

Title	癌細胞に由来する担癌生体にみられる酵素偏倚誘導物質の精製とその性質について
Author(s)	柏木, 厚典
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32111">https://hdl.handle.net/11094/32111</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【 4 】

氏名・(本籍)	相 木 厚 典
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 4 2 2 5 号
学位授与の日付	昭 和 53 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	癌細胞に由来する担癌生体にみられる酵素偏倚誘導物質の精製とその性質について
論文審査委員	(主査) 教 授 田中 武彦 (副査) 教 授 山村 雄一 教 授 坂本 幸哉

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

担癌生体の肝臓では腫瘍増殖に伴い一定の酵素偏倚が認められる。すなわち肝臓固有の分化した機能に関する酵素活性は低下し、細胞増殖に関する酵素活性は上昇する。これら癌組織が担癌生体各種組織代謝に及ぼす影響に関して種々の検討が加えられ、癌細胞由来の体液性因子の存在が示唆されているが、その実体は明らかでない。そこで①Ehrlich腹水癌担癌マウス各種組織について、細胞増殖と密接に関係するポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)活性の変動を検討する。②それら担癌生体にみられるODC活性の変動を誘導する癌細胞性因子を、癌細胞破碎画分、癌性腹水、担癌血漿中で証明する。③癌性腹水中よりその癌細胞性因子を精製し、性質を検討する。

〔実験方法と結果〕

(i) 担癌宿主組織中のODC活性の変動

2.9×10<sup>7</sup>個のEhrlich腹水癌細胞を5—7週令雄ICRマウスに移植し、継時的に肝臓、脾臓、腎臓と腫瘍細胞中のODC活性を測定した。マウスは6時間前より絶食にし午後2時より6時の間に屠殺した。ODC活性は各組織ホモジネートの10万×g、40分遠心上澄分画について基本的にD. H. Russell & S. H. Snyderの方法に従いDL-ornithine [1-<sup>14</sup>C]より遊離される<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>から測定した。癌細胞内ODC活性は対数増殖期の初期に著明に増加し、それに1~2日遅れて肝臓と脾臓ODC活性のピークが認められ、いずれも以後急速に低下する。一方腎臓では逆に腫瘍増殖初期より急激に低下し、6日目以後ほぼ0となった。

(ii) 癌細胞破碎画分、癌性腹水、担癌血漿中に存在する正常肝ODC活性増加因子について

各種組織中のODC活性増加因子活性は組織ホモジネート又は癌性腹水、担癌血漿の10万×g、60分遠心上澄分画を正常マウス腹腔内に注射し、一定時間後の肝ODC誘導活性により定量した。

①腫瘍細胞破碎画分による肝ODC活性増加作用 ②Ehrlich腹水癌細胞の超音波破碎画分をマウス腹腔内に注射し、継時的に肝ODC活性を測定すると、注射24時間後をピークとする著明なODC誘導が認められ、20 $\mu$ gタンパク質/マウスの投与量で有効であった。③上記分画には脾臓ODC誘導活性も認められたが、腎ODC低下活性は検出できなかった。④本因子活性は大部分非可溶性画分に存在した。

⑤癌性腹水、担癌血漿による肝ODC活性増加作用。移植7日目の担癌血漿、癌性腹水を同様に正常マウス腹腔内に注射すると、注射20時間後をピークとする肝ODC誘導が認められた。

⑥本因子の腫瘍特異性について。本因子が腫瘍と密接な関係にあるかどうか検討した。正常マウス各種組織（肝臓、脾臓、腎臓、筋肉、血漿）術後6、18、32時間目の再生肝、胎肝、Freund's complete adjuvant 誘発マウス腹水中には本因子の活性が認められず、又混合試験によりそれら組織中に本因子活性の阻害物質は認めなかった。検討した全てのマウス腫瘍（Ehrlich腹水癌、MH-134, Sarcoma 180, Actinomycin-S誘発細網肉腫）又は癌性腹水で本因子活性を認めた。

⑦異種動物由来の腫瘍（ラットのAH-13, AH-130細胞又は癌性腹水、ヒトの肝、肺、直腸癌細胞と癌性胸水、イヌの胃肉腫組織）はWalker's肉腫組織に軽度の活性を認める以外は全て活性を示さなかった。

⑧肝ODCの誘導は種々の内分泌ホルモン（成長ホルモン、グルコルチコイド、インシュリン、グルカゴン）などにより誘導されるが、本因子は脳下垂体摘出又は両側副腎摘出マウスの腹腔内へ注射しても正常マウス同様にその作用が発現し、更にその誘導活性が増強された。

### (iii) 癌性腹水中の肝ODC活性増加因子の性質と精製について

癌性腹水を9,000×g、10分遠心上澄を-20℃に凍結保存した標品を融解し、10万×g、60分遠心上澄について、その性質と精製を検討した。①57℃、5分間の熱処理にてほとんど失活した。②pH 2.0で完全に失活し、pH 4.0—9.45間で安定であった。③5 M尿素にて89%失活し、0.1% SDS 処理にて完全に失活した。④Pronaseにて完全に失活し、DNase, RNase, には抵抗性であった。⑤超限外濾過膜 HM-300 (M. W. >30万) を通る分画に活性を認めるが、30万以上の分画に強い活性を認めた。⑥25%アセトン沈澱に大部分の活性は回収された。⑦癌性腹水0.1M  $CaCl_2$  存在下に0.35% Dextran Sulfate 処理によりリポタンパク質を除去したのち硫酸分画 (30—55%) を行い、20mMリン酸緩衝液 pH 7.4で平衡化したDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーの0.13M—0.2M KCl 溶出分画を集め、55%硫酸にて濃縮した。本分画はSephadex G-200ゲル濾過にてVoid Volumeに回収された。そこで同分画をSephadex 6Bでゲル濾過を行うと主に2ピークに分離され、第1ピークの前半分分画 (FrI) に主要活性を認めた。本標品は25%の回収で約100倍の精製標品で1 $\mu$ g/マウスの投与量にて肝ODCを上昇させた。4%ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動にて主に二本のタンパク質バンドが認められた。本標品はGlycosidase Mixture処理にて完全に失活し、Sialidase 処理には抵抗性を示した。又14mMDTT処理にて失活した。

〔総 活〕

①Ehrlich腹水癌担癌宿主肝臓において、ポリアミン生合成系の律速酵素であるODCは著明に誘導され、癌細胞破碎画分、癌性腹水、担癌血漿中にその誘導に関与する因子が証明された。②本因子は正常マウス肝臓に及ぼす影響に関する限り、腫瘍組織に特異性が強く、又種特異性が示唆された。③癌性腹水中の本因子は非耐熱性、アルカリにて安定な分子量30万以上の酸性タンパク質（特に糖タンパク質が示唆された）であり、分子内S—S架橋が活性に重要である。デキストラン硫酸処理、硫酸分画、DEAEセルロースクロマトグラフィー、Sephrose 6Bゲル濾過にて回収25%にて約100倍の精製標品を得た。

### 論文の審査結果の要旨

本論文の意義は、重要な生理作用が指摘されているポリアミンの生合成系の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素を指標にして、①担癌生体の代謝異常が、腫瘍由来の体液性因子により誘導され、②その癌細胞性因子の精製と性質を検討し、腫瘍—宿主関連の一断面を物質レベルで明らかにしたことにある。精製された物質は、腫瘍特異性が強く、極めて少量で、正常マウス肝に作用し、担癌肝類似の酵素偏倚を誘導した。

本物質の物理化学的性質、生物活性や動態を解析することは、ヒト癌悪液質を理解する上に重要な示唆を与えると考えられる。

以上の点で本論文は医学博士に値するものと判定した。