The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ヒト膵リボヌクレアーゼの精製とその免疫学的性質
Author(s)	栗原, 稔
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33579
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

【64】

氏名・(本籍)	栗原　稔（くりはら　みのる）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第　5856　号
学位授与の日付	昭和57年12月21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	**ヒト膵リボヌクレアーゼの精製とその免疫学的性質**
論文審査委員	(主査) 教授 神前　五郎 (副査) 教授 田川　邦夫　教授 和田　博

論文内容の要旨

〔目　的〕

従来から悪性腫瘍患者で血清リボヌクレアーゼ(RNase)活性が上昇する事が報告されてきた。1975年Reddiらは，ヒト血清中の膵型RNaseはポリシチジル酸(poly(C))を基質として特異的に測定できること，膵癌患者で血中の膵型RNaseの活性上昇がみられることを明らかにし，これを膵癌のスクリーニング検査のために用いることを報告した。しかしその後，poly(C)に特異的な血清RNase活性が膵癌患者で確かに上昇しているが，他の悪性腫瘍患者の血清膵RNase活性との間に有意の差がないことが報告された。この様に相反した結果が得られる原因として，ヒト血中には膵，肝，白血球などに由来する種々のRNaseが存在し，酵素活性の測定ではこれらを分別定量することが困難であること，poly(C)に特異的なRNaseが膵以外の臓器からも供給されている可能性があること，あるいは腎不全や低栄養状態などの患者の病態が原疾患よりも血中RNase活性の増減に強い影響を与えること，などが推測されている。しかしその詳細は不明である。これを明らかにするため，著者はヒト膵液より膵RNaseを精製し，その性質を明らかにすると共に，ヒト膵RNaseを特異的に測定するためにradioimmunoassay法を確立した。

〔方法ならびに成績〕

1．ヒト膵RNaseの精製

膵頭十二指腸切除後，外膵液瘻として体外にドレナージされた膵液を原材料として用いた。活性測定はpoly(C)を基質として行った。膵液のpHを塩酸でpH 3.5に調整し，沈澱を除いた後phosphocellulose columnにかけ1.5M NaClで溶出した。この後phosphocellulose columnにかけNaClの濃

度勾配で溶出する事を2回繰返し行なった。RNaseの活性は0.3M－ 0.5 M NaClの濃度で溶出された。次にpoly(G) affinity column chromatographyを行った。さらにSephadex G－75によるゲル濾過を行った。これにより活性は3つの分画に分離溶出された。3つのRNaseを分子量の大きい順にRNase－Ⅰ，RNase－Ⅱ，RNase－Ⅲ，とした。RNase－Ⅰの分画をさらに等電点電気泳動で精製した。活性はpH 10.0付近に泳動された。以上の過程で得られたRNaseはSDS電気泳動でそれぞれ異なった位置に一本の蛋白のバンドを示した。またpH 4.3 polyacrylamide電気泳動でも，それぞれ異った位置に一本の蛋白のバンドとして泳動され，それぞれの位置に活性がみとめられた。比活性は約1,300倍上昇した。yieldは3者併せて 8.91 %であった。

2．ヒト膵 RNaseの性質

SDS電気泳動より推定された3種の膵RNaseの分子量はそれぞれ 27,000， 19,000， 13,000であった。酵素活性は，Na^{+}，K^{+}，Mg^{2+}，Co^{2+}，スペルミン，スペルミジンにより賦活化され，Cu^{2+}，Zn^{2+}，ヘパリンにより阻害された。基質特異性として，膵 RNaseはpoly(C)をよく分解したが，poly(A)，poly(G)，poly(U)，をあまり分解しなかった。これは膵由来のbovine RNase－Aの基質特異性とよく似ていた。これらの性質は，3種の膵 RNase共類似していた。

3．ヒト膵 RNaseの免疫学的性質とrodioimunoassay法の確立

精製した膵RNase－Ⅰでモルモットを感作し，抗血清を得た。 Ouchterlony analysisで，抗血清と3種の膵RNaseとの間に一本のfuseする沈降線を生じたが，抗ヒト膵RNase－Ⅰ血清と，ヒト肝RNaseとの間に沈降線は生じなかった。精製RNase－Ⅰをクロラミン T法によりラベルした。2抗体法によりB・F分離を行いRIA系を確立した。RIAの測定可能域は10ng/－ 500ng/ml であった。ヒト肝RNaseとは50%B/Bo点で約10%の免疫交叉性を示した。bovine RNase－Aとは免疫交叉性を示さなかった。本RIAによりヒト血清，尿，唾液，膵液中のimmunoreactiveな膵型RNaseは測定可能であり，20才－30才の正常人の血清RNase濃度は 351 ± 144 ng/mlであった。

〔総　括〕

1．ヒト膵液より3種の分子量の異なる膵 RNaseを分離精製した。分子量はSDS電気泳動法で，27,000， 19,000， 13,000と推定された。

2．精製した3種の膵 RNaseは，従来報告されてきた血中，尿中の膵型RNase，膵臓のRNase，およびbovine RNase－Aとactivator，inhibitor，基質特異性などの点でよく類似していた。

3．3種の膵 RNaseはOuchterlony analysisで免疫学的に同一であったが，ヒト肝RNaseとは異なっていた。

4．精製した膵 RNaseを抗原として，2抗体法によるRIA系を確立した。これによりヒト血中，尿中にimmunoreactiveな膵型RNaseが存在することが示された。また，ヒト唾液中にも膵型RNaseが存在することが示された。

5．著者が確立した膵 RNaseのRIA系は，感度，精度，特異性にすぐれており，悪性腫瘍患者ことに膵癌患者血中のRNase上昇の機序の解明に有効な手段であると考えられた。

論文の審査結果の要旨

ヒト膵液より，塩酸による酸処理，phosphocellulose カラムクロマトグラフィー，poly(G)affinity カラムクロマトグラフィー，Sephadex G75ゲル濾過，等電点電気泳動法により，3種の分子量の異なる膵 RNase を精製し，その性質を明らかにした。又抗血清を作製し，radioimmunoassay 系を確立し，ヒト体液中の膵 RNase を特異的に測定する方法を開発した。