

|         |                                                        |
|---------|--------------------------------------------------------|
| 氏 名     | 稲 田 雅 美<br>いな だ まさ み                                   |
| 学位の種類   | 医 学 博 士                                                |
| 学位記番号   | 医 博 第 423 号                                            |
| 学位授与の日付 | 昭 和 48 年 1 月 23 日                                      |
| 学位授与の要件 | 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当                                |
| 研究科・専攻  | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                    |
| 学位論文題目  | <b>Studies on Hog Intrinsic Factor</b><br>(豚内因子に関する研究) |
| 論文調査委員  | (主 査)<br>教 授 脇 坂 行 一    教 授 高 安 正 夫    教 授 深 瀬 政 市     |

### 論 文 内 容 の 要 旨

悪性貧血の成因について1929年 Castle の発表した内因子、外因子説が内因子研究の発端となったが、Vitamin B<sub>12</sub> が1948年 Rickets & Smith らによって発見され、これが Castle の外因子と同定されるに至って内因子研究がさかんになった。さらに豚胃粘膜中にも、内因子活性物質が含まれていることが認められ、豚内因子の精製および性質についての研究は急速に進歩した。

そこで著者は、豚内因子精製、その物理化学的分析、免疫学的方法による諸性質、および人腸管よりの吸収等の研究を試みた。第1篇においては、豚内因子精製とその物理化学的分析のため、豚胃粘膜抽出物を材料とし、これに放射性 B<sub>12</sub> を予め結合させ、DEAE- と CM-cellulose を使用し、Batch 法、Column chromatography 法で内因子活性物質の精製を試みた。精製物の内因子活性は Schilling 法で検索し、次いで物理化学的分析として、濾紙泳動法、超遠沈法、吸収スペクトル、アミノ酸分析、Galactosamine, Glucosamine, Hexose (Meinini 法)、Fucose (Dische & Schettler), Sialic acid (Oudin & Werner 法) 等の定量および B<sub>12</sub> 結合能の測定を行なった。その結果、chromatography で放射能ピークに一致した蛋白ピークを得、また 0.4 mg で内因子活性を十分認めた。濾紙泳動では単一の蛋白ピークを示し、そこに一致して糖、放射能のそれぞれのピークを認めた。超遠沈法で 3.4 S の沈降係数を示す対称的なピークを認め、アミノ酸分析で17種類のアミノ酸を含有し、糖成分として Glucosamine, Galactosamine, Hexose, Fucose, Sialic acid 等をそれぞれ、7.7%, 3.1%, 25.0%, 11.0%および3.0%含んでいた。B<sub>12</sub> 結合能は 23.0 μg/mg を示し、内因子は B<sub>12</sub> と 1:1 または 2:1 結合が推定された。第2篇では豚内因子の物理化学的性状と豚各組織、器管内の内因子様物質の免疫学的方法による検索を行なった。すなわち、Adjuvant 加精製内因子で家兎を免疫し、抗豚内因子抗体を作製し、Radioimmunodiffusion 法で、内因子の長期保存、加熱および塩酸、Ethyl alcohol, Acetone, 尿素等による化学的処理および Pepsin, Trypsin, Chymotrypsin, Nagase, Papain 等による酵素処理による影響および豚肝、脾、胆汁、血清、腎、甲状腺内における内因子様物質の有無の検索を行なった。その結果、豚内因子は 8M-尿素、Papain 処理、45% Ace-

tone と Pepsin ( $B_{12}$  結合型の時) には抵抗性があり、塩酸, Pepsin ( $B_{12}$  非結合型), 高濃度の  $\alpha$ -Chymotrypsin, Trypsin, 45% Ethyl alcohol, Acetone (非結合時) にはほとんど抵抗性がないことを認めた。また豚胆汁, 血清, 肝, 脾内には内因子様物質が存在するが, 腎, 甲状腺内には内因子様物質は認めなかった。第3篇においては, 豚内因子の人腸管からの吸収を検索するため, 対照10人, 悪性貧血患者3人, 胃全摘者3人に, 粗製内因子を早朝空腹時, 経口投与し, 投与前後において, それぞれ血中および尿中の内因子存在を Radioimmunodiffusion 法で検索した。その結果, 対照者10人中7人に内因子投与後に血中および尿中に放射能を示す沈降線を認めたが, 投与前には認めなかった。悪性貧血患者, 胃全摘者では, 投与後も全く放射能をもつ沈降線は認めなかった。すなわち, Radioimmunodiffusion で検べると対照者では, 投与された豚内因子に由来する  $B_{12}$  結合物質の吸収が認められ, かつ, 尿中への排泄も認められた。以上の成績から次のごとく結論した。得た豚精製内因子はほぼ単一の物質を示し, 分子量はば 50,000 をもち, 蛋白, 糖を含有し, 17種のアミノ酸, Hexose, Hexosamine, Fucose, Sialic acid から成り, 塩酸, Pepsin ( $B_{12}$  非結合時),  $\alpha$ -Chymotrypsin および Trypsin (いずれも高濃度の時) にはほとんど抵抗性を示さない。また, 免疫学的方法により, 人に豚内因子を経口投与すると, 腸管から吸収されて血中に入ると考えさせる所見を得たが, これが内因子自体か, 或いはその一部かは, なお検索を必要とする。

#### 論文審査の結果の要旨

著者はビタミン  $B_{12}$  の吸収に重要な役割を演ずる内因子の性状を明らかにするために, 豚内因子活性物質の精製とその物理化学的性質の検討を行ない, さらに人腸管よりの内因子吸収の有無について研究した材料として豚胃粘膜抽出物を用い, これに  $^{60}\text{CO}-B_{12}$  を結合させ, DEAE-cellulose CM-cellulose を使用して Batch 法, Column chromatography 法により内因子活性物質を精製し,  $23.0 \mu\text{g}/\text{mg}$  の  $B_{12}$  結合能を有し,  $0.4 \text{ mg}$  で充分な内因子活性を示す単一の蛋白より成る内因子精製物を得, そのアミノ酸組成, 糖成分を明らかにした。さらに抗豚内因子抗体を用いて Radioimmunodiffusion 法で豚内因子の Ethyl alcohol, Acetone, 尿素, 各種の蛋白分解酵素等に対する抵抗性を検討するとともに, 豚の諸種内臓, 組織中における内因子標物質の有無を検索し, 豚胆汁, 血清, 肝, 脾内に内因子様物質の存在を認めた。また対照者, 悪性貧血患者, 胃全摘者に粗製豚内因子を経口投与し, その前後において血中および尿中の内因子の存在を Radioimmunodiffusion 法で検索した結果, 対照者では豚内因子が腸管から吸収されて血中に入ることを示唆する所見を得た。以上本論文は豚内因子の性状を明らかにし, その腸管からの吸収の可能性について知見を加えたものである。

よって, 本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。