

Title	肝 γ -グルタミルトランスフェラーゼの誘導と停止に関与する諸因子の検索
Author(s)	大野, 忠良
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/32690
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

[3]

氏名・(本籍)	大 野 忠 良
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 5 1 9 9 号
学位授与の日付	昭 和 5 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医学研究科 生理系専攻 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	肝 γ -グルタミルトランスフェラーゼの誘導と停止に関する 諸因子の検索
論文審査委員	(主査) 教授 坂本 幸哉 (副査) 教授 田中 武彦 教授 山野 俊雄

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

γ -グルタミルトランスフェラーゼ (EC2. 3. 2. 2., 以下, GGTと略す) は成熟動物では, 腎において最も活性が高い。一方, 正常肝では, 腎の約1/400 (ラット) ~1/3000 (マウス) の活性しか認められない。しかし, 肝臓においても, A) 胎生末期には, 成熟動物肝の約40倍 (ラット) から300倍 (マウス) にも達するし, B) 化学発癌剤によるラット肝癌発生過程でも肝GGT活性の上昇がみられ, 肝癌では正常肝の約120倍~250倍に活性が上昇する。A) では, 誕生後速やかに活性の低下がみられるのに対し, B) では二峰性のpeakを示し, 化学発癌剤の長期投与では, 正常食に戻してもはや活性低下がみられぬようになり, 活性変化が不可逆的である。

そこで, 肝GGT活性の誘導形成に寄与する因子及び活性の低下に関する因子について検索し, 肝癌発生過程における肝GGT活性の停止機構の消失が何によってもたらされたかを, 明らかにしようとした。

[方 法]

1. 動物: 正常肝としてはマウス(ICR/Jcl)及びラット(呑龍)の周生期肝, ラット成熟動物肝を用いた。3'-MeDABによる肝癌誘導は, 雄ラット(初体重180~250g)に3'-MeDAB食(0.06%含有)を, ad libitumに与えた。必要な場合には両側副腎摘除術(AdX)を施した。
2. 注射法: Hydrocortisone-21-acetate及びdibutyryl cAMP(dbcAMP)を0.9% Salineに懸濁又は溶解させ, 成熟動物には, 各5mg/100g体重, 新生仔の場合は, 各25 μ g/g体重(ある条件下では1 μ g/g体重), それぞれ皮下及び腹腔内に注射した。成熟動物にはdbcAMPと共にTheophy-

line を、 2 mg/100g 体重注射した。Actinomycin D (Act. D) は、 0.2 μ g /g 体重、腹腔内に注射した。

3. 酵素活性の測定法 : GGT は γ -L-glutamyl-p-nitroanilide 4.4mM, glycylglycine 22mM を基質に pH 8.6 にて反応させ p-nitroaniline の遊離を 405nm で測定した。GSH-S-トランスフェラーゼ (EC 2. 5. 1. 18, GST) は、 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene 1mM, GSH 5mM を基質として pH 6.5 にて反応させ 340nm における conjugate の生成を追った。

チロシンアミノトランスフェラーゼ (EC 2. 6. 1. 5, TAT) は、 tyrosine 5.6mM, α -oxoglutarate 10mM を基質に PALP 50 μ M 存在下 pH 7.6 にて反応させ p-hydroxyphenylpyruvate の enolborate complex の生成を 310nm で追跡した。

4. cAMP 量, cGMP 量の定量 : protein binding assay 及び radioimmunoassay 法を併用した。
5. Corticosterone 量の定量 : 蛍光法及び Murphy 法 (CBG 法) によった。
6. GGT 活性染色法 : 組織切片と基質 γ -L-glutamyl-4-methoxy- β -naphthylamide, glycylglycine とを反応させ Fast Garnet GBC に couple させることにより染色した。

[成 績]

A. 胎仔肝 G G T 活性について

1. 胎仔肝 G G T 活性の上昇には glucocorticoid (GC) が関与している。生後の G G T 活性の下降は、 GC の注射により阻止される。
2. 生後一週で G G T の GC に対する応答性は消失する。(同一注射量で T A T の誘導形成は認められる)。
3. 生後 7 日目のラットを AdX し、 GC を注射すると T A T は誘導されるが、 G G T はもはや誘導されず、成熟動物肝でも GC 注射によって G G T 活性は上昇しない。
4. 胎仔 plasma corticosterone 量は胎生期は高値を示すが誕生 1 日前に既に下降しており plasma corticosterone 量の減少が G G T 活性下降の一因子であると考えられる。
5. GC による肝 G G T 活性の上昇は Act. D により部分的に抑えられる。
6. Act. D 単独投与により生後の G G T 活性低下が阻止される。
7. 誕生直後では、 GC による G G T 活性上昇を dbcAMP の併用で阻止できないが、誕生後 4 ~ 5 日では部分的阻止が可能であり、 dbcAMP 単独注射によっても G G T 活性の下降が促進された。
8. 周生期肝 cAMP 量は胎生末期に上昇し生後 5 日までは上昇が続行する。cGMP 量も量的には、 cAMP より 1 桁低いと同様の動向を示す。
9. 従って G G T 活性の下降は corticosterone 量の減少と、 cAMP 量の高値によってもたらされたものと思われる。

B. 化学発癌剤による肝癌発生過程について

1. 3'-MeDAB による肝癌発生過程で肝 G G T 活性は比較的初期 (投与後 4 ~ 7 週) に上昇し、一旦下降した後、徐々に上昇を続ける。二度目の上昇は正常食に戻さぬ限り下降する事はなく 13 週以後では正常食に戻しても、もはや G G T 活性の下降が認められない。

2. 3'-MeDAB投与後8週でAdXを施すとGGT活性の下降が観察されるが正常ラット肝のGGT活性値よりは高い。
3. そこで3'-MeDAB食投与開始1週前にAdXを行い、3'-MeDAB食の投与を継続するとGGT活性の上昇が少なくとも8週まではよく抑えられていた。しかし、この場合も3'-MeDABの長期投与によりGGT活性は上昇した。この時plasma corticosterone量は上昇していた。
4. 3'-MeDAB投与期間中のplasma corticosterone量には有意の変動が認められなかった。
5. 同期間中の肝cAMP量はGGT活性の変動に似ていたが2nd peakは低かった。
6. GGT活性上昇の1st peak出現時には、正常成熟動物肝ではみられなかったGCに対する応答性が復活し、dbcAMPによる活性低下作用も観察された。しかし、2nd peakのGGT活性上昇の進展期では肝の内在性cAMP量の上昇が1st peak時より低く、外来性dbcAMPへの応答性(GGT活性の低下)もみられなくなった。
7. GGT, GSTは生体内で同一基質(GSH)に対して競争関係にあるが3'-MeDAB投与期間中GST活性はGGT活性と鏡像関係の動向を示した。

[総括]

1. 肝GGT活性の上昇にはGCが関与していることがGCの注射によるGGT活性の上昇、plasma corticosterone量の低下やAdXによるGGT活性の低下等により示された。
2. 肝GGT活性の下降にはplasma corticosterone量に比してcAMP量が相対的に高いレベルにあることが必要である。
3. 3'-MeDABによって肝癌を誘導する際、肝GGT活性は二峰性のpeakを示す。1st peakは肝の高いcAMPレベルにより下降するが2nd peakでは肝cAMP量が余り上昇せず、又、dbcAMPに対する応答性も減少するため、もはや肝GGT活性の低下が認められなくなる。

論文の審査結果の要旨

3'-MeDAB食投与による、ラット肝癌誘導過程で、肝 γ -グルタミルトランスフェラーゼ活性は、投与後比較的初期に上昇し、その後一旦低下し、再び上昇し始めexponentialな増加を示すに至る、一方、マウス、ラットの肝癌では出生直前に急激に上昇し誕生後速やかに下降し、成熟動物の値になる。著者は、この活性の上昇に、グルココルチコイドが関与し、活性誘導の停止には、cAMPが、大いに関与することを明らかにしたもので、学位論文として、十分価値あるものと認める。