The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33407
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【54】

氏名・(本籍)	太田俊行（おおたとしゆき）
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℃，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℃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回ゲル沪過を行なった。これをpoly(G)-Sepharose C L−4Bに吸着させ，1.0 MのNaClで溶出させた。次にHeparin−Sepharose 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SDS10%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とわずかしか切断しなかった。

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。^{125}I－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30－40μCi/μg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（牛膵リボヌクレアーゼA，アスペルギルスリボヌクレアーゼT_1，ヒトトリプシン，ヒト膵アミラーゼ，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，ヒト膵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±60.3ng/ml(mean±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イ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膵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±60.3ng/ml(mean±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。