

人胃癌の胃壁内進展と collagenase 活性について

岡山大学医学部第1外科教室（主任：田中早苗教授）

伊 藤 国 昭

（昭和52年2月19日受稿）

目 次

はじめに

実験方法

- 1) 材料および組織片採取法
- 2) collagen の抽出および collagen 分解活性の測定
- 3) 組織学的検索
- 4) disc 電気泳動

実験成績

- 1) 正常胃の collagen 分解活性
- 2) 潰瘍胃の collagen 分解活性
- 3) 癌胃の collagen 分解活性
 - a) 組織型と collagen 分解活性
 - b) 進展形式と collagen 分解活性
 - c) 間質量と collagen 分解活性
 - d) Borrman 分類と collagen 分解活性
 - e) 高活性部位の組織像

考 案

結 論

文 献

はじめに

腫瘍の発育進展について、特に、腫瘍細胞と間質の関係について、古くから多くの学者によって研究がなされてきた。あるものは、間質が腫瘍増殖に対して促進的に働くとし、あるものは、間質は、腫瘍に対する生体の抵抗性の表現であると述べている。また、進展する腫瘍近傍の間質の変化、変性についても、光顕的、電顕的に検討がなされている。この腫瘍細胞近傍にみられる間質の変性や破壊現象の発現因子としていろいろな説がとえられているが、Mahr¹⁾および Buch²⁾は電顕的観察にて、腫瘍

細胞から proteolytic enzyme が産生されると述べた。その他にも、Waldschmidt-Leiz の cathepsin 説³⁾、mucolytic enzyme 説⁴⁾、hyaluronidase 説⁵⁾等の種々の生化学的因子があげられてきた。Gersh⁶⁾は腫瘍間質、特に collagen fiber を形態学的に観察した結果、腫瘍細胞が collagenase 様酵素を産生し、collagen fiber を変性せしめるのではないかと推測している。

collagenase は 1962年、Gross 等⁷⁾が変態時のオタマジャクシの尾に存在することを証明して以来、種々の組織に存在することが判明したが、腫瘍においても Dresden 等⁸⁾が上皮由来の腫瘍に高頻度に活性を認めることを報告し、胃癌では宇宿等⁹⁾がその活性の存在を報告している。しかし、腫瘍の進展との関係を論じた報告はまだない。そこで、著者は胃癌各部の collagenase 活性を測定し、同時に組織学的観察を行ない、胃癌の形態学的特徴と collagenase 活性の関係を検討し、腫瘍が進展する際に演ずる collagenase の役割について考案した。

実験方法

1) 材料および組織片採取法

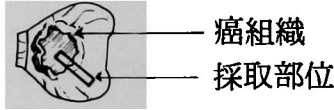
材料は、正常胃として、食道癌手術の際に同時に切除した胃などの非病変部分（以下これを正常胃と呼ぶ）3例、潰瘍胃3例、癌胃44例である。

組織片採取方法は、図1に示すごとく、切除直後の胃より、癌巣部を周辺部を含めて短冊形に全層にわたり切り取り、36℃のタイロッド液にて、約30分間予備培養し、この組織をさらに2mmの巾に切り、図1に示すごとく、直径2mmの眼科用トレパンで高さ2mm、直径2mmの円柱形に打ち抜き小組織片を採取した。この組織片を、一例について20~27コ作製し、個々の組織片について後述の方法で collagen 分解活性を測定した。

2) collagen の抽出および collagen 分解活性の

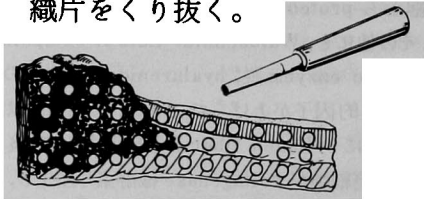
図1 組織片採取法

1) 切除胃から下記のごとく切り出す。



2) タイロード液にて36℃ 2時間予備培養をする。

3) 巾2mmに切り眼科用トレパンで組織片をくり抜く。



4) 組織片をタイロードでよく洗いゲルの上におく。

測定

collagen はウイスター系ラットの皮膚より図3のごとく、0.05M 酢酸にて抽出した後27,000Gで遠沈し、上澄へ10%になるようにNaClを加え、10,000Gにて遠沈、沈渣を再び0.05M 酢酸で溶解、これを数回くり返し、最後にNaOHで中和し、蒸留水で透析した後、凍結乾燥し、冷凍保存した。

collagen 分解活性の測定は、Gross-Lapierre⁷⁾の

図2 コラーゲン分解活性測定法

- 1) 凍結乾燥コラーゲン 20mg を pH. 7.6 寒冷リン酸緩衝液 10ml. に溶解。
- 2) 0.4 M. NaClにて透析。
- 3) 0.25 ml. コラーゲン溶液をマイクロチューブにとり約8時間 35°C 恒温槽中で乳白色ゲル状とする。
- 4) pH. 7.2 タイロード液にて、約4時間コラーゲンゲルを溶す。
- 5) 組織片をゲルの上におき、35°C 恒温槽中に入れる。48時間後に融解度を判定する。

図3 コラーゲン抽出法

- 1) ラットの皮をはぐ。
- 2) カミソリで毛、脂肪、筋肉等を除去し皮ふのみとする。
- 3) 水洗。
- 4) はさみで細断。
- 5) ポリロフ ホモジナイザーにてホモジナイズする。
- 6) 水洗。
- 7) 2800G. で10分間遠沈。

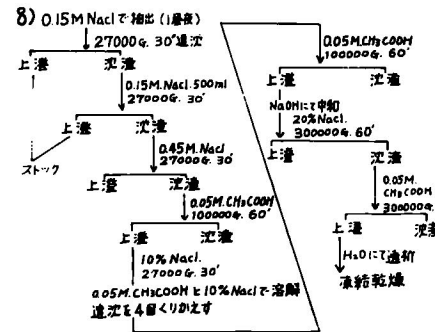
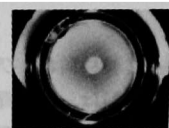
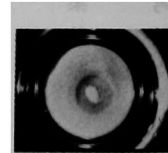


図4 コラーゲン融解活性判定基準

(一) 融解なし



(二) 融解部が組織片の直径以下



(土) 融解はあるが明らかでないもの



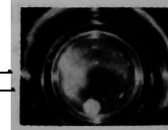
(三) 融解部がシャーレの1/2以下



(十) 融解部が組織片の半径以下



(卍) 融解部がシャーレの1/2以上



方法に従って行なった。図2に示すごとく上記凍結乾燥した酸可溶性の collagen 20 mg を pH 7.6 滅菌寒冷リン酸緩衝液 10 ml に溶解し、この溶液を 0.4 M NaCl にて一昼夜透析した後、本谷、宇宿等のマイクロ二重シャーレ (内径 1 cm) に 0.25 ml 入れ、35℃ にて 8 時間おくと、collagen 溶液は乳白色の gel 状となる。ついで、この gel をタイロード液にて約 4 時間浸した後、上記組織片を gel 上に載せ、35℃ の incubator にて 48 時間 incubate する。48 時間後に組織片の周囲にみられる collagen gel の融解輪の大きさを肉眼的に (-) ~ (++++) の 6 段階に分けて判定し、collagen 分解活性とした。なお、判定基準は図4の通りである。

3) 組織学的検索

collagen 分解活性の測定に切り出した部の隣接部分および小組織片をくり抜いた残りの組織を H・E 染色, colloid 鉄染色, azan 染色を行ない光顕にて組織学的な特徴および collagen の変化について観察した。

4) disc 電気泳動

抽出した collagen の純度を調べるためと、マイクロ二重シャーレ内の collagen 分解産物が、collagenase によるものであるかどうかを調べるために、disc 電気泳動を行なった。方法は、永井の方法¹⁰⁾に従って pH 2.3 gel を用い、試料 1 本につき 2 mA の電流を約 30 分間流し泳動した。

実験成績

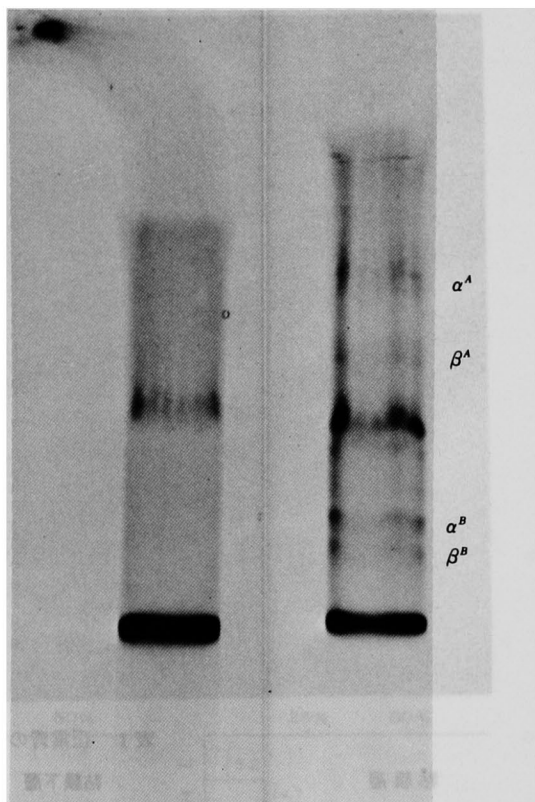
1) 正常胃の collagenase 活性 (表 1)

実験方法で述べたごとく、癌、潰瘍のない正常胃 3 例、89 組織片を、粘膜層、粘膜下層、筋層の 3 層に分けて、collagen 分解活性を測定した。活性の程度を (-) ~ (++++) の 6 段階に分け、その各段階のしめる頻度を % であらわした。これによると、三層とも軽度の活性である (+) が大部分をしめ、(+) の頻度は粘膜層では 81.1%、筋層では 75.0%、粘膜下層では 62.5% である。(++) 以上の活性はほとんどみられず、筋層で一組織片だけ (++) が出たのみであった。われわれが用いた正常胃は、3 例とも比較的高令者の胃であり、軽度の病変はあるものと思われるが、肉眼的にみて変化のない部より採取した。

2) 潰瘍胃の collagen 分解活性 (表 2)

3 例の潰瘍胃について collagen 分解活性分布を調べた。3 例とも胃前庭部小弯側に潰瘍のみられた例で、実験方法で述べたごとく、胃壁全層を潰瘍部、

図5 disc 電気泳動



左: 抽出 collagen の disc 電気泳動 collagen による単一の band がみられる
 右: collagenase による融解産物の disc 電気泳動
 α^A β^A は分解産物の large fragment
 α^B β^B は small fragment

潰瘍周辺部を含めて collagen 分解活性分布を測定し、潰瘍底、潰瘍底隣接部、周辺粘膜層、周辺粘膜下層、周辺部筋層の 5 つの部分に分けて集計した。潰瘍底は陥凹の底部、胃内腔に露出した部分であり、胃より分泌された消化酵素の影響も考えられるので、十分に組織片をタイロード液で洗浄した後活性を測定した。また同時に、胃内容物 (胃液など) も同様な方法で collagen 分解活性を測定したが、collagen の融解はまったくみられなかった。collagen 分解活性は表 2 のごとく、潰瘍病変部から離れた周辺組織の筋層と粘膜下層では、ほとんど正常胃のそれと差はないと思われるが、潰瘍底で (++) 程度の中等度活性がみられた。潰瘍底隣接部では、潰瘍底ほどではないが、正常胃の粘膜下層、筋層よりもやや活性が上昇していた。また、周辺粘膜では、ほとん

図6 基質コラーゲンの電顕像

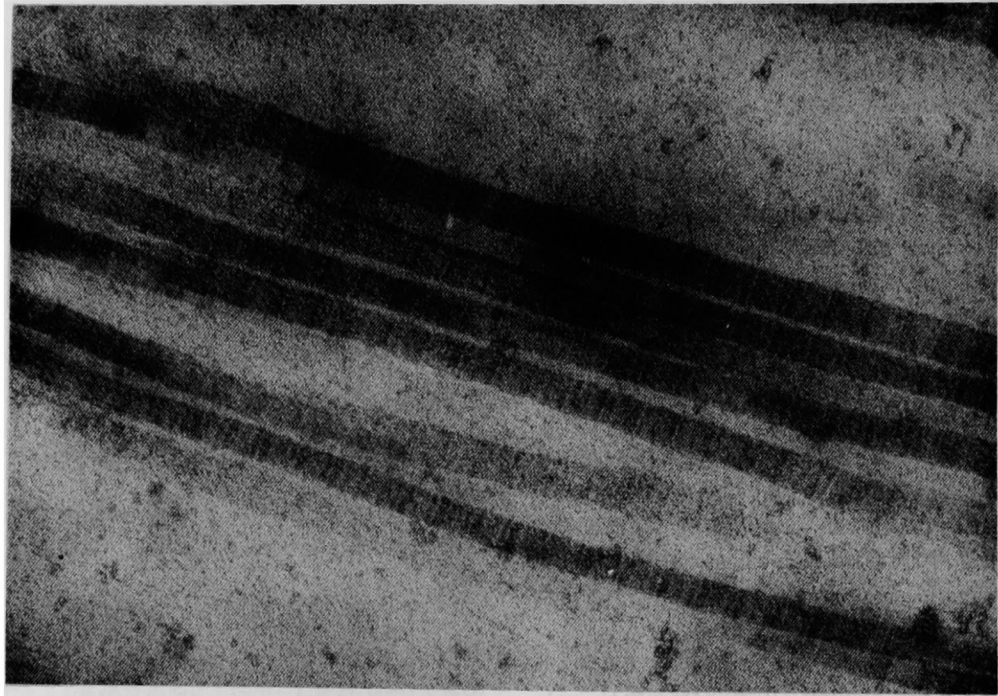
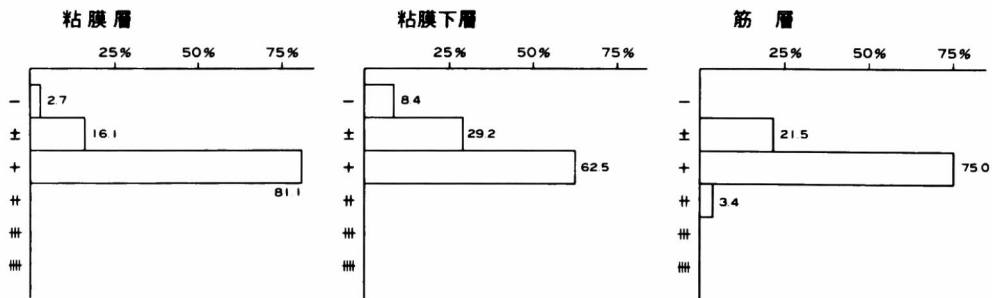


表1 正常胃の Collagen 分解活性



ど潰瘍底と同じ位の中等度の活性上昇がみられた。この周辺組織の活性上昇には、Gastritis などの随伴病変が影響していると思われる。

3) 癌胃の collagen 分解活性 (表 3)

44例の癌胃の collagen 分解活性分布を調べたが、集計の都合上、採取組織を大きく4つの部分に分けた。すなわち、①進展先進部を除く腫瘍部分：腫瘍中心部、②腫瘍が正常組織と接する部で、腫瘍部分の最外層：腫瘍の進展先進部、③腫瘍組織に接する正常組織：腫瘍隣接部、④腫瘍隣接部よりさらに腫瘍から離れた部分：周辺組織である。結果は表3のごとく、腫瘍中心部では6段階の活性度のうち(+)が最も多く、32.9%であった。しかし、(+)

と(##)もそれぞれ28.0%前後で、この3段階が他に比べ高頻度である。また、腫瘍中心部でも、まったく融解の起こらなかった組織片が0.4%にみられた。進展先進部でも(##)が最も多く、進展先進部の全組織片中47.4%にみられるが、(##)も36.5%と多くみられた。それに反し、(+以下は極めて少なく(-)~(+を合わせても8.0%にしかならなかった。すなわち、腫瘍中心部と進展先進部を比較すると、進展先進部には(##)以上の高活性が多く、(+以下のものが少ない。このことは、腫瘍中心部よりも先進部に collagen 分解活性が高いことを示すものである。

腫瘍隣接部では、(##)が33.6%、(##)が10.3

表2 潰瘍胃の Collagen 分解活性

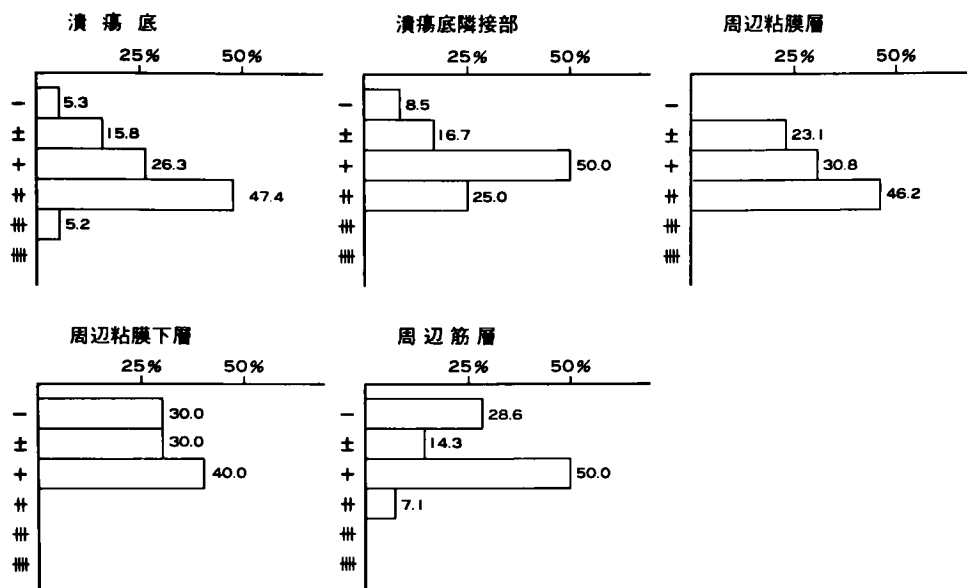
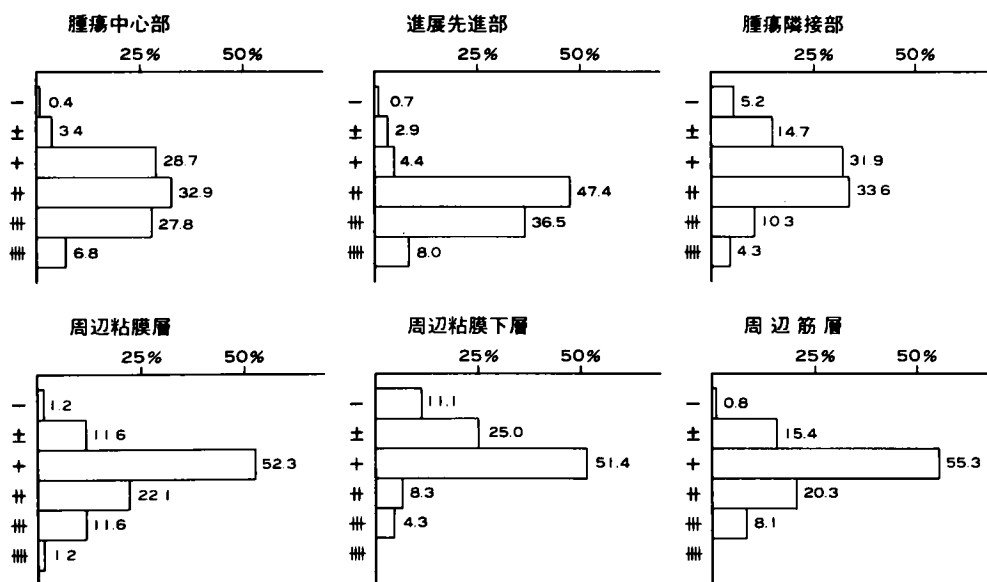


表3 癌胃の Collagen 分解活性



%, (+)が31.9%, (±)以下は19.9%であり、腫瘍部分よりも (+)以下の活性を示すものが増し、(++)以上のものの頻度が減少している。周辺組織は粘膜層、粘膜下層、筋層に分けて検討したが、粘膜下層はこの三層のうち最も低活性であり、粘膜層は最も高活性を示す部である。しかし、周辺組織は腫瘍部分や腫瘍隣接部に比較すると低活性である

が、正常胃に比べると粘膜層、粘膜下層、筋層とも活性は高い。

a) 組織型と collagen 分解活性 (表4)

collagen 分解活性の測定のためパンチした部に隣接した組織を胃癌取扱い規約の組織分類に基づいて、各組織型に分類した (表5)

この組織分類のうち今回の検索症例には、乳頭腺

表4 組織型とCollagen 分解活性

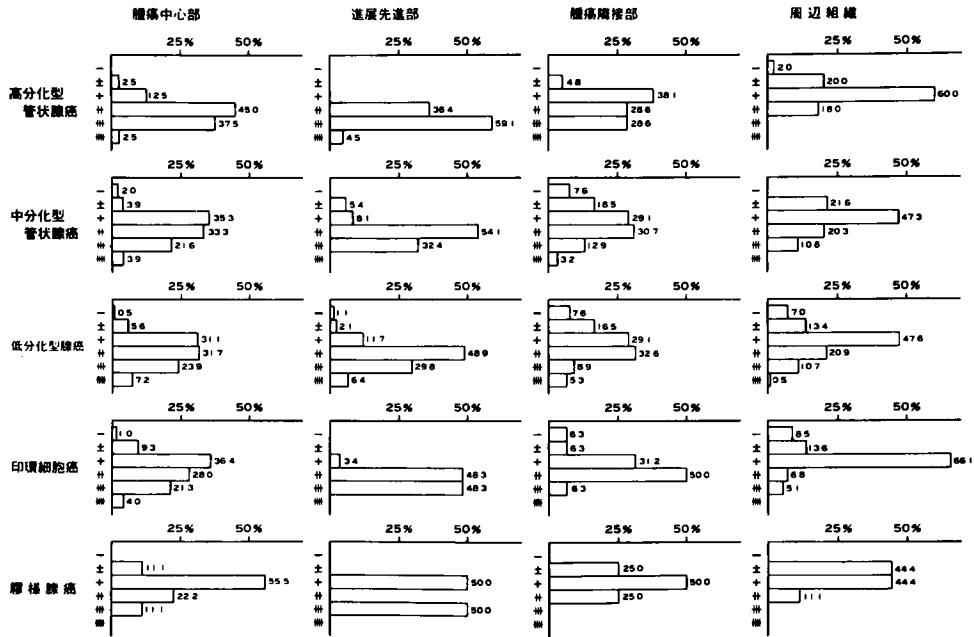


表5 組織分類

- 一般型 Common Type
 - 乳頭腺癌 Papillary adenocarcinoma (pap)
 - 管状腺癌 Tubular adenocarcinoma (tub)
 - 高分化型 well differentiated type (tub₁)
 - 中分化型 moderately differentiated type (tub₂)
 - 低分化腺癌 Poorly differentiated adenocarcinoma (por)
 - 膠様腺癌 Mucinous adenocarcinoma (muc)
 - 印環細胞癌 Signet-ring cell carcinoma (sig)
- 特殊型 Specific Type
 - 腺扁平上皮癌 Adenosquamous carcinoma (as)
 - 扁平上皮癌 Squamous cell carcinoma (sq)
 - カルチノイド腫瘍 Carcinoid tumor (cd)
 - 未分化癌 Undifferentiated carcinoma (ud)
 - その他 Miscellaneous (ms)

注: () の文字は各々の略語。

(胃癌取扱い規約より)

癌はなかった。

まず、高分化型管状腺癌は6例であるが、この高分化型管状腺癌の collagenase 活性をみると、腫瘍中心部は他の組織型に比し活性が高く、しかも低活性を示す部分は少なく、高活性を示す部分が大部分である。この組織像の表現は優性像でもってあらわしているため、高分化型といえどもその組織中には乳頭状とか中分化像が少部分混存することがある。この少部分の乳頭状の構造を示す部位をみると活性が高く、これに反し組織像が中分化型の組織型に近づくにつれて、中等度活性から低活性の部が増える傾向を示した。進展先進部では、すべて(++)以上の活性を示し、しかも、(+++)以上の高活性の部が60.0%以上であり、これは他の組織型よりも高率である。腫瘍に接する隣接部では、(++), (+++)がともに28.6%をしめ、他の組織型の隣接部に比べると高い割合をしめているが、腫瘍周辺部では(++)以上の活性頻度がわずか18.0%で、この部の活性はむしろ他の組織型に比べて低活性である。

中分化型管状腺癌では、腫瘍中心部で(+)の部分が高分化型のものより増加しており、逆に(+++)以上の部は減少している。また、進展先進部でも(+++)が(+++)よりも多く高分化型の逆を示している。このことより、中分化型のcollagenase 活性は、

全体的に高分化型腺管腺癌よりも活性が低いと思われる。しかし、腫瘍中心部と進展先進部の差は、高分化型に比し大きく、中心部で(+)以下の低活性部分が41.2%あるのに、進展先進部では13.5%であった。

低分化型腺癌では、腫瘍組織部の活性は高分化型や中分化型が平均して高活性を示すのに比して、低分化型では腫瘍の中心部ほど(+)以下の低活性部分が比較的多くなり、進展先進部に近づくにつれて、(++)以上の高活性が多くなる。すなわち、腫瘍中心部より先進部ほど活性が高くなっている。したがって、中心部と先進部の差は大きくなる。

印環細胞癌は、中心部では上記三組織型に比べ最も活性度が低く、進展先進部ではほとんどが(++), (+++)の高活性を示す。この傾向は印環細胞癌の中でも特に superficial spreading type を示す早期癌に著明で、粘膜層の腫瘍中心部の活性は低いが、進展先進部特に水平方向の先進部になるにつれて高活性を示す。

膠様腺癌は1例のみであるので、統計的に論ずることはできないが、活性分布の上で mucin の多い部分の活性度は低く、中心部の中でも高活性を示す部は mucin の少ない部位であった。また、進展先進部でも活性の上昇はみられない。

周辺組織の高活性を示す部分の特色は、粘膜層で

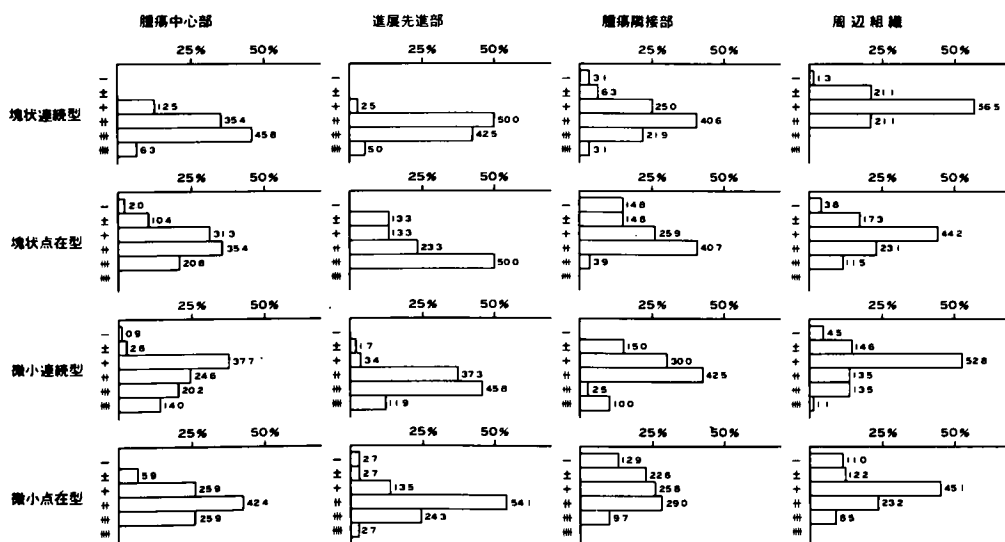
は腸上皮化生の強い部位であり、筋層では癌巣の大きな漿膜侵襲のみられる癌の周辺組織で、漿膜面に近い部に(++)~(+++)の活性が少数であるがみられた。

b) 進展形式と collagen 分解活性 (表6)

胃癌の進展形式をわれわれは、進展先進部の癌巣の連続性の有無と間質の多寡によって4型に分類している。すなわち、①塊状連続型は癌巣が密集し、塊状で大きく massive に存在し、癌巣間の間質は少ないもの。②塊状点在型は癌巣そのものは塊状を呈するが、その塊状の癌巣は、塊状連続型のごとく大きくなく、癌巣間には間質がしめるため小塊状となり、点在しているもの。③微小連続型は低分化型の癌にみられるもので癌巣の個々は小さく、しかも癌巣間の間質は少ないため、癌細胞の密度が比較的高いもの。④微小点在型は微小連続型にみられる低分化型の癌巣が間質量が多いため、間質の間に散在性に癌細胞がみられるものである。この4型について collagen 分解活性を検討した。

塊状連続型は中心部、先進部ともに他の進展形式よりも活性が高く、特に中心部では他の進展形式に比較して(+)以下の低活性部分が少なく、わずか12.5%である。進展先進部でも低活性部分が少なく(+)が2.5%にみられるのみである。進展先進部と中心部との活性差は、他の進展形式のように著明

表6 進展形式と Collagen 分解活性



でなく、癌巣全体に平均して高活性を示す。しかし、周辺組織では逆に他の型に比して、活性の上昇はなく、正常胃に近い活性を示した。

塊状点在型では腫瘍中心部で(+)以下の低活性が、塊状連続型に比べると増えており、進展先進部でも(++)が50.0%と高頻度に見られる反面、(+)以下も26.6%と塊状連続型に比して低活性がしめる割合が多くなっている。

微小連続型は腫瘍中心部は(+++)が20.2%、(++++)が14.0%とやや多いが、(+)以下の低活性部分も40.9%と多い。しかし、進展先進部では(+++), (++++)の高活性部分が57.7%にみられ、これは4型のうち最も多い。このことは、中心部と進展先進部の活性の差が著しいことを示す。

微小点在型は癌巣全体に(++)の中等度活性を示す部が多く、(+++)以上の高活性の部分が比較的少ない。進展先進部でも同じような傾向がみられた。一般に、進展先進部で高活性のみられた塊状連続型、微小連続型は他の2型に比較して隣接部の活性が高い傾向にある。周辺組織の活性をみると、塊状連続型がやや低活性であるが、他の3型はほとんど差がみられなかった。

c) 間質量と collagenase 活性 (表7)

腫瘍細胞の密度と collagenase 活性との相関をみる意味で、癌組織の間質量を胃癌取扱い規約に基づき、medullary, intermediate, scirrhou の3型に分類し集計した。各型の中心部の活性をみると、medullary では(+++), (++++)の高活性を示す部

分の頻度が51.0%と多く、(+)以下の低活性部分が17.5%しかないのに反し、scirrhou では(+++)以上が17.4%と少なく、(+)以下の低活性部分が52.3%と多くなっている。進展先進部でも medullary は(+++)以上の高活性部分が多く57.1%であるが、scirrhou では逆に17.1%と低頻度である。intermediate では中心部で高活性部分が31.5%、低活性部分が34.2%であり、前二者の中間値を示し、進展先進部でも medullary より低活性部分が増え、scirrhou より高活性部分が増えている。

d) Borrmann 分類と collagenase 活性 (表8)

肉眼分類別の症例分布は Borrmann I型が2例、II型25例、III型13例、IV型4例であった。Borrmann I型では症例数が少ないため統計的検討はできないが、腫瘍中心部、先進部とも高活性で、隆起の頂上部は(++)程度の中等度活性が多く、隆起の基部ではほとんど(+++)で、(+)以下の低活性はみられなかった。進展先進部では(+++), (++++)が全部で、低活性部はみられない。周辺組織では活性の上昇はなく、正常胃とほとんど変わらない。

Borrmann II型では進展先進部に高活性が集まっており、特に、周堤の隆起部分はほとんど(+++)か(++++)で、著明な高活性を示すことが特徴である。なお、潰瘍底では活性の上昇がみられず、(+)以下の低活性が多い。また、隣接部、周辺組織ともに正常胃よりやや活性の上昇をみる程度である。

Borrmann III型は、ほとんどII型と同様な活性分布であるが、表8でみるように中心部にやや(+++),

表7 間質量と Collagen 分解活性

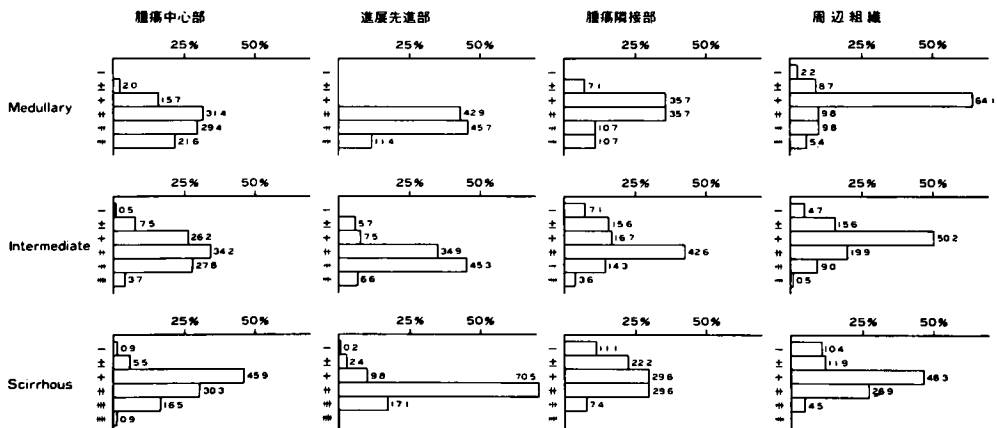
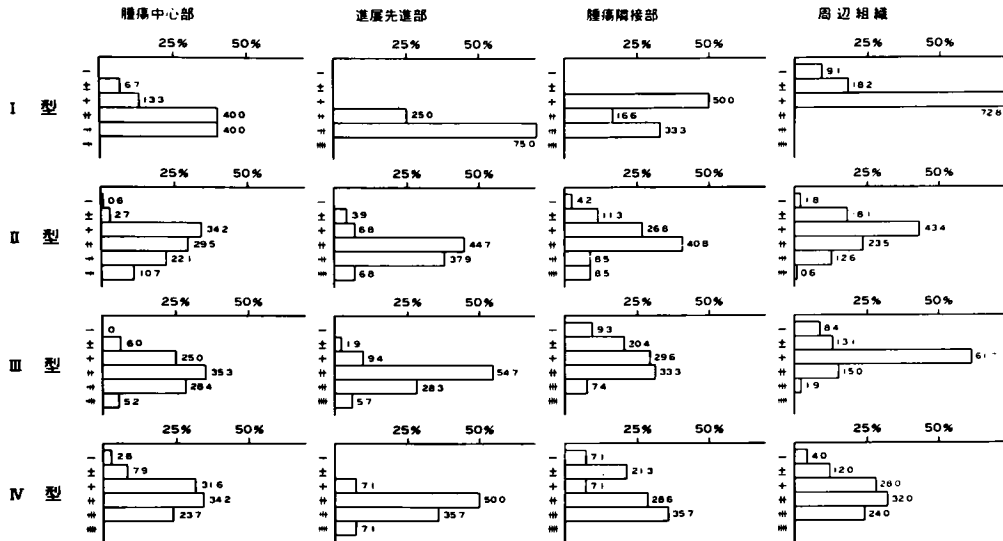


表 8 Borrmann 分類と Collagen 分解活性



(卅)の割合が多いが、これは中心部であっても進展先進部に近い浸潤部分が高活性であったためと思われる。進展先進部では、(卅)、(卅卅)の高活性部分が比較的低率であるが、(卅)の分布は54.7%であり、先進部の活性は他の型に比して、中等度活性を示す部の割合が多くなっている。

Borrmann IV型では、中心部は他の肉眼型に比較して低活性部分が高率で、進展先進部では Borrmann II, III型よりやや高活性かと思われるが大差はない。しかし、周辺組織は他の型に比して、高活性の部が高頻度にみられる。腫瘍中心部よりも隣接部がやや高活性を示し、胃全体が瀰漫性に活性上昇を示している。特に、腫瘍部から離れた、明らかに腫瘍細胞のない周辺組織で、しかも肉眼的に壁が肥厚し、硬化している部の筋層に高活性をみる事が多いことは、この型の特徴で、癌進展を考察する際に注目すべき所見と思われる。

e) 高活性部位の組織像

高活性部位の組織像の特徴は図7のごとく、腺管構造が密に存在し、back to backに癌腺管が接しているとき高分化型癌にみられる。癌巣周囲の collagen は束状で平行に走っているが、癌巣内の collagen は図8にみられるように線維も細く、まばらにしかなく、網状の構造で、fibroblastも少なく、あっても変性、崩壊しているのが多い。

低分化型癌で高活性を示す部位では、図9の右半分にみられるように癌細胞が密に存在し、核分裂像も比較的多くみられる。間質は図10, 11のように fibroblast は比較的多くみられるが、核が変形、濃縮しているものが多い。collagen 線維は全体に少なく、細い線維が網状に分布している。逆に、低活性部分は図12にみられるように collagen 線維が多く、太い collagen 線維が腫瘍細胞間を束状に走行しているため、癌細胞は collagen 線維の間に散在性に点在している。

考 案

collagenase は1962年 Grass 等⁷⁾がオタマジャクシの尾に存在することを証明して以来、人の組織でも、歯内^{11, 12)}分娩後の子宮¹³⁾リュウマチ患者の関節液¹⁴⁾皮膚¹⁵⁾等に含まれることが明らかにされた。腫瘍では squamous cell carcinoma,¹⁶⁾ basal cell epithelioma,¹⁷⁾ malignant melanoma¹⁸⁾ でかなり高活性の collagenase が証明されている。また、Dresden⁸⁾ は人の各種の腫瘍について、collagenase 活性を測定し、上記腫瘍の他に colon の adenocarcinoma でも同様に collagenase 産生能があることを報告しているが、leiomyosarcoma, chondroma, chondrosarcoma 等の間葉系の腫瘍にはあまり活性を認めていない。Reley 等¹⁹⁾ は、上皮由来の組織で

は、ほとんど全部に collagenase 活性を認めたが、上皮を含まない組織では、108組織片中2ケのみ陽性であり、collagenase の産生には上皮組織の関与が必要であると述べている。しかし、火傷の瘢痕や、肉芽組織などの間葉系組織でも、かなり高い活性を示し、また、Harris 等²⁰⁾は実験腫瘍の V₂ carcinoma の capsule の部分にも collagenase 活性を認めている。われわれの結果においても、上皮組織のない胃の粘膜下層や、筋層にも活性が認められた。また、腫瘍に接する腫瘍隣接部の活性は比較的高いが、腫瘍から離れた周辺部でも、時には(++)か(+++)程度の活性がみられることがある。

collagenase 活性の測定方法のうち、組織を直接 homogenate したものは、活性があまりない。このために、哺乳類での発見ができたと思われるが、Gross²¹⁾はオタマジャクシの尾を collagen gel 上で組織培養し、collagen gel を融解することによって collagenase を証明した。それ以来、この方法を用いて、種々の組織で collagenase が産生されることを証明されてきた。しかし、最近になって ¹⁴C-glycine または ¹⁴C-proline で label した基質の collagen を用いることによって、溶解した ¹⁴C の量を液体シンチレーションカウンターで測定し、活性の程度を定量的に測定する方法²²⁾がとられるようになった。いずれにしろ、組織から直接取り出すのではなく、組織培養により、その間に出て来る collagenase の活性を測定する方法がとられている。

組織培養の培養液中 collagenase の活性を経時的にみた場合、1日目には活性がほとんどなく、2日目より活性が出るといわれている²³⁾したがって、われわれの実験では、48時間組織培養した後、融解した collagen gel 上の融解輪の大きさをもって、collagenase 活性とした。collagen はまず最初に collagenase によって tropocollagen の3本の各 chain の3/4の所で切断され、これによって分かれて生じた TC 75と TC 25はいずれも体温で分解され、最後には CO₂と H₂O になるといわれている²⁴⁾

永井等²⁵⁾はオタマジャクシの尾より抽出した collagenase が再生 collagen を分解する現象を、disc 電気泳動法によって経時的に観察したが、それによると collagen の α と β の band が collagenase によって分解され、それぞれの band の下側に新しい2つの band が出ることを示した。われわれの検索でも、マイクロ二重シャーレ内の融解産物を disc 電気泳動にかけると図5右のごとく、collagen の分解に

よってできた $\alpha^A\beta^A$, $\alpha^B\beta^B$ の4つの band が認められた。このように、永井等がオタマジャクシで観察した collagenase の作用機序は、胃癌組織より産生された collagen 分解酵素にも同様にみられるものと思われる。

collagenase を産生する細胞については、先に述べたごとく、Eisen 等²⁶⁾は主に上皮組織で作られるとしている。しかし、間葉系の細胞でも顆粒白血球²⁶⁾や貧食細胞²⁷⁾および線維芽細胞²⁸⁾には collagenase が含まれていることが証明されている。組織として活性を測定した場合でも、やはり上皮組織に活性が高く、われわれの測定結果でも、胃粘膜は粘膜下層、筋層よりも明らかに高い活性がみられた。しかし、間葉系組織にまったく活性がないのではなく、筋層や粘膜下層に少しは collagenase 活性があり、何らかの機序が働けば、この部位の collagenase 活性も上昇するのではないと思われる。

そこで、われわれが測定した癌組織中の collagenase は腫瘍細胞が産生するものか、腫瘍に対する宿主が産生するものかが問題となる。もし、宿主側の反応によって collagenase 活性が上昇しているのであれば、癌組織中の collagenase 活性の高い部位では、上記の顆粒白血球や線維芽細胞が多いはずである。しかし、われわれの結果では、高分化腺管腺癌の medullary の部分では高活性を示すが、この部位では、顆粒球、嗜細胞は少なく、しかも線維芽細胞は大部分変性している。

また、最近、われわれは胃癌の癌細胞のみを85代継代した培養癌細胞、すなわち、間質成分がまったくない癌細胞の collagenase 活性を測定した結果、高度な collagen 分解作用を持っていることが判明した。また、培養癌細胞数の多寡により collagenase 活性が比例して増減することを知った²⁹⁾これらのごとく、癌細胞から collagenase が産生されることは明らかである。一方、癌胃で、癌細胞のない周辺の筋層や粘膜下層でも、正常胃より活性の上昇がみられる。特に Borrmann IV型癌では、癌細胞のない周辺部で、しかも線維化が著しく、肥厚がみられる部は、線維芽細胞も多くみられるのであるが、collagenase も高活性を示している。先述の Harris 等²⁰⁾も述べているごとく、ascitic V₂ carcinoma をウサギの筋肉内に移植した場合、癌細胞自体は正常上皮の10倍近い活性を示すが、その腫瘍の capsule でもかなりの collagenolytic activity がある。したがって腫瘍、特に上皮性の腫瘍は collagenase を産

生するが、宿主側の間質でも何らかの刺激によって collagenase が産生されると推定される。

ついで、collagenase 活性上昇の機序について考えてみると、まず、組織学的な検索によると、collagenase 活性の高い部では、collagen の束状構造がくずれ、走行異常や collagen 線維の変性、崩壊がみられる。このことは、腫瘍が増殖進展する場合、周囲組織、特に線維性間質の大部分である collagen は癌が進展してゆくための障害となることが推察され、したがって、これを排除するためには collagenase の産生が必要であり、進展先進部において最も collagenase 活性が高いのであろうと推察する。一方、宿主側から考えると、腫瘍と接して腫瘍の影響を最も受けやすい部位は進展先進部で、この部には collagen の生成が要求されるわけであるが、手塚³⁰⁾によれば、collagen の新陳代謝のためには、ある種の tied back 機構が関係しており、collagen が分解することが引き金となって、collagen 産生が促進されるといわれている。炎症の際にも collagen 合成の盛んな時期には collagenase 活性は上昇している。腫瘍においても collagen 合成の最も要求される進展先進部では、collagenase 活性が最も高くなっている。これらのことから、腫瘍が進展するために出す collagenase が、逆に宿主側の間質反応としての collagen 産生能を刺激して、collagen 合成に一役を果たしているのではないかと推察される。そして、何らかの理由でこの間質反応が弱まった時、このバランスがくずれた時、腫瘍の壁内進展が促進されるのではないかとと思われる。

腫瘍には組織学的に種々の特徴があり、この形態学的特徴と腫瘍の生化学的性質を関連づける研究は古くからなされてきた。Bierich³¹⁾は腫瘍の caseinolytic activity を測定し、高分化型の腫瘍ほど activity が高い述べた。また、Santeusson³²⁾や Leighton³³⁾等も同様に腫瘍の proteolytic activity を測定し、悪性度の低いものは proteolytic activity が高く、悪性度の高いものは activity が低いと報告している。しかし、これらは、腫瘍の各部位による活性の高低をあらわしたのものではない。われわれの腫瘍各部についての検討では、高分化型腺管腺癌の腫瘍中心部、先進部はともに collagenase 活性が高く、これに反し、低分化型腺癌では、比較的活性度が低く、特に中心部の活性が低くなっている。しかし、低分化型腺管腺癌は、高分化型腺管腺癌に比較して間質量が多い。そのため、一定容量当りの癌細胞数は、低

分化型の方が少ないと思われる。このことから癌細胞密度の少ない低分化型癌の一定量から出される collagenase は全体量として少ないのは当然と思われる。しかし、低分化型腺癌でも、進展先進部の腫瘍細胞の密度が高い部では、collagenase 活性は高活性を示し、さらに(++)の活性を示したものは、高分化型の medullary の部分よりも、低分化型の medullary の部分の方が多いという興味ある結果を得ている。これらのことから collagenase 活性は、腫瘍細胞量に比例するのみならず、腫瘍細胞の分化度にも関連すると考えられるが、これは今後の検討をまたねばならない。また、signet ring cell carcinoma では中心部で低く、癌巣の辺縁に行くにしたがって活性が上昇していた。この傾向は signet ring cell carcinoma の中でも Stout³⁴⁾のいう superficial spreading type の早期癌で、特に著明である。しかも、この superficial spreading type の sm 癌では、垂直方向の進展先進部では、ほとんど(+)程度の活性にしかすぎないが、水平方向の進展先進部では(++)～(+++)と高活性を示す。このことは、胃癌の進展の方向性と collagenase 活性との相関を推測させて興味深い。

先に述べたごとく、胃癌の進展様式は expansive に進展するものと、infiltrative に進展するものの2つが考えられる。Vasiliev³⁵⁾は形態学的観察から expansive に進展する腫瘍では、周囲の結合織を破壊する物質を産生しているのではないかと推測し、腫瘍の protease 様酵素の存在を示唆している。われわれの進展形式分類で、expansive に進展するとみられる塊状連続型では、腫瘍全体に collagenase 活性は高くなっている。しかし、光顕による観察では進展先進部の collagen の構造は、非常に規則的で変性は少ない。ところが、癌巣内の collagen は図8に示すように、細い網状構造を呈しており、癌巣周囲の collagen と異なる。しかし、これらの変化は当然のことながら collagen 産生機序が関与していると考えられるため、collagen 分解機序以外の factor を考え合わせて論ずる必要がある。塊状点在型は、塊状連続型に比較して、やや間質のしめる割合が多くなるとともに、癌細胞が小型化し infiltrative な傾向も増すと思われるが、前者に比較すると、腫瘍部分の活性はやや低下している。しかし、中心部と進展先進部の活性の差は、前者よりも大きい。また、われわれが分類した4つの進展形式中、最も infiltrative な進展傾向の強いと思われる微小点

型では、進展先進部の高活性部が少なくなるに反し、中等度活性が最も多くなっている。この微小点在型は、組織学的にみると間質量が増し、癌細胞密度の低いのが特徴である。したがって、間質を含めた腫瘍組織としての活性は低くなる。

そこで、つきには癌細胞個々の活性を考える必要がある。癌巣が一塊となり、expansiveに増殖する高分化型腺癌の活性は前述のごとく、癌巣生体に平均して活性が上昇、腫瘍中心部と進展先進部の差はあまりない。また、expansiveな進展でなく infiltrativeに進展する癌型での collagenase 活性をみると、低分化な癌細胞が密に存在し、細胞間の間質量の少ない微小連続型では、collagenase 活性が進展先進部においてわれわれの分類の4型中最も高活性を示す。しかし、中心部の活性は塊状連続型より低い。したがって、中心部と先進部の活性差は最も大きいことになる。この活性の差がそれぞれの型別の生物学的悪性度をあらわすには予後と比較検討する必要があると考える。

これらの4型それぞれの5生率は微小連続型20.7%、微小点在型は46.9%、塊状連続型60.0%、塊状点在型53.3%であり、collagenase 活性差の強い微小連続型が最も予後が悪くなっている。また、低分化型の癌であるが間質量の異なる2つの型、すなわち微小連続型と微小点在型にみられる間質の collagen 線維の変化を組織学的にみると、微小連続型は線維の走行が乱れ、ほとんど束状構造はなく、細い網状の collagen があるのみで collagen fiber の著しい変性を示している。微小点在型の collagen は束状構造もしっかり保たれ、太い線維が束状に走っている。ただ、腫瘍細胞周囲のごく限られた範囲に、変性や膨化した collagen 線維がみられるだけである。滝沢等⁴⁰⁾もわれわれと同じように、癌巣と間質の配列と、間質の変性の状態から癌を α 、 β 、 γ の3型に分類し、予後との関係を述べているが、間質の変性、崩壊の最も著しい γ 型が予後が最も悪いと報告している。滝沢等の γ 型に相当する間質の変化は、微小連続型の進展先進部にみられるものと同じである。

以上のことから考えて、微小連続型の進展先進部は、腫瘍の増殖が活発なため、腫瘍細胞の活動も盛んで、collagenase の産生も多いと推定しうる。これに反し、微小点在型では何らかの機序により、癌細胞は線維性間質にかまされて分散、分断されるため、腫瘍細胞の活動も減弱され、collagenase の産

生もやや少ないと思われる。

肉眼分類別にみると、Borrmann I型が中心部で高活性を示し、周辺組織では正常胃組織とほとんど変わらない。Borrmann I型では胃内腔へ向かって進展するものと思われる。したがって、周辺組織に対する腫瘍の影響は少なく collagenase 活性も前述のごとくほとんど上昇しないのではないと思われる。

Borrmann II型をみると、ほとんどが expansive な進展であって、腫瘍の進展によって影響される部位は非常に狭い範囲である。したがって、腫瘍隣接部の活性は、他の Borrmann 型の隣接部に比較しかなり高活性である。周辺組織になると活性が低下している。Borrmann IV型の場合は infiltrative な進展を示すため、癌細胞に影響される範囲が広い。すなわち、進展先進部の範囲が広いと考えられる。したがって、腫瘍に対する reaction としての間質反応および fibroblast や顆粒球の collagenase 産生能の亢進も広範囲にあらわれると思われる。また、Borrmann IV型の場合、腫瘍細胞のない周辺組織でも collagenase の活性が上昇している。これは、先述のごとく、胃全体として collagenase 活性上昇が起こり、これが引き金となって fixed back 機構が働き、collagen 産生亢進していることも考えられるのである。また、Borrmann IV型で、癌細胞のない周辺組織の漿膜面に近い部で、時々高活性を示すことが認められる。これは Borrmann IV型のもは、ほとんど漿膜侵襲陽性であるが、漿膜に露出した腫瘍細胞が腹膜播種を起こす場合、腫瘍細胞が侵襲する部の腹膜の活性があらかじめ上昇することが考えられる。Bierbeck³⁷⁾は Ehlich の腹水癌を使い、腹膜侵襲の際の漿膜および漿膜下組織の変化を電顕的に観察しているが、その際、腫瘍細胞が漿膜の basement membrane を通過する前にすでに漿膜下層の結合織の破壊が起こっており、腫瘍細胞の生化学的物質による結合織の変化ではないかと述べている。胃の漿膜侵襲のある s (+) の胃癌でも同様であろうと推測される。

Borrmann II型、III型のごとく潰瘍のある癌では、潰瘍底の比較的炎症性変化の強い部位、すなわち、顆粒白血球や貧血細胞の浸潤が多くみられる部では、癌巣の進展部に比してむしろ活性が低い傾向がみられた。この部は壊死組織が多くみられるとともに、fibrosis も進んでいる。したがって、間質量の割に癌細胞数も少ないので、collagenase 活性が低いも

のと思わるるが、良性腫瘍の潰瘍底に比較するとやはり少し高活性である。これらのことから考えて、炎症性変化で上昇する collagenase 活性よりも、腫瘍による collagenase 活性の上昇の方がより大きいように思われる。

結 論

- 1) 胃癌組織は正常胃組織より collagenase 活性が高い。
- 2) 癌組織の中では中心部より進展先進部が高活性である。
- 3) 癌の隣接部、周辺組織でも正常胃よりは高活性を示す。
- 4) 組織型では高分化型癌は癌巣全体に平均して高活性を示し、低分化型癌では癌巣内でも低活性を

示す部分と高活性を示す部分とがあり、癌細胞の密度に比例して活性度が上昇しているように思われた。

- 5) 進展形式では、塊状連続型が癌組織全体に高活性であり、他の塊状点状型、微小連続型、微小点状型では、中心部と進展先進部の活性差が著しい。
- 6) Borrmann I型は、癌巣部は平均して高活性を示し、周辺組織はほとんど正常組織と変わらないが、Borrmann IV型は、周辺部を含めた癌胃全体に活性の上昇をみる。

以上のことから考えて、collagenase は胃癌の壁内進展に関係あるものと思われる。

稿を終わるに臨み、御指導、御校閲を賜った田中早苗教授、岡島邦雄助教授に感謝の意を表する。

文 献

- 1) Mahr, H. J.: Die 1-Leucinaminopeptidase (LAP) in Tumorzellen und ihre Bedeutung beim destruierenden Tumorwachstum. Frankfurter Zeitschrift für Pathologie., **77**: 107-124, 1967.
- 2) Bush, W.: Electronen mikroskopische Untersuchungen an der Tumorbindewebsgrenze beim Mammacarcinom der Frau., Virchow Arch. Abt. A. Path. Anat., **346**: 15-28, 1969.
- 3) Waldschmidt-Leitz, E., und Schäffner, A.: Über die Aktivierung der Proteolyse in bosartigen Geschwulsten., Natur Wiss., **18**: 280-281, 1930.
- 4) Mc Cutcheon, M., Coman, D. R., Moore F. B.: Studies on invasiveness of cancer: adhesiveness of malignant cells in various human adenocarcinoma., Cancer, **1**: 460-467, 1948.
- 5) Duran-Reynals, F.: The action of tumor extract: the spread of experimental vaccinia of the rabbit., Amer. J. Cancer, **15**: 2790-2797, 1931.
- 6) Gersh, I.: The organization of the ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth., Amer. J. Anat., **85**: 457-507, 1949.
- 7) Grass, J., Lapiere, C. M.: Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay., Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., **48**: 1014-1022, 1962.
- 8) Dresden, M. N., Heilman, S. A., Schmidt, J. D.: Collagenolytic enzyme in human neoplasms., Cancer. Res., **32**: 993-996, 1972.
- 9) Gentaro Usuku., Masura Honya., Ikuko Oyamada., Tomoyuki Ogata.: Study on animal collagenase., Acta. Path. Jap., **24**: 1-19, 1974.
- 10) 永井裕: ディスク電気泳動法. 蛋白質, 核酸, 酵素, **11**: 818-826, 1966.
- 11) Fullmer, H. M., Gibson, W.: Collagnolytic activity in gingival of man., Nature., **209**: 728-729, 1966.
- 12) Beutner, E. H., Triftshauser, C., Hazen, S. P.: Collagenase activity of gingival tissue from patients with periodontal diseases., Proc. Soc. Exp. Biol., Med., **121**: 1082-1085, 1966.
- 13) Jeffrey, J. J., Gross. J.: Collagenase from rat uterus: isolation and partial characterization., Biochemistry, **9**: 268-273, 1970.

- 14) Evanson, J. M., Jeffrey, J. J., Krane, S. M.: Human collagenase : identification and characterization of an enzyme from leumatoid synovium culture., *Science*, **158** : 499-502, 1967.
- 15) Fullmer, H. M., Lazarus, G., Gibson, W. A., Taylor, R. and Guthrie : Collagnolytic activity of the skin associated with neuromuscular disease including amiotrophic lateral sclerosis., *Lancet*, **1** : 1007-1009, 1966.
- 16) Hashimoto K., Yamanishi Y., Maegens, E., Mustapha, K. and Kanzaki J.: Collagenolytic activity of squamous cell carcinoma of the skin., *Cancer Res.*, **33** : 2790-2801, 1973.
- 17) Yamanishi Y., Musta K., Dabbos, and Hashimoto K.: Effect of collagenolytic activity in basal cell epithelioma of the skin and reconstituted collagen and physical properties and kinetics of the crude enzyme., *Cancer Res.*, **32** : 2551-2560, 1972.
- 18) Yamanishi Y., Edgar, M., Mustapha, K., Ohyama H., Hashimoto K.: Collagenolytic activity in malignant melanoma : Physicochemical studies., *Cancer Res.*, **33** : 2507-2512, 1972.
- 19) Riley WB Jr., Peacock E E Jr.: Identification, distribution, and significans of collagenolytic enzyme in human tissues., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124** : 207-210, 1967.
- 20) Harris E D Jr., Faulkner C. S., Wood, S. Jr.: Collagenase in carcinoma cells., *Biochem. Biophys Res Commun.*, **48** : 1247-1253, 1972.
- 21) Gross, Jr., Nagai Y.: Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme., *Proc. Nathl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54** : 1197-1204, 1965.
- 22) Sakamoto S., Goldhaber, P., Glimcher, M. J.: A new method for the assay of tissue collagenase., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139** : 1057-1059, 1972.
- 23) Bruns, R. R., Grass, J.: Band pattern of the segmental long spacing form of collagen : its use in the analysis of primary structure., *Biochemistry.*, **12** : 808-815, 1973.
- 24) Nagai Y., Grass, J., Pieg, K. A.: Disc electrophoresis of collagen components., *Ann. New-York Acad. Sci.*, **121** : 494-500, 1964.
- 25) Eisen, A. I., Grass, J.: The role of epithelium and mesenchyme in the production of a collagenolytic enzyme and a hyaluronidase in the amuran tadpola., *Dev. Biol.*, **12** : 408-418, 1965.
- 26) Lazarus, G. S., Brown, R. S., Daniel, J. R., Fullmer, H. M.: *Science*, **159** : 1483-1485, 1968.
- 27) Parakkal, P. F.: Role of macrophages in collagen resorption during bair growth cycle., *J. Ultrastruct Res.*, **29** : 210-217, 1969.
- 28) Weib, Z., Burleigh, M. C.: A specific collagenase from rabbit fibroblasts in monolayer culture., *Biochem. J.*, **137** : 373-385, 1974.
- 29) 三村哲重, 伊藤国昭, 岡島邦雄, 田中早苗 : 悪性腫瘍の collagenase 活性について. 第35回日本癌学会記事, **103**, 1976.
- 30) 手塚統夫 : 皮膚の代謝 (VII), 代謝, **11** : 65-76, 1974.
- 31) Bierich, R.: Über die vorgänge beim einwuchern der krebszellen., *Klinische Wochenhrift*, **6** : 1599-1603, 1927.
- 32) Santesson, L.: Characteristics of epithelial mouse tumor cells in vitro and tumor structures in vivo. A comparative study., *Acta Path. et Microbial. Scandinav.*, **Suppl. 24** : 1-237, 1935.
- 33) Leighton, J., Kline, I.: Studies on human cancer using sponge matrix tissue culture. II. invasion of connective tissue by carcinoma (Strain Hela)., *Texas Res. Biol. & Med.*, **12** : 868-873, 1954.
- 34) Stout, P.: Superficial spreading type of carcinoma of the stomach., *Arch. Surg.*, **44** : 651-657, 1942.
- 35) Vasiliev, JU. M.: The role of connective tissue proliferation in invasive growth of normal and malignant tissues., *Brit. J. Cancer.*, **12** : 524-536, 1958.

- 36) 滝沢延次郎：病理学から見た癌種の悪性度について. 千葉医学会誌, 43 : 906-931, 1968.
- 37) Bierbeck, M. S. G. and Wheatbey, O. N.: An Electron microscopic study of the invasion of ascites tumor cells into abdominal wall., Cancer Res., 25 : 490, 1965.

伊藤国昭論文附図

図7. 高分化型腺癌の高活性部分

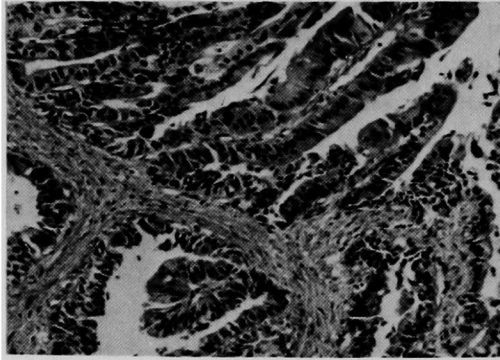


図8. 高分化型腺癌の高活性部分の癌巢内間質



図9. 低分化型腺癌の高活性部

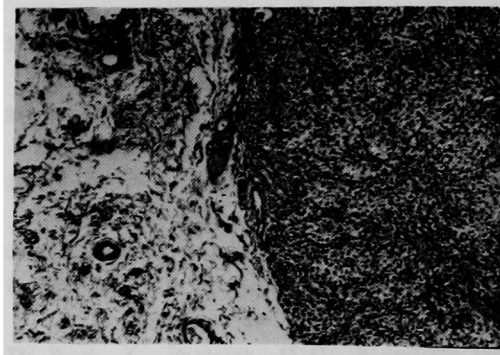


図10. 図9の強拡大

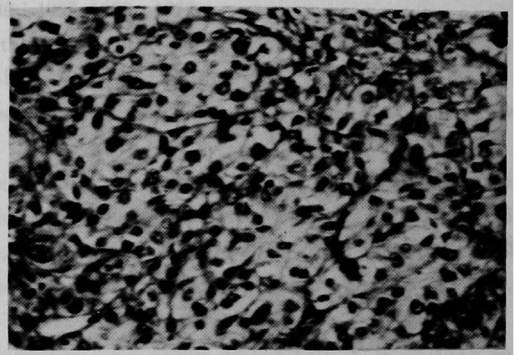


図11. 低分化型腺癌の高活性部分

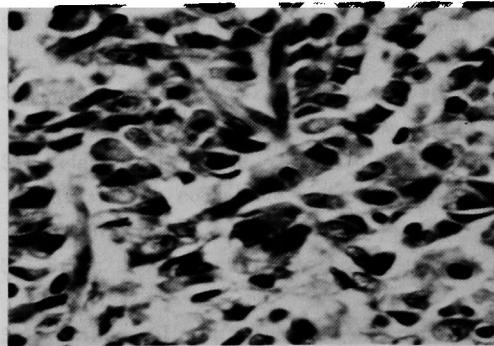
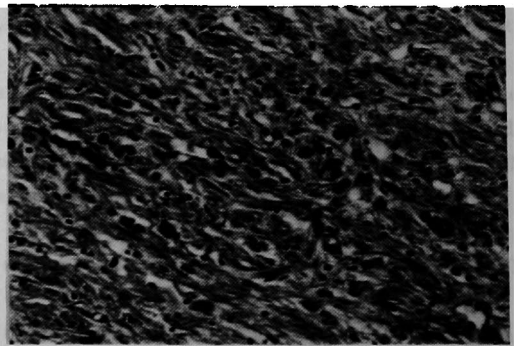


図12. 低活性部分



**On the study of collagenolytic activity
and spreading mode of human stomach cancer**

By

Kuniaki ITO

The 1st Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Sanae Tanaka)

The degradation and resorption of collagen in malignant tumor are investigated widely. The native collagen has resistance of the action of common protease at physiologic body temperature and pH. of somatic fluid. In 1963, Gross and Lapiere discovered an animal collagenolytic enzyme which act at neutral pH. and physiologic body temperature, by tissue incubation method. By this method, we measured collagenolytic activity of human stomach cancer, histological observations was performed simultaneously to study of the relationship between collagenolytic activity and morphological types of the stomach cancer.

The results are follows:

1) In the cancer tissue stomach of the collagenolytic activity were significantly more high than non-cancerous tissue of stomach.

2) In the cancer lesion, the collagenolytic activity elevated at the spreading front.

3) On the surroundings of cancer lesion, the collagenolytic activity were not so high as cancer tissue, but sleightly higher than normal stomach ones.

4) On histological pattern, the well differentiated adenocarcinoma showed relatively high collagenolytic activity in both of center and spreading front of cancer lesion. In the poorly differentiated adenocarcinoma, the activity were low in the center but gradually arised in the spreading front.

5) On the collagenolytic activity by spreading mode, no difference was not seen in center and spreading front in massive continuous type, but in the non-massive interspersed type and non-massive continuous type, there was great difference between the spreading front and center of the cancer lesion.

6) The type of Borrmann I showed calacteristic distribution of collagenase activity, which was high in cancer lesion, but was low at the surrounding region, on the other hand, in the type of Borrmann IV it was elevated all over the whole stomach.