

Title	ヒト肝リボヌクレアーゼの精製・性質とそのラジオイムノアッセイの確立
Author(s)	太田, 俊行
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/33407
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	太田俊行
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5836 号
学位授与の日付	昭和 57 年 12 月 4 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	ヒト肝リボヌクレアーゼの精製・性質とそのラジオイムノアッセイの確立
論文審査委員	(主査) 教授 神前 五郎 (副査) 教授 和田 博 教授 宮井 潔

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

従来から血清リボヌクレアーゼ活性が膵疾患、悪性腫瘍、腎疾患、白血病等で上昇することが報告されてきた。しかしその上昇機序や由来は明らかでない。ヒト血中には主として膵由来の分泌型リボヌクレアーゼと肝由来の非分泌型リボヌクレアーゼが存在するとされているが、これまでの酵素化学的測定法では各臓器由来のリボヌクレアーゼを正確に分別定量することは不可能であった。本研究ではまずヒト肝臓よりリボヌクレアーゼを精製してその性質を検討した。そしてこの精製物を用いてラジオイムノアッセイ(RIA)法による肝リボヌクレアーゼの測定法を確立し、各種疾患における血中肝リボヌクレアーゼ量の変動を明らかにしようと試みた。

〔方法ならびに成績〕

活性は yeast RNA を基質として酵素液を 0.1 M Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.2) 中で 37°C, 15 分間反応させ、氷冷した 15% 過塩素酸 (硝酸ランタン添加) で反応を停止させ、遠心分離して得られる上清液を 6 倍希釈し、吸光度を 260 nm で測定した。上記条件で O. D. を 1.0 上昇させる酵素活性を 1 単位とした。剖検時に得たヒト肝臓を -40°C に保存したものを精製の原材料にした。肝をホモジネートし塩酸を加えて pH 4.0 とし、遠心分離して得られる上清液をホスホセルロースカラムに吸着させ、1.0 M の NaCl でグラジエントをかけ溶出させた。溶出した酵素を透析し凍結乾燥して濃縮した。ついで Sephadex G-150 および G-100 を用いて 2 回ゲル濾過を行なった。これを poly(G)-Sephadex C-4B に吸着させ、1.0 M の NaCl で溶出させた。次に Heparin-Sephadex CL-6B に吸着させ、これを 1.0 M の NaCl でグラジエントをかけ溶出した。

精製物は SDS 10% ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動、および 7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (pH 4.3) で単一バンドであった。最終回収率は 4.0% で、その比活性は約 3600 倍に上昇した。SDS 電気泳動により分子量は約 19,500 と推定された。

ヒト肝リボヌクレアーゼの至適 pH は 7.0 で、pH 5.5 および 9.0 ではその活性は半減した。pH 安定性は pH 3~11 の間で 4℃、48 時間安定であった。耐熱性は 0.1M Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.2) 中で 15 分間加熱したところ、75℃ まで安定で 80℃ で活性は半減した。基質特異性ではヒト肝リボヌクレアーゼは poly(A), poly(G) を全く切断せず、poly(C), poly(U) に対しては yeast RNA を 100 とすると、それぞれ 5.2, 3.9 とわずかしき切断しなかった。

RIA 法のための抗ヒト肝リボヌクレアーゼ血清はモルモットにて作成した。¹²⁵I-ヒト肝リボヌクレアーゼの作成はクロラミン T 法でおこない、その比活性は 30-40 μ Ci/ μ g であった。抗血清は 2,000 倍希釈で使用した。B/F 分離は二抗体法によった。

標準曲線は良好な用量反応相関を認め、20-800 ng/ml の範囲でヒト肝リボヌクレアーゼが測定可能であった。ヒト血清・尿の希釈曲線と標準曲線とはよく平行した。各種酵素 (牛腓リボヌクレアーゼ A, アスペルギルスリボヌクレアーゼ T₁, ヒトトリプシン, ヒト腓アミラーゼ, ブタエラスターゼ) とヒト肝リボヌクレアーゼとは免疫交叉性を示さず、ヒト腓リボヌクレアーゼとは約 1% の免疫交叉性を示した。各種動物血清 (ウシ, ウマ, ネコ, ウサギ, マウス, ラット) と免疫交叉性はなかった。測定内および測定間の変動係数 (C.V.) はそれぞれ 9.74%, 9.32% であった。回収率は平均 85.2% であった。健康成人 49 人の血中肝リボヌクレアーゼの平均値は 97.9 ± 60.3 ng/ml (mean \pm S.D.) であった。

各種疾患例における血中肝リボヌクレアーゼ量を本 RIA 系で測定した。最も高値を示したのが腎不全症例で 23 例中 20 例が高値を示し、その平均は正常の約 6 倍の上昇を示した。血液透析の前後でその値はほとんど変動しなかった。次に高値を示したのは肝癌症例であり、20 例中 8 例が高値を示したが、その平均は正常の約 2.5 倍にとどまった。膵癌では 12 例中 4 例が高値であったが、1 例を除き上昇は軽度であった。急性膵炎、胃癌、大腸癌でも高値を示すものがあり、一方肝硬変症例では全体にやや低値を示した。

[総括]

- 1) poly(G) およびヘパリンによるアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて、ヒト肝リボヌクレアーゼを電気泳動的に単一成分にまで精製した。
- 2) ヒト肝リボヌクレアーゼは分子量約 19,500、至適 pH は 7.0 であり、耐熱性は 75℃、15 分間安定であった。基質特異性では yeast RNA をよく切断した。
- 3) ヒト肝リボヌクレアーゼ測定のための二抗体法による新しい RIA 系を確立した。本 RIA 系は感度、特異性、精度、再現性とも優れており、回収率もほぼ満足しうる結果が得られた。
- 4) ヒト肝リボヌクレアーゼとヒト腓リボヌクレアーゼは約 1% の免疫交叉性を示した
- 5) 健康成人 49 名の血中肝リボヌクレアーゼ量の平均値は 97.9 ± 60.3 ng/ml (mean \pm S.D.) であった。血中肝リボヌクレアーゼは腎不全、各種末期癌などで上昇した。しかし肝癌で特異的に上昇すること

はなかった。

論文の審査結果の要旨

本論文はヒト肝臓からポリ(G)およびヘパリンによるアフィニティカラムクロマトグラフィーを用いてヒト肝リボヌクレアーゼを電気泳動的に単一成分に精製してその性質を明らかにするとともに、精製酵素を用いてヒト肝リボヌクレアーゼ測定のための二抗体法による新しいラジオイムノアッセイ系を確立したものである。本研究は血中の肝由来の非分泌型リボヌクレアーゼの分別定量を可能にしたもので、今後各種疾患の病態解明に利用し得る価値ある研究であると認められる。