化作用

従来 HCG は加熱により破壊されるほか、試験管内にて Ketone により不活化され (LH の自由アミノ基のアセチル化による)、結晶トリプシンは FSH には比較的影響が少ないが LH を破壊し、またチステインは LH を強力で破壊し FSH をも徐々に破壊する等の事実が知られている<sup>26,27</sup>。そこで本節では、C物質の代りにトリプシン及びチステインを用いて、試験管内G不活化作用につき Mainini 反応及び Friedman 反応を指標として実験を行い、C物質による先きの成績と

比較した。

### 第1節 Mainini 反応による実験

実験方法: PuG (50, 100iu), Synahorin (30, 50 KE) にトリプシン或はチステインの 1, 3, 5, 8, 10mg を夫々混合し, 37°C に2時間おいたのち1群3疋ずつのガマに注射して排精の有無をみた。

実験成績: トリプシンによる成績は表17に, またチステインによる成績は表18に示した如く, トリプシンでは5mg 以上, チステインでは3~5mg 以上混合作用せしめた際に排精は失われ, 量的にC物質には多少劣るがGに対するかなり強力な排精阻止作用が認められる。

### 第2節 Friedman 反応による実験

#### 第1項 38°C, 2時間作用せしめた場合

実験方法: PuG (50iu), Synahorin (30KE) に, トリプシンは8mg, チステインは5mg を混合, 38°C, 2時間後1群2疋ずつの家兎耳静脈に注射し24

時間後排卵の有無を検した。また同じ検体について Mainini 反応を行い排精陰性なることを確めた。

実験成績: 表19, 20に示した如く, トリプシンを PuG に混合した2疋中の1疋及びチステインを Synahorin に混合した2疋中の1疋に陰性であつたが他はいずれも陽性で, C物質における成績と同様に, 従来G破壊作用の明らかにされている上記2物質を用いた場合でも, 38°C, 2時間作用により Mainini 反応では排精が阻止されるのに Friedman 反応では排卵を惹起することを知り得た。

#### 第2項 38°C, 20時間作用せしめた場合

実験方法: 上記と同じ混合比とし, 作用時間を延長して20時間後に注射して排卵を検した。なお, その間におけるG力価の低下を考慮し, Gの同単位のものと同条件において対照とした。またC物質についても同時に実験を行つた。

実験成績: 成績は表21の如く, トリプシン, チス

表 17. トリプシンの試験管内G不活化作用

G種類	混合Tryp.量 単位	1mg	3mg	5mg	8mg	10mg	対 照
PuG	50iu	+++	---+	---	---	---	+++
	100iu	++-	+++	---	---	---	+++
Syn.	30KE	+++	+++	---	---	---	+++
	50KE	+++	++-	---	---	---	+++

(38°C, 2時間)

表 18. チステインの管試験内G不活化作用

G種類	混合Cyst.量 単位	1mg	3mg	5mg	8mg	10mg	対 照
PuG	50iu	++-	---	---	---	---	+++
	100iu	++-	---	---	---	---	+++
Syn.	30KE	+++	---	---	---	---	+++
	50KE	++-	++-	---	---	---	+++

(38°C, 2時間)

表19. トリプシンの試験管内G不活化作用の  
Friedman 反応における成績

G種類 単 位	混 合 Tryp.量	マイニー ニ反応	出 血 点 左 右	フリード マン反応
PuG 50iu	8mg	-	+	+
Syn. 30KE	8mg	-	+	+

(38°C, 2時間)

表20. チステインの試験管内G不活化作用の  
Friedman 反応における成績

G種類 単 位	混 合 Cyst.量	マイニー ニ反応	出 血 点 左 右	フリード マン反応
PuG 50iu	5mg	-	+	+
Syn. 30KE	5mg	-	+	+

(38°C, 2時間)

テイン、C物質ともに38°C、20時間作用せしめた後の本実験では排卵は認められず、Friedman反応によってもC物質の試験管内G不活化作用を証明し得るものであり、ただ長時間作用せしめることが必要であることがわかる。また、C物質がG破壊作用を有する既知物質のトリプシン、チステインと同様な成績を示すことは興味あるところである。

表21. トリプシン、チステイン、C物質の試験管内G不活化作用のFriedman反応における成績

混合物質 (量)	G種類・単位	マイニ ニ反 応	出血点		フリー ドマン 反応
			左	右	
トリプシン (8mg)	PuG 50iu	—	—	—	—
	Syn. 30KE	—	—	—	—
チステイン (5mg)	PuG 50iu	—	—	—	—
	Syn. 30KE	—	—	—	—
C物質 (0.5mg)	PuG 50iu	—	—	—	—
	Syn. 30KE	—	—	—	—

(38°C, 20時間)

### 第3節 小 括

以上を小括すると、(1) HCG に対して破壊作用を有するトリプシン及びチステインは、C物質よりやや大量を要するが試験管内でGと混合し38°Cに2時間作用せしめてMainini反応を行うと排精はみられなくなるが、Friedman反応ではなお陽性にあらわれる。(2) しかし38°Cに20時間作用せしめるとFriedman反応でも排卵は認められず、C物質においても同様である。(3) 従つてC物質はトリプシン、チステイン等のG破壊物質と同様に試験管内でCを破壊することがこの実験から観られる。

### 第5章 濾紙電気泳動による実験

前章の実験において、Friedman反応の成績から、C物質がトリプシン、チステインと同様に試験管内でGを不活化することがほぼ明らかになったが、更にこれを濾紙電気泳動による泳動像の所見から観察した。Proteohormoneの濾紙電気泳動はMichl et al (1951), Dustin et al (1952), Stran & Seeger (1953, 1954)により行われ<sup>27)</sup>、Stranら、梶原(1954)<sup>28)</sup>、Butt (1956)<sup>29)</sup>、小西 (1958)<sup>30)</sup>らの臨床的応用の報告があるが、従来の生物学的検定から脱却して化学的にGを検定する手段として近年多方面で試みられている。

### 第1節 G不活化物質混合Gの濾紙電気泳動像

実験方法：GはPuG及びSynahorinを用い、これにC物質、トリプシン、チステインを夫々混合38°C、2時間後濾紙電気泳動を行い、それらの像の異同を観察した。なお予備実験の結果、明瞭なSpotの得られるG単位はPuGでは200iu、Synahorinでは10KEであつたので、Gはこれらの単位及びその倍量を用いて実験した。

泳動法には小林式濾紙電気泳動装置を用い、緩衝液はBarbital液を使用した。1cmにつき0.2mAすなわち5mAの定電流を流して2時間泳動したが、Spotを一層明瞭にするため5Vの電圧をかけSpot中に点状像があらわれるようにした。

実験成績：得られた泳動像の一部を示すと図8~11の如くである。

すなわち、G単独を泳動せしめた場合に比し、トリプシン、チステイン、C物質等を作用せしめた場合は、泳動によつて生ずるSpotは同様に極めて稀薄となり、時には全く認められなくなる。

### 第2節 濃縮法応用による混合Gの濾紙電気泳動像

実験方法：GにC物質を作用せしめて濾紙電気泳動を行うときは濾紙にC物質の褐色色調が残るためこれを取り除く目的と、C物質により破壊、不活化されたあとの検体を通常のG濃縮法に従い濃縮した際に、更に泳動によつて証明される程度の量のGが残存するか否かを検するため、検体に4倍量の純アセトンを加え、十分に攪拌してそのまま室温に30分間静置し、そのあと2000回転5分間遠沈して上清を取り除き、得たる沈渣を乾燥せしめた後蒸溜水0.1ccに溶解して泳動せしめた。対照のGも同様操作により再現せしめた結晶固形物を0.1ccの蒸溜水に溶解して泳動を行つた。

実験成績：Synahorin 10KEにC物質0.25mgを38°C、2時間作用せしめた1部の成績を図12に示したが、Spotにあらわれる程のG物質の残存は証明されなかつた。

### 第3節 小 括

C物質のG不活化が試験管内にて直接Gに作用してこれを変性不活化することを濾紙電気泳動像から立証した。

### 第6章 総 括

Lの作用に関しては、Cranston (1945)<sup>31)</sup>の発表以来多数の報告があり、Lの水性エキスには、動物実験にて性周期の可逆的抑制及び性腺・附属性器・胸腺の重量低下 (Cranston 1945<sup>31)</sup>, Drasher 1949<sup>32)</sup>), 副腎重量の低下 (Plunkett & Nable 1951<sup>33)</sup>, Skeleton &

Grant 1951<sup>(3)</sup>, Slusher 1954<sup>(2)</sup>)等のG効果抑制作用のあることが報告されている。その作用機序については、下垂体におけるG産生の抑制説(Cranston 1945<sup>(3)</sup>, Drasher & Zahl 1946<sup>(4)</sup>, Cranston & Robinson 1949<sup>(5)</sup>), 血中循環Gの不活化説(Zahl 1948<sup>(6)</sup>, Plunkett, Colpitts & Noble 1950<sup>(6)</sup>, Loeser & Mikuliz 1955<sup>(9)</sup>, Kemper & Loeser 1958<sup>(10)</sup>)などがあり、一致しないが後者の説を信ずるものが多い。

Lの水性エキスを諸種Gを試験管内で不活化することは Noble, Plunkett & Graham (1954)<sup>(7)</sup>により発見され Graham & Noble<sup>(8)</sup>によれば単なる酸化によつては不活化は起らず、一旦不活化されたものは再び活性とはならないと述べているが、本体はまだ明らかにされていない。先きに教室の石井・福沢ら<sup>(9)~(10)</sup>はLの化学的抽出によりC物質を分離し、これがLの試験管内G不活化作用物質であることを明らかにしたが、著者はC物質のG不活化作用に関して更に深く研究を行い、以下の好成績を得た。

(1) C物質が試験管内にて諸種Gを不活化することは既に明かにされているところであるが<sup>(4)</sup>, 先づ不活化作用の温度との関係をみると大体 37°C, 40分で不活化されることが Mainini 反応で証明される。またG単位が増大するに比例してこれを不活化するに要するC量も増大し、両者の量的関係に相関性がみとめられる。従つて所要C量から逆にGの定量が可能であることが考えられ、実際に妊娠各月数の妊婦尿・血清中のG量の経過を観察したところ従来の知見とはほぼ一致する成績が得られた。しかし Mainini 反応を用いた場合のC物質のG不活化作用がC物質の精巣に対する直接作用によることも考えられるので、G注射前にC物質を投与し、またはトノサマ蛙のアドレナリン排精にC物質を併せ投与してみたが影響はなく、G及びC物質混合注射で排精のなかつたgamma精巣を組織学的に観察しても精巣に対する障害作用は否定できる。一方L類似植物のヨモギ成分中にはC物質と同作用をもつ物質は証明されず、従つてC物質はLに特異な成分であるか、Lに他の類似植物より大量に含まれる成分であるように考えられる。

(2) Mainini 反応を指標とした場合にはC物質の試験管内G不活化作用は極めて明瞭に表現されるが、FSH 検定を主とするラツテ子宮重量法を指標としても、C物質を作用せしめたGでは子宮重量の増大は甚だ軽度で、これによつてC物質はFSHに対してかなり強力な不活化作用のあることが推測される。しかし、Friedman 反応の排卵を指標として実験してみる

と、C物質を 37°C に 1 時間作用せしめたGを注射した場合排卵は大部分陽性である。これには両反応の生物学的相異と性腺の感受性の相異が関係すると思われるが、しかしC物質を作用せしめたG注射例ではG単独注射例にくらべて排卵時間の延長が認められ、37°C 1時間の作用の間に或る程度Gは不活化されるとみることができ、Gに対するC物質の作用時間を延長(20時間)すると Friedman 反応でも排卵を起さなくなる。

(3) HCG は加熱によつて破壊されるのみならず、LH はトリプシン、チステインによつても破壊されることが従来から明らかにされている。そこでこれら両薬剤をC物質の代りに用いて 38°C 2時間で試験管内G不活化作用につき Mainini 反応及び Friedman 反応を行つてみると、排精は認められないが排卵は陽性にあらわれ、C物質の場合と同様であつた。しかし、Gに対する作用時間を延長せしめ20時間後に反応を実施すればC物質と同様排卵を示さず、従つてC物質はトリプシン、チステイン等のG破壊物質と同様にG(LH)を不活化すると考えることができる。また、C物質がトリプシン、チステイン等と同様、試験管内にて直接にG作用してこれを変性、破壊せしめることは濾紙電気泳動像からもわかる。

### 結 論

著者は Lithospermum の Gonadotropin 不活化成分とされているC物質について研究を行い次の結論を得た。

1. C物質のG不活化作用は、Mainini 反応を指標とした場合極めて鋭敏に表現され、またC物質とGとの間に量的相関が認められるが、これにはC物質の精巣に対する作用は関係しない。
2. C物質のG不活化作用はラツテ子宮重量法でも証明でき、FSH に対してかなり強力な不活化作用のあることが推測される。
3. C物質を 37°C, 1 時間作用させたGは Friedman 反応でなお排卵を惹起するが、20時間作用せしめた場合には排卵は認められない。
4. C物質の Mainini 反応及び Friedman 反応を指標とする場合の不活化は、トリプシンやチステインにおけるほぼ同様の経過を示し、濾紙電気泳動像においてもほぼ同様の所見が認められた。
5. Lithospermum 類似植物(ヨモギ)にはC物質と同様の抽出法にて、これと同じG不活化作用をもつ物質は証明されなかつた。

稿を終るに当り、本研究に際し終始御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師岩井正二教授に衷心より感謝の

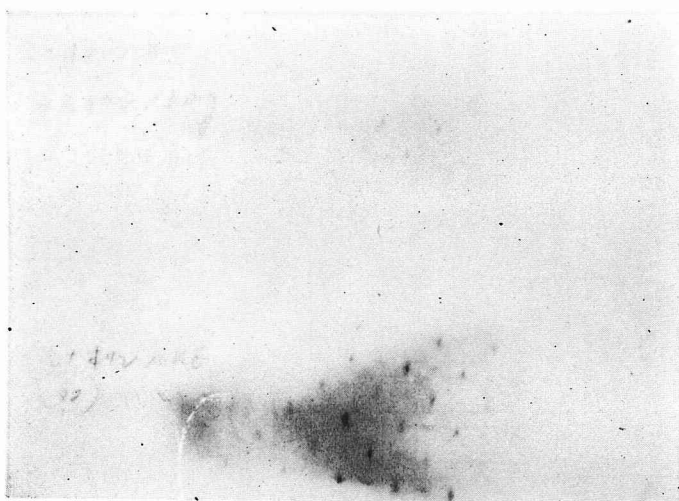
図 8.



Syn. 10KE+Trypsilin 1mg

Syn. 10KE

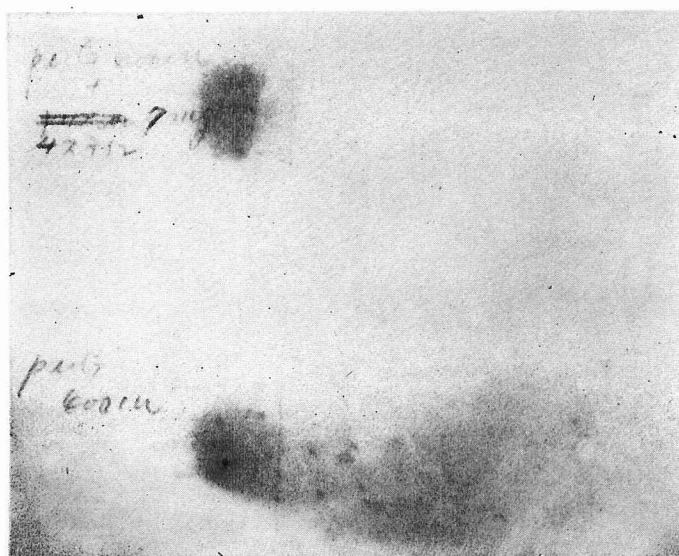
図 9.



Syn. 10KE+Cystein 15mg

Syn 10KE

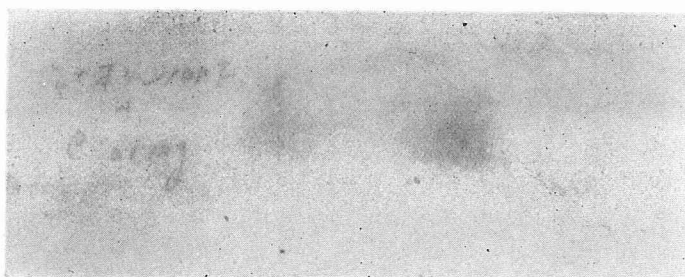
図 10.



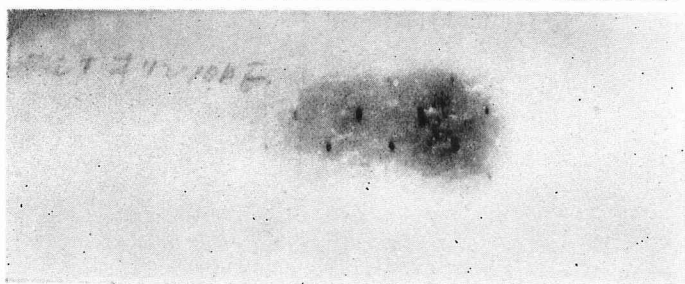
PuG 400iu+チステイン 7mg

PuG 400iu

図 11.

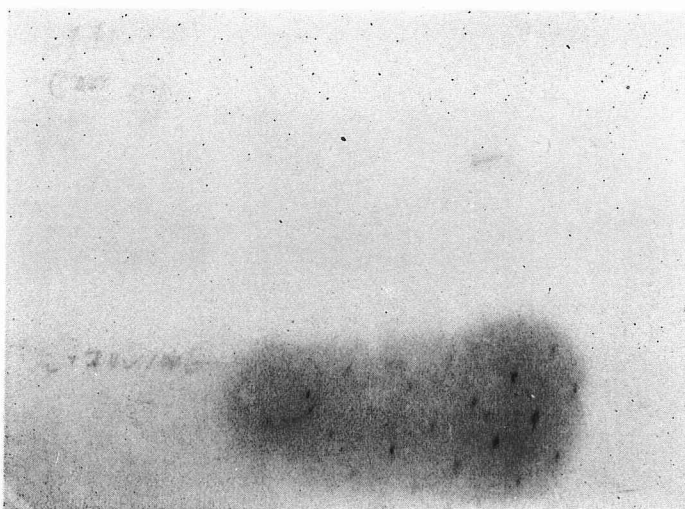


Syn. 10KE+C 0.1mg

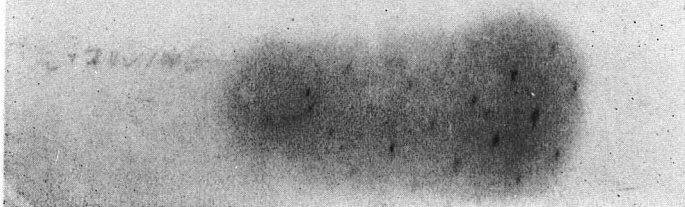


Syn. 10KE

図 12.



Syn. 10KE+C 0.25mg



Syn. 10KE

意を表すると共に、絶大なる御支援、御協力を戴いた石井次男講師、福沢芳章博士並びに教室員各位に深甚なる感謝の意を捧げる。

(本論文の要旨は昭和34年4第回日本不妊科学会総会及び第10回長野県医学会の席上発表した。)

### 文 献

- ①Pincus: The Hormones, Vol I, Chemistry of Anterior Pituitary hormones 1950      ④大野: 日本臨床 15: 1, 1957 (昭32)      ③Cranston: J. Pharmacol. & Exp. Therap 83: 130, 1945
- ④Drasher & Zohl: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 63: 66, 1946      ⑤Zahl: ibid 67: 405, 1948
- ⑥Plumkett, Colpitts & Noble: ibid 73: 311, 1950
- ⑦Noble, Plumkett & Graham: Endocrinol. 10: 212, 1954      ⑧Loeser & Mikulicz: Klin. Wschr. 33: 1017, 1955      ⑨Graham & Noble: Endocrinol. 56: 239, 1955      ⑩Kemper & Loeser: Acta Endocrinol. 29: 525, 1958      ⑪岩井・石井: 産と婦 22: 473, 1955 (昭30)      ⑫石井・福沢・池上・今泉: 日産婦誌 8: 225, 1956 (昭31)      ⑬石井・福沢: 日不妊会誌 2: 4, 4, 1957 (昭32)      ⑭福沢: 日産婦誌 10: 1183, 1958 (昭33)      ⑮石井・福沢・三浦: 日産婦誌 10: 13, 1958 (昭33)      ⑯石井・福沢・三浦・塩沢・宮坂: 日産婦誌 11: 161, 1959 (昭34)
- ⑰神保・竹内: 産婦の世界 4: 246, 1952 (昭27)
- ⑱神保・竹内・武田・伊藤: 産婦の世界 5: 815, 1953 (昭28)      ⑲関口: ホと臨床 3: 796, 915, 1955 (昭30)      ⑳高木: 日産婦誌 7: 275, 1955 (昭30)
- ㉑古賀: 産婦の世界 5: 808, 1953 (昭28)      ㉒Mainini: J. A. M. A. 138: 121, 1948      ㉓山本: 日生理誌 6: 8-9, 1936 (昭11)      ㉔原: 日生理誌 6: 8-9, 1936 (昭11)      ㉕沖中・伊藤: 基礎と臨床 上巻, 医学書院 266, 1954 (昭29)      ㉖赤須: 日本産婦人科全書 7/1 薬物療法, 228, 1957 (昭32)      ㉗小西: 産婦の世界 10: 214, 1958 (昭33)      ㉘梶原: 臨婦産 8: 363, 1954 (昭29)      ㉙Butt: Endocrinol. 13: 167, 1956      ㉚Plumkett & Noble: Endocrinol. 49: 1, 1951      ㉛Skeleton & Grant: Am. J. Physiol. 167: 379, 1951      ㉜Slusher: Endocrinol. 55: 466, 1954      ㉝Cranston & Robinson: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 70: 66, 1949      ㉞Loeser & Mikulicz: Klin. Wschr 33: 67, 1955.      ㉟Noble & Graham: Canad. Med. Assoc. J.