

ラット組織中のスペルミジン合成酵素阻害による  
ポリアミンの調節

甲第28号

小林 正樹

ラット組織中のスペルミジン合成酵素阻害による  
ポリアミンの調節

小林 正樹

# 目次

緒言 .....	1
第 1 章 IS-MS によるポリアミン分析法の拡張と応用 .....	4
第 1 節 アセチルポリアミンの同時分析 .....	4
第 2 節 経口投与 $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンのトレーサー研究 .....	9
第 3 節 小括 .....	13
第 2 章 スペルミジン合成酵素阻害剤の選択 .....	15
第 1 節 精製酵素に対する阻害性の比較 .....	15
第 2 節 ラットへの経口投与による評価 .....	17
第 3 節 小括 .....	18
第 3 章 経口投与 4MCHA によるラット組織中ポリアミンレベルの 調節 .....	19
第 1 節 投与量の影響 .....	20
第 2 節 長期連続投与 .....	22
第 3 節 ポリアミンとの同時投与 .....	24

第 4 節 小括 .....	26
第 4 章 経口投与4MCHA の再生肝に及ぼす影響 .....	28
第 1 節 再生肝重量とポリアミン .....	28
第 2 節 免疫組織化学的検討 .....	31
第 3 節 小括 .....	32
総括 .....	33
略語表 .....	35
謝辞 .....	36
実験の部 .....	37
引用文献 .....	46

# ラット組織中のスペルミジン合成酵素阻害によるポリアミンの調節

## 緒言

哺乳動物細胞中に含まれるポリアミンは、ジアミンであるプトレシン (put) を含めてスペルミジン (spd) およびスペルミン (spm) を指すのが一般的であり、これらの生合成および相互変換経路は

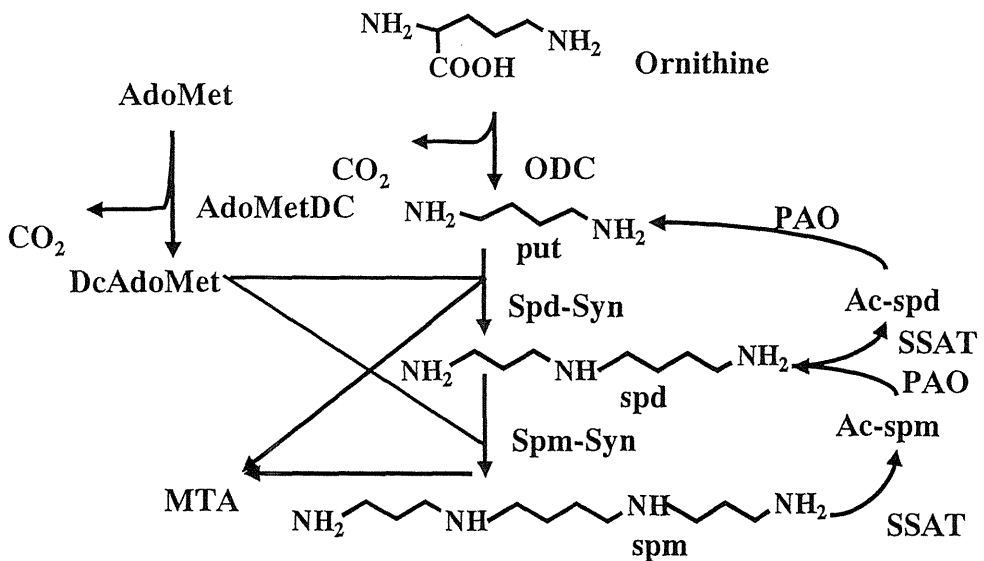


Fig. 1 Biosynthetic Pathway of Polyamines

すでに確立されている (Fig. 1)<sup>1,2)</sup> すなわち、アルギニンから生成するオルニチンが、誘導酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) により put になり、一方、S-アデノシルメチオニン (AdoMet) が、誘導酵素である AdoMet 脱炭酸化酵素 (AdoMetDC) により、脱炭酸化 AdoMet (dcAdoMet) になる。構成酵素であるスペルミジン合成酵素 (spd-syn) は put に dcAdoMet のアミノプロピル基を転移して spd を合成し、同じく構成酵素であるスペルミン合成酵素 (spm-syn) は spd に dcAdoMet のアミノプロピル基を転移して spm

を合成する。また、誘導酵素である spd/spm-N<sup>1</sup>-アセチル転移酵素(SSAT)により、アセチル CoA のアセチル基をアミノプロピル基側の末端アミノ基に転移された spd および spm は、構成酵素であるポリアミン酸化酵素(PAO)により、それぞれ put および spd に変換される。また、spm を直接 spd に変換する spm 酸化酵素(SMO)も最近発見された。<sup>3,4)</sup> これらのほかに、ジアミン酸化酵素(DAO)による put の代謝に代表されるポリアミンの異化経路もいろいろ知られている。<sup>5,6)</sup>

細胞の増殖・分化のいろいろな生理的条件の下で複雑に変動するポリアミンは、このような生合成、代謝経路のほかに細胞外との取り込み・排出機構によっても調節されており、各因子がどのように機能しているかを解析することは、ポリアミンの生理的意義の解明のみならず、増殖・分化の調節にも役立つと考えられている。<sup>7,8)</sup> そのために、各酵素に対する選択的阻害剤の開発が精力的に行われてきた。とりわけ、ポリアミン生合成の律速酵素と考えられている ODC については多くの阻害剤が開発され、酵素自殺基質である  $\alpha$ -ジフルオロメチルオルニチン(DFMO)<sup>9)</sup> は、ポリ

Table 1 Effects of inhibitors of polyamine synthesis and polyamine analogues on polyamine content and cell growth

Inhibitor or analogue <sup>a</sup>	Target	Putrescine	Spermidine	Effect on spermine	Total polyamines	dcAdoMet	Growth
DFMO	ODC	↓	↓	NC <sup>b</sup>	↓	↑↑	↓↓↓
AbeAdo or CGP48664	AdoMetDC	↑↑	↓	↓	↑	↓	↓ <sup>c</sup>
AdoDATO or 4MCHA	Spermidine synthase	↑	↓	↑	NC	↑	NC
BDAP or AdoDATAD	Spermine synthase	↓	↑	↓	NC	↑	NC
BE-3-3-3, BE-3-4-3, or BE-3-7-3	ODC and AdoMetDC	↓	↓	↓	↓↓↓	↓	↓↓↓ <sup>d</sup>
BE-4-4-4-4	Not fully defined	↓	↓	↓	↓↓↓	NR <sup>e</sup>	↓↓↓ <sup>d</sup>

<sup>a</sup> NC, little or no change

<sup>b</sup> After prolonged exposure, treatment with AbeAdo becomes cytotoxic.

<sup>c</sup> Cytotoxic

<sup>d</sup> NR, not reported

アミン研究の発展に大いに貢献してきた。各生合成酵素に対する代表的な阻害剤或はポリアミンアナログが、培養細胞の生育やポリアミン含量、dcAdoMet 量にどのような影響を及ぼすかをまとめたものを引用して Table 1 に示す。<sup>10)</sup>

本研究の標的酵素である spd-syn の阻害は、Table 1 で示されるように、培養細胞中の spd を極端に減少させ spm を極端に上昇させるが、細胞の生育、増殖には影響が見られなかったため、研究者の関心が spd-syn に向けられなかったのは当然かもしれない。その上、in vivo で spd-syn 阻害研究を進めるための障害として、使用する阻害剤の問題、多数の生体試料中のポリアミンを正確に測定する分析法の問題などがあったために、in vivo での研究はこれまでほとんど行われなかった。しかし、バクテリア、植物を含めた生物界において spd は中心的なポリアミンであり、あらゆる増殖系で増え、増殖が止まれば減ることが知られており、spd が増殖・分化に深く関わっていることに疑いはない。このような事実から、in vivo で spd-syn を阻害して人為的に spd 量が調節できれば、正常な細胞機能に何らかの影響が生じるであろうと考え本研究を行った。ポリアミン分析法としてはすでに開発したイオンスプレーイオン化マスマスペクトロメトリー(IS-MS)による方法<sup>11)</sup>を利用することとした。

第 1 章には、IS-MS 法の応用面の開発について記述し、それを通じて本研究で使用した分析法の詳細がわかるようにした。第 2 章には、in vivo 実験に適した spd-syn 阻害剤の選択について検討した結果を記述した。第 3 章では、第 2 章の結果から選ばれた阻害剤、trans-4-methylcyclohexylamine (4MCHA)、をラットに経口投与し、組織中ポリアミンレベルに及ぼす効果について記述した。第 4 章では、第 3 章の結果に基づき、再生肝に及ぼす 4MCHA の効果を記述した。

## 第1章 IS-MSによるポリアミン分析法の拡張と応用

ポリアミン分析は、癌の診断と治療研究の両面で有用な知見をもたらす可能性を秘めている。近年になって、ジアセチルスペルミン ( $\text{Ac}_2\text{-spm}$ ) が癌患者尿中で増えることが報告され、<sup>12)</sup> 患者の予後を予測する指標として利用されている CEA より優れているという報告<sup>13)</sup> もあり、注目されている。一方、癌の治療面では、ポリアミン生合成酵素阻害剤などを用いて、細胞内のポリアミン量を調節する努力が行われている。<sup>10)</sup> そのような研究では、動物個体を使って細胞外からのポリアミンの取り込みも考慮しなければならない。<sup>14)</sup> IS-MS 法は  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンを内標準物質として用い、カラムなどを用いずに質量分析装置のみで分離定量を同時に行う方法である。この方法は、質量の大きい  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンを内標準物質に用いて、 $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンをトレーサーとする実験法の開発につながった。第1節では、方法の拡張と癌患者尿中の  $\text{Ac}_2\text{-spm}$  の測定について記述し、第2節では担癌ラットを用いてポリアミンのトレーサー実験に関して得られた知見を記述する。

### 第1節 アセチルポリアミンの同時分析<sup>15)</sup>

#### 1-1 IS-MS 法の拡張

IS-MS によるポリアミン定量法の概略は、試料に内標準物質の  $^{15}\text{N}$ -put、 $^{15}\text{N}$ -spd、 $^{15}\text{N}$ -spm を加え、CM-セルロースの小カラムにかけて put、spd、spm を同一分画に溶出した後、HFB 誘導体にして直接 IS-MS で分析し、それぞれの内標準物質に対する各ポリアミンのイオン強度比から3種ポリアミンを同時定量する方法である。<sup>11)</sup> この方法に  $\text{Ac}_2\text{-spm}$ 、モノアセチルスペルミジン ( $\text{Ac-spd}$ ) を加えて同時定量する方法に拡張することを試みた。すでに用いている前処理及び、IS-MS 測定のやり方が適応できるかどうかを



調べた結果、特に障害になるような問題は無かった。すなわち、Ac<sub>2</sub>-spm および Ac-spd は、CM-セルロースの前処理で put、spd、spm と同一分画に溶出されるので同時分析が可能であり、HFB 化の条件で脱アセチルされる危険性はないことが Ac-spd、Ac-spm、Ac<sub>2</sub>-spm を用いて確かめられた。また、それらの HFB-誘導体のマススペクトルにおいて、主イオンピークはアンモニウムイオンではなく、プロトンを結合したイオンであることが分かった。これらの知見を基にして、内標準物質に用いる <sup>15</sup>N-標識アセチルポリアミンを合成し、設定した IS-MS 条件で分析して得られたマススペクトルの一例を Fig. 2 に示す。なお、菊川らの試薬<sup>16)</sup>を用いるジアセチルポリアミンの改良合成法を実験の部に記す。

HFB-put、HFB-spd、HFB-spm では、既報のとおり H<sup>+</sup>結合イオ

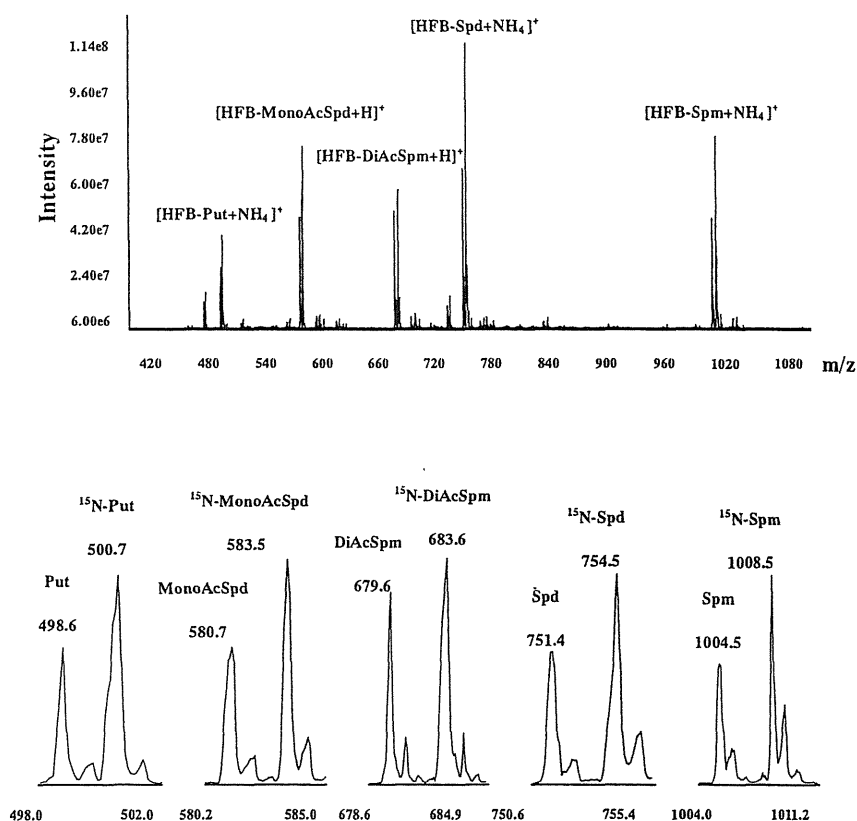


Fig. 2 Mass spectrum of a mixture of five polyamine and their <sup>15</sup>N-substituents

ンピークと  $\text{NH}_4^+$  結合イオンピークの両者が検出され、 $\text{HN}_4^+$  結合イオンピークが主イオンピークとなっているのに対し、HFB-Ac<sub>2</sub>-spm、HFB-Ac-spd では、同様に  $\text{H}^+$  結合イオンピークと  $\text{NH}_4^+$  結合イオンピークが検出されたが、 $\text{H}^+$  結合イオンピークの方が主イオンピークとなり前者の場合とは際立った対照を示していた。なお Ac-spd については N<sup>1</sup>-Ac-spd も N<sup>8</sup>-Ac-spd も質量が同じなため MS では区別がつかないことが分かり、それ以上の検討は行わなかった。

### 1-2 N<sup>1</sup>,N<sup>12</sup>-ジアセチルスペルミン定量法の確立

標品の HFB-Ac<sub>2</sub>-spm および HFB-<sup>15</sup>N-Ac<sub>2</sub>-spm の拡大したマスペクトルを Fig. 3 に示す。ここで m/z 679.3 と 696.3 は Ac<sub>2</sub>-spm 由来のピークで 683.3 と 700.3 は <sup>15</sup>N-Ac<sub>2</sub>-spm 由来のピークである。このスペクトルに基づき m/z 683.3 のイオン強度に対する m/z 679.3 のイオン強度比を用いて Ac<sub>2</sub>-spm を定量することにした。

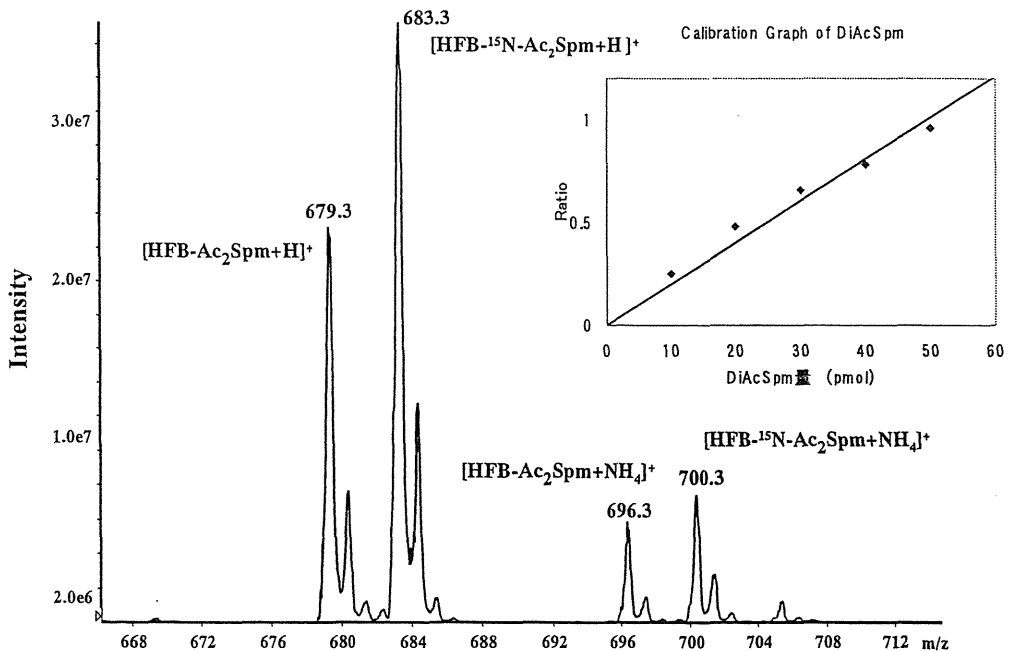


Fig. 3 Mass spectrum of Ac<sub>2</sub>-spm

一定量の  $^{15}\text{N-Ac}_2\text{-spm}$  に対し標品の  $\text{Ac}_2\text{-spm}$  量をかえて得られた検量線は良好な直線性を示した。

次に実際の癌患者尿を用いてこの方法の信頼性を検討した。癌患者尿に対して内標の  $^{15}\text{N-Ac}_2\text{-spm}$  を加え、 $\text{Ac}_2\text{-spm}$  の量をかえて添加回収実験を行った。試料の前処理は常法にしたがい、測定した結果を Table 2 と Fig. 4 に示す。この結果から本法が精度、正確さ共に満足できるばかりでなく、 $\text{Ac}_2\text{-spm}$  の同定も同時に行っており、信頼性の高い方法であることが証明された。なお、グラフから読み取れるようにこの癌患者尿中には約 0.2nmol の

Table 2 Reliability of the method examined by addition of various amounts of  $\text{Ac}_2\text{-spm}$  to urine of a cancer patient <sup>a)</sup>

	$\text{Ac}_2\text{Spm added(nmol)}$				
	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3
Ratio <sup>b)</sup>	$0.37 \pm 0.02^c)$	$0.42 \pm 0.02$	$0.49 \pm 0.03$	$0.56 \pm 0.03$	$0.61 \pm 0.04$
cv (%)	5.4	4.8	6.1	5.4	6.6

<sup>a)</sup> To 0.1ml of urine were added various amounts of  $\text{Ac}_2\text{Spm}$  and 0.6 nmol of  $^{15}\text{N-Ac}_2\text{Spm}$  as internal standard.

<sup>b)</sup>  $\text{Ac}_2\text{Spm}/^{15}\text{N-Ac}_2\text{Spm}$

<sup>c)</sup> Mean  $\pm$  S.D. (n = 9 : 3 samples , 3 determinations / sample )

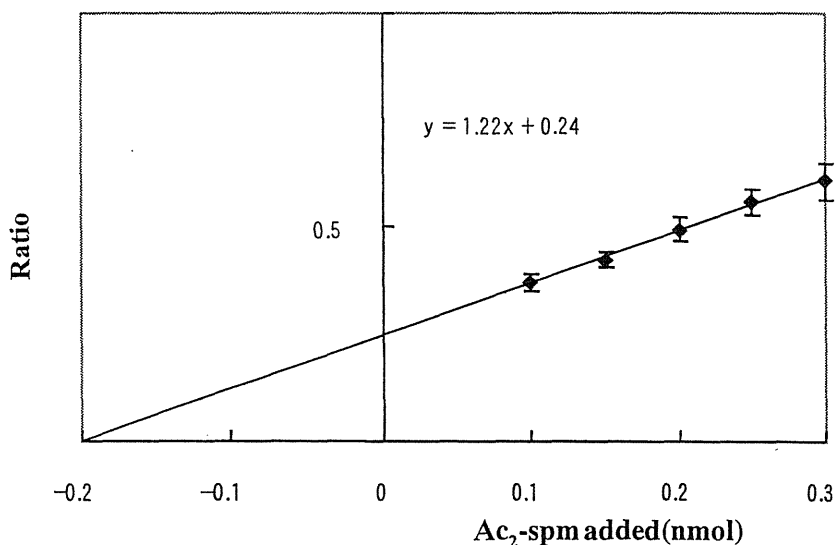


Fig. 4 Linearity of standard addition graph

Ac<sub>2</sub>-spm が含まれており、この値は ELISA 法の測定値とほぼ一致した。

### 1-3 癌患者尿の測定

すでに癌患者尿中の Ac<sub>2</sub>-spm は ELISA<sup>17)</sup>や HPLC<sup>12,18)</sup>で定量され、癌の診断・予後を占うマーカーとして研究が進んでいる。ここでは開発した方法の有用性を調べる目的で、都臨床研で ELISA により測定された同一癌患者尿を本法で測定し両者を比較した。17名の患者について ELISA 法と本法で測定した結果の相関を見たグラフを Fig. 5 に示す。グラフから相関係数は 0.94 となりいづれも信頼できる方法であることが証明された。同定しながら定量できる本法は、同定は出来ないが日常測定が可能な ELISA 法の有用性を確かめることができた。

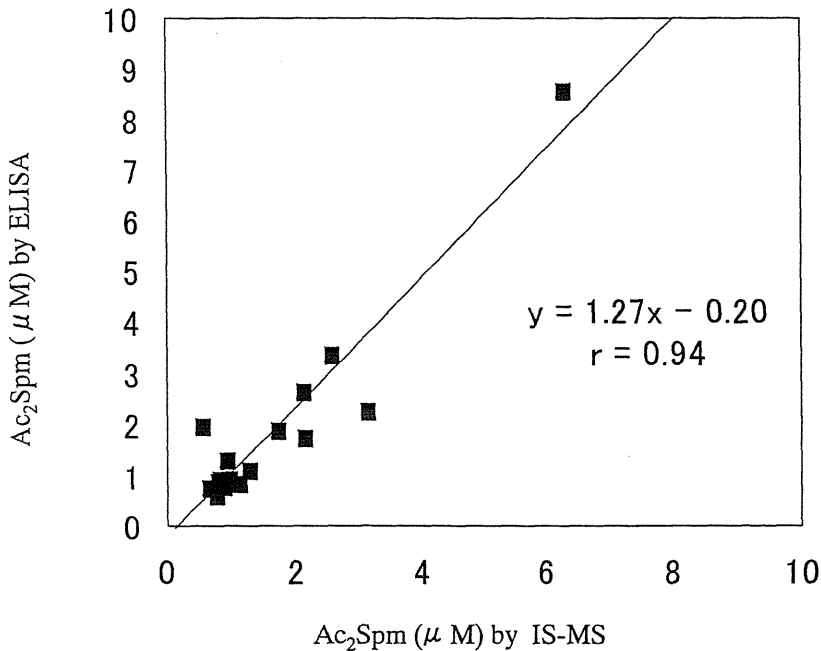


Fig. 5 Correlation Graph of Ac<sub>2</sub>-spm Concentrations in the Urine of 17 Cancer Patients Measured by ELISA and IS-MS

## 第2節 経口投与 $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンのトレーサー研究<sup>19)</sup>

### 2-1 トレーサー実験法

われわれはすでに  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンをトレーサー化合物として用いるポリアミントレーサー実験法を開発した。<sup>20)</sup> その概要は、 $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンを含む試料に新たに合成した  $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -標識ポリアミン<sup>21)</sup>を内標準物質として加え、CM-セルロースによる前処理を行ってポリアミン分画を集め、HFB化してIS-MSで直接定量する方法である。標品を用いて得られたマスペクトルをFig. 6に示す。内在性の put、spd、spm および  $^{15}\text{N}$ -put、 $^{15}\text{N}$ -spd、 $^{15}\text{N}$ -spm の全部で6種ポリアミンを同時に定量することができる。

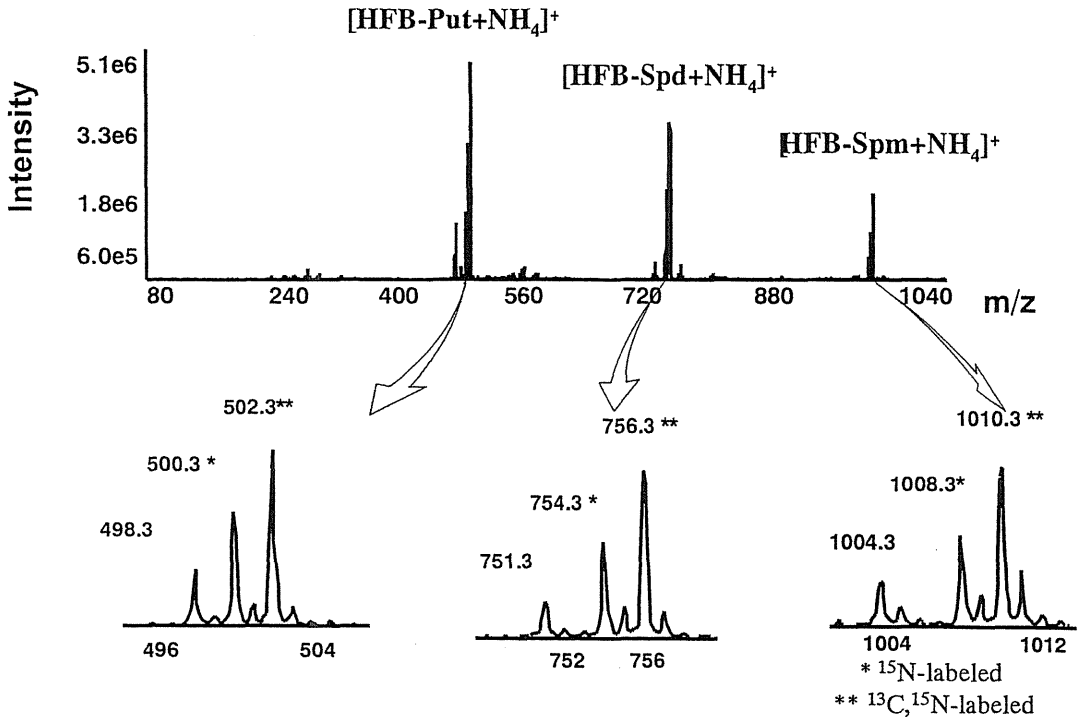


Fig. 6 Simultaneous mass analyses of endogenous put,spd,spm and  $^{15}\text{N}$ -labeled put,spd,spm

IS-MS のみの測定時間は3分以内ですみ、オートインジェクターを接続することにより多数試料の処理が可能になった。実際には、同一試料を三回測定して平均化した。組織試料中ポリアミンをさらに正確に測定するために二重測定を行い、一方には既知量

ポリアミンを添加して、標準添加法により定量値を算出した。前処理を含めた方法の詳細は実験の部に記す。

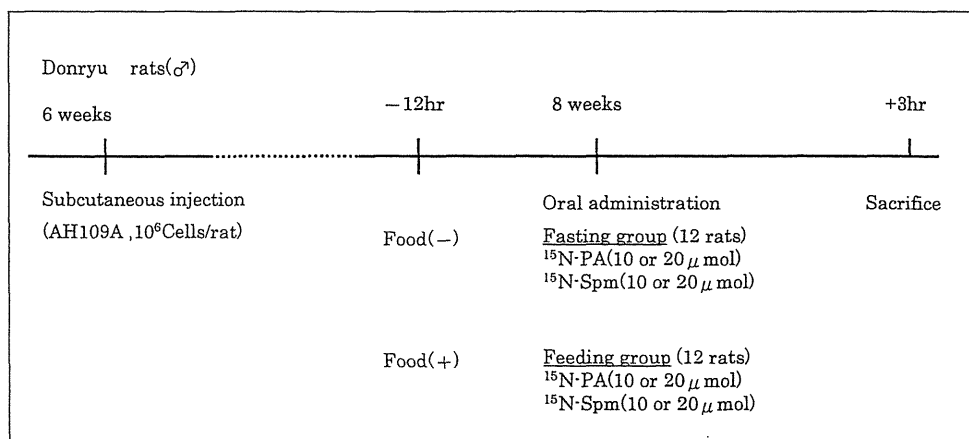
## 2-2 担癌ラットの作成

$^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンをラットに経口投与して取り込み実験を行うにあたり、食餌も含めた腸管内ポリアミンが担癌ラットの癌の生育を促進するという報告もあり、<sup>22-24)</sup> 癌への取り込みも同時に調べることにした。担癌ラットの作成に当たり、出来るだけ再現性のある担癌ラットが得られること、また、 $^{15}\text{N}$ -ポリアミンの取り込みや内在性ポリアミンを正常組織と比較できるような固形癌が好ましいこと、などを条件として検討した結果、ドンリュウラットの腹水肝癌細胞を同ラットの皮下に移植して固形癌を作成する方法を採用することにした。腹水肝癌細胞としては AH130 (TKG0530)、AH7974 (TKG0540)、AH109A (TKG0529)<sup>25)</sup>の三種について検討を行った。これらはいずれも DAB による肝癌由来細胞であり正常肝とくらべるのにも都合がよいと考えられた。種々検討した結果、AH109A の約  $10^6$  cells を 6 週齢のドンリュウラット (♂) の背部皮下に移植して、2 週間飼育したものを固形癌担癌ラットとして用いることにした。

## 2-3 投与実験条件の設定

$^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンの経口投与実験条件を次のように設定した。食餌中に含まれるポリアミンおよび腸内細菌由来あるいは消化液由来などのポリアミンによる  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミン希釈の影響を考慮し、 $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンの投与量を  $10\ \mu\text{mol}$  または  $20\ \mu\text{mol}$ /匹の 2 系列で行うこととし、さらに投与前 12 時間絶食した群 (Fasting group) と食餌を与え続けた群 (Feeding group) とに分けた。また、肝への  $^{15}\text{N}$ -spm と  $^{15}\text{N}$ -spd の取り込みに際して両者が競合するのではないかという SD ラットの結果<sup>20)</sup>の再検討も含めて、 $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンの投与は  $^{15}\text{N}$ -put、 $^{15}\text{N}$ -spd、 $^{15}\text{N}$ -spm の

3者同時投与 ( $^{15}\text{N-PA}$ ) と  $^{15}\text{N-spm}$  の単独投与の2系列で行うことにした。組織試料の採取は、Bardóczらのput投与実験結果、<sup>26)</sup>及びわれわれの実験結果から、投与後3時間に決めた。測定対象組織は、小腸、肝臓、腎臓、癌とした。実験のスケジュールは次のとおりで、 $^{15}\text{N-PA}$ 投与(4群)および $^{15}\text{N-Spm}$ 投与(4群)は各群3匹ずつで行った。



#### 2-4 結果と考察

測定結果のまとめは付表に示す。Fasting group と Feeding group について、それぞれ対応する 10 或は 20  $\mu\text{mol}$  投与  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンの測定値をくらべてみると、いくつかの例外を除けば、Feeding group の方が明らかに高かった。この結果は食餌中ポリアミンによる  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンの希釈効果から予想される結果とは矛盾していた。また、投与量の 10 或は 20  $\mu\text{mol}$  は 1 日のポリアミン摂取量のおよそ 50~150 倍であり、このことから食餌による希釈効果は無視してもよいことが分かる。さらに他の内在性ポリアミン(腸内細菌、消化液など)による希釈効果についても、 $^{15}\text{N-PA}$  と  $^{15}\text{N-spm}$  の 10  $\mu\text{mol}$  と 20  $\mu\text{mol}$  投与の値をそれぞれ比べてみて、およそ 2 倍前後の値を示していることから、少なくとも 10  $\mu\text{mol}$  以上の  $^{15}\text{N}$ -ポリアミン一回経口投与実験においては、

消化管腔内の内在性ポリアミンによる影響は余り考えなくてもよいことがわかった。 $^{15}\text{N}$ -PA 投与群の各臓器における  $^{15}\text{N}$ -put、 $^{15}\text{N}$ -spd、 $^{15}\text{N}$ -spm の量的大小関係は、Fasting group でも Feeding group でも同様な傾向を示した。すなわち、小腸では三者共にほぼ同じで、肝では  $^{15}\text{N}$ -spd  $>$   $^{15}\text{N}$ -spm  $\gg$   $^{15}\text{N}$ -put の順で、腎では  $^{15}\text{N}$ -spm  $>$   $^{15}\text{N}$ -spd  $\gg$   $^{15}\text{N}$ -put の順であった。癌では他の組織と比べて  $^{15}\text{N}$ -put が多く、 $^{15}\text{N}$ -spd は少なく、 $^{15}\text{N}$ -spm はさらに少なかった。

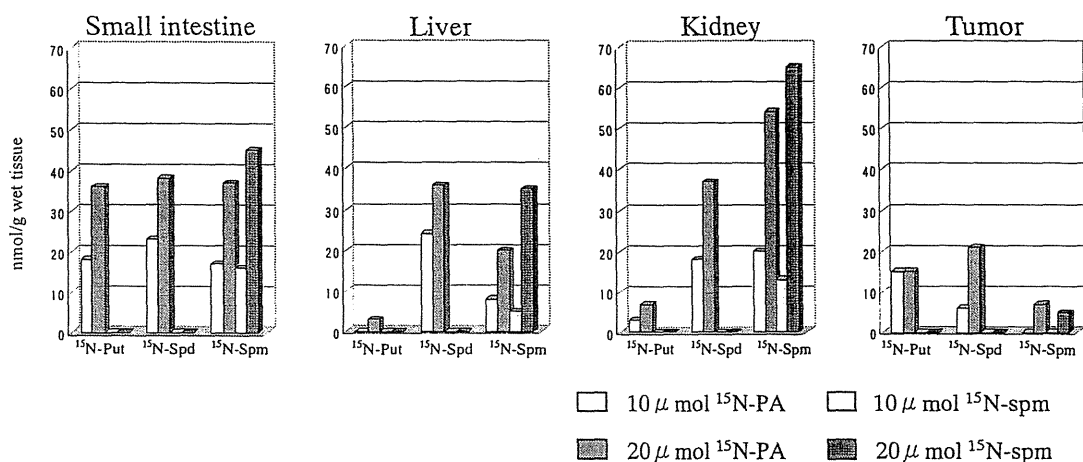


Fig. 7  $^{15}\text{N}$ -Polyamines in tissues of Feeding Rats

Fig. 7 は Feeding group についての  $^{15}\text{N}$ -ポリアミンの測定値をヒストグラムにしたものである。小腸においては  $^{15}\text{N}$ -PA、 $^{15}\text{N}$ -spm の 10 或は  $20\mu\text{mol}$  投与で測定値に明らかな濃度依存性が認められ、 $^{15}\text{N}$ -Put、 $^{15}\text{N}$ -Spd、 $^{15}\text{N}$ -Spm の値は各投与量でほぼ同じ値を示した。このことは小腸からのポリアミンの吸収が受動拡散機構によるとする説<sup>27-29)</sup>を支持している。肝臓では  $^{15}\text{N}$ -PA において、 $^{15}\text{N}$ -spd の値が  $^{15}\text{N}$ -spm の値よりも明らかに多く、また  $^{15}\text{N}$ -spm  $20\mu\text{mol}$  の単独投与での  $^{15}\text{N}$ -spm の値と  $^{15}\text{N}$ -PA  $20\mu\text{mol}$  投与での  $^{15}\text{N}$ -spd の値がほぼ同じであった。これは、spd と spm の取り込み系が同一であり、spd の方が取り込まれやすいという SD ラットの結果<sup>20)</sup>



を支持している。腎臓では、肝臓とは逆に、 $^{15}\text{N-PA}$  投与で  $^{15}\text{N-spm}$  が  $^{15}\text{N-spd}$  を上回っていた。これは肝臓だけではなくその他の組織でも同様な競合が起こり、より取り込まれにくい  $^{15}\text{N-spm}$  が腎臓に集まり、高値を示したと考えられる。癌組織でも  $^{15}\text{N-PA}$  投与で、 $^{15}\text{N-spd}$  が  $^{15}\text{N-spm}$  より高かったが、肝臓と比べてそれらの値は低く、外部からのポリアミンの取り込みは、活発ではないように見えた。全体をみて  $^{15}\text{N-Put}$  の収支が合わないのは明らかである。これは、生体内のアミン酸化酵素により  $^{15}\text{N-Put}$  が分解されるためであろうと思われる。<sup>6,37)</sup> 今回3種の  $^{15}\text{N-}$ ポリアミンを同時に投与し、それらの組織分布量を同時に測定、比較することができたため、腸管から吸収された  $^{15}\text{N-}$ ポリアミンの生体内挙動に関して有用な情報を得ることができた。

### 第3節小括

#### 3-1 アセチルポリアミンの同時分析

従来の IS-MS 法によるポリアミンの測定は、put、spd、spm の3種を対象にして、カラムなどの分離操作を行わずに一回の測定に3分間かけて、直接 MS で同定と定量を行ってきた。本研究では、これにアセチルポリアミン、とりわけ癌との関係が指摘されている  $\text{Ac}_2\text{-spm}$  を加えることを目的にして行った。 $\text{Ac}_2\text{-spm}$  は、CM-セルロースの前処理でポリアミン分画に含まれ、HFB 化条件で脱アセチルは認められず、主イオンピーク [ $\text{HFB-Ac}_2\text{-spm+H}$ ]<sup>+</sup> を用いて、put、spd、spm と一緒に定量できた。開発した  $\text{Ac}_2\text{-spm}$  の定量法を用いて癌患者尿中の  $\text{Ac}_2\text{-spm}$  を定量し、ELISA による定量結果と比較して良い相関があることを確かめた。

#### 3-2 経口投与 $^{15}\text{N-}$ 標識ポリアミンのトレーサー研究

IS-MS によるポリアミン測定法では、 $^{15}\text{N-}$ 標識ポリアミンを内標準物質として、内在性ポリアミンを定量するが、さらに質量の

大きい  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンを内標準物質として用いれば、内在性および  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンを同時に定量できる。本研究では、担癌ラットに  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンを経口投与して、ポリアミンの体内動態に関する興味ある知見を得ることができた。すなわち、(1)腸管からの put、spd、spm の吸収はほとんど同じで濃度依存性があり、受動拡散機構によるとする説を支持していること、(2)肝臓など腫瘍組織も含めて spdの方が spmより取り込まれやすいこと、(3)腸管から吸収された過量のポリアミンは速やかに腎臓に集まり排泄に向かうこと、(4)経口投与された put は spd や spm とは違う挙動を示し、アミン酸化酵素による活発な代謝を受けていると思われること、などである。

## 第2章 スペルミジン合成酵素阻害剤の選択

Spd-syn を選択的に阻害するために、活性部位を標的にしていくつかの競合阻害剤がデザイン・合成されてきた。<sup>36)</sup> Put 結合部位と dcAdoMet 結合部位に亘り結合する S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane(AdoDATO)は、アミノプロピル基転移反応の遷移状態を考慮して合成された最も強い阻害剤として知られている。<sup>31,32)</sup> また、dcAdoMet 結合部位は spm-syn にもありそれを標的とする阻害剤では選択性が期待できないため、put 結合部位を標的として、われわれは trans-4-methylcyclohexylamine (4MCHA)や n-butylamine (BA)などの比較的強い阻害剤を開発してきた。<sup>33)</sup> AdoDATO に比べて、4MCHA や BA の阻害性は弱いですが、細胞増殖時に dcAdoMet が増大すると、競合により AdoDATO の阻害性は弱められるのに対し、4MCHA や BA は影響を受けないことが実験的に証明されている。<sup>34)</sup> さらに AdoDATO はその調製や細胞内取り込みなどに制約があり、実用面から見て put 結合部位を標的とする阻害剤が有用と考えられる。そこで、本研究では環状の 4MCHA と直鎖状の BA をタイプの違う二つのモデル化合物として、各々について新たに化合物をデザイン・合成し、精製した spd-syn に対する阻害性を比較検討した後、in vivo 実験に使用可能な阻害剤の選択を行うこととした。

### 第1節 精製酵素に対する阻害性の比較<sup>35)</sup>


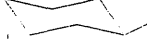

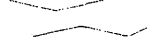



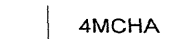
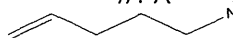

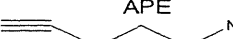


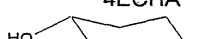
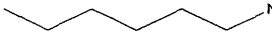

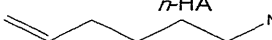


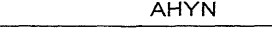
#### 1-1 化合物のデザインと合成

4MCHA アナログ これまでの各種化合物による阻害実験および spd-syn の三次元構造モデルなどから、put 結合部位のアミノプロピル基転移反応が行われる空間は疎水的で比較的広いと考えられたので、4MCHA の 4 位にメチル基を導入した 4,4-dimethylcyclohexylamine (DMCHA)を合成した。これは cis, trans の区別

もなく疎水空間への親和性も高まるのではないかと考えた。つぎに、4MCHA のメチル基の代わりにメチレン基を導入した 4-methylenecyclohexylamine(MLCHA)を合成した。これも cis, trans の区別はないが、二重結合による六員環の自由度の制約がどのような影響を与えるかに興味があった。また、4MCHA のメチル基をエチル基に変えた trans-4-ethylcyclohexylamine (4ECHA)は、4MCHA と同様に cis, trans 混合物の塩酸塩を再結晶を繰り返して精製した。なお、4MCHA のメチル基をフッ素に変えた化合物は不安定で合成できなかった。

BA アナログ 不飽和結合を含む鎖状アミンを調製した。鎖中の二重結合の導入は cis, trans 幾何異性体の問題を生じるため、鎖の末端に二重結合を導入し鎖長の違う 4-amino-1-butene(ABE), 5-amino-1-pentene(APE), 6-amino-1-hexene(AHE)の 3 種を合成した。また、鎖の末端に三重結合を導入したものとして 5-amino-1-pentene(APYN), 6-amino-1-hexyne(AHYN)を合成した。

Table 3 IC<sub>50</sub> values of compounds tested

n-BA analogs	IC <sub>50</sub> (μM)	4MCHA analogs	IC <sub>50</sub> (μM)
	35		17
	3.8		430
	13.5		1.7
	3.6		>1000
	1.7		60
	20		135
	>1000		85
	105		400
	22		
	40		
			

## 1-2 化合物の阻害性

各種化合物の精製 spd-syn に対する阻害性(IC<sub>50</sub>)をまとめて表に示す。この結果から、4MCHA アナログの中ではそれに勝るものはなかったが、BA アナログの中では APE が最も強い阻害性を示し、その IC<sub>50</sub> は 4MCHA と同じ値を示した。

## 第2節 ラットへの経口投与による評価<sup>36)</sup>

第 1 節の結果から、同等の強い阻害効果を示した 4MCHA と APE を代表としてラットに経口投与し、その効果を比較検討した。6 週齢のドンリュウラット(♂)5 匹を一群として、コントロール、APE 100 μ mol を毎日 1 回投与、および 4MCHA 100 μ mol を毎日 1 回投与の三群について、7 日後の肝臓および腎臓中の put, spd, spm を測定した結果を Table 4 にまとめて示した。APE 投与群のポリアミン含量はコントロール群と有意な差はなく、APE は in vivo では効果を示さないことが明らかになった。これは恐らくアミン酸化酵素<sup>6,37)</sup>により速やかに代謝されたためと考えられる。一方、4MCHA 投与群では spd の顕著な減少と spm の増大が認められ、4MCHA が、in vivo で効果を示すことが明らかになった。この結果に基づき以後の研究には 4MCHA を用いることとした。

Table 4 Effects of orally administered APE and 4MCHA once daily for 1 week on polyamine contents in rat liver and kidney

	Liver		Kidney	
	spd	spm	spd	spm
control	904±52	682±125	559±48	682±184
APE (100 μ mol/day)	967±99	793±82	542±34	702±47
4MCHA(100 μ mol/day)	542±141	1002±158	357±75	714±123

Values in the Table show nmol/g wet tissue, mean ± S.D. of 5 rats. Significance between 4MCHA-treated and control rats (\* : P<0.05)

### 第3節 小括

従来の知見に基づき、spd-syn の put 結合部位で競合する化合物として、環状構造の 4MCHA および鎖状構造の BA を取り上げ、アナログを各種合成しそれらの阻害性(IC<sub>50</sub>)を、精製 spd-syn を用いる活性測定系で、比較検討した。その結果、4MCHA アナログの中では 4MCHA に勝るものは見出されなかったが、BA アナログの中では APE が BA よりも強い阻害性を示し、それは 4MCHA とほぼ同等だった。この結果から、ラットへの投与実験に用いる阻害剤の候補として、4MCHA と BA を選んだ。両阻害剤のラットへの効果を調べるために、7日間、各々100 μmol を毎日1回経口投与して組織中のポリアミン濃度を測定した。その結果、APE は組織中ポリアミン濃度に全く影響を与えなかったが、4MCHA は、組織中 spd の顕著な減少と spm の増大を引き起こし、in vivo で使用可能な阻害剤であることがわかった。

### 第3章 経口投与 4MCHA によるラット組織中ポリアミンレベルの調節<sup>36)</sup>

われわれはすでに、HTC 細胞の懸濁培養の系で 4MCHA の効果を調べ、250  $\mu$ M 4MCHA 存在下では spd レベルはコントロールの 2% にまで減り、spm レベルは余り変わらず、put レベルは顕著に増え、それらの合計は余り変わらず、生育速度にも影響が見られないことを報告し、その結果から HTC 細胞の生育には spd がなくても put と spm があればよいのではないかと推察した。また、4MCHA 濃度を 1.25 mM に上げると、spd レベルはコントロールの 1% にまで減り、spm レベルも 25% に減り、put は 250  $\mu$ M 処理のレベルを保ち、それらの合計は減少し、生育速度も顕著に減少し、その減少は spd を添加しても回復せず、4MCHA を培地から取り除くと回復することを報告した。これらの結果から、4MCHA の濃度を高めることによる生育速度の減少は、spd-syn の阻害によるポリアミン濃度の変動が一部関与するにしても、生育に必須な部分に 4MCHA が作用するためではないかと推定した。<sup>38)</sup> このような *in vitro* の実験に加えて、飲料水に 4MCHA を溶かしてラットに自由に飲ませ続ける *in vivo* 実験も行った。ラット組織中 spd レベルの減少、spm レベルの増大は明らかに 0.02% 含飲料水で生育したラットより 0.1% 含飲料水のラットの方が大きく、後者のラットで見られた体重増加の目立った減少は、ラットが 4MCHA を忌避し水を飲む量が 70% も減少したためと考えた。<sup>39)</sup> しかし、この体重減少が 4MCHA の作用により生じたことは、濃度を高めたときに見られた HTC 細胞の生育速度の減少と考え合わせても、十分に考えられることであり、4MCHA の *in vivo* 効果については定量的な実験により確認する必要があった。

## 第1節 投与量の影響

### 1-1 生育への影響

ドンリュウラット（♂、6週齢）5匹を一群として、はじめの平均体重が近似するように四群に分け、各群に生理食塩液 1 mL に溶かした濃度の違う 4MCHA (0, 30, 50, 100  $\mu\text{mol}$ ) を毎日 1 回経口投与して、1 週間に亘り各群の体重の増加の様子を調べた。Table 5 に示すように、体重の増加率は 4MCHA の投与量が増すにつれて明らかに減少することがわかった。50  $\mu\text{mol}$  及び 100  $\mu\text{mol}$  投与群において、投与 2 日目の一時的な体重増加の停止または減少の理由は不明であるが、4MCHA に対するラットの代謝適応によるのかもしれない。なお、100  $\mu\text{mol}$  投与群については、他の群と比べて行動の活発さに差が認められたために、1 週間後に血液学的検査（15 項目）及び血液化学的検査（16 項目）を行った結果、コントロールに比べて特に有意な差は認められず、4MCHA の毒性を窺わせるデータは得られなかった。データは本論文末尾に添付する。

Table 5 Body-weight gains of rats administered different doses of 4MCHA once daily for 1 week

Administered( $\mu\text{mol}$ ) 4MCHA	day				
	1	2	4	6	8
0	211 $\pm$ 21	218 $\pm$ 21	239 $\pm$ 20	259 $\pm$ 23	279 $\pm$ 24
30	210 $\pm$ 11	219 $\pm$ 10	235 $\pm$ 11	252 $\pm$ 13	264 $\pm$ 12
50	207 $\pm$ 21	208 $\pm$ 23	227 $\pm$ 27	242 $\pm$ 30	255 $\pm$ 30
100	209 $\pm$ 16	202 $\pm$ 17	211 $\pm$ 27	222 $\pm$ 33	229 $\pm$ 32*

Values in the table show body weight (g), mean $\pm$ S.D. of 5 rats. Significance between 4MCHA-treated and control rats (\*:  $P<0.05$ )

### 1-2 組織中ポリアミン濃度への影響

四群のラットについて、7日目の 4MCHA 投与 24 時間後に肝臓、腎臓、小腸、脾臓を採取し、各組織中の put, spd, spm 濃度を測定した。Fig. 8 からわかるように、各組織によりポリアミン濃度は



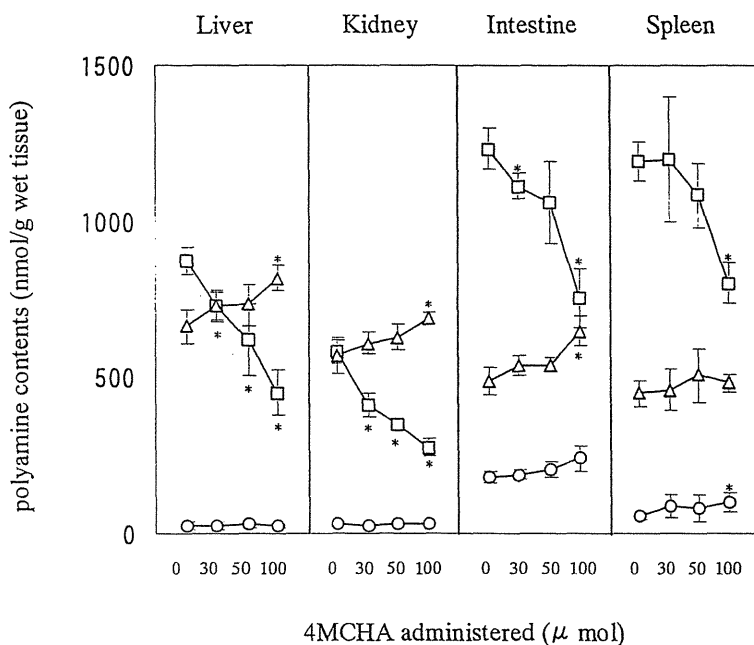


Fig. 8 Changes in polyamine levels in rat tissues administered different doses of 4MCHA once daily for 1 week. Put, —○—; spd, —□—; spm, —△—. Significance between 4MCHA-treated and control (0  $\mu$  mol) rats (\* :  $P < 0.01$ )

異なるが、4MCHAの投与量が増すにつれて spd レベルの減少及び spm レベルの緩やかな増大傾向は共通に認められた。Put は肝臓、腎臓では低レベルを維持していたが、代謝回転が活発で、ODC 誘導のために put レベルが比較的高い小腸、脾臓では上昇傾向を示した。これは 4MCHA により put から spd への合成が抑制されたために、put が余剰になった結果と考えられ、全組織を通じて 4MCHA による ODC の目立った誘導はなかったと考えられる。Put, spd, spm 濃度の総和についてみると、4MCHA の投与量が増すにつれて、腎臓はほぼ同じ値を保ち培養細胞で見られる結果と矛盾しなかったが、肝臓、小腸、脾臓では明らかに減少傾向が見られた。これは spd レベルの顕著な減少に対してそれに見合う spm レベルの増大がなかったためである。その説明の一つとして、spd-syn の阻害により AdoMetDC が誘導され dcAdoMet が存在するにもかかわらず、spm 合成に利用される spd、すなわち新たに

合成された遊離型の spd、<sup>40,41)</sup> が不足したことが考えられる。なお、肝臓について、ポリアミン測定用の試料溶液を用いて、4MCHA の濃度を DNS 誘導体の蛍光 HPLC 法(実験の部参照)により測定したが、検出限界 3 nmol/g 湿重量で、100  $\mu$ mol 投与群でも 4MCHA は検出されなかった。このことは 4MCHA が投与 24 時間後にはほとんど消失したことを示しており、もし 4MCHA に spd-syn 阻害以外の別の作用があればその効果は軽減されることにつながるかもしれない。しかし、4MCHA の別の効果については代謝産物の効果も考慮しなければならず、今後の課題である。

## 第 2 節 長期連続投与

前節で、1 週間の 4MCHA 連続投与により引き起こされた組織中ポリアミン濃度の変動が、さらに長期間投与し続けた場合どうなるか、その間に正常レベルに戻されるような適応が見られるかどうか、を調べるために連続投与の期間を 4 週間に延長してその推移を検討することにした。4MCHA の投与量は、投与ラットがコントロールラットとくらべて、食餌摂取量などで見かけ上違いないことを条件に、前節の結果を基にして 30  $\mu$ mol と 50  $\mu$ mol を選んだ。長期投与の場合、ラットの成長に応じて投与量を増やさなければならず、各週毎のラットの平均体重を基準にして投与計画を次のように決めた。

30  $\mu$ mol 投与シリーズ: I 週 30  $\mu$ mol、II 週 38  $\mu$ mol、III 週 45  $\mu$ mol、IV 週 53  $\mu$ mol

50  $\mu$ mol 投与シリーズ: I 週 50  $\mu$ mol、II 週 63  $\mu$ mol、III 週 75  $\mu$ mol、IV 週 88  $\mu$ mol

実験は前節までに記したと同様に、ドンリュウラット (♂、6 週齢) 5 匹を一群として、コントロール四群、30  $\mu$ mol 投与シリーズ四群、50  $\mu$ mol 投与シリーズ四群に対して、設定 4MCHA 量を

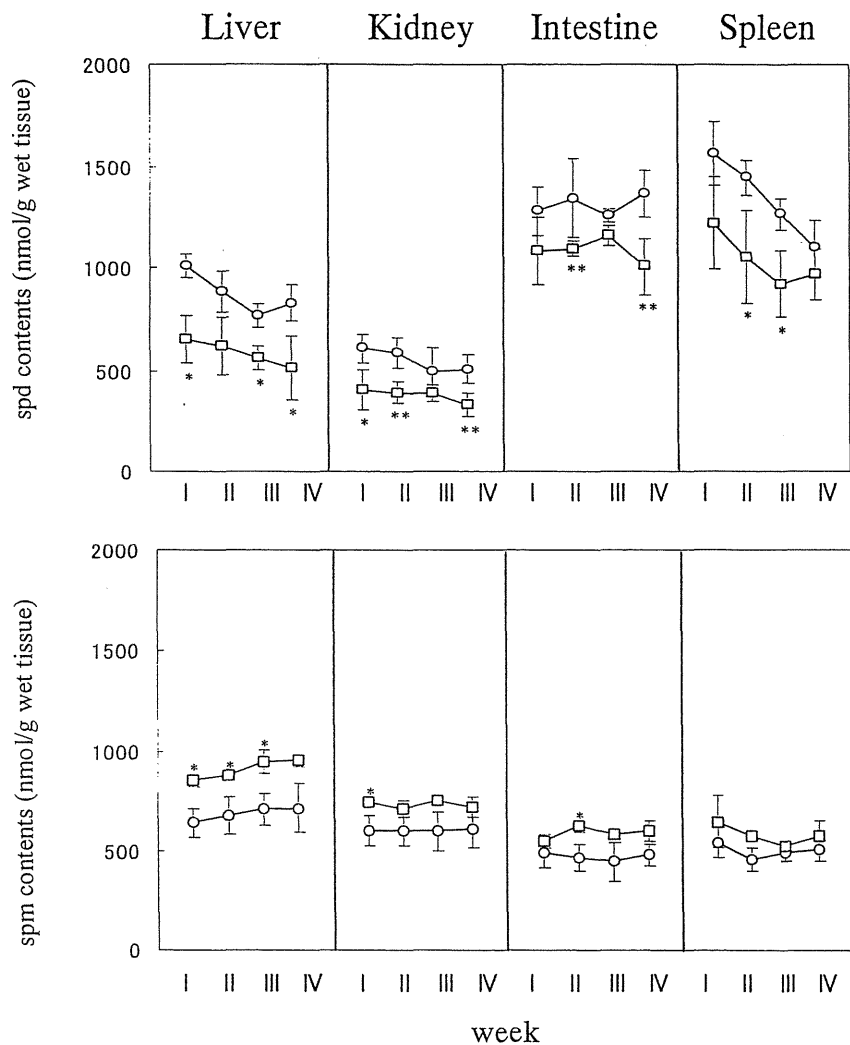


Fig. 9 Changes in Spd and spm levels in rat tissues administered 4MCHA once daily for 4 week. Controls, —○—; 50 μmol series of 4MCHA, —□—. Significance between 4MCHA-treated and controls (\*\* : p<0.001, \* : p<0.01)

含む生理食塩液 1 mL を毎日 1 回経口投与し、体重を測定した。各週毎にコントロールを含む 3 シリーズから各一群ずつをとり肝臓、腎臓、小腸、脾臓を採取し、各組織中の put, spd, spm 濃度を測定した。体重増加の減少は 50 μmol 投与シリーズで明らかに認められ 30 μmol 投与シリーズではわずかだった (IV 週目の平均体重 : コントロール 390 g, 30 μmol 投与シリーズ 380 g, 50 μmol

投与シリーズ 340 g; 増加曲線は文末付録に載せる)。また、30  $\mu\text{mol}$  投与シリーズにおける put, spd, spm 濃度の変化はコントロールのそれらと比べて差が余りなかったので文末付録に載せ、本文中にはコントロールと 50  $\mu\text{mol}$  投与シリーズの結果を示す (Fig. 9)。ポリアミン濃度の変化は I 週目に見られた傾向が IV 週目まで持続され、正常な成長に伴う変化がそれに加わったもので、その間にポリアミンレベルをコントロールのレベルに戻すような変化は認められなかった。各組織で spm 濃度には大きな差はなく、成長の間も各組織でほぼ一定の値を維持しているのに対して、spd 濃度は各組織で大きな差があり、小腸を除けば成長に応じて減少する傾向が見られ、特に脾臓でその減少は目立った。したがって、spm/spd 値は小腸を除けば成長に伴い大きくなる傾向があり、4MCHA 投与群はコントロール群の上昇傾向と平行して高い値を保ち続けた。

以上の結果から、4MCHA の連続経口投与により、投与されたラットに見かけ上障害をあたえずに、spm/spd 値が人為的に高められたラットを調整できることがわかった。

### 第 3 節 ポリアミンとの同時投与

経口投与ポリアミンが腸管から吸収されて各臓器に分布することは良く知られている。<sup>19)</sup> 4MCHA により spd 濃度を減らしておき、同時に経口投与により spd を供給した場合、体重の増加率や組織内ポリアミン濃度にどのような影響を及ぼすかを検討した。4MCHA の投与量としては、組織内 spd, spm 濃度に最も大きな変動を与えた 100  $\mu\text{mol}$  を採用した。これは、取り込まれる spd が比較的少量でも検出し易くなるのではないかと考えて選んだ。同時投与 spd 量は、すでに <sup>15</sup>N-spd の取り込み実験から組織内取り込み量が明瞭に判別できる量として、20, 50, 100  $\mu\text{mol}$  が適当と考え

選んだ。また、spm 20  $\mu\text{mol}$  の同時投与群についても検討した。

実験は前節と同様に、ドンリュウラット（♂、6週齢）5匹を一群として、はじめの平均体重が近似するように六群に分け、一群はコントロールとして他の五群に生理食塩液 1 mL に溶かした 4MCHA 100  $\mu\text{mol}$  + (0; spd 20, 50, 100  $\mu\text{mol}$ ; spm 20  $\mu\text{mol}$ ) を毎日1回経口投与して、投与開始から8日目に肝臓、腎臓、小腸、脾臓を採取し、各組織中の put, spd, spm 濃度を測定した。(Table 6) コントロールにくらべて、spd の顕著な減少と spm の増大は、4MCHA を投与されたラットの全てで共通に見られ、spd 同時投与によりその減少分の spd を補うには時間がかかるように見えた。しかし、各臓器で見られるように、同時投与 spm 量の増加に伴い組織内 spd 濃度は徐々に高まる傾向を示した。特に、小腸や腎臓

Table 6 Effects of spd and spm administered simultaneously with 4MCHA once daily for 1 week on polyamine contents in rat tissues

Administered ( $\mu\text{mol}$ )			Liver			Kidney		
4MCHA	spd	spm	spd	spm	spm/spd	spd	spm	spm/spd
-	-	-	1295 $\pm$ 114	599 $\pm$ 35	0.46	660 $\pm$ 42	552 $\pm$ 40	0.84
100	-	-	455 $\pm$ 52 **	974 $\pm$ 62 **	2.14	317 $\pm$ 30 **	756 $\pm$ 18 **	2.38
100	20	-	588 $\pm$ 88 **	745 $\pm$ 49 **	1.27	418 $\pm$ 34 **	582 $\pm$ 18	1.39
100	50	-	711 $\pm$ 47 **	720 $\pm$ 61 **	1.01	497 $\pm$ 38 **	567 $\pm$ 73	1.14
100	100	-	832 $\pm$ 149 **	769 $\pm$ 123	0.92	592 $\pm$ 99	567 $\pm$ 53	0.96
100	-	20	495 $\pm$ 28 **	1063 $\pm$ 28 **	2.15	311 $\pm$ 31 **	780 $\pm$ 39 **	2.51

Administered ( $\mu\text{mol}$ )			Intestine			Spleen		
4MCHA	spd	spm	spd	spm	spm/spd	spd	spm	spm/spd
-	-	-	1251 $\pm$ 86	411 $\pm$ 33	0.33	1632 $\pm$ 250	508 $\pm$ 40	0.31
100	-	-	765 $\pm$ 105 **	686 $\pm$ 70 **	0.90	816 $\pm$ 139 **	725 $\pm$ 61 **	0.89
100	20	-	965 $\pm$ 60 **	497 $\pm$ 32 *	0.50	1147 $\pm$ 77 *	604 $\pm$ 41 *	0.53
100	50	-	1247 $\pm$ 52	516 $\pm$ 48 *	0.41	1375 $\pm$ 171 **	601 $\pm$ 87	0.44
100	100	-	1088 $\pm$ 197	459 $\pm$ 36	0.42	1381 $\pm$ 300	569 $\pm$ 97	0.41
100	-	20	874 $\pm$ 129 **	713 $\pm$ 63 **	0.82	962 $\pm$ 235 *	695 $\pm$ 93 *	0.72

Spd and spm contents in tissues show nmol/g wet tissue, mean  $\pm$  S.D. of 5 rats. Significance between 4MCHA-treated and controls (\*\* :  $P < 0.001$ , \* :  $P < 0.01$ )

では取り込みは目立った一方、組織内 spm 濃度に及ぼす同時投与 spd の効果を見てみると、4MCHA 単独投与の場合にくらべて spm 濃度は明らかに低められており、その度合は同時投与 spd 量には依存していないように見えた。これは投与 spd が組織内 spm 合成を抑制したため、その理由としては、4MCHA により誘導される AdoMetDC が投与 spd により抑制され dcAdoMet が不足したことが考えられる。培養細胞で spd を培地に加えると ODC, AdoMetDC の誘導が直ちに抑制されることは良く知られており、<sup>2)</sup> この結果は in vivo でもそのような誘導抑制がおこることを示した例と考えられる。Spm 同時投与で得られた結果は 4MCHA 単独投与で得られた結果とあまり変わらず、spd 同時投与の場合とは明瞭な違いがあった。

以上のことから、4MCHA と spd の同時投与は spd の取り込みと spm 合成の抑制により、4MCHA により引き起こされる異常なポリアミンレベルを正常レベルに戻す効果があるように思われた。しかし、体重増加の度合いについては、予期に反して、spd 同時投与群の方が 4MCHA 単独及び spm 同時投与群より低められる傾向が認められた。その理由としては、ODC が誘導されないまま spd-syn が 4MCHA により阻害され、本来阻害されるべき AdoMetDC が投与 spd により抑制された結果、全ポリアミンが減少したことが考えられるであろう。

#### 第 4 節 小括

4MCHA の in vivo 効果を定量的に調べるために、ラットに毎日 1 回、一週間あるいは一ヶ月間連続経口投与した。その間の体重増加率は、4MCHA の投与量が増すにつれて減少し、投与量との間に相関がみられた。また、組織中のポリアミン濃度の変動 (spd の減少と spm の増加) も 4MCHA の投与量に依存していた。また、

4MCHA 50  $\mu\text{mol}$  を一ヶ月間連続経口投与して得られた組織内ポリアミン濃度の結果は、一週間の連続経口投与で得られた結果に成長に伴う変化が加わったものであり、見かけ上正常ラットと変わらず人為的に spm/spd 値を高めたラットを長期にわたり調整できることがわかった。つぎに、4MCHA 100  $\mu\text{mol}$  と spd (20,50,100  $\mu\text{mol}$ ) の同時経口投与一週間の実験を行った。4MCHA による spd の顕著な減少のために、同時投与 spd の投与量依存的な組織内 spd 濃度の高まりが観察された。また、spd の同時投与量には依存せずに、4MCHA による組織内 spm 濃度の上昇が抑制された。これは、投与 spd により AdoMetDC の誘導が抑制され、たためかもしれない。また、spm 20  $\mu\text{mol}$  の同時投与も行ったが、4MCHA 単独で見られた結果と同じで spd の同時投与とは大きな違いがあった。本研究から、4MCHA と spd の同時経口投与により組織内全ポリアミンレベルが下がることが分かった。

## 第4章 経口投与 4MCHA の肝再生に及ぼす効果

動物個体を対象として、いろいろな生理的条件下で組織ごとに或いは細胞ごとに、その時の細胞機能に適応するように、ポリアミンレベルが調節されていることは確かである。したがって、人為的にポリアミンレベルを変えることは細胞機能に影響を及ぼす可能性がある。第3章までに、4MCHA をラットに経口投与して組織中の spm/spd 値を正常ラットより高値に維持できることがわかった。Spm/spd 値が高まる方向性は、細胞増殖が停止していくときに一般的に観察されることから、本章では、4MCHA 投与ラットの細胞増殖系にどのような影響が見られるかを調べるために、増殖系として再生肝を選び検討した。

### 第1節 再生肝重量とポリアミン

ドンリュウラット(♂、6週齢)5匹を1群として、コントロール四群及び4MCHA投与四群に分けた。前章に記したように、投与群には4MCHA 50  $\mu\text{mol}$  を毎日1回経口投与した。1週間後に、コントロール群と一緒に、全ラットに67%の部分肝切除を施した。<sup>42)</sup> 投与群は術後も投与を継続した。術後1, 2, 5, 10日目に、両群か

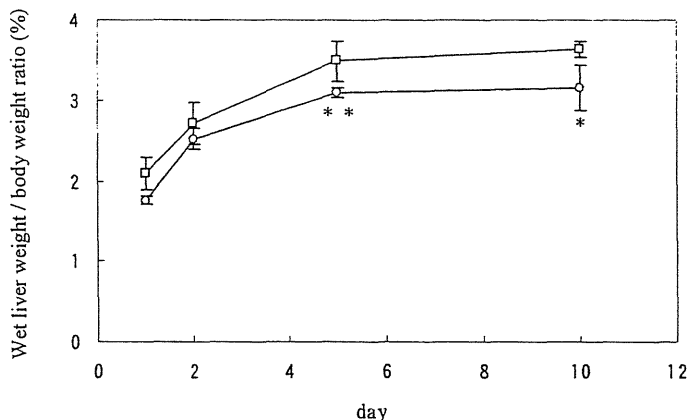


Fig. 10 Change of ratios of remnant liver wet weight to body weight.  
Control,  $\square$ —; 4MCHA,  $\circ$ — Significance between 4MCHA-treated and control rats (\*\* :  $p < 0.01$ , \* :  $p < 0.05$ )



ら1群ずつをそれぞれとり、再生肝を摘出した。投与群と、コントロール群は部分肝切除時に体重に差があったため、再生肝増殖の程度をみる一指標として、体重に対する再生肝湿重量の百分率で表した。Fig. 10 に示すように、その指標はコントロール群に比べて4MCHA投与群で低く、術後5、10日目では有意な差を示した。これは、4MCHA投与群では、肝の再生が本来あるべき大きさに到達せずに終了したことを示唆している。

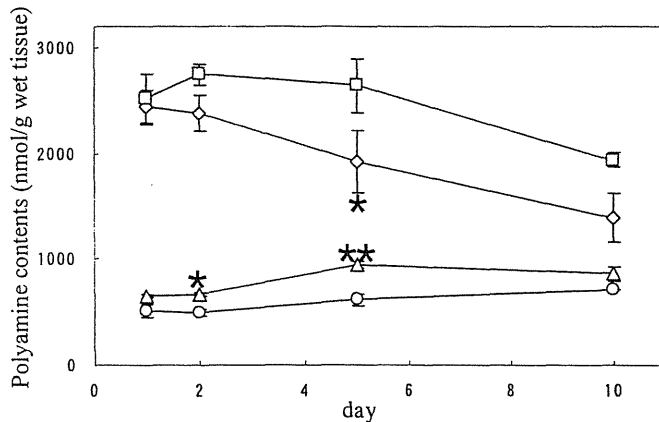


Fig. 11 Change in polyamine levels.

Control (spd—□—, spm—○—); 4MCHA (spd—◇—, spm—△—)

Significance between 4MCHA treated and control rats. (\*\*:  $p < 0.001$ , \*:  $p < 0.01$ )

再生肝中ポリアミンレベルの測定結果を Fig. 11 にまとめて示す。再生肝初期(24h)に、ODCが誘導され、putレベルの上昇、spdレベルの顕著な上昇、spmレベルの下降が観察されることは良く知られている。<sup>43)</sup> 術後1日目に見られたspdレベルの急激な上昇には、コントロール群と4MCHA投与群との間には差が認められず、術前までの4MCHA投与の影響は認められなかった。しかし、両群のspdレベルの変動は2日目以後に明らかに違いを示した。すなわち、コントロール群ではさらに上昇が続き5日目まで高レベルを保っていたが、投与群では2日目で下降に転じ、5日目ではコントロール群のおよそ70%にまで減少した。一方、spmレベルの変動は緩やかで、4MCHA投与群の方がコントロール群より

高値を保ちながら、術後2日目までは低いレベルを保った後、徐々に上昇し10日目では、ほぼ術前のレベルに戻った。なお、投与群の5日目の spm レベルが高めな感じを与えるが、spd レベルの低めな感じと相俟って、AdoMetDC 誘導のかかわりを暗示させる。なお、put レベルは両群間に差はなく、術後1日目が最も高く、以後減少し続けた。これは肝再生時に見られる ODC の一過性の誘導によるものであり、4MCHA はそれに影響を及ぼさないことを示している。

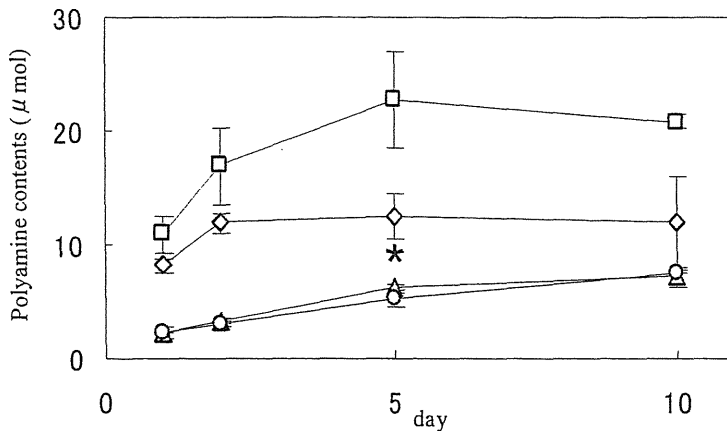


Fig.12 Change in total spd and total spm during liver regeneration.  
Control (spd —□—, spm —○—); 4MCHA (spd —◇—, spm —△—).  
Significance between 4MCHA treated and control rats. (\*: p<0.01)

Fig.12 は、spd 及び spm 合成の様子を見るために、全 spd 量あるいは全 spm 量(濃度×肝重量)を肝再生の過程でプロットしたものである。全 spd 量についてコントロール群と投与群の間で極めて顕著な違いが認められた。すなわち、コントロール群では5日目が最大値で10日目もほぼ同値を保っていたのに対し、投与群では2日目にほぼ最大値(コントロール群の最大値の約55%)に到達し、以降10日目までその値を保った。コントロール群の5日目の最大値が実際には3日目には到達していた可能性は高い。<sup>43)</sup> このような事実は、肝再生の初期に、増殖が終わるまでに必要な spd

が合成されてしまっていることを示唆した。全 spm 量については両群に差は認められず、肝再生の間中増え続けた。

肝再生において、ODC とポリアミン(主に put と spd)が増大することはよく知られた事実であるが、ポリアミンが増殖に重要な役割を演じているかどうかについては、未だ結論が得られていない。DFMO を用いて得られた結果は、ODC の増大が増殖に重要であったという結果<sup>44)</sup> と ODC の抑制が増殖に影響を与えなかったという結果<sup>45)</sup>に分かれている。近年 SSAT トランスジェニックラットの肝再生研究<sup>43)</sup>を通して、肝再生には spd and/or spm 特に spd が重要であることが報告された。本研究で得られた結果もまた spd の重要性を示唆している。

## 第 2 節 免疫組織化学的検討

ラットの部分肝切除後、肝再生のマーカーとして proliferating cell nuclear antigen (PCNA) が有用であることは既に証明されている。<sup>46)</sup> 術後 2,5,10 日目の再生肝について PCNA 染色を行い、全肝細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の百分率を計算した。2 日目についてみると、コントロール群は 55.3%、4MCHA 投与群は 28.8%となり、投与群の増殖細胞割合が明らかに低かった。この傾向は 5 日目でも見られたが、肝再生がほぼ終了した 10 日目では、両群ともに PCNA 陽性細胞はほとんど見られなかった。そのほか、鏡検的には、両群ともに異常は認められず、4 MCHA の細胞形態に及ぼす影響は無かった。

なお 4MCHA の細胞増殖に及ぼす効果を調べるために、再生肝実験とは別に、小腸上皮細胞及び表皮細胞についてコントロールと比較した。この実験では、5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU)の取り込みを、免疫組織化学的手法で調べた結果、4MCHA 投与群で増殖細胞割合が低いことがみとめられた(具体的な数値は未だ計測していない)。

### 第3節 小括

正常ラットと4MCHA投与ラットについて、67%部分肝切除を施し、肝再生の過程を比較検討した。体重に対する再生肝湿重量の比は、4MCHA投与群で明らかに低く、術後5日目でコントロール群と比べて有意な差( $p<0.01$ )があった。ポリアミン濃度の変動は、特にspdレベルの変動が興味深かった。術後1日目の結果では、4MCHA前投与のspdレベルに及ぼす効果はないように見えた。これは、ODCが部分肝切除により誘導され、短時間に大量のputが生合成されたためと考えられる。術後2日目以後のspdレベルは、コントロール群では5日目まで高値を保つのに対し、4MCHA投与群では減少していった。Spmについては部分肝切除後に緩やかに減少し10日目には通常の肝臓中のレベルに回復していた。肝再生の一指標として用いたPCNA染色により、術後2、5日目の再生肝において、コントロール群と比べて4MCHA投与群に増殖抑制があったことが確認された。

以上のように、4MCHA投与群とコントロール群との間には、肝再生に明らかな差があった。4MCHAによる再生肝抑制効果とspm/spd比の高値との関連性についても、現在さらに検討中である。比較的増殖が盛んな小腸上皮細胞、表皮細胞でも4MCHAによる増殖抑制効果が認められたことは、4MCHAによる体重増加率の減少効果とも合っている。

## 総括

培養細胞で spd-syn を阻害した時の spd,spm レベルの変動が、自然界で細胞増殖が停止する時に一般的に見られる変動と類似していることに基づき、選択的阻害剤による spd-syn の in vivo 阻害と細胞増殖との関わりを、調べることを目的として本研究を行った。

第 1 章では、当研究室で開発した IS-MS 法によるポリアミン分析法の拡張と応用として、癌診断マーカーである尿中 Ac<sub>2</sub>-spm の同時分析、および経口投与 <sup>15</sup>N-標識ポリアミンのトレーサー研究について記述した。これらの研究を通して、多くの生体試料中のポリアミンを微量で正確、迅速に測定できる方法として改良が加えられ、本研究を推進するために重要な方法論となった。

第 2 章では、in vivo 実験に通用できる spd-syn 阻害剤の選択について記述した。酵素の基質結合部位の中で、put 結合部位を標的とする競合阻害剤が有用と考えられ、既知の比較的強力な阻害剤である BA および 4MCHA を取り上げ、それらのアナログを新たに合成し、IC<sub>50</sub> 値を比較検討した。その結果、APE と 4MCHA が最も強く阻害し、IC<sub>50</sub> 値も同等だったことから、この両者をラットに経口投与し、それらの効果を調べた。その結果、APE は全く阻害効果を示さなかったため、阻害効果を示した 4MCHA を in vivo 実験に用いることにした。

第 3 章では、ラットに 4MCHA を 1 週間または 1 ヶ月間、毎日 1 回連続経口投与し、組織中ポリアミンレベルに及ぼす効果を調べた。投与量を変える 1 週間の実験で、投与量依存的に体重増加の度合は低くなる傾向があり、また、投与量依存的に各組織中 spd が顕著に減少し spm が緩やかに上昇した。得られた結果から 1 ヶ月の長期投与のための投与量を選んだ。その基準は、コントロールラットと見かけ上行動に差が認められず、組織内ポリアミン

レベルに明瞭な差が認められることとした。1ヶ月間投与の結果は、基本的には1週間投与の結果と同じで、それに成長に伴う変化が加わったものであり、少なくとも1ヶ月間は人為的に spm/spd 値を高められたラットが作れることを示した。このようなモデルラットの応用面の1つとして、同時経口投与 spd の影響を調べた。組織中への spd の取り込みは緩やかで、4MCHA により高められる組織中 spm の合成を少量の投与 spd が抑制したため、全ポリアミンレベルが減少し、体重増加の度合いにはむしろ好ましくない影響が見られた。なお、同時投与 spm の影響は認められなかった。

第4章では、spd-syn 阻害の細胞増殖に及ぼす影響を調べるため、細胞増殖系としては再生肝を選び、モデルラットとコントロールラットで肝再生の過程を比較した。増殖の度合いをみる指標として、体重に対する再生肝湿重量の比をみると、明らかに4MCHA 投与群の方が低く、増殖が抑制されていた。ポリアミンの中では spd レベルの変動が特に目立ち、術後1日目の急激な上昇の後、コントロール群では5日目まで高値を保っていたのに対し、4MCHA 投与群では2日目から下降に転じ、5日目ではコントロール群の70%まで下がった。2日目、5日目の再生肝について PCNA 免疫染色を行い、全肝細胞数に対する PCNA 陽性細胞数比を両群で比較したところ、4MCHA 投与群はコントロール群と比べておよそ半分程度となり、4MCHA により再生肝の増殖が抑制されることが明らかとなった。

以上、本研究の今後の展開としては、モデルラットを用いて、増殖系のみならず、ほかの実験系でポリアミンの生理的意義に関する情報が得られる可能性がある。また、癌治療研究における位置づけは、細胞の死滅ではなく増殖速度の抑制にあり、治療のためには従来行われているいろいろなやり方との併用が考えられるであろう。

## 略語表

Ac <sub>2</sub> -spm	N <sup>1</sup> ,N <sup>12</sup> -Diacetylspermine
AdoDATO	S-adenosyl-1,8-diamino-3-thiooctane
AdoMetDC	S-adenosylmethionine decarboxylase
APE	5-amino-1-pentene
CEA	carcinoembryonic antigen
CMC	carboxymethyl cellulose
DAO	diamine oxidase
DFMO	$\alpha$ -difluoromethylornithine
DNS	5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HFB	heptafluorobutyryl
IS-MS	ionspray ionization mass spectrometry
4MCHA	trans-4-methylcyclohexylamine
ODC	ornithine decarboxylase
PAO	polyamine oxidase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
Put	putrescine
Spd	spermidine
Spd-syn	spermidine synthase
Spm	spermine
Spm-syn	spermine synthase
SSAT	spermidine / spermine N <sup>1</sup> -acetyltransferase

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なるご指導、ご鞭撻並びに本論文の御校閲を賜りました城西大学薬学部 鮫島 啓二郎 教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、数々の有益なご指導と御助言を戴きました白幡 晶 教授、新津 勝 助教授に深く感謝致します。

実験に際し、温かい御助言を戴きました合田 ひとみ 助手、和田 牧子 助手、高尾 浩一 助手、坂本 武史 助手、塩田 泰生 助手、許 泳吉 先輩に心より感謝致します。

IS-MS 法に、有益で重要な尿サンプルを提供していただきました東京都臨床研の平松 恭子 先生、工学院の川喜多 正夫 先生、都立駒込病院の高橋 慶一 先生に心より感謝致します。

MS 測定に際し、有益な御助言、御指導を戴きました城西大学機器センター 三橋 秀之 氏に感謝致します。

また、本論文の作成に際し、御校閲と御教示を戴きました城西大学薬学部 白幡 晶 教授ならびに谷 覺 教授に深く感謝致します。最後に、城西大学薬品分析化学教室、生化学教室の皆様に感謝します。



## 第 1 章に関する実験

### 試薬

標品として用いたポリアミン塩酸塩; put·2HCl、spd·3HCl、spm·4HCl は SIGMA (St.Louis,MO) から購入した。内標準物質および合成原料の  $^{15}\text{N}$ -標識ポリアミンは当研究室で合成したものを使った。<sup>47)</sup> 誘導体化に用いたヘプタフルオロ酪酸無水物 (HFBA,GC 分析用)、アセトニトリル (HPLC 分析用)、ジエチルエーテル (油脂酸化・過氧化物価測定用)、[p-(ベンジルオキシカルボニロキシ)フェニル]ジメチルスルホニウムメチルサルフェート (Z-DSP)、試料の前処理に用いた酢酸とピリジンおよび CM-セルロース (CMC) は和光純薬工業から購入した。ヒドラジン 1 水和物 (98%)、カラムクロマトグラフィーに用いたシリカゲル 60N (spherical,neutral,40~50 $\mu\text{m}$ ) は関東化学から購入した。酢酸アンモニウムは Aldrich から購入したものをを用いた。その他の試薬、溶媒は市販の特級品を用い、実験に使用した水は Milli Q (ミリポア) により調整したものをを用いた。

### Ac<sub>2</sub>-spd および Ac<sub>2</sub>-spm の簡便高収率合成法

遊離の spd 或は spm(1.7mmol)をジオキササン(8.5ml)に溶かし、N-methoxydiacetamide<sup>16)</sup>(3.6mmol)を加えて室温で攪拌する。約 3 時間後に Ac<sub>2</sub>-spm はろ過できる白色結晶として析出し、それをろ取り EtOH で溶かし、塩酸を加えて塩酸塩とし、EtOH/Et<sub>2</sub>O より再結晶する。また spd の場合は、反応後 Ac<sub>2</sub>-spd が油状になるため、EtOH を適量加え、全てを溶かした後に計算量の HCl を加えることにより塩酸塩の結晶として得られる。

### $^{15}\text{N}$ -標識 $\text{Ac}_2\text{-spm}$ の合成 <sup>15)</sup>

$^{15}\text{N}$ -put $\cdot$ 2HCl(100 mg, 0.6mmol)を用い既に報告されている $^{15}\text{N}$ -spm 合成法にしたがい最後の接触還元による脱ベンジル操作の前に、無水酢酸 (0.17 ml, 1.8mmol) を含むピリジン溶液 (5 ml) 中で室温、1 時間反応させてアセチル化した後、クロロホルム/メタノール/酢酸溶媒 (1:3:0.1) でシリカゲルカラムクロマトグラフィにより精製した。溶媒を留去し AcOH に溶かし、Pd-C (20 mg)を加え、60°Cで 5 時間還元して保護基を除去した。引き続き溶液をろ過してろ液をとり濃塩酸 (1.8 mmol) を加え塩酸塩とし、溶媒を留去後、エタノールから再結晶した。(104 mg, 0.3mmol)  
Anal. Calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{32}^{15}\text{N}_4\text{O}_2\text{Cl}_2\cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$ : C, 45.49; H, 8.84;  $^{15}\text{N}$ , 16.25. Found: C, 45.50; H, 8.80;  $^{15}\text{N}$ , 16.38.

### $^{15}\text{N}$ -標識 $\text{N}^1\text{-Ac-sp}$ の合成 <sup>15)</sup>

中間体の $[1,4,8\text{-}^{15}\text{N}_3]\text{-N}^1\text{-phthaloyl-N}^4\text{-benzyloxycarbonylspermidine}$  (0.2 g 0.4mmol)までは既に報告されている spd 合成法にしたがって行った。これに MeOH (5 ml)、ヒドラジン 1 水和物 (0.1 ml, 2 mmol) を加え 3 時間還流した。溶媒を留去して得られる残渣を 4M  $\text{NH}_3/\text{CHCl}_3$  により抽出し  $\text{CHCl}_3$  を集めた。溶媒を留去して、無水酢酸 (0.08 ml, 0.8mmol) を含むピリジン溶液 (5 ml) 中で室温 1 時間反応させてアセチル化した後、溶媒を留去し、AcOH (2ml) に溶かし Pd-C (20 mg)を加え、60°Cで 5 時間還元して保護基を除去した。引き続き溶液をろ過してろ液をとり、濃塩酸 (1.0 mmol) を加えて塩酸塩とし、溶媒留去後、エタノールから再結晶した。(75 mg, 0.28mmol) Anal. Calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{23}^{15}\text{N}_3\text{OCl}_2\cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$ : C, 40.12; H, 8.79;  $^{15}\text{N}$ , 16.72. Found: C, 40.57; H, 8.80;  $^{15}\text{N}$ , 17.00.

### $^{15}\text{N}$ -標識 $\text{N}^8$ -Ac-spd の合成 <sup>15)</sup>

$\text{N}^1$ -Ac-spd の場合と同じ中間体[1,4,8- $^{15}\text{N}_3$ ]- $\text{N}^1$ -phthaloyl- $\text{N}^4$ -benzyloxycarbonyl-spermidine(0.2 g 0.4mmol)を AcOH (20ml) に溶かし、Pd-C (150 mg)を加え、室温 3 時間開放条件下で還元して Z 基を除去した。引き続き、溶液をろ過してろ液を留去した後、クロロホルム/メタノール/酢酸溶媒 (5:1:0.1) でシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。溶媒を留去し無水酢酸 (0.08 ml, 0.8mmol) を含むピリジン溶液 (5 ml) 中で室温、1 時間反応させてアセチル化した後、溶媒を留去し、これに MeOH (5 ml)、ヒドラジン 1 水和物 (0.1 ml, 2 mmol) を加え 3 時間還流した。溶媒を留去して得られる残渣を 4M  $\text{NH}_3/\text{CHCl}_3$  で抽出し  $\text{CHCl}_3$  層を集めた。溶媒を留去して、残渣を AcOH (2ml) に溶かし、Pd-C (20 mg)を加え、60°C で 5 時間還元して保護基を除去した。引き続き、溶液をろ過してろ液をとり、濃塩酸 (1.0 mmol) を加えて塩酸塩とし、エタノールから再結晶した。(56 mg, 0.2mmol) Anal. Calcd for  $\text{C}_9\text{H}_{23}^{15}\text{N}_3\text{OCl}_2 \cdot 1/3\text{H}_2\text{O}$ : C, 40.12; H, 8.79;  $^{15}\text{N}$ , 16.72. Found: C, 40.25; H, 8.54;  $^{15}\text{N}$ , 16.93.

### ポリアミンの HFB 誘導体化 <sup>48)</sup>

試料溶液をネジ付き試験管に入れ乾固後、アセトニトリル (0.1 ml) と HFBA (0.05 ml) を加え、100°C で 30 分加熱して反応させた。反応液を窒素気流下留去し、残渣をジエチルエーテル (0.3 ml) で溶かし 0.5mol/l アンモニア溶液を加え振とう後遠心分離した。ジエチルエーテル層を取って窒素気流下留去し、得られた残渣を 50%-AcONH<sub>4</sub>/50%-CH<sub>3</sub>CN に溶かして MS 測定用試料とした。

### IS-MS 測定条件 <sup>11)</sup>

装置は PE-SCIEX 社の API-300 マススペクトロメーターを用い、

イオン化は IonSpray 法で行った。アセチルポリアミンは既に報告されている IS-MS 法に基づいておこなった。<sup>15)</sup>

### 癌患者尿

都立駒込病院外科医長 高橋 慶一 先生担当の入院患者尿について、都立臨床研の平松 恭子氏が ELISA で測定し、凍結保存されたもの各 1ml を同病院倫理委員会の許可を得て入手した。

### 尿の前処理<sup>15)</sup>

癌患者尿 0.1 ml に内標準物質の <sup>15</sup>N-Ac<sub>2</sub>Spm 0.6nmol を加え、0.01M ピリジン-酢酸溶液で 10 倍に希釈してカラムにかける試料とした。カラムは CM-セルロース (0.2 ml) をポリプロピレン製カラム (10 ml) に充填し、1 M ピリジン-酢酸溶液 (3 ml) で洗った後、0.01M ピリジン-酢酸溶液で平衡化したものを用いた。試料を吸着させた後、0.01M ピリジン-酢酸溶液 (1 ml)、0.05M ピリジン-酢酸溶液 (3 ml) で順次洗浄し、1 M ピリジン-酢酸溶液 (1 ml) でポリアミンを溶出し、TAITEC 製 VC-960 で減圧遠心乾燥した。得られた残渣を HFB 化して MS の試料とした。

### 担癌ラットの作成<sup>19)</sup>

AH109A (東北大・加齢医研から供給) -80℃で保存していたものを 38℃の恒温槽で短時間に解凍し生理食塩水 (大塚生食注、10 ml) を加えた後、遠心分離 (3000rpm, 3min) し上清を捨てる。この操作を二度繰り返し、得られたペレットを生理食塩水 (5 ml) に懸濁し、懸濁液をテルモ注射針 (18G×1<sup>1</sup>/<sub>2</sub>) 付テルモシリンジ (2.5 ml) 入れ Donryu rat (5 週齢、♂) の腹腔内に注入 (0.5 ml) した。

継代は、1 週前に移植した腹水肝癌ラットから同じサイズの注

射等を用いて腹水を取り出しその 0.5ml を同週齢の Donryu rat に注入する操作を繰り返して行った。

固形癌の作成は、腹水を生理食塩水で 10 倍に希釈した細胞懸濁液 (約  $10^7$  cells/ml) 0.1ml を、エーテル麻酔した Donryu rat (6 週齢、♂) の背部皮下に、テルモ注射針 (21G×1 $\frac{1}{2}$ ) 付テルモシリンジ (1 ml) で注入した。実験に使用したラットはさらに 2 週間飼育したものをを用いた。

### 経口投与実験

$^{15}\text{N}$ -put、 $^{15}\text{N}$ -spd、 $^{15}\text{N}$ -spm をそれぞれ 10mM、20mM 含む生理食塩水溶液 (3 者混合)、および  $^{15}\text{N}$ -spm のみで 10mM、20mM 含む生理食塩水溶液 (単独、 $^{15}\text{N}$ -spm) を調製し、これらの溶液 1ml を経口投与した。担癌ラットは経口投与まで通常食餌をした feeding グループと経口投与 12 時間前から絶食させた fasting グループに分け、実験項目別に各群 3 匹で行った。経口投与 3 時間目に頸椎脱臼し、小腸 (十二指腸から下 10cm)、肝臓、腎臓、癌、を取り出し直ちに液体窒素で凍結し、 $-30^\circ\text{C}$  で保存した。小腸については切開して内部を生理食塩水で十分に洗浄後凍結した。

### 生体試料の前処理と測定<sup>19,20)</sup>

氷冷下で各組織を細切し (ペースト状)、そこから約 0.3g を正確に量り、0.1M 塩酸 (1ml) を正確に加え、Potter-Elvehjem Homogenizer でホモジナイズした。引き続き 0.5M 過塩素酸 (1ml) を正確に加えさらにホモジナイズしこの懸濁液を 15ml のポリエチレン製チューブに移し 3000rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を集めた (約 2.5ml)。その除タンパク上清 0.1ml を正確に 2 本の試験管にとり一方には (put 1nmol、spd 7nmol、spm 7nmol) の標準ポリアミンを添加し、両方の試験管に内標準物質の  $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ -標識

ポリアミン ( $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -put 2nmol、 $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -spd 15nmol、 $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -spm 15nmol) を加えピリジン 0.5ml を加えおおよそ pH5 にした後、CM-セルロースを用いてポリアミン分画を集め、HFBA を用いて誘導体化したのち IS-MS で各試料につき 1 検体 3 回の測定を行った。

## 第 2 章に関する実験

### 阻害剤

本実験に用いた阻害剤は渡辺らにより合成され、<sup>35)</sup> 精製スペルミジン合成酵素を用いる活性測定系で各種化合物の  $\text{IC}_{50}$  を求めた。

### 経口投与実験

ドンリュウラット ♂ 6 週齢を各群 5 匹、体重が近似するように 3 群に分けた。1 日 1 回テルモシリンジ(1ml)とゾンデを用いてコントロール(生食のみ)、APE (100 $\mu\text{mol}/\text{day}$ )、4MCHA (100 $\mu\text{mol}/\text{day}$ )を生食 1ml に溶かし、強制経口投与を行ない、7 日目に頸椎脱臼し肝臓、腎臓を取り出し直ちに液体窒素で凍結し、 $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。前処理、測定法は第 1 章の生体試料の前処理と測定及びポリアミンの HFB 誘導体化に準じて行い IS-MS で測定を行った。

## 第 3 章に関する実験

### 第 1 節 経口投与実験

ドンリュウラット ♂ 6 週齢を各群 5 匹、体重が近似するように 4 群に分けた。各群に生理食塩液 1 mL に溶かした濃度の違う 4MCHA (0, 30, 50, 100  $\mu\text{mol}$ ) 毎日 1 回ゾンデを用いて強制経口

投与を行ない、8日目に頸椎脱臼し肝臓、腎臓、小腸、脾臓を取り出し直ちに液体窒素で凍結し、-30℃で保存した。前処理、測定法は第1章の生体試料の前処理と測定及びポリアミンのHFB誘導体化に準じて行いIS-MSで測定を行った。

## 第2節 長期投与実験

ドンリュウラット ♂6週齢を各群5匹、体重が近似するように8群に分けた。そのうち4群はコントロール(生食のみ)、残り4群は4MCHA投与群(30 $\mu$ mol/day)に生食1mlに溶かし毎日1回ゾンデを用いて強制経口投与を行なった。経口投与開始から1,2,3,4週でコントロール及び4MCHA投与群から各1群(5匹)を頸椎脱臼し肝臓、腎臓、小腸、脾臓を取り出し直ちに液体窒素で凍結し、-30℃で保存した。前処理、測定法は第1章の生体試料の前処理と測定及びポリアミンのHFB誘導体化に準じて行いIS-MSで測定を行った。投与量は本論に示した様に各週の平均体重に比例させ増やした。同様に50 $\mu$ mol長期投与を行った。

## 第3節 ポリアミン同時投与実験

ドンリュウラット ♂6週齢を各群5匹、体重が近似するように6群に分けた。コントロール(生食のみ)5群に生理食塩液1mLに溶かした4MCHA 100  $\mu$ mol + (0; spd 20, 50, 100  $\mu$ mol; spm 20  $\mu$ mol)を毎日1回ゾンデを用いて強制経口投与を行なった。経口投与開始から8日目に肝臓、腎臓、小腸、脾臓を取り出し直ちに液体窒素で凍結し、-30℃で保存した。前処理、測定法は第1章の生体試料の前処理と測定及びポリアミンのHFB誘導体化に準じて行いIS-MSで測定を行った。

## 組織内 4MCHA の定量

ラット組織を氷冷下で各組織を細切し（ペースト状）、そこから約 0.3g を正確に量り、0.1M 塩酸（1ml）を正確に加え、Potter-Elvehjem Homogenizer でホモジナイズした。引き続き 0.5M 過塩素酸（1ml）を正確に加えさらにホモジナイズしこの懸濁液を 15ml のポリエチレン製チューブに移し 3000rpm で 5 分間遠心分離した後、上清を集めた（約 2.5ml）。この上清 0.4ml を 2 本のスクリー管に取り一方には 4MCHA を 0.5nmol 標準添加し、両方のスクリー管には内標として 4-ethylcyclohexylamine(4ECHA) を 2nmol 入れた。これらを 1mol/l NaOH 2ml と酢酸エチル 2ml で抽出し、酢酸エチル層から 1ml 取り窒素気流下で酢酸エチルを留去した。得られた残渣にアセトン 0.6ml、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> の飽和水溶液 0.4ml、Dansyl Chloride (DNS-Cl) の 10mg/ml アセトン溶液を 0.1ml 入れ、室温で 1 時間攪拌し、1 時間経過後に proline の 150mg/ml 水溶液を 0.1ml 加えさらに 30 分攪拌する。反応液からトルエン 0.5ml で抽出し、蛍光 HPLC 測定用試料とした。HPLC 測定条件は、CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=3:1、流速 0.6ml/min、Ex 350nm、Em 510nm で行った。

## 第 4 章に関する実験

### 第 1 節 再生肝実験

donryu rat ♂ 6 週齢を各群 5 匹、体重が近似するように 8 群に分けた。そのうち 4 群はコントロール(生食のみ)、残り 4 群は 4MCHA 投与群(50 $\mu$ mol/day)に生食 1ml に溶かし毎日 1 回ゾンデを用いて強制経口投与を行なった。経口投与 1 週間後に Higgins and Anderson 法<sup>42)</sup>により肝の部分切除を行い、術後も経口投与を続け 1,2,5,10 日目にコントロール及び 4MCHA 投与群から各 1 群(5



匹)を頸椎脱臼し肝臓を取り出し、組織染色用に肝臓のほぼ同じ部位からディスクのメスを用いて薄く(3mm)切り出し、10% 中性緩衝ホルマリン(Wako)中に沈めた。残りを直ちに液体窒素で凍結し、-30℃で保存した。前処理、測定法は第 1 章の生体試料の前処理と測定及びポリアミンの HFB 誘導体化に準じて行い IS-MS で測定を行った。

## 第 2 節 免疫組織化学的検討

10% 中性緩衝ホルマリンに浸し、約 24 時間経過した組織切片を、株式会社 イナリサーチ 臨床病理部にて PCNA 染色及び染色結果の判定を委託した。また、財団法人 佐々木研究所 病理部にて PCNA 染色、H/E 染色、BrdU 染色、染色結果の判定を委託した。

## 引用文献

- 1) Tabor, C.W., and Tabor, H., *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749-790(1984).
- 2) Pegg, A. E., *Biochem. J.* **234**, 249-262(1986).
- 3) Wang, Y., Devereux, W., Woster, P. M., Stewart, T.M., Hacker, A., and Casero Jr, R. A., *Cancer Res.* **61**, 5370-5373(2001).
- 4) Vujicic, S., Diegelman, P., Bacchi, C. J., Kramer, D. L. and Porter, C. W., *Biochem, J.* **367**, 665-675(2002).
- 5) Seiler, N., Delcros, J. G., and Moulinoux, J. P., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 843-861(1996).
- 6) Sessa, A., and Perin, A., *Agents Actions* **43**, 69-77(1994).
- 7) Thomas, T., and Thomas, T. J., *J. Cell Mol. Med.* **7**, 113-126(2003).
- 8) Wallace, H. M., Fraser, A. V., and Hughes, A., *Biochem. J.* **376**, 1-14(2003).
- 9) Metcalf, B. W., Bey, P., Danzin, C., Jung, M. J., Casara, P., and Vevet, J. P., *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 2551-2553(1978).
- 10) Marton, L. J. and Pegg, A. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 55-91(1995).
- 11) Furuumi, N., Amano, D., Xu, Y. J., samejima, K., Niitsu, M. and Shirahata, A., *Anal. Biochem.* **265**, 253-259(1998).
- 12) Hiramatsu, K., Sugimoto, M., Kamei, S., Hoshino, M., Iwasaki, K., Kawakita, M., *J. Biochem.*, **177**, 107-112(1995).
- 13) 高橋慶一、平松恭子、川喜多正夫、山口達郎、大植雅之、森 武生 日本ポリアミン研究会－第 17 回研究発表会－講演要旨集 p19,東京(2002.1).
- 14) Seiler, N., Sarhan, S., Grauffel, C., Jones, R., Knödgen, B., and Moulinoux, J.-P., *Cancer Res.*, **50**, 5077-5083(1990).

- 15) Kobayashi, M., Samejima, K., Hiramatsu, K., and Kawakita, M., *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 372-374(2002).
- 16) Kikugawa, Y., Mitsui, K., Sakamoto, T., Kawase, M., and Tamiya, H., *Tetrahedron Letters*. **31**, 243-246(1990).
- 17) Hiramatsu, K., Miura, H., Kamei, S., Iwasaki, K., Kawakita, M., *J. Biochem.*, **124**, 231-236(1998).
- 18) Shimpo, K., Chihara, T., Ida, C., Kawai, K., Wakamatsu, K., Ito, S., Matsui, T., Hirano, M., Watanabe, T., Nagatsu, T., Kuzuya, H., *Biogenic Amines*, **16**, 211-223(2001).
- 19) Kobayashi, M., Xu, Y, J., Samejima, K., Goda, H., Niitsu, M., Takahashi, M., and Hashimoto, Y., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 285-288(2003).
- 20) Xu, Y, J., Hara, T., Samejima, K., Sasaki, H., Kobayashi, M., Takahashi, A., and Niitsu, M., *Anal. Biochem.*, **301**, 255-260(2002).
- 21) Hara, T., Xu, Y-J., Sasaki, H., Niitsu, M., and Samejima, K., *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* **43**, 1005-1011(2000).
- 22) Sarhan, S., Knödgen, B., and Seiler, N., *Anticancer Res.*, **9**, 215-224(1989).
- 23) Moulinoux, J.-Ph., Quemener, V., Cipolia, B., *J. Urology.*, **146**, 1408-1412(1991).
- 24) Edited by Murphy, G. M., *Eur. J. Gast. & Hepat.*, **13**, 1011-1046(2001).
- 25) 東北大学加齢研究所医用細胞資源センター Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University. より供給
- 26) Bardócz, S., Grant, G., Brown, D. S., Ralph, A., and Pusztai, A., *J. Nutr. Biochem.* **4**, 66-71(1993).

- 27) Chang, E. B., Rao, M. C., “*Physiology of the Gastrointestinal Tract* 3rd ed., ed. by Johnson, L. R., Raven press, New York, 2027-2081(1994).
- 28) Bardócz, S., Hughes, E. L., Grant, G., Brown, D. S., Duguid, T. J., and Pusztai, A., *J. Nutr. Biochem.* **9**, 332-338(1998).
- 29) Milovic, V., Faust, D., Turchanowa, L., Stein, J., and Caspary, W.F., *Nutrition.* **17**, 462-466(2001).
- 30) Pegg, A. E., Poulin, R., and Coward, J. K., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 425-442(1995).
- 31) Coward, J. K., and Pegg, A. E., *Adv. Enzyme Regul.* **26**, 107-113(1987).
- 32) Coward, J. K., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs* (ed. By Sandler, M. and Smith, H.T.), pp 724-750, Oxford University Press, Oxford, 1989.
- 33) Shirahata, A., Morohoshi, T., Fukai, M., Akatsu, S., and Samejima, K., *Biochem. Pharmacol.* **41**, 205-212(1991).
- 34) Shirahata, A., Morohoshi, T., and Samejima, K., *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 3220-3222(1988).
- 35) Goda, H., Watanabe, T., Takeda, N., Kobayashi, M., Wada, M., Hosoda, H., Shirahata, A. and Samejima, K., *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1327-1332(2004).
- 36) Kobayashi, M., Watanabe, T., Xu, Y. J., Tatemori, M., Goda, H., Niitsu, M., Shirahata, A. and Samejima, K., to be published in *Biol. Pharm. Bull.* **28**, (2005).
- 37) Jalkanen, S. and Salmi, M., *The EMBO Journal.* **20**, 3893-3901(2001).
- 38) Beppu, T., Shirahata, A., Takahashi, N., Hosoda, H. and Samejima, K., *J. Biochem.* **117**, 339-345(1995).

- 39) Shirahata, A., Takahashi, N., Beppu, T., Hosoda, H. and Samejima, K., *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1897-1903(1993).
- 40) Davis, R. H., Morris, D. R. and Coffino, P., *Microbiol. Reviews.* **56**, 280-290(1992).
- 41) Xu, Y. J., Furuumi, N., Samejima, K., Niitsu, M. and Shirahata, A., *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 1021-1026(2000).
- 42) Higgins, G. M., and Anderson, R. M., *Arch. Pathol.* **12**, 186-202(1931).
- 43) Alhonen, L., Räsänen, T.-L., Sinervirta, R., Parkkinen, J. J., Korhonen, V.-P., Pietilä, M. and Jänne, J., *Biochem. J.* **362**, 149-153(2002).
- 44) Luk, G. D., *Gastroenterology.* **90**, 1261-1267(1986).
- 45) Beyer, H. S., Ellefson, M., Stanley, M. and Zieve, L., *Am. J. Physiol.* **262**, G677-684(1992).
- 46) Assy, N., Gong, Y., Zhang, M., Pettigrew, N. M., Pashniak, D. and Minuk, G. Y., *J. Lab. Clin. Med.* **131**, 251-256(1998).
- 47) Samejima, k., Takeda, Y., Kawase, M., Okada, M. and Kyogoku, Y., *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3428-3435(1984).
- 48) Niitsu, M., Samejima, K., Matsuzaki, S. and Hamana, K., *J. Chromatogr.* **641**, 155-123(1993).

