



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 担癌宿主におけるHexosamine-類の量的変動並びに癌細胞のエネルギー関連物質代謝に及ぼす二, 三アミノ糖の影響                                                                                      |
| Author(s)    | 西野, 幸重                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1965, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/29015">https://hdl.handle.net/11094/29015</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 7 】

|             |                                                             |
|-------------|-------------------------------------------------------------|
| 氏 名・(本籍)    | 西 野 幸 重                                                     |
|             | <small>にし の ゆき しげ</small>                                   |
| 学 位 の 種 類   | 薬 学 博 士                                                     |
| 学 位 記 番 号   | 第 7 4 9 号                                                   |
| 学位授与の日付     | 昭 和 40 年 5 月 27 日                                           |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 5 条第 2 項該当                                            |
| 学 位 論 文 題 目 | 担癌宿主における Hexosamine 一類の量的変動並びに癌細胞のエネルギー関連物質代謝に及ぼす二、三アミノ糖の影響 |
| 論文審査委員      | (主査)<br>教 授 羽 野 寿                                           |
|             | (副査)<br>教 授 川崎近太郎 教 授 上原喜八郎 教 授 青沼 繁                        |

論 文 内 容 の 要 旨

羽野らは人癌組織が粘液化して膠様癌となればしばしば良く延命すること、又 Chondroitin-硫酸が多く含まれる軟骨部や動脈壁には転位癌の少ないことに着目し、ムコ多糖類及びアミノ糖の制癌性作用に関する実験的研究を行ない、興味ある成績を得た。即ち Chondroitin-硫酸の酸水解低重合物がラット腹水肝癌及びマウス-Ehrlich-腹水癌に対し Hyaluron-酸と共に in vitro, in vivo で制癌作用を有し、アミノ糖では Galactosamine (Gal) Glucosamine (Gm) よりも比較的有效であることを見出した。

そこで私はこのような生体にとっていわば生理的な Hexosamine であるアミノ糖が一定の制癌性作用を示す点に興味を持ち、特に Gm と Gal の作用の相違を悪性腫瘍細胞の物質代謝面から調べ、それらの制癌性作用との関連性を比較検討することにした。

第 1 章 腹水癌担癌動物における Hexosamine-類の代謝

制癌性アミノ糖の作用を物質代謝の面から検討するには病態生理学上未だ数多くの問題を残している担癌生体における Hexosamine-類の変動について注目する必要がある。この Hexosamine-類の代謝は種々の病体と関連性を有し、特に人癌患者及び担癌動物で癌の増殖にともなう血清ムコ蛋白 (Hexosamine を構成要素とする) が著しく増加することは担癌現象の大きな特徴の一つであるが、未だ癌と宿主との関係において未明な点が極めて多く残されている。この意味で、私は Ehrlich-腹水癌移植にともなうマウスの二、三臓器中 Hexosamine 類の量的変動を検索し、以下のような実験成績を得た。

〔 I 〕 担癌マウスの二、三臓器、癌細胞及び腹水中 Hexosamine-類の量的変動について

- (1) 正常マウスの肝、腎、脾及び皮膚の Hexosamine-含量はマウスの体重の正常な増加によって有意な変化を示さない。しかし Ehrlich-癌担癌マウスでは肝、腎及び皮膚の Hexosamine-含量

は担癌の初期から中期の癌増殖期にかけて著明に増加し、脾では減少するが担癌末期にはいずれも正常値の範囲内に回復する。以上各期における、それぞれの臓器重量には異常な変化がなく、末期の腹水中には血色素が認められるのみである。

以上のことから担癌による Hexosamine-類の変動は癌の増殖と平行して起こり、癌周辺臓器の崩壊に起因するとは推察し難い。

更にこのような変動に対する既知制癌剤の影響を検討した。Mitomycin C の投与によってすべての臓器における変動は正常値の範囲内に回復するが、N, N', N''-triethylene-thiophosphoramidate (Thio-TEPA) 又は 6-Mercaptopurine (6-MP) では癌細胞の増殖が抑制されている時期でも変動がみられ、制癌効果とこの変動の正常値への回復との間には必ずしも平行関係は認められない。

- (2) 癌細胞及び腹水中には Hexosamine-類が比較的多量に存在する。癌細胞中の含量は移植後 7～15日目の間はほぼ一定であるが、腹水中の濃度は7日目が高く、それ以後は約30%低下する。

制癌剤 6-MPを与えると移植後7日目の腹水中 Hexosamine-濃度は低下する。Thio-TEPA 及び Mitomycin C は腹水の貯溜を遅延させ、Hexosamine の濃度では制癌剤を与えない場合と大差を認めないが、腹水中総 Hexosamine-量の経日的な増加を抑制する。

## 〔Ⅱ〕正常及び担癌マウス、ラットの二、三臓器並びに癌細胞の Hexosamine-類合成能について

前実験において癌腹水中に比較的多量の Hexosamine-類の存在を認めたが、その由来と併せて担癌宿主臓器における Hexosamine-含量変動の一因を窺う目的で実験を行ない、以下の成績を得た。

- (1) 担癌マウスの肝及び腎の Hexosamine-類合成能は移植後7日目に正常の約2倍（乾燥重量 mg当り）に増加し、これは同臓器中 Hexosamine-含量の増加を裏付けている。
- (2) Ehrlich-及び AH—130—癌細胞の該合成能は正常及び担癌動物の肝、腎、脾のその2～5倍（乾燥重量 mg 当り）である。又 Ehrlich-癌細胞の合成能は移植後7日目が高く以後は約30%低下する。この傾向は腹水中 Hexosamine-濃度の経日的変化とよく一致することから腹水中該物質は癌細胞に由来するものと推察される。

## 第2章 Ehrlich-癌担癌マウスの腹水中 Hyaluron-酸量並びに癌細胞の Hexosamine-類合成能に及ぼす二、三アミノ糖及び既知制癌剤の影響

前章で Ehrlich-癌腹水中に Hexosamine-類が比較的多量に存在することを認めたが、これは癌細胞の高い Hexosamine-類合成能に由来するものと思われる。この Hexosamine はムコ多糖類合成の前駆物質であり、癌細胞において主として Hyaluron-酸の合成に利用されることは間違いないものと考えられており、Hyaluron-酸が癌腹水に存在することも既に認められている。

そこで癌細胞の増殖と腹水中 Hyaluron-酸濃度並びに癌細胞の Hexosamine-類合成能の関係を調べ、併せてそれらに対する諸種アミノ糖及び既知制癌剤の作用態度を比較検討した。

## 〔Ⅰ〕担癌マウスの腹水中 Hyaluron-酸量に及ぼす二、三アミノ糖及び既知制癌剤の影響について

- (1) 癌移植後 7, 10, 12日目の細胞増殖期の腹水中 Hyaluron-酸濃度はほぼ一定で (40 mg%) 僅かに上昇の傾向を示し、この上昇は細胞増殖が最早やみられなくなった15日目に急激かつ顕著に

現われる。

- (2) Gal 投与によって腹水中 Hyaluron-酸濃度は著明に減少するが、Gm 及び両者の N-Acetyl-体投与ではみられない。

一方、既知制癌剤 Thio-TEPA, 6-MP, Mitomycin C は Gal とは逆にその濃度を増加させる。

## 〔Ⅱ〕癌細胞の Hexosamine-類合成能に及ぼす二、三アミノ糖及び既知制癌剤の影響について

〔Ⅰ〕で認めた腹水中 Hyaluron-酸濃度の増減の要因を調べる目的で以下の実験を行なった。

- (1) 癌細胞の Hyaluron-酸合成の第一段階である Hexosamine-類合成に対し、アミノ糖の影響は少ない。制癌剤では Nitromin だけがこの合成能を *in vitro*, *in vivo* で抑制する。
- (2) Hexosamine-類合成に必要な基質 (Glucose+Glutamine) を加えない medium 中で、アミノ糖を癌細胞と incubate すれば、Gm は Gal よりも速かに消費されるが、それらの N-Acetyl-体は消費されない。

Gal を投与した担癌マウスの癌細胞中に遊離の Hexosamine が比較的多量存在する。

## 〔Ⅲ〕癌細胞の Hyaluron-酸分解酵素活性について

Hyaluron-酸分解酵素である Hyaluronidase 及び  $\beta$ -Glucuronidase が癌増殖の場である腹水中の Hyaluron-酸量の調節に一役をはたしている可能性も想像されるので、以下これらの分解酵素の活性につき検討した。

- (1) 腹水癌細胞では、移植後の日数の如何に拘らず Hyaluronidase-活性は殆んど認められず、又 Freeman らの Hyaluronidase-抽出法に従って、移植後7日目の Ehrlich-癌細胞から得た分画にもその活性を認めない。
- (2) 正常マウスの臓器中  $\beta$ -Glucuronidase-活性は肝>脾>腎の順であるが、癌移植後7日目の担癌マウスでは脾>肝>腎の順となり、脾臓中での活性の増加がみられる。尚癌細胞そのものの活性は腎臓のそれと同様で、他の臓器よりも比較的低い。

## 〔Ⅳ〕癌細胞の形態及び組織化学的变化について

- (1) 癌移植後15日目の担癌末期には崩壊した細胞が可成り増加し (Giemsa-染色) 腹水中の Hyaluron-酸濃度は上昇している。しかもこの際 Toluidine blue (pH 4.1) での細胞内容物の Metachromasie-反応は増殖期の細胞のそれよりも淡く、これは Hyaluron-酸の減少を意味している。
- (2) Gal 又は制癌剤を投与した場合も、癌細胞の Metachromasie (pH 4.1) の染色程度は淡く、特に 6-MP 投与後の癌細胞では膜外に細胞質の滲出が顕著となり、この滲出物は pH 4.1及び 7.0 で Metachromasie を呈した。

以上の顕微鏡的所見から、担癌末期及び既知制癌剤投与による腹水中 Hyoluron- 酸濃度の増加は癌細胞の崩壊と関係あるものと推察した。

## 第3章 腹水癌細胞のエネルギー関連物質代謝に及ぼす二、三アミノ糖の影響

第2章において癌細胞の Hexosamine-類代謝に対する二、三アミノ糖の影響を検討し Gm と Gal の作用に一定の差異を認めた。これらアミノ糖はその化学構造及びそれ自身が辿る代謝経路から考え、

Glucose (G) を中心としたエネルギー関連物質代謝に対し当然一定の影響を与えるものと予想され、ひいてはアミノ糖が癌細胞の代謝系に制癌的な作用を及ぼす可能性も考え得られる。

〔Ⅰ〕癌細胞による嫌氣的解糖並びに酵母 Hexokinase- 活性に及ぼす二、三アミノ糖の影響について

- (1) 癌細胞による嫌氣的解糖を Gm は Gal よりも強く抑制するが、それらの N-Acetyl-体は影響を与えない。
- (2) Gを欠く条件下で、Gm 又は Gal を癌細胞と incubate すれば CO<sub>2</sub> の発生がみられ、その程度は Gm>Gal である。これはアミノ糖自身もGよりは軽度であるが解糖系で代謝されることを意味している。
- (3) Gを基質とした場合の酵母 Hexokinase-活性を Gm は Gal よりも強く阻害するが、それらの N-Acetyl-体は影響を与えない。Gm 及び Gal 自身もGよりは軽度であるが該酵素の基質となり、その程度は Gm>Gal である。

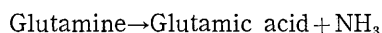
〔Ⅱ〕癌細胞の内発呼吸に及ぼす二、三アミノ糖の影響について

- (1) Gm はGと同程度に Ehrlich-癌細胞の内発呼吸を抑制する (Crabtree-効果)。しかし Gal 及び N-Acetyl-体ではこの作用はみられない。A H-130 癌細胞でも同様である。
- (2) Gの呼吸抑制効果に対し Gm はこれを更に増強し、Gal はやや回復させる傾向を示すが、N-Acetyl-体は認むべき影響を及ぼさない。

〔Ⅲ〕Glucose と Glucosamine の癌細胞呼吸抑制作用の差異について

- (1) G及び Gm の癌細胞呼吸抑制に対し KF, Monoiodoacetic acid (IAA) は殆んど影響を与えない。一方 2, 4-Dinitrophenol (DNP) は Gm による抑制を完全に回復させる。又Gの同効果に対して DNP は反応開始直後30分だけ回復させるが、それ以後再び呼吸の抑制が起る。
- (2) 癌細胞の Mitochondria による Pyruvate-酸化を Gm は抑制するが、Gではこの作用はみられない。

〔Ⅳ〕Glutaminase-I-活性について



上記の反応を触媒する Glutaminase-I は Mitochondria に存在し、呼吸又は解糖系を regulate する一因子であると考えられている。

- (1) Ehrlich-腹水癌細胞の Glutaminase-活性は正常及び担癌マウス肝臓の4~5倍(乾燥重量 mg 当り)である。
- (2) G及び Gm は該酵素活性を阻害し、Gal も僅かながら同じ影響を与える。
- (3) Gm を癌細胞と incubate すると NH<sub>3</sub> 遊離が起こる。

#### 結 論

Ehrlich-腹水癌担癌マウスの腹水と二、三臓器中 Hexosamine- 類の量的変動を調べ、その腹水中該物質量ならびに癌細胞のムコ多糖類及びエネルギー関連物質の代謝に及ぼす、制癌性アミノ糖類の作用について検討し、以下の結論を得た。

- 1) 担癌マウスの腹水中には Hexosamine-類が比較的多量存在し、これは癌細胞の高い Hexosamine-

類合成能に由来すると想われる。

- 2) 癌細胞及び腹水中のムコ多糖類、殊に Hyaluron-酸量は Galactosamine (Gal) によって減少し、Glucosamine (Gm) 及び両者の N-Acetyl-体は影響を与えない。
- 3) 担癌末期における腹水中 Hyaluron-酸濃度の増加及び制癌剤 N, N', N''-triethylene-thiophosphoramidate (Thio-TEPA), 6-Mercaptopurine (6-MP), Mitomycin C 投与による該物質の増加は癌細胞の崩壊によると想われる。
- 4) 癌細胞では Hyaluronidase-活性は殆んど認められず、その  $\beta$ -Glucuronidase-活性は正常及び担癌マウスの肝、脾より低く、腎にはほぼ等しい。
- 5) 癌移植によってマウスの脾  $\beta$ -Glucuronidase-活性は著明に上昇する。
- 6) 担癌マウスの肝、腎及び皮膚中の Hexosamine-含量は癌細胞の増殖期に増加し、脾では減少するが、この変動は必ずしも制癌効果と平行して正常値に復帰しない。
- 7) Gm は Gal よりも速かに癌細胞によって消費される。
- 8) 癌細胞の嫌氣的解糖及び Glucose を基質とした場合の酵母 Hexokinase-活性は Gm 及び Gal によって抑制される。
- 9) 癌細胞での内発呼吸及び Mitochondria による Pyruvate の酸化は Gm によって抑制される。
- 10) 癌細胞の Glutaminase-I-活性は正常及び担癌マウスの肝よりも高いが、Gm によって抑制される。

## 論文の審査結果の要旨

体内のムコ多糖類やムコ蛋白の量が病態生理的に変動し、殊に近年担癌時の血中に増加することが知られ、他方 Hexosamine-類が一定の制癌性作用を有することが実験的に証明されているので、癌の増殖と宿主に於ける Hexosamine-類の変動との関係を明らかにする必要がある。

本論文は癌細胞の増殖と担癌宿主の腹水及び二、三臓器における Hexosamine-代謝の変動について研究し、これに及ぼす各種制癌薬並びに Glucosamine と Galactosamine の影響を明らかにする目的で、癌細胞の代謝面から研究したものである。

担癌マウスの Hexosamine-類含量は癌細胞の増殖期、特に肝、腎、皮膚の組織中に増加し、脾では減少するが、この変動は制癌剤特に Mitomycin C の効果と平行して正常に復帰する。また腹水中に多量存在し、それは癌細胞の旺盛な Hexosamine-類合成能に由来するもので、制癌剤の Nitro-min は in vitro, in vivo においてこの合成能を抑制するが、Thio-TEPA, 6-Mercaptopurine, Mitomycin C はかかる作用が少ない。

癌細胞は主として Hexosamine を Hyaluron-酸合成に利用するといわれるが、担癌腹水中の Hyaluron-酸の濃度は僅かに上昇するのみで、むしろ癌細胞増殖が制癌剤によって停止する時期に急激かつ顕著に増加し、Galactosamine では著しく減少するが、Glucosamine 及び両者の N-Acetyl-体では変らない。この際 Glucosamine は Galactosamine よりも速かに癌細胞によって消費される。

他方癌細胞中の Hyaluronidase- 活性と  $\beta$ -Glucuronidase-活性は他の臓器よりもむしろ低いことから、上記腹水中 Hyaluron-酸の増量は癌細胞の崩壊に関係するものと思われる。

癌細胞の嫌氣的解糖及びブドウ糖を基質とした場合の酵母 Hexokinase-活性は Glucosamine 及び Galactosamine によって抑制されるが、前者が強い。癌細胞の内発呼吸及びミトコンドリアによる Pyruvate の酸化は前者によって抑制され、この呼吸抑制は K F, Monoiodoacetic acid では影響なく 2,4-Dinitrophenol では回復される。また Glutaminase-I の活性は高いが、Glucosamine によって抑制される。

以上、近年まで不明であった担癌宿主腹水中の Hexosamine-類の由来を追求し、同時に Glucosamine の如きアミノ糖が制癌性を有する作用機作の一部を明らかにしたことは、病態生理学のみならず、薬学の分野における今後の制癌剤研究に貢献するところが大きく、博士論文として価値あるものと認める。