

担癌マウスの低密度リポタンパク質に関する研究

第 2 編

血清および肝低密度リポタンパクのステロイド代謝について

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

担癌生体とホルモンの関連性については, Beaton¹⁾ が乳癌末期患者の両側卵巣摘除により癌の発育が抑制されることを見だし, 実験的には去勢や性腺移植がマウスの乳癌発生に与える影響をみた Loeb²⁾ の研究をもつてはじまる, 担癌動物ではステロイドの代謝に異常がみられるということが知られている, Keller³⁾ は副腎における代謝異常を指摘し, Begg⁴⁾ は Walker carcinoma や Jensen sarcoma 移植ラットの副腎にステロイド代謝異常の存在することを報告し, 山本⁵⁾ は癌組織およびその副腎, 肝などにおける cholesterol の catabolism に異常があることを報告している。

私は第1編で Ehrlich 腹水癌腫瘍にふくまれている低密度リポタンパクの脂質について報告したが, 本論文では, この低密度リポタンパク (以下 LDL と略す) に含まれる steroid の状態について, ³H-cholesterol を使用し, cholesterol およびその metabolite の LDL 内における分布について担癌マウスと正常マウスとを比較検討しその代謝について推論を加えた。

第2章 実験方法

1) 実験動物: 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15g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, JTC11⁶⁾ として株化されたものである。この腫瘍細胞を dd 系雄マウスの背部皮下に, 1匹あたり約500×10⁴個を移植し, 10日後腫瘍が示指頭大から拇指頭大になったものを使用し

た。

2) 実験材料: 正常マウスおよび担癌マウスは, ともに同日生れのものでその血清および肝を使用した。

放射性コレステロールは, 住友化学原子力研究所にて, コレステロールにトリチウムガス接触法でトリチウムを置換して作製された ³H-cholesterol を使用した。

cholesterol は和光純薬株式会社より購入,

pregnenolone (Δ^5 -pregnen-3 β -ol-20-one) progesterone (Δ^4 -pregnen-3, 20-dione) は東京化成工業株式会社より購入。

11-deoxycorticosterone (Δ^4 -pregnen-21-ol-3, 20-dione) corticosterone (Δ^4 -pregnen-11 β , 21-diol-3, 20-dione) は塩野義研究所より提供されたものを使用した。

Kiesel Gel H nach stahl は Merck 社より購入したものを使用し, その他の試薬はすべて試薬特級を使用した。

3) 実験方法

³H-cholesterol, specific activity 107 μ c/mg, 5mg をエタノール0.4ml に溶かし, 生理食塩水50ml に加え, emulsion とした。この溶液0.5ml をマウス腹腔内に注入, 1匹平均 ³H-cholesterol 50 μ g を注入した。注入後12時間経過したマウスからクロロホルム麻醉下に, 血清および肝をとり, そのホモジネートの10×10⁴×g 上清より硫酸デキストラン沈澱法をもちいて, 第1編, 第2章, 第4節でのべた方法にしたがい LDL を分離した。

4) 脂質抽出, LDL の20倍量のエーテル: エタノール (1:3v/v) で脂質抽出をおこなった後, 50°C, N₂ ガス下に蒸発乾固させ, 得られた脂質はクロロホルムに溶解し実験試料とした。

5) ステロイド分離法

マウス腹腔内への ^3H -cholesterol 注入により産出された cholesterol 代謝物質の分離は, pregnenolone, progesterone および 11-deoxycorticosterone の純品を併用し, 薄層クロマトグラフィーでおこなった。

I) 固定相: Merck 製 Kiesel Gel H をもちい, $20 \times 20\text{cm}$ の薄層板に $500\ \mu$ の厚さの薄層を作成し, 105°C , 2時間加熱, 活性化した直後のものを使用した。

II) 展開材料: 4) により得たクロロホルム溶解実験試料を microsyringe にて $30\ \mu\text{l}$ づつ薄層板下縁から 2.5cm の位置に 1cm の線状に spot した。

III) 展開溶媒: Neher⁷⁾ の方法で, cyclohexane, ethyl acetate, ethanol (45:45:10) をもちいた, 薄層の展開に先だち, 展開槽を展開溶媒で, 室温にて約1時間飽和させた。展開には約45分を要した。

IV) 発色: 展開後 5% リンモリブデン酸エタノール溶液を噴霧し, 100°C , 20分間加熱して各物質を発色させ, 展開部位を明確にし, 各物質の相当部位の薄層をミクロスパーテルで削り落してカウント測定に供した。

$R_f = 0.53 \sim 0.60$ までに pregnenolone と progesterone の展開部位を認め, $R_f = 0.38 \sim 0.41$ に 11-deoxycorticosterone, $R_f = 0.23 \sim 0.26$ に corticosterone の展開部位を認めた。これらの展開部位の薄層を削り落とし, 薄層に含有されるステロイドを各々酢酸エチル 10ml で溶出した。室温にて約30分を要した。ついで更に物質の分離を明確にする為に, Carrier として各試料に各々相当する純品 $0.5\ \text{mg}$ を加え, 薄層上にスポットし, chloroform: ethanol (90:10 v/v) の溶媒で再度クロマトグラフィーをおこなった。この展開分離により, progesterone は $R_f = 0.73 \sim 0.75$ に, pregnenolone は $R_f = 0.58 \sim 0.62$ に存在し両者は完全に分離された。これらの薄層に紫外光線 2537\AA (NIKKO SEKIEI WORK Model LS-DI) を照射して展開帯を明確にし, 相当部位の薄層を削り落とし, ステロイドを抽出しその中に含まれるアイソトープ含有量を測定した。

6) 放射能測定法: 薄層クロマトグラフィーより削り落された Kiesel Gel H の粉末にエタノール $10\ \text{ml}$ を加え, 試料をエタノールに溶出させ, 4番のガラスフィルターで濾過し, エタノールを窒素ガスにて $1\ \text{ml}$ に濃縮する, それに $4\ \text{mg}$ の PPO (2, 5-diphenyl oxazole) と $100\ \text{mg}$ の POPOP (1, 4-bis-2-(5-phenyl oxazolyl)-benzene) をトルエン 1.01 に溶

解して作成されたシンチレーション・カウンター用溶液 $15\ \text{ml}$ を加え Packard Tri-Carb 3365 液体シンチレーションカウンターで5分間カウントして放射能を測定した。

第3章 実験成績

第1表および第2表は正常マウスにおいて ^3H -cholesterol 腹腔内注入後血清および肝にとり込まれる速度とその代謝状態を経時的に観察し, そのカウント数を cpm で表わしたものである。第1図および

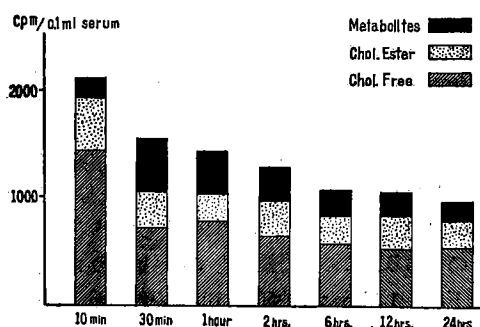
第1表 ^3H -cholesterol metabolites in SERUM
(cpm/0.1 ml serum)

	cholesterol free	cholesteryl ester	cholesterol metabolites
10 min	1429	486	175
30 min	715	329	514
1 hour	772	257	386
2 hrs.	644	329	315
6 hrs.	572	272	229
12 hrs.	529	315	215
24 hrs.	558	243	186

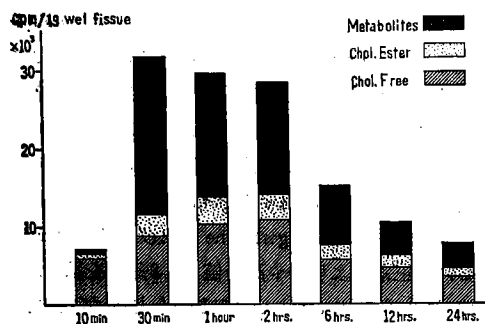
第2表 ^3H -cholesterol metabolites in LIVER
(cpm/0.1 g wet tissue)

	cholesterol free	cholesteryl ester	cholesterol metabolites
10 min	589	37	58
30 min	898	262	2047
1 hour	1024	361	1585
2 hrs	1088	344	1452
6 hrs	568	214	745
12 hrs	440	181	422
24 hrs	422	96	254

第1図 ^3H -Cholesterol Metabolites in Serum



第2図 ^3H -Cholesterol Metabolites in Liver



第2図は第1表および第2表の数値をヒストグラムで表わしたものである。血清では、注入10分後は cholesterol free が総コレステロールの74%を占め、metabolites は8%であるが30分後から2時間の間で cholesteryl ester が33%と増加し、metabolites も24%に増加している。6時間以後では cholesteryl ester が約37% metabolites が約20%となり安定した状態となっている。肝では注入10分後で cholesterol free が総コレステロールの93%を占め、metabolites は8%であるが30分から2時間の間で、cholesteryl ester が22%と増加し、metabolites は63%に増加している。6時間から12時間後で cholesterol ester は約28%となり metabolites は約40%となっている。以上の結果から ^3H -cholesterol を腹腔内に注入して、血清および肝にとりこまれ、その代謝状態を観察するには注入後6時間以後の状態が適しているものと考え ^3H -cholesterol 注入後の LDL を分離する時間的指標とした。

第3表は正常マウスと担癌マウスにおける血清への ^3H -cholesterol のとりこみを cpm で表わしたものである。正常血清では cholesteryl ester は34% cholesterol free は66%で、その metabolites は22%である。担癌血清では cholesteryl ester は37%

第3表 ^3H -cholesterol metabolites (12 hrs. after)
(cpm/0.2 ml serum)

	serum of normal	serum of tumor bearing
cholesteryl ester	483	426
cholesterol free	919	701
pregnenolone & progesterone	76	101
DOC	183	132
corticosterone	47	140
polar steroid	106	511

cholesterol free は63%で、その metabolites は43%である。すなわち担癌血清において正常血清の2倍の metabolites を示している。ester と free との間には正常と担癌の差は認められない。

第4表 ^3H -cholesterol metabolites (12 hrs. after)
(cpm/1 g wet tissue)

	serum of normal	serum of tumor bearing
cholesteryl ester	495	483
cholesterol free	4197	3278
pregnenolone & progesterone	324	326
DOC	384	336
corticosterone	143	126
polar steroid	750	1030

第4表は ^3H -cholesterol の肝へのとりこみを cpm で表わした正常、担癌の比較である。正常肝では cholesteryl ester は10%、free は90%で、その metabolites は25%である。担癌肝では ester が12%で正常肝との著明な差異はないが、metabolites は32%で血清におけると同様に担癌マウスにおいて metabolism の亢進が推察される。

第5表 ^3H -cholesterol metabolites in LDL
(cpm/1 mg protein)

	serum of normal	serum of tumor bearing
cholesteryl ester	71369	34485
cholesterol free	25008	20171
pregnenolone & progesterone	1738	3285
DOC	1387	3017
corticosterone	877	2143

第5表は血清 LDL における正常と担癌の比較を cpm で表わしたものである。正常血清 LDL では、cholesteryl ester が74%、free が26%を占め、その metabolites は13%である。すなわち血清 LDL においては cholesteryl ester が正常より担癌でやや減少(10%)しているが、metabolites では担癌が正常の2倍以上を示し、第3表に示した血清における metabolites と同様に metabolism の亢進が推察される。

第6表は肝 LDL における正常と担癌の比較を cpm で表わしたものである。正常肝 LDL では、

第6表 ^3H -cholesterol metabolites in LDL
(cpm/1 mg protein)

	liver of normal	liver of tumor bearing
cholesteryl ester	3481	5106
cholesterol free	16724	11869
pregnenolone & progesterone	1205	3017
DOC	672	1458
corticosterone	436	738

cholesteryl ester が17%, free が83%を占め, その metabolites は10%である。担癌肝 LDL では, ester が30%, free が79%を占め, その metabolites は23%である。すなわち肝 LDL では cholesteryl ester が正常より担癌で約2倍の増加を示し, metabolites でも担癌が正常の2倍以上を示している。

考 按

cholesterol の合成は主として肝でおこなわれ, lipoprotein として血中を移動するが, その大部分はエステル化された状態で1,019~1,063の密度をもつ LDL に存在する⁹⁾と言われている。本実験では第5表に示すごとく正常マウス血清 LDL では, cholesteryl ester は総コレステロールの74%を占め, 担癌では63%を占めている, これを第3表の血清中のエステル型と比較すると, 正常マウス血清中でエステル型は34%, 担癌マウス血清中で37%であり大部分がエステル化された状態で LDL 中に存在することを裏づけていると考えられる。

cholesterol の steroid hormone への転換過程¹⁰⁾¹¹⁾について考察してみると, 第5表に示すごとく血清 LDL では担癌血清 LDL において pregnenolone および progesterone は, 注入した ^3H -cholesterol の5.2%で, この値は正常血清 LDL の3倍以上である。DOC は4.7%でやはり正常血清 LDL の3倍以上であり, corticosterone では担癌血清 LDL は3.3%で正常血清 LDL の約4倍を示している。また, 第6表に示す肝 LDL では, 担癌肝 LDL において pregnenolone および progesterone は13.5%で正常肝 LDL の2倍以上であり, DOC では6.4%で正常肝 LDL の3倍以上である。corticosterone では3.3%で正常肝 LDL の2倍以上となつている。以上のごとく担癌 LDL に含有される cholesterol metabolites は正常 LDL に比較して血清, 肝ともに2~3倍の

値を示し, 担癌マウスにおける cholesterol metabolism の亢進が推察される。第3表に示す血清の cholesterol metabolites は担癌血清が corticosterone および polar steroid において正常血清の3~4倍の metabolites を示しているが, pregnenolone progesterone および DOC には著明な差は認められない。第4表に示す肝の cholesterol metabolites では, 担癌肝が pregnenolone, progesterone および polar steroid において正常肝よりやや高い値(0.8%)を示すが, DOC および corticosterone では殆んど差がない。このことは, 第5表, 第6表の実験結果から考えて, LDL が cholesterol metabolites の血中移動に関与する重要な factor になつていることを示すものと考ええる。

結 語

low density lipoprotein 中の steroid について, Ehrlich 腹水癌移植雄マウスの腹腔内に ^3H -cholesterol を注入し, 血中, 肝の24時間までの steroid metabolites の状態を調べたところ6時間以後では安定した状態を示した。そこで12時間後の血中および肝の LDL を dextran sulfate precipitation method¹²⁾¹³⁾により分離し, その中の steroid の分布を調べ正常マウス LDL と担癌マウス LDL について比較検討した。

1) 担癌マウス血清 LDL の cholesteryl ester 対 cholesterol free は, 63:37で血中 cholesterol の大部分が ester の状態で LDL にとりこまれているが, この cholesteryl ester/cholesterol free の比は正常マウス血清 LDL との間有意の差は認められない。

2) 血清 LDL における cholesterol metabolites は担癌血清 LDL が正常血清 LDL より3~4倍の metabolism の亢進がみられた。

3) 肝 LDL における cholesterol metabolites は担癌肝 LDL が正常肝 LDL より2~3倍の metabolites の亢進がみられた。

4) cholesterol の steroid hormone への転換過程では, pregnenolone, progesterone, DOC および corticosterone への代謝において担癌血清 LDL における代謝は, すべての代謝過程において正常血清 LDL の3~4倍の値を示している。

5) 肝 LDL における steroid への代謝過程では, 担癌肝 LDL が正常肝 LDL の2~3倍の値を示し, 担癌体の steroid への代謝の亢進が考えられる。

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5回ステロイド班研究会および第40回日本生化学会総会で発表した)

文 献

- | | |
|--|--|
| <p>1) Beatson, G. T.: <i>Lancet</i>, 2, 104, 1896.</p> <p>2) Loeb, L.: <i>J. Med. Research</i>, 40, 477, 1919.</p> <p>3) Keller, M.: <i>J. Clin. Endocrinol. Metab.</i>, 16, 1075, 1956.</p> <p>4) Begg, R. W.: <i>Cancer Research</i>, 11, 341, 1951.</p> <p>5) Yamamoto, Y. Shinzeki, K. and Narusue, M.: <i>Acta Med. Okayama</i>, 20, 29, 1966.</p> <p>6) Y. Yamamoto, S. Tanaka: <i>Gann</i> 58, 147, 1967.</p> <p>7) R. Neher: <i>Steroid chromatography</i>. Elsevier Publ., Amsterdam 1964.</p> <p>8) Sato, J.: <i>Bull. Cancer Inst.</i>, Okayama Univ.</p> | <p>Med. School 1, 42, 1961.</p> <p>9) Harold A. Harper: <i>Review of physiological chemistry</i> p. 242. Lange Medical Publ.</p> <p>10) K. Shimizu, M. Gut, and R. I. Dorfman: <i>J. Biol. Chem.</i>, 237, 699, 1962.</p> <p>11) Ichii, S. Kobayashi, S. and Matsumoto, M.: <i>Steroids</i>, 5, 663, 1965.</p> <p>12) D. G. Cornwell, F. A. Kruer: <i>J. Lipid Research</i> 110, 2, 1961.</p> <p>13) M. Burstein, and J. Samaille: <i>J. Physiol. (Paris)</i>, 49, 83, 1957.</p> |
|--|--|

Studies on Low Density Lipoprotein in Tumor bearing Mice
Part II. On steroid hormone in serum and liver
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 the cholesterol conversion to steroid hormone in serum and liver, and which were compared with those of normal mice by means of thin-layer chromatography and radioactivity. ^3H -cholesteryl ester was completely formed by 6 hours after the ^3H -cholesterol administration from peritoneal cavity. The most part of the cholesterol was esterified and incorporated into lipoproteins.

The metabolic processes were studied in Ehrlich ascites carcinoma bearing mice. The cholesterol conversion to steroid hormone in tumor bearing mice L D L was elevated twice to four times than the normal.
