



Title	ポリエチレングリコール修飾アスパラギナーゼの諸性質と抗腫瘍性
Author(s)	上崎, 善規
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33455
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

氏名・(本籍)	かみ　　さよ　　よし　　のり 上　　崎　　善　　規
学位の種類	医　　学　　博　　士
学位記番号	第　　5　8　3　8　　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	ポリエチレングリコール修飾アスパラギナーゼの諸性質と 抗腫瘍性
論文審査委員	(主査) 教　授　和　田　　博 (副査) 教　授　岸　本　　進　　教　授　田　口　　鐵　男

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　的〕

大腸菌アスパラギナーゼはある種の腫瘍，特にリンパ系白血病に対し劇的な治療効果を示すにもかかわらず，異種高分子蛋白を直接血中に投与しなければならないことに基づくアナフィラキシーショックなどの免疫学的な副作用と，異種蛋白の生体内半減期が短いことによる頻回投与が必要なことのために，その使用が著しく制限されている。このアスパラギナーゼをポリエチレングリコールを用いて化学的に修飾することにより，抗アスパラギナーゼ抗体と反応しない標品が得られたので，その免疫学的，酵素学的性質および抗腫瘍作用について検討した。

〔方　法〕

①化学修飾：モノメトキシポリエチレングリコール（分子量，約5,000）を塩化シアヌールと乾燥ベンゼン中で80℃44時間反応させ，活性化二本鎖ポリエチレングリコールを得た。さらにこれを精製大腸菌アスパラギナーゼとホウ酸バッファ（pH10.0）中で37℃1時間反応させ修飾酵素を得た。限外濾過により反応副産物を除去したものを以下の実験に用いた。②免疫学的性質：抗アスパラギナーゼ抗体との反応性はカバットやマイヤーの定量沈降法およびオクテロニーの二重免疫拡散法により検討した。また，修飾酵素をBalb/c系雌性マウスに投与し，2回ないし3回免疫後の血清中の抗アスパラギナーゼ抗体価の変動については，アスパラギナーゼ結合羊赤血球を用いた凝集反応により測定した。③酵素活性：反応産物であるアスパラギン酸をGOT，MDHを用いてNADHの変化量として測定した。④生体内における性状：Wistar系雄性ラット（300g）に80単位/kgの修飾および非修飾アスパラギナーゼを腹腔内投与し，経時的に採血し，アスパラギナーゼ活性と血清中のアスパラギン

値をアミノ酸自動分析機を用いて測定した。⑤抗腫瘍作用：CBA マウスにガードナーリンパ肉腫（6 C 3 HED）（ 1×10^6 細胞/マウス）を腹腔内に移植し，24時間後に修飾および非修飾酵素を投与し，生存日数を比較した。実験は腫瘍移植後60日に終了したが，60日目に生存していたマウスは完治しておりその後も生存し続けた。

〔結果〕

修飾アスパラギナーゼは1分子，92個のアミノ基中52個に活性化二本鎖ポリエチレングリコールが共有結合で修飾されており，分子量は非修飾酵素の14万に比べ，ゲル濾過で約60万の位置に溶出された。この修飾酵素は家兔の抗アスパラギナーゼ抗体とは抗原量を変化させても全く沈降体を形成せず，オクテロニー法でも沈降線を形成しなかった。さらに，マウスに修飾酵素（ $20 \mu\text{g}$ /マウス）を静注し，抗アスパラギナーゼ抗体価の測定を行ったところ，2回免疫マウスでは非修飾酵素投与群の抗体価（1/16）に比べ5匹中に2匹に（1/4）の有意な抗体価の上昇が認められたにすぎず，3回免疫ではコントロールの抗体価（1/128）に対し，5匹中3匹に平均（1/4）の抗体価を認めただけであった。従って修飾アスパラギナーゼは完全には免疫原性（抗体産生能）を消失していないが，著しく低下していた。

本酵素の抗腫瘍作用は血中および組織中のアスパラギンを涸渇させることに基づくため，修飾による酵素学的性質の変化について検討したが，pH依存性，基質であるアスパラギンに対する K_m ，ともに非修飾酵素と同一であり，低濃度のアスパラギンを生理的条件下に分解する能力を有することが推察された。但し，修飾により酵素活性はもとの約1/10に低下していた。ラットの腹腔内に投与した場合も，非修飾酵素と同じく投与後数時間以内に血清中の同酵素活性が最大となり，以後その活性は減少していった。この減衰部分は片対数グラフ上直線となり，非修飾，修飾酵素の血中半減期はそれぞれ29時間，56時間と算出され，修飾酵素は約20倍長い半減期を持つことが明らかとなった。従って，非修飾酵素投与ラットでは約1日後に血中酵素活性が測定できなくなり，2日目より血清アスパラギンの出現，回復が認められたのに対し，同活性量の修飾酵素投与群は3週間以上にわたり血清アスパラギンが涸渇した状態が持続した。

ガードナーリンパ肉腫を移植したマウスに対する抗腫瘍作用を検討したところ，無治療マウスの平均生存日数13.0日に比べ，非修飾酵素治療群（8単位/マウス）のそれは29.2日であり，修飾酵素投与群（8単位/マウス）は46.4日で，しかも5匹中3匹は60日以上生存し，完治していた。生体内半減期の延長から予測されるように，同活性の両酵素を比較するとポリエチレングリコール修飾酵素の方が優れた治療効果を示した。また，あらかじめアスパラギナーゼに対する抗体をもつマウスに腫瘍細胞を移植し同様な治療実験を行ったところ，非修飾酵素は全く治療効果を示さなかったのに対し，修飾酵素は前処置していないマウスの時と同じ治療効果を示した。

〔総括〕

ポリエチレングリコール修飾アスパラギナーゼの性質について *in vitro* および *in vivo* において検討した。酵素活性は修飾により1/10に低下するが，生理活性は十分に残存しており，むしろ生体内半減期の著しい延長により，抗腫活性が増強していた。従って，この修飾アスパラギナーゼを臨床応

用することは次の3点において非修飾酵素にまさると考えられる。第1に、生体内半減期の延長は1回の修飾酵素投与により長期間血清アスパラギンを溜めさせることが可能となり、頻回投与の必要がない。このことは免疫学的な副作用を誘発する危険性をさらに減少させる。第2に、抗体との反応性を消失していることは、既に非修飾アスパラギナーゼ療法を受けて抗アスパラギナーゼ抗体価の高い患者にも安全に投与することができる。第3に、抗体産生能が著しく低下していることから、初回療法にこの修飾酵素を用いれば免疫学的副作用が比較的発生しにくいと考えられる。

論文の審査結果の要旨

本論文は抗体との反応性を消失した高分子ポリエチレングリコール修飾アスパラギナーゼについて、その免疫学的、酵素学的性質および抗腫瘍作用について検討したものであり、生体内半減期の著しい延長やそれにもとづく抗腫瘍活性の増強など臨床応用の可能性を示唆しており、医学博士の学位を授与する価値があるものと認定される。