

論文内容要旨

緒言

Neocarzinostatin(NCS)は1964年, *Streptomyces carzinostaticus*の培養濾液より分離された18種, 96個のアミノ酸からなる分子量約9300の酸性の高分子抗腫瘍性抗生物質であり, その作用機作はDNA合成の特異的な阻害作用と分裂阻害作用である。我々はNCSの精製法の検討中, NCS粗物質中にNCSの作用を特異的に阻害する拮抗物質が含まれていることを見出した。この拮抗物質はCM-celluloseのカラムクロマトでNCSよりも先に溶出されることからこの物質をpre-neocarzinostatin(pre-NCS)と名づけた。最終的に得られたpre-NCSは, 化学的にはNCSに酷似しており, それ自身は抗菌作用も抗腫瘍作用もなければ毒性もないが, NCSの個有の生物活性である抗菌作用, 抗HeLa作用および抗腫瘍作用を特異的に阻害した。本研究はpre-NCSの産生, 精製法, 物理化学的性状および拮抗作用を明らかにすることが目的である。

材料と方法

- 1 pre-NCSの検定法: *Sarcina lutea*の含菌平板にpre-NCSを含むバルブディスクをのせ, 37℃, 3時間拡散させた。次にこのバルブディスクを取り除き, この上に2 mcg/mlのNCS溶液に浸した濾紙を貼布し室温20分間放置後, 濾紙をはがし37℃で15時間培養した。バルブディスクの周辺に生ずる細菌の発育増殖帯(円)の直径よりpre-NCSを定量した。
- 2 抗菌作用: NCSの抗菌活性およびこの活性に対するpre-NCSの拮抗作用は比濁法で検討した。用いた菌は*Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*および*Mycoplasma gallisepticum*である。
- 3 HeLa細胞のDNA合成阻害作用: 10%牛血清を添加したYLEで2日間単層培養した増殖期のHeLa細胞に0.5 μ ci/mlの³H-thymidineを添加し, 常法通りPCA不溶画分の放射活性を測定した。
- 4 抗腫瘍作用: 18~22gのdd系マウスに 2×10^7 個のsarcoma 180癌細胞を移植し, 24時間後より1日1回6日間腹腔内に連続投与し, 13日後の腹水量で抗腫瘍効果を判定した。
- 5 ¹³¹I-pre-NCSおよび¹³¹I-NCSの体内分布: McFarlaneらの方法でアイソトープを標識し, Sephadex G-25で精製した。8mg(4 μ ci)/4mlのラベルpre-NCSおよびラベルNCSを約2kgの家兎に静注し, 60分まで十分毎に採血し, 60分後に放血し, 1/10M PBS(PH6.8)で各臓器のホモジネートを作り, その放射活性を測定し

た。

実 験 結 果

- 1 Pre-NCSの産生：NCSの産生菌である *Streptomyces carzinostaticus* をグルコース、カザミノ酸を主成分とする培地で培養（27℃）した時、pre-NCSの産生は12時間後より急激に高まり27時間後を peak（280mcg/ml）としてその後徐々に減少した。一方NCSは20時間後より徐々に産生され48時間後に最高の500mcg/mlの titer を示した。
- 2 精製：27時間でbroth outした培養濾液を65%飽和硫酸で塩析し、得られた沈澱を透析、ゲル濾過、凍結乾燥して粗物質とした。さらにCMCのカラムクロマトでこの粗物質はNCS活性もpre-NCS活性もない分画S、pre-NCS活性を有する分画A、NCSの活性区分群である分画N-1、N-2およびN-3の計5つの分画に分けられた。分画AをCMCで再クロマトして最終的に白色粉末として、また硫酸溶液よりプリズム状の結晶としても得られた。200ℓより2.34gの収量であつた。
- 3 物理化学的性状：NCSもpre-NCSもUV、IRは典型的な polypeptide のパターンを示し、Disc電気泳動、等電点電気泳動の場で単一性を示した。また等電点はNCSでpH3.6、pre-NCSでpH3.15を示した。両物質とも18種、96（98）個のアミノ酸から成り、ヒスチジン、メチオニンは含まれず、4モルの1/2システチンの存在が示唆された。アミノ酸分析より分子量は9,300であつた。
- 4 拮抗作用：NCS前処理、両物質の同時処理では拮抗作用は全くみられなかつたが、NCS処理前にpre-NCSで処理した時にはNCSの抗菌作用、抗HeLa作用および抗腫瘍作用が拮抗的に阻害された。しかしpre-NCSの前投与でNCSのマウス毒性の低下は全く認められなかつた。
- 5 ¹³¹I-pre-NCS および ¹³¹I-NCSの体内分布：血中濃度の推移では両物質に差がなかつたが、体内分布では大きな差が見られ、大腸、小腸、肝、睪丸、大脳および肝ではNCSの4~6倍高い分布を示し、一方脾ではpre-NCSの方が4倍高く分布することが分つた。

考 察

pre-NCSはNCSと化学的に酷似しているがその拮抗作用の態度から、細胞への吸着部位が同じでも活性部位が異なること、また同時処理の実験から、細胞への吸着速度が異なることが示唆される。さらに家兎を免疫して得られたNCSの抗体は沈降反応でpre-NCSとcrossすることを確認している。S. luteaではNCSの1/100量のpre-NCSの前処理で明確な拮抗作用が見られたのに対し、HeLa細胞では逆に10倍量のpre-NCSを必要とした。このことはNCSもpre-NCSも動物の血清で不活化されるが、その不活化速度がpre-NCSはNCSよりも16倍も早いことにも起因すると考えられる。米原らの報告したBlasticidin Sの拮抗物質detoxinは同じnucleoside生物質であるPolyoxinあるいはmiharomycinの作用をも拮抗するが、pre-NCSはNCSの作用のみを特異的に阻害する。さらにdetoxinと異なりpre-NCSはNCSの抗癌作用を拮抗するも毒性を軽減せず、このことは1つにはpre-NCSとNCSの体内分布の相異によるものであり、また上述の血清あるいは体液による不活化の速度も関係していると考えられる。

審査結果の要旨

本論文は一放線菌 *Streptomyces carzinostalicus* の産生する制癌性抗生物質である Neocarzinostatin (NCS) の研究に、培養液乃至は粗物質中に化学的には NCS と極めて類似しており乍ら作用としては全く逆に NCS の抗菌作用、抗腫細胞作用を特異的に阻止する新物質の存在に気づき、これを分離精製し、その生物学的活性を明らかにした論文である。

NCS は約 100 ケのアミノ酸からなる分子量約 10,000 の酸性の単純蛋白であるが、特異的に感受性を示す八連球菌や He La 細胞の DNA 合成を阻害する。ここで分離された拮抗物質は pre-neocarzinostatin (pre NCS) とよばれるが、精製の結果、分子量もアミノ酸組成も NCS と異なる。ただし等電点はやや酸性 (3.15) である。pre NCS を八連球菌に予め与えたあと NCS を与えると、特異的に NCS の作用を阻害するが、他の抗生物質や抗腫瘍物質の作用を阻害しない。上記の事実はそのまま He La 細胞にもあてはまる。換言すれば pre NCS 単独では八連球菌にも He La 細胞にも何ひとつ作用を及ぼさず、またマウスにも毒性を示さないが、あとから NCS を投与するとその作用を競合的に阻止する事が判明した。ただし動物実験では pre NCS は NCS の抗腫瘍作用と拮抗するが毒性とは拮抗しない事が判明した。その説明として ¹³¹I ラベルの NCS および pre-NCS を作製し、体内分布の動態をウサギで追求したところ、例えば肝臓では NCS が pre NCS の 4-6 倍高く分布し、脾臓では逆に pre NCS の方が 4 倍高く分布する事が判明した。換言すれば同じ局所に注射する制癌効果の検定では pre NCS は NCS の作用に拮抗するが、静脈内注射では NCS と pre NCS の分布が臓器毎に異なるため拮抗作用を示さぬものと解釈された。

なお細胞レベルに於ては pre NCS と NCS とは吸着部位を等しくするが、pre NCS には NCS の作用基を蛋白のコンフォーメーションの上で欠いているものと判断される。ただし血清学的に NCS と pre NCS の鑑別は現在のところ不可能である。

以上本論文は pre NCS という新物質を NCS の培養液から新たに分画採取に成功し、その物理化学的特性を NCS と比較して明らかにし、その特異的な生物活性 (NCS に対する拮抗阻害) を明らかにした点、充分博士論文に値するものと認める。