

担癌マウスの低密度リポタンパク質に関する研究

第 1 編

血清および臓器低密度リポタンパクの脂質について

岡山大学医学部附属病院第1外科教室(主任:田中早苗教授)

大学院学生 岡 村 進 介

〔昭和44年3月28日受稿〕

第1章 緒 言

抗原抗体反応にもとづく沈降線の検出により、低密度リポタンパクの抗原性が知られ³⁵⁾、免疫電気泳動法¹²⁾や免疫拡散法¹⁾により、リポ蛋白の純度の検定が行なわれる。Gitlin ら³⁶⁾は蛍光抗体法によつて β -リポタンパクが血漿アルブミン、 α -グロブリン、 β 金属含有グロブリンやフィブリノーゲンとともに、広くヒトの組織に分布していることを認め、Levine ら^{37,38)}は、double diffusion reaction により、リポタンパクが抗原として作用することを報告している。只友³⁾は、マウス Ehrlich 腹水癌移植腫瘍の低密度リポタンパクをもちいて、その抗原性について報告し、その低密度リポタンパクにより感作されたマウス血清グロブリンが細胞培養器中で腫瘍細胞の増殖を抑制することを証明している。

私は、Ehrlich 腹水癌移植マウスの血清、肝、脾および腫瘍から低密度リポタンパク(以下 LDL と略す)を分離し、正常マウスの LDL とその生化学的性質および脂質について比較検討をおこなつた。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

実験動物には、dd 系雄マウス(藤井医化学試験動物取扱所より購入)生後3~4週で、体重15gr.前後のものを使用し、飼料はオリエンタル酵母工業株式会社の実験動物用固形飼料を使用した。実験にもちいた腫瘍は岡山大学癌源研究所より分与された Ehrlich 腹水癌細胞で、JTC11³²⁾として株化されたものである。この腫瘍細胞を dd 系雄マウス、50匹の背部皮下に、1匹あたり約 500×10^4 個を移植し、10日後、示指頭大から拇指頭大になつた腫瘍を剔出使用した。

第2節 実験材料

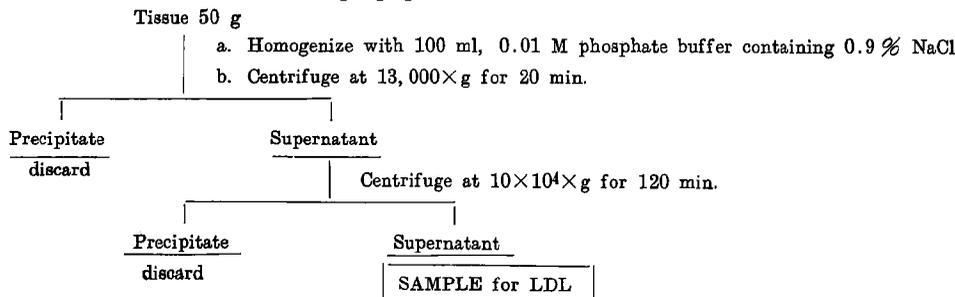
正常マウスは、Ehrlich 腫瘍移植にもちいたマウスと同日生れのもので、その血清、肝および脾を、担癌マウスは、血清、肝、脾および腫瘍を用いた。

第3節 試料の調製

肝、脾および腫瘍から、LDL の試料を抽出した、すなわち、表1のごとく、クロロホルム麻醉下に、肝、脾および腫瘍を剔出し、湿重量50gr. に対し、0.9% NaCl を含む 0.01M phosphate buffer 100ml の割合で、homogenizer にて homogenize したのち、卓上型遠心機(型式: FT9S, 電気遠心沈澱機、久

(表1)

Sample preparation for LDL from tissues



保田製作所)にて、 $13,000 \times g$ 、20分遠沈した。すなわち、この段階における上清には、有形細胞、細胞破片、核は含まれていない。さらにこの上清を $10 \times 10^4 \times g$ (日立分離用超遠心機: 40P型を使用) 120分で超遠心することにより、microsome および mitochondria 分画は沈澱し上清は組織可溶性の LDL を含む血清に近い状態にあると考え、LDL を分離する試料とした。

第4節 低密度リポタンパクの分離

硫酸デキストラン沈澱法⁴⁾³⁴⁾により、血清および第3節で抽出した試料から LDL を分離した。すなわち表2に示した方法で、試料10mlに10% dextran sulfate Mw 2×10^5 (Pharmacia uppsala, Sweden より購入)を0.2mlの割合で加え、つづいて1M CaCl_2 を加えると、試料は直ちに白濁、沈澱を生じる。数時間放置後卓上型遠心機にて、 $5,450 \times g$ 10分間遠心する。その上清を捨て、沈澱を5% NaClに溶解、 CaCl_2 および水を加えて数時間放置後、さらに $5,450$

$\times g$ 10分間遠心する。この段階での沈澱は、 β -lipoprotein-dextran sulfate complex を形成している。この沈澱に蓆酸ソーダ、NaCl および protamin sulfate を加え、充分混合したのち遠沈し、 β -lipoprotein を分離した。

第5節 disc electrophoresis ^{11)~16)}

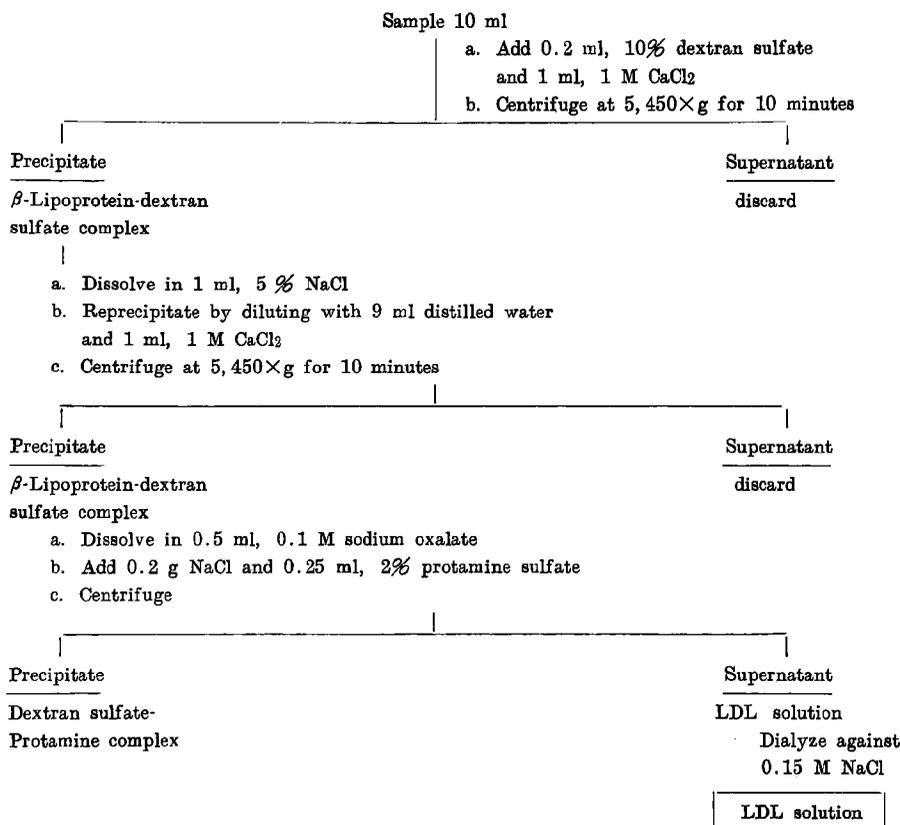
a) 装置

ミツミ科学産業株式会社より市販されているディスク電気泳動装置を使用した。泳動用ガラス管は、内径5mm、長さ80mmのものを使用した。そのほか主なものとして、ガラス管立て(ガラス管の下端が密閉されるように作つたもの)ゲル調製用注射器(10~20ml用)ポリエチレンチューブ、ゲル取出し用金属製針、蛍光灯(20W)脱染色用ガラス管(内径8mm、長さ80mm)脱染色時使用するビスキングチューブ(脱染色用ガラス管の下端を塞ぐために使用)

b) 試薬

(表2)

Isolation of LDL with Dextran Sulfate



acrylamide monomer (生化学工業株式会社)
 N, N, N, N-tetramethyl-ethylenediamine (TEMED)
 重合促進剤 (東京化成工業株式会社)
 N, N-methylenebis-acrylamide (BIS) 架橋剤 (和光純薬株式会社)
 riboflavin 光重合用触媒 (和光純薬)
 過硫酸アンモニウム 重合用触媒 (和光純薬)
 glycine (和光純薬)
 amido black 10B (第一化学薬品)
 sudan black B (E. Merck AG, Darmstadt)
 保存溶液, 使用液, 電極槽用緩衝液については表

(表 3)

1. 保存溶液

A 溶液		
pH 2.9	1N KOH	12 ml
	水酢酸	53.25 ml
	TEMED	1.15 ml
	ad qs	100 ml
B 溶液		
pH 5.9	1N KOH	48 ml
	水酢酸	2.95 ml
	TEMED	0.46 ml
	ad qs	100 ml
C 溶液		
}	acrylamide	15 gr.
	BIS	0.4 gr.
	ad qs	100 ml
D 溶液		
}	acrylamide	10.0 gr.
	BIS	2.5 gr.
	ad qs	100 ml
E 溶液		
}	riboflavin	4.0 mg
	ad qs	100 ml
F 溶液		
}	glycine	28.1 gr.
	水酢酸	3.06 ml
	ad qs	1.0 l

2. 使用液

分離用ゲル溶液		
A 液	1 容	} を光重合
C "	2 "	
E "	1 "	
水	4 "	
試料用, 濃縮用ゲル溶液		
B 液	1 容	
D "	2 "	
E "	1 "	
水	4 "	

3. 電極槽用緩衝液

F 溶液を使用

3 に示した.

脱染色用溶液: 7%酢酸溶液をもちいた.

そのほかの試薬は, すべて試薬特級を使用した.

c) 操作法

I) 分離用ゲルの調製

ガラス管をゴム栓つきのガラス管立てに垂直に立て, 新しく作った分離用ゲル溶液を表 3 に示してある割合でポリエチレンチューブをもちいて注射器に吸取り, よく混合する, 次にチューブを通してガラス管に静かに注ぐ, 酸素との接触は重合を阻害するから, 溶液の上面を蒸留水で覆う, 1/4皮下針をもちいて静かにガラス管壁に沿って水を重畳する, 水層は 3~4mm の高さとした. これを蛍光灯下に光重合せしめた, ガラス管と蛍光灯との距離は約 8 cm に保つた. 重合には数時間を要した.

II) 濃縮用ゲルの調製

分離用ゲルの光重合が終ると, ガラス管内の水を捨て, 少量の濃縮用ゲル溶液で管内を洗つたあと, 分離用ゲルの上に静かに濃縮用ゲル溶液を加え (約 8~9mm の高さ) 上面を水層で覆う, 重合までに約 20 分を要した.

III) 試料用ゲルの調製

濃縮用ゲルの重合が終ると管内の水を捨て試料用ゲル溶液 (表 3 参照) 0.3ml に, 各試料 (第 2 章, 第 4 節で述べた方法により分離した LDL) をタンパク質量として約 300 μ g を加えた. この溶液 0.15ml を濃縮用ゲルの上部にのせ, 重合をおこなつた, 重合には 30~60 分を要した.

IV) 電気泳動

試料用ゲルの重合が終ると, ガラス管立てから, ガラス管をはずし, 電気泳動装置の上部電極槽の底に取りつけたゴム栓の穴に垂直にさしこみ, 上下両電極槽に緩衝液 (表 3 参照) を入れ, 電極は, 上をプラス, 下をマイナスとし, 2°C, 泳動時 PH2.3 の条件下で泳動を開始した. 電流はガラス管 1 本あたり, 2.5 mA で約 90 分泳動した.

V) ゲルの染色

泳動終了後, ガラス管を上部電極槽からとりはずし, 水を満した水槽中に移し, 水中でガラス管からゲルを取り出した, 取り出したゲルを染色液 (amido black 10B 液) に浸し一昼夜放置した.

sudan black B による泳動前染色²⁰⁾

1. 染色液: 0.1gr. のズダーン黒 B を 1 ml の酢酸エチルに室温で溶解し, これに 9 ml のプロピレングリコールを加える.

2. 染色：泳動用試料に1の液を5:1 (v/v)の割合で加え充分かくはん、振盪後、15分間遠心し過剰の色素を除いた。以上の処置のち電気泳動をおこなった。

VI) 脱染色

染色したゲルを脱染色用ガラス管に入れ、下端をビスキングチューブで覆い、上部電極槽に泳動用ガラス管をとりつけたと同じ要領でとりつけ、上下両電極槽に7%酢酸溶液を入れ、下の電極をプラス、上をマイナスとして泳動を開始した。管あたり10 mAの電流を通じた。自然脱染色では脱染色に数日を要した。

第6節 脂質の抽出

Folch⁵⁾の方法にしたがつて、分離した LDL の20倍量の chloroform:methanol (2:1 v/v)にて脂質の抽出をおこない、一部は定量に、一部は50°Cの water bath 中で N₂ ガスのもとに蒸発乾固させ、脂質を chloroform に溶解し、薄層クロマトグラフィーの試料とした。また cholesterol の定量にもちいた。

第7節 脂質および蛋白質の定量

a) 総脂質の定量

Joseph H. Bragdon の方法⁶⁾にしたがい、第2章第6節でえた試料(抽出した脂質)を、25 ml メスフラスコに入れ、50°C の water bath 中で N₂ ガス flow のもとに乾固、これに試薬(20gr. K₂Cr₂O₇を1,000ml H₂SO₄に溶解したもの)10mlを加え100°C、30分間加熱のち、蒸留水を加えて25mlとし、ベックマン型分光光度計(島津光電分光光度計QR-50型)で対照と比較し、波長580 mμで比色定量した。なお標準曲線は、palmitic acid, cholesterol および tristearin をもちいて作成した。

b) リン脂質の定量

Fiske-Subbarow 変法^{7)~9)}にしたがつて、Folch 抽出液を灰化ビンの中で50°C, water bath 中で、N₂ ガス flow のもとに乾固、これにモリブデン酸アンモンを飽和した70%過塩素酸0.4mlを加えて加熱し灰化する、冷却後蒸留水2.0mlを加え、10分間沸騰加熱したのち再び冷却し、25%モリブデン酸アンモン0.3ml および10%アスコルビン酸0.3mlを加えてよく振盪し、38°Cの恒温槽中で、2時間放置する。ついで2,000 rpm、10分間遠心分離し、青色の上澄液をベックマン型分光光度計にて波長820 mμで対照と比較定量し、25を乗じて³⁹⁾リン脂質の量とした。なお、標準曲線は KH₂PO₄ をもちいてあらか

じめ作成した。

c) 蛋白質の定量

micro-Kjeldal 法¹⁰⁾にしたがい、第2章、第4節でえた試料に濃硫酸0.1mlを加え灰化し、蛋白質中の窒素を NH₄HSO₄ にし、NaOH で中和して、NH₃ に変え Nessler 試薬(和光純薬)にて発色し、ベックマン型分光光度計にて、波長420 mμで対照と比較定量し、えたN量に系数6.25を乗じて³⁹⁾蛋白質量とした。なお標準曲線は、(NH₄)₂SO₄ をもちいて作成した。

d) 総コレステロールの定量

Schoenheimer-Sperry の方法¹⁷⁾にしたがい、第2章、第6節でえた試料に氷酢酸2.0mlを加え、遮光した25°Cの水槽中におき、あらかじめ作成していた冷無水酢酸化 H₂SO₄ 液を4ml加え、充分振盪し、25°Cの水槽中に27分間放置後、10分以内にベックマン型分光光度計を使用し、波長620mμで比色定量した。なお、標準曲線は、cholesterol の純品をもちいて作成した。

第8節 薄層クロマトグラフィー

固定相: Merck 製 Kieselgel G 45gr. に、蒸留水90mlを混じ、20×20×0.05 cmの薄層板を作成、110°C、30分間加熱活性化したのち使用した。

展開試料: 第2章、第6節でえた薄層クロマトグラフィーの試料を microsyringe にて、各試料とも総脂質量として0.01mgを薄層板下縁から2.5cmの位置に1cmの線状に spot した。spot 相互の間隔は、1cmとし物質の混入を防いだ。また R_f 値をもとめるため、標準物質として、cholesterol と lecithin をもちいた。

展開溶媒: リン脂質の分離には、chloroform:methanol:water (65:25:4v/v)を使用し、展開に先だち、薄層板を室温中、約1.5時間飽和させた。総脂質の分離には petroleumether: ethylether: acetic acid (60:40:1v/v)を使用し、室温中約30分間展開槽を飽和させた。

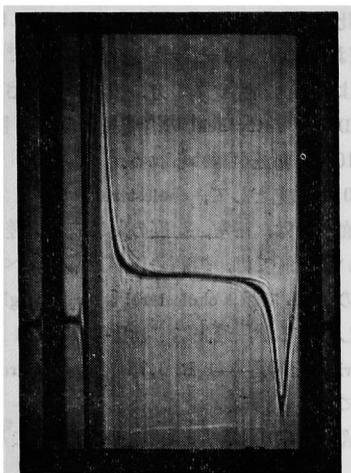
発色: 展開後の薄層板を風乾したのち、5%モリブデン酸アンモンを含む ethanol 溶液を薄層板1板につき約3mlあて一様に噴霧し、120°C 10分間加熱して発色をおこなった。

第3章 実験成績

第1節 LDL の化学的性質

第1図は分離した LDL に、密度1.063の塩溶液を加え、51,200 rpm、26°Cで超遠心分析¹⁸⁾¹⁹⁾をお

第1図
Ultracentrifugal Analysis of β -Lipoprotein

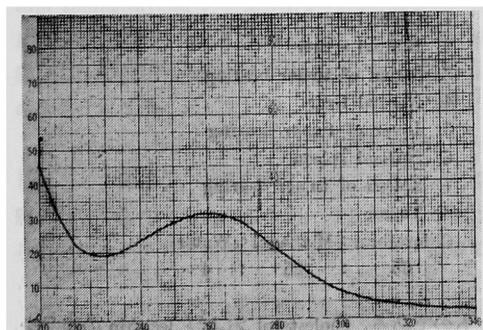


Sf = 5.9 at 26°C
51,200 rpm at 30 min. Solution Density 1,063 g/ml

こなつたもので、回転数が51,200 rpm に達した後、0, 6, 12, 22, 30, 38分に撮影した。Sf は5.9であり、Lindgren ら²²⁾による超遠心でえられたデータによれば、分子量は 130×10^4 と推定される。

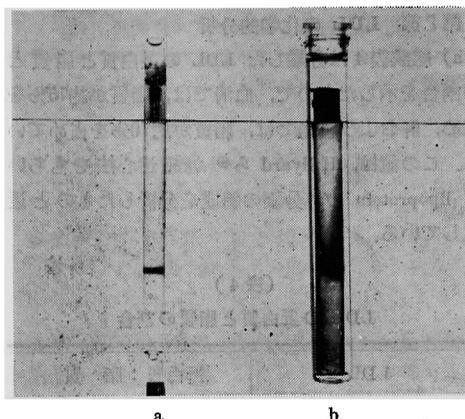
第2図は、LDLの吸光度曲線であり、極大260 μ 、極小229 μ を示している。

第2図
エールリッヒ腹水癌腫瘤 LDLの吸光度曲線



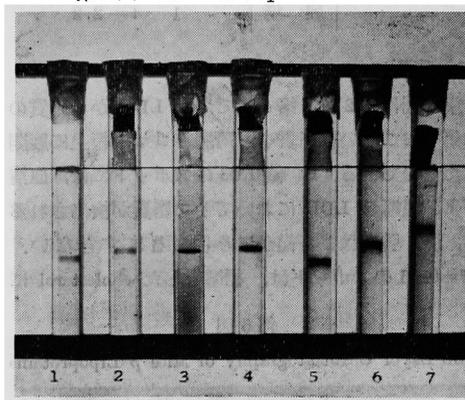
第3図は、正常マウスの肝よりえた組織の LDL を polyacrylamide を支持体とする disc electrophoresis により分離したもので、左に sudan black B による泳動前染色²⁰⁾により脂質の染色がみられ、右に amido black 10B による泳動後染色により蛋白部分の染色を示している。同一部に脂質および蛋白質の染色された1本のバンドが認められる。

第3図 Disc Electrophoresis of LDL



a : Sudan black B による泳動前脂質染色
b : Amido black 10B による泳動後蛋白染色

第4図 Disc Electrophoresis of LDL



1. Normal serum
2. Serum of tumor bearing
3. Normal liver
4. Liver of tumor bearing
5. Normal spleen
6. Spleen of tumor bearing
7. Tumor

第4図は、disc electrophoresis における血清、肝および脾の LDL の正常と担癌との比較であるが、いずれも正常の LDL より、担癌の LDL の方が易動度は小さい。すなわち、正常マウスの血清 LDL の易動度は $1.85 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec}^{-1}$ であり、担癌マウス血清の LDL は、 $1.66 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec}^{-1}$ である。正常マウス肝 LDL の易動度は、 $1.85 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec}^{-1}$ であり、担癌マウス肝 LDL は $1.57 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec}^{-1}$ である。腫瘍からとつた LDL の易動度は $1.31 \times 10^{-5} \text{cm}^2 \text{volt}^{-1} \text{sec}^{-1}$ で、他臓器の易動

度に比しかなりの差がみられる。

第2節 LDL の化学的分析

a) 組成表4は分離した LDL の蛋白質と脂質との割合を示したもので、血清では、脂質が約75%を占め、肝および腫瘍では、脂質が約70%を占めている。この値は、Hillyard ら⁴⁰が超遠心法をもちいて lipoprotein の各分画の組成を分析したものと近似している。

(表4)
LDL の蛋白質と脂質の割合

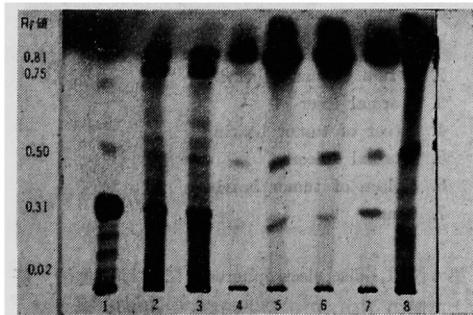
LDL		蛋白質 : 脂質
正常マウス	血清	1 : 3.5
	肝	1 : 2.2
担癌マウス	血清	1 : 3.4
	肝	1 : 2.0
	腫瘍	1 : 2.2

b) 脂質について

第5図は第2章、第4節でえれ LDL から脂質の抽出をおこない総脂質を、薄層クロマト板上に展開したものである。Rf 値 0.02 のスポットには、血清および腫瘍の LDL においてリン脂質が検出されるが、肝、脾ではごく僅かにみられるにすぎない。Rf=0.31 のスポットは、標準とした cholesterol に

第5図

Thin-Layer Chromatography of Mice β -Lipoproteins



1. Control
2. Normal serum
3. Serum of tumor bearing
4. Normal liver
5. Liver of tumor bearing
6. Normal spleen
7. Spleen of tumor bearing
8. Tumor

Petroleum Ether : Ethyl Ether : Acetic Acid

60 : 40 : 1

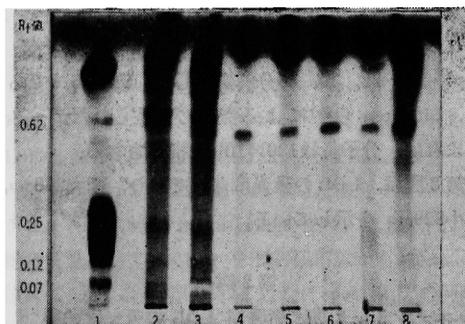
一致しているが、血清、肝および脾においては、担癌体に多量にみとみられる。腫瘍そのものの含量は血清に比べ1/10の減少がみられる、Rf=0.50のスポットは、fatty acid と考えられるが、肝では正常マウスよりも担癌マウスの方に多量に検出される。腫瘍 LDL の fatty acid の含有量は、肝、脾に比べて約10倍の含量が認められる。

Rf=0.75は主として、cholesterol ester と考えられる。血清では、正常、担癌の間に有意の差は認められないが、肝では、担癌の方が正常に比べて多い。腫瘍の LDL では、cholesterol ester と triglyceride が接近しているが、最先端の物質は Rf0.81 以上で triglyceride と考えられ Rf 0.75 で cholesterol ester が僅かに認められる。

第6図は、LDL のリン脂質を薄層板上に展開し

第6図

Thin-Layer Chromatography of Mice β -Lipoproteins



1. Control
2. Normal serum
3. Serum of tumor bearing
4. Normal liver
5. Liver of tumor bearing
6. Normal spleen
7. Spleen of tumor bearing
8. Tumor

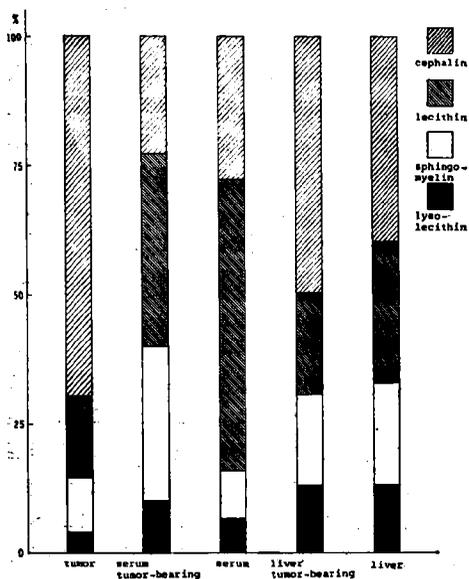
Chloroform : Methanol : Water

65 : 25 : 4

たものである。cholesterol および lecithin の純品を対照として展開した。最先端のスポットは殆んど Rf が cholesterol より高い物質と考えられる。この Rf より推定した結果、Rf=0.62は cephalin, Rf=0.25 lecithin, Rf=0.12 sphingomyelin, Rf=0.07 lysolecithin として検討を加えた、このデントメトリーにて、腫瘍、血清および肝 LDL 中の各種リン脂質の総リン脂質に対する百分率をグラフに示したものが第7図である。正常、担癌血清の LDL で

第7図

Phospholipids in Mouse Low Density Lipoprotein



は, cephalin および lysolecithin ともに有意の差は認められない. lecithin についてみると, 担癌血清の LDL では, 正常に比して含有量はほぼ 2/3 に減少し, sphingomyelin は 3 倍の増加を示している. 担癌の肝 LDL では, 正常より lecithin の含有量が約 8% 少なく, cephalin の 10% 増加がみられる. 腫瘍 LDL では, 他の正常組織 LDL と比べて, lecithin sphingomyelin の含量が 1/2~1/4 に減少し, 逆に cephalin が約 75% を占めている, すなわち, 腫瘍 LDL では正常血清, 肝の含有比に対し cephalin の含有比は 2 倍を示している.

表 5 は cholesterol に対するリン脂質の割合を示したものであるが, 血清 LDL では正常に比して担癌のリン脂質の含有比が減少し, 肝においてもやはり担癌においてリン脂質の減少がみられる. 腫瘍で

(表 5)

LDL の cholesterol と phospholipid の割合

LDL		cholesterol : phospholipid	
正常マウス	血清	1	: 1.30
	肝	1	: 1.22
担癌マウス	血清	1	: 1.18
	肝	1	: 1.06
	腫瘍	1	: 4.08

(表 6)

単位蛋白質量に対するリン脂質量の割合

LDL		蛋白質 : リン脂質	
正常マウス	血清	100	: 3
	肝	100	: 0.4
担癌マウス	血清	100	: 1.8
	肝	100	: 0.14
	腫瘍	100	: 0.08

は比較の対照となるものがないが, cholesterol 対リン脂質の含有比が血清, 肝に比してリン脂質の含有比が大 (約 3 倍) である.

表 6 は単位蛋白質に対するリン脂質量の割合を示したものである, 血清 LDL では, やはり担癌の方が正常より約 1/3 の含有比の減少を示している. 腫瘍組織の LDL では, 単位蛋白質に対するリン脂質の含有比が著明に減少している.

第 4 章 考 案

1929年 Macheboeuf²¹⁾ はウマ血清より脂質と蛋白質との結合体として一定組成を有するものを分離し, lipoprotein の存在が明らかにされた. その後血清のリポタンパク質についての報告は枚挙にいとまがない, 組織中でも多くの脂質が, リポタンパクの形で存在し, 細胞成分の構造保持, あるいは機能の発揮に密接な関連を有することがしだいに明らかにされつつあるが, それらの分離法, あるいは測定法などは, 血清に比べて確立されているとはいえない, 本実験では, 硫酸多糖類による沈澱法により LDL を分離したが, この方法は, 1955年頃より, Bernfeld²³⁾²⁴⁾, Burstein²⁵⁾, Oncley²⁶⁾らによつておこなわれている. 一般に硫酸多糖類によつて沈澱するリポ蛋白質は, LDL, すなわち Sf=0~400 の LDL と Sf>400 のヒロミクロンに限られ, この方法では, 密度の高いリポ蛋白質, すなわち α-リポタンパクは沈澱しないとされている³⁰⁾⁴⁾, 超遠心法による分画分離は, ヒロミクロンの分離をも可能にしようが, 実験の性質と目的により, 分離方法を選択しなければならない. 本実験では, 血清, 肝, 脾および腫瘍のように性質の異なる臓器より抽出した LDL を同一のレベルで観察するため便宜上沈澱法をもちいた.

第 4 図は, disc electrophoresis における各種 LDL の正常および担癌の比較であるが, いずれも, 担癌の LDL は移動度が正常の LDL よりも小さい, 膠

質粒子の易動度は、粒子の荷電のみならず、粒子の大きさ、および形によつて決定される。膠質粒子が電気泳動される時は、膠質粒子表面に極性をもつた溶媒または溶質中の成分分子を吸着してできる電気2重層によつてもたらされる電位と、膠質粒子の解離基が電離するためにもたらされる電荷が原因となつて泳動される。緩衝液のPHによつて変化をうけるのは、解離基による電荷であるので、蛋白質の易動度は主として、解離基の種類と量およびそれらの電離状態によつて決められる。そこで LDL の構造²⁷⁾は直径 185 Å でタンパク質の polypeptide 鎖は、リポタンパク分子の表面にあり、体液中では媒体たる水と接触していなければならない、さらに脂質成分の一つである phospholipid は荷電基をもち親水性であるので、タンパク質とともに表面に分布し、モザイク構造を形成し、さらにこれに水分子が結合してその構造を保つている⁴¹⁾⁴²⁾。無機イオンである phosphate 易動度は $-20.2\text{cm}^2\text{volt}^{-1}\text{sec}^{-1}$ で易動度は当然大である。表 6 に示す如く、担癌体 LDL の phospholipid の単位蛋白質質量に対する含有量は正常に比して小であることから、易動度の差は phospholipid の含有量に関係があるのではないかと考えられる。Sack ら²⁸⁾はダイズリン脂質をヒト血清と incubate したところ、リン脂質がリポ蛋白中にとり込まれ、また、電気泳動的に易動度がはやくなることをみいだした。このリン脂質と結合したり蛋白は負の荷電をますことにより易動度が変化することは容易に想定される。

一般に担癌動物では蓄積脂質の欠乏が認められ²⁹⁾、脂質消耗の主体をなすものは中性脂質であると言われている^{43)~45)}。臓器の脂質、ことにリン脂質の分布をみると、癌組織には一般的に少ないようである⁴⁶⁾。ラットの DAB 肝癌発生過程において、リン脂質でだいに減少し、癌組織では著しく減少したという報告もある⁴⁷⁾。また、メチルコラントレンで作成した皮膚腫瘍でもリン脂質の消失が報告されている³¹⁾。

LDL の脂質の面から検討した結果では、LDL と限定する限りにおいて、表 4 に示すごとく、脂質が約 70% を占めるのは当然であるが、その脂質の組成を観察すると、cholesterol 対リン脂質の含有比から考えれば、表 5 に示すごとく一般に担癌生体の LDL のリン脂質の含有量が正常に比べて減少している。腫瘍組織の LDL では、リン脂質が cholesterol の約 4 倍の含有比となつているが、これはリン脂質の

含有量が大であることを示すものではないと考えられる。表 6 に示すごとく、単位蛋白質質量に対するリン脂質量は、腫瘍 LDL において著しい減少をみるのである。したがつて、腫瘍 LDL では、相対的にリン脂質および cholesterol の減少が著明で、脂質の主体は triglyceride であろうと考えられる。単位蛋白質に対するリン脂質含量の割合は、担癌の方が正常に比してリン脂質含量の減少をみるが、量的差異において、血清と肝では、肝において 1/3 の減少を示し、血清では 1/2 の減少を示しており、担癌動物の臓器蓄積脂質の欠乏と言う点からみて興味がある。

リン脂質の組成については、メチルコラントレン投与動物肝は、lecithin よりも cephalin が多いこと³²⁾が知られているが、本実験における LDL の組成においても、第 7 図に示すごとく lecithin は担癌動物において正常の約 1/2 に減少している。phosphatidyl ethanolamine から phosphatidyl choline へのメチル化酵素の活性が正常動物より低下のていることが推察される。

第 5 章 結 語

Ehrlich 腹水癌移植マウスの血清、肝および腫瘍から、超遠心法、硫酸デキストラン沈澱法をもちいて、低密度リポタンパクを分離し、この脂質部分について正常マウスから分離した LDL の脂質部分と比較検討を加えた。

1) disc electrophoresis において、担癌生体の LDL の易動度は、正常動物のそれに比して小さく、特に腫瘍組織の LDL の易動度は血清 LDL の易動度に比べて著しく小さい。

2) LDL の単位蛋白質質量に対するリン脂質の含有量は、血清、肝とともに担癌においてリン脂質の減少を認め、特に腫瘍組織 LDL では含有比が著しく小さい。

3) cholesterol に対するリン脂質の比率をみると、血清および肝において、ともに担癌生体の方がリン脂質の減少を示している。腫瘍 LDL では、リン脂質が cholesterol の約 4 倍の割合である。

4) LDL のリン脂質の組成では lecithin の含有量が担癌血清 LDL において、正常の約 1/2 に減少しており、担癌肝 LDL でも正常より減少している。腫瘍 LDL では、lecithin の含有量が、血清に比べて著しく減少しており、phosphatidyl ethanolamine の増加が著しい。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜わつた田中早苗教授、山本泰久講師に深甚の謝意を表します。

(本論文の要旨は第40回日本生化学会総会において発表した)

文 献

- 1) I. Smith: "Chromatographic and electrophoretic techniques" Vol. 2. Interscience Publishers Inc. N. Y. 1960.
- 2) P. Grabar and C. A. Williams: *Biochem. Biophys. Acta*, **17**, 67, 1955.
- 3) Tadatomo, Y.: *岡山医学会雑誌*, Vol. 80. No. 3, No. 4.
- 4) D. G. Cornwell, F. A. Kruger: *J. Lipid Research* **110**, 2, 1961.
- 5) Folch, J. Lees, M. and Sloane Stanley, G. H.: *J. Biol. Chem.*, **226**, 496, 1957.
- 6) Bragdon, J. H.: *J. Biol. Chem.*, **190**, 513, 1951.
- 7) Fiske-Subbarow: *J. Biol. Chem.*, **66**, 375, 1925.
- 8) King, E. J.: *Biochem. J.*, **26**, 292, 1932.
- 9) Wagner, H.: *Fette, Seifen, Auztrichmittel*, **63**, 119, 1961.
- 10) 波多野博行, 鷹野重威: 生化学領域における光電比色法, 各論 3, p. 29, 南江堂, 1958.
- 11) K. Ananth Narayan, Howard L. Creinn, and Fred A. Kummerow.: *J. Lipid Research* **150**, 6, 1966.
- 12) John. T. Clarke.: *Ann. N. Y. Academy of Sciences*, **428**, 121, 1967.
- 13) Williams & Reisfield: *Ann. N. Y. Academy of Science*, **373**, 121, 1967.
- 14) 永井裕: 蛋白質・核酸・酵素, **774**, 11(9).
- 15) 荻田善一: 代謝, **331**, 2(4), 1965.
- 16) 荻田善一: 代謝, **419**, 2(5), 1965.
- 17) Schoenheimer-Sperry: *J. Biol. Chem.*, **106**, 745, 1934.
- 18) O. F. De Lalla and J. W. Gofman: *Methods of Biochemical Analysis*, **1**, 459, 1954.
- 19) F. T. Lindgren, H. A. Elliot and J. W. Gofman: *J. Phys. Colloid Chem.*, **55**, 80, 1951.
- 20) H. J. McDonald, J. Q. Kissane: *Anal. Chem.*, **1**, 178, 1960.
- 21) M. A. Macheboeuf: *Bull. Soc. Chem. Biol.*, **11**, 268, 1929.
- 22) F. T. Lindgren, and A. V. Nichols: "Plasma Proteins" (ed. Putnam, F. W.) Vol. 2, p. 15 Academic Press inc., N. Y. 1960.
- 23) P. Bernfeld: *The Lipoproteins, methods and Clinical Significance* (ed. F. Homburger, D. Bernfeld) **24**, S. Karger 1958.
- 24) P. Bernfeld: *Fed. Proc.*, **14**, 182, 1955.
- 25) M. Burstein, J. Oudin: *Compt. Rend.*, **244**, 2187, 1958.
- 26) J. L. Oncley, K. W. Walton, D. G. Cornwell: *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 4666, 1957.
- 27) F. A. Vandenhuevel: *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 1307, 1962.
- 28) B. A. Sacks, and E. Danielson: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **93**, 22, 1956.
- 29) F. Kögl, C. Smack, J. H. Veerkamp.: L. L. M. van Deenen, *Z. Krebsforsch.*, **63**, 558, 1960.
- 30) M. Burstein: *Compt. rend.*, **243**, 527, 1956. **245**, 586, 1957.
- 31) E. M. Boyd, and I. E. Miller: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 1447, 1959.
- 32) Sato, J.: *Bull. Cancer Inst., Okayama Univ. Med. School*, **1**, 42, 1961.
- 33) P. H. Figard, and D. M. Greenberg: *Cancer Res.*, **22**, 361, 1962.
- 34) M. Burstein, and J. Samaille: *J. Physiol. (Paris)*, **49**, 83, 1957.
- 35) D. Gitlin: *Science*, **117**, 591, 1953.
- 36) D. Gitlin, B. H. Lancing, and A. Whipple: *J. Exptl. Med.*, **97**, 163, 1953.
- 37) L. Levine, D. L. Kauffman and R. K. Brown: *J. Exptl. Med.*, **102**, 105, 1955.
- 38) W. W. Brinner, J. W. Riddle, and D. G. Cornwell: *J. Exptl. Med.*, **110**, 113, 1959.
- 39) Harold A. Harper: *Review of Physiological Chemistry*; 1967. Lange Medical Publications Maruzen Asian Edition
- 40) Hillyard, L. A., Entenman, C., Feinberg, H., Chaikoff, I. L.: *J. Biol. Chem.*, **214**, 79,

- 1955.
- 41) F. A. Vandenhoevel: *Can. J. Biochem. Physiol.*, **40**, 1299, 1962.
- 42) D. G. Therriault, and J. F. Taylor: *J. Am. Oil Chemist's Soc.*, **41**, 490, 1964.
- 43) Mider, G. B., Scherman, C. D. Jr. & Morton, J. J.: *Cancer Res.*, **9**, 222, 1949.
- 44) Haven, F. L., Bloor, W. R. & Randall, C.: *Cancer Res.*, **9**, 90, 1949.
- 45) Boyd, E. M., Connell, M. L. & McEwen, H. D.: *Can. J. Med. Sci.*, **30**, 741, 1952.
- 46) 及川淳: 腫瘍生化学, p. 314, 朝倉書店, 1965.
- 47) 猪俣賢三: 鹿児島医誌, **12**, 3487, 1961.

Studies on Low Density Lipoprotein in Tumor bearing Mice Part I. On lipids in serum and organ low density lipoprotein

By

Shinsuke OKAMURA

The Department of Surgery, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Sanae Tanaka, M. D.)

Low density lipoprotein in Ehrlich tumor bearing mice was studied on lipids in serum and Organs, and which were compared with those of normal mice by means of disc electrophoresis, biochemical analysis and thin-layer chromatography. The mobility of tumor bearing mice low density lipoprotein (L D L) in electrophoresis was smaller than that of normal mice L D L. The quantity of phospholipid to protein was decreased in tumor bearing mice L D L than normal.

The ratio of phospholipid to cholesterol in serum and liver was decreased in tumor bearing mice than normal. On the structure of phospholipids, the content of lecithine in tumor bearing mice L D L reduced by half than normal.