

悪性腫瘍における乳酸脱水素酵素と その Isozyme に関する研究

第 二 編

担腫瘍マウス血清乳酸脱水素酵素活性及びその Isozyme pattern に及ぼす抗癌剤の影響について

岡山大学医学部平木内科教室 (主任：平木潔教授)

大学院学生 大 島 由 紀 子

[昭和42年12月22日受稿]

内 容 目 次

第1章 結 言

第2章 実験材料及び実験方法

第3章 実験成績

第1節 正常マウス血清乳酸脱水素酵素活性及び Isozyme pattern

第2節 腫瘍移植による血清乳酸脱水素酵素活性及び Isozyme pattern の変動

第3節 抗癌剤の正常マウス血清乳酸脱水素酵

素活性に及ぼす影響

第4節 Bashford 癌移植マウスの血清乳酸脱水素酵素に及ぼす各種抗癌剤の効果

第5節 Fibrosarcoma 移植マウスの血清乳酸脱水素酵素に及ぼす各種抗癌剤の効果

第4章 総括と考按

第5章 結 語

第1章 結 言

乳酸脱水素酵素 (LDH) は動物の全ての正常組織及び腫瘍組織に存在し、電気泳動上5つの分割 (Isozymes) に分けられる¹⁾が、正常動物の血清及び組織 LDH 活性はほぼ一定であり、かつ夫々特徴的な Isozyme pattern を有している。一方血清中の諸酵素は一般に組織中の酵素に由来するものといわれ、特に悪性腫瘍においては、血清中の多数の酵素活性が変化するとされている。すなわち LDH は悪性腫瘍、特に広汎な転移巣をもつ癌、急性白血病、慢性骨髄性白血病等で著明に上昇²⁻⁸⁾し、更にその際 Isozyme pattern の変動もみられることが既に報告されている³⁾。そして血清 LDH 活性が腫瘍の増大縮小に伴って上昇或は低下し、白血病では臨床症状と血清 LDH 活性がきわめてよく相関することも報告されている^{2), 9-14)}。

私は第一編においてヒト白血病で血清 LDH が、Isozyme pattern において LD₃ の増加、LD₅ の減少を伴って著明に上昇し、それらは病勢を反映して明らかに変動することを報告した。本論文において

は担腫瘍マウスに作用機序の異なる3種の抗癌剤を投与した場合の腫瘍の増大縮小に伴う血清 LDH 活性及び Isozyme pattern の変動を追求し、それらが悪性腫瘍の治療において効果判定の規準として用いられるか否かについて検討した。

第2章 実験材料及び実験方法

実験には Bashford 癌及びベンゼン注射により Swiss系マウス皮下に発生し継代中の Fibrosarcoma¹⁵⁾ を用い、Bashford 癌の移植には Strong A 系マウスを、Fibrosarcoma の移植には Swiss 系マウスを使用した。これらは本学マウスコロニーにて繁殖せる純系マウスで、全て月令3ヶ月の成熟雄マウスに腫瘍の移植を行つた。腫瘍の継代については担腫瘍マウスを屠殺後速かに、かつ無菌的に腫瘍組織を摘出し、シャーレ中にて小鋏で細切し、約 2mm³ の小片を作りその一片を背部皮下に移植針で埋没した。抗癌剤としては Mitomycin C (MMC)、Chromomycin A₃ (TM) 及び Chloroquine phosphate (CQ) を用い、それぞれ 0.25 mg/kg/日、20 mcg/kg/日、25 mg/kg/日の量を原則として腫瘍移植後 24時間目

より2週間、毎日腹腔内に注射した。CQのみはその作用機序より効果発現に他の2剤より長時間を要するものと考え4週間投与した。

腫瘍移植後1週毎にマウスを屠殺し、血清LDH活性及び腫瘍重量を測定し、更に血清LDH isozyme patternを測定した。治療群ではそれぞれ2週目、4週目に同様の測定を行った。又これらの抗癌剤の副作用をみるために治療群と同量の抗癌剤をStrong A系マウスに投与し、血清LDH活性の変動を測定した。

採血はRiley¹⁶⁾のintraorbital technipueにより無麻酔で行った。isozyme測定にはヘパリン処理の毛細マトリットク管に採血し、一端をmodeling clayで封じ、1500 r. p. m. で15分間遠沈して得られた上清を用いた。

LDH活性の測定はWróblewski法で行った。すなわち340 μ において1分間にDPNHの吸光度0.001の減少を1単位/ccとした。その他活性及びisozyme測定についての詳細は第一編において既に述べた。尚isozymeは陰極側に最も速く移動するものをLD₁とした。

第3章 実験成績

第1節 正常マウス血清LDH活性及びisozyme pattern (表1)

Strong A系マウスの血清LDH活性は500単位から1500単位の間であり、平均1008単位である。isozyme patternではLD₁が最も多く、LD₃、LD₂がこれにつき、LD₄又はLD₅が最も少ない。Swiss系マウスの血清LDH活性は670単位から1170単位の間であり、平均940単位である。isozyme patternではLD₁が最も多く、LD₂がこれにつき、LD₃又はLD₄が最も少ない。

第2節 腫瘍移植による血清LDH活性及びisozyme patternの変動

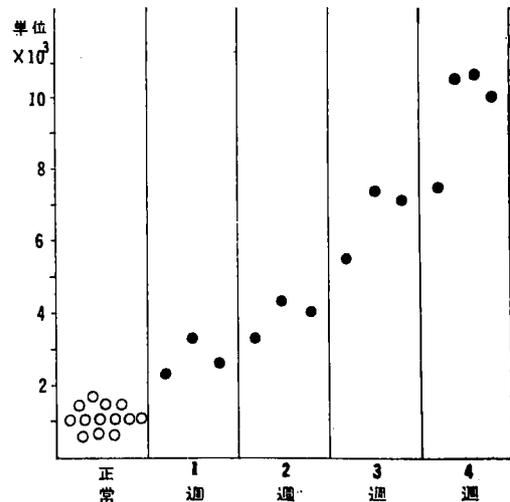
Bashford癌の移植後1週毎に血清LDH活性を測定したが、正常Strong A系マウスの活性は平均1008単位であるのに対し、担癌マウスでは移植後1週目ですでに活性は2~3倍になり、その後漸次上昇を続け、4週目には約10倍の高活性を示した。(表2, 図1)

isozyme pattenでは第1週目に正常に比較して増加していたLD₁が週を重ねるにつれ漸次減少し、反対に正常より減少していたLD₃、LD₄は漸次増

表1 正常マウス血清LDH活性及びisozyme pattern

	マウス番号	活性(単位)	LD ₁ (%)	LD ₂ (%)	LD ₃ (%)	LD ₄ (%)	LD ₅ (%)
Strong A マウス	1	600	60.4	13.9	13.2	3.6	8.9
	2	1250	63.6	15.4	11.3	7.7	2.0
	3	1000	49.4	10.8	23.3	6.8	9.7
	4	1000					
	5	1500					
	6	1000					
	7	1250					
	8	1000					
	9	1330					
	10	500					
	11	1000					
	12	670					
	13	1000					
	平均値	1008	57.8	13.4	15.9	6.0	6.9
Swiss マウス	1	670	64.9	14.6	6.8	6.0	7.7
	2	1000	66.6	14.8	6.8	4.9	6.9
	3	1000	69.2	10.1	4.5	4.2	12.0
	4	1170					
	5	800					
	6	1000					
	平均値	940	66.9	13.2	6.0	5.0	8.9

図1 Bashford癌移植 Strong A マウスの血清LDH活性の変動



加した。(表2, 図2)

正常Swissマウスの血清LDH活性は940単位であるがFibrosarcoma移植後漸次活性は上昇し、1

表2 Bashford 癌移植 Strong A マウスの血清 LDH 活性及び isozyme pattern

	マウス番号	腫瘍重量 (mg)	活 性 (単位)	LD ₁ (%)	LD ₂ (%)	LD ₃ (%)	LD ₄ (%)	LD ₅ (%)
正常マウス	(平均値)		1008	57.8	13.4	15.9	6.0	6.9
移植後 1週間	1	815	2670	79.9	2.9	1.6	6.0	9.6
	2	測定不能	3330	69.5	16.3	7.5	1.9	4.8
	3	450	2330	71.9	14.9	7.8	2.8	2.6
	平均値	633	2777	73.7	11.4	5.6	3.6	5.7
移植後 2週間	1	450	4000	71.2	12.3	11.2	4.0	1.3
	2	1180	4250	83.7	7.9	4.1	2.5	1.8
	3	1070	3250	60.3	15.2	18.8	4.4	1.3
	平均値	900	3833	71.7	11.8	11.4	3.6	1.5
移植後 3週間	1	580	5000	60.9	16.4	16.8	3.8	2.1
	2	6590	6600	80.1	9.2	7.4	1.2	2.1
	3	950	7400	55.9	11.1	22.3	8.1	2.6
	平均値	2707	6333	65.6	12.2	15.5	4.4	2.3
移植後 4週間	1	3840	10670	52.0	12.7	20.5	9.8	5.0
	2	2650	10500	33.7	15.0	26.1	10.5	14.7
	3	340	7500	45.8	8.0	20.3	8.3	17.6
	4	530	10000	51.9	10.6	14.3	7.4	15.8
	平均値	1840	9668	45.8	11.6	20.3	9.0	13.3

表3 Fibrosarcoma 移植 Swiss マウスの血清 LDH 活性及び isozyme pattern

	マウス番号	腫瘍重量 (mg)	活 性 (単位)	LD ₁ (%)	LD ₂ (%)	LD ₃ (%)	LD ₄ (%)	LD ₅ (%)
正常マウス	(平均値)		940	69.2	10.1	4.5	4.2	12.0
移植後 1週間	1	20	2000	61.0	17.4	10.4	4.9	6.3
	2	20	1330	46.6	27.5	9.7	6.5	9.7
	3	20	2000	55.8	19.1	11.1	5.4	8.6
	平均値	20	1770	54.6	21.5	10.5	5.3	8.2
移植後 2週間	1	960	8000	53.6	19.3	18.1	5.0	4.0
	2	3140	5300	53.8	28.8	10.1	4.2	3.3
	3	260	4500	50.4	22.0	15.0	4.0	8.3
	平均値	1415	5930	52.6	23.4	14.4	4.4	5.2
移植後 3週間	1	126	6000	69.7	13.2	13.1	3.0	1.0
	2	610	5000	72.9	11.7	9.1	4.1	2.2
	3	40	8000	57.6	16.3	9.8	5.9	10.4
	平均値	259	6330	66.7	13.7	10.7	4.3	4.6
移植後 4週間	1	180	4000	56.9	15.5	15.5	3.5	8.6
	2	190	6000	55.5	16.8	16.7	4.2	6.8
	3	190	5000	62.2	21.1	10.4	3.7	2.6
	平均値	153	5000	58.2	17.8	14.2	3.8	6.0

LDH 活性の変動を測定した。TM 及び MMC 注射群では対照群の約 2 倍に活性の軽度上昇がみとめられたが、CQ 注射群では活性の変動は殆んどみとめられなかった。

第 4 節 Bashford 癌移植マウスの血清 LDH に及ぼす各種抗癌剤の効果 (表 5, 図 6, 図 7, 図 8)

Strong A 系マウスに Bashford 癌を移植後、MMC 及び TM により 2 週間、CQ により 4 週間治療した後の血清 LDH 活性及びその isozyme pattern を測定し、対照群のそれと比較した。

対照群では注射による活性低下は全くみられず、

また CQ 治療群でも無処置担癌マウスの移植後 4 週目の活性とほぼ等しく、抗癌効果の生物学的表現と考えられる腫瘍重量にも差はみられなかった。一方、MMC, TM 治療群では腫瘍発育の抑制とともに血清 LDH 活性の上昇が阻止され、特に MMC 治療群で著しい効果が認められた。即ち MMC 治療群では腫瘍の発育が殆んど抑制され、活性も無処置群に比較して著しく低下し、1900 単位を示したにすぎない。TM 治療群では腫瘍に対する発育抑制効果は MMC 治療群に比較してやや劣り、血清 LDH も 2600 単位と、MMC 治療群に比しやや高い活性を示した。

表 5 Bashford 癌移植マウスの血清 LDH に及ぼす各種抗癌剤の効果

	マウス番号	処置	腫瘍重量 (mg)	活性 (単位)	LD ₁ (%)	LD ₂ (%)	LD ₃ (%)	LD ₄ (%)	LD ₅ (%)
MMC 治療群	1	無処置	450	4000	71.2	12.3	11.2	4.0	1.3
	2		1180	4250	83.7	7.9	4.1	2.5	1.8
	3		1070	3250	60.3	15.2	18.8	4.4	1.3
		平均値	900	3833	71.7	11.8	11.4	3.6	1.5
	1	MMC	40	1750	49.6	16.6	16.8	8.2	8.8
	2		20	2500	50.3	13.0	18.1	4.2	14.4
3	10		1500	66.6	10.0	7.7	4.7	11.0	
	平均値	23	1917	55.5	13.2	14.2	5.7	11.4	
TM† 治療群	1	生理食塩水	Ⓝ 2580	5670	35.1	13.8	20.8	18.4	11.9
	2		3140	6670	41.8	17.3	14.3	11.4	15.2
	3		Ⓝ 1820	5330	35.8	27.6	14.7	8.1	14.0
		平均値	2513	5890	37.6	19.6	16.6	12.6	13.7
	1	TM	4690	2400	49.2	27.2	10.1	4.6	8.9
	2		Ⓝ 1130	3000	43.6	20.7	17.1	10.7	7.9
3	30		2400	12.5	61.0	13.9	6.3	6.5	
	平均値	1950	2600	35.1	36.3	13.7	7.2	7.8	
CQ 治療群	1	無処置	3840	10670	52.0	12.7	20.5	9.8	5.0
	2		2650	10500	33.7	15.0	26.1	10.5	14.7
	3		340	7500	45.8	8.0	20.3	8.3	17.6
	4		530	10000	51.9	10.6	14.3	7.4	15.8
		平均値	1840	9668	45.8	11.6	20.3	9.0	13.3
	1	CQ	3300	7500	49.5	14.9	20.2	8.2	7.9
2	1590		9350	48.4	11.2	21.8	9.4	9.2	
3	1980		10000	63.2	13.4	10.8	3.5	9.1	
	平均値	2290	8950	53.5	13.2	17.6	7.0	8.7	

† 印 腫瘍移植後 1 週目に注射を開始す。

Ⓝ 印. 壊死傾向の強いもの

図6 担 Bashford 癌マウスの腫瘍重量に及ぼす抗癌剤の効果

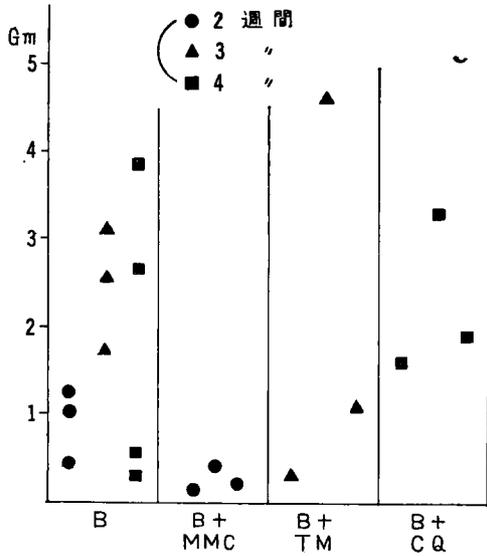


図7 担 Bashford 癌マウスの血清 LDH 活性に及ぼす抗癌剤の影響

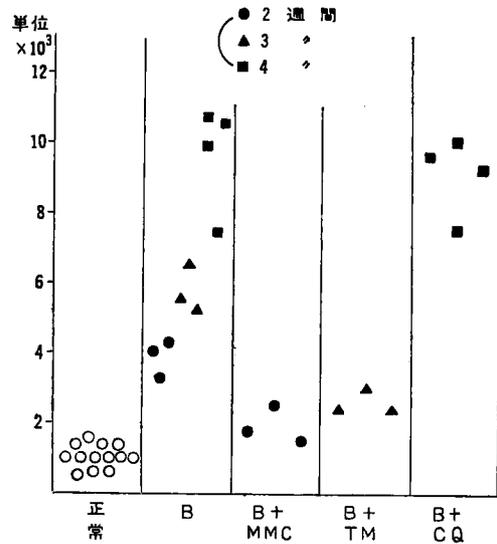


表6 Fibrosarcoma 移植マウスの血清 LDH に及ぼす各種抗癌剤の効果

	マウス番号	処置	腫瘍重量 (mg)	活性 (単位)	LD ₁ (%)	LD ₂ (%)	LD ₃ (%)	LD ₄ (%)	LD ₅ (%)
	1	生理食塩水	3710	6500	36.8	11.6	17.4	20.4	13.8
	2		710	5000	49.9	16.0	13.2	7.9	13.0
	3	2週間	270	5000	35.1	20.5	10.3	10.9	23.1
	平均値		1563	5500	40.6	16.0	13.6	13.1	16.7
MMC 治療群	1	MMC	0	2250	54.8	18.5	16.5	4.7	5.5
	2		Ⓝ 1140	3000	63.2	18.0	11.9	3.0	3.9
	3	2週間	50	2000	65.3	16.4	10.3	3.8	4.2
	4		210	3500	52.7	20.2	18.1	4.0	5.0
平均値		467	2688	59.0	18.3	14.2	3.9	4.6	
TM 治療群	1	TM	680	3000	52.8	20.7	9.5	5.3	11.7
	2		50	3000	63.9	9.4	8.8	4.8	13.0
	3	2週間	200	2860	46.3	21.8	16.0	6.8	9.1
	平均値		310	2953	54.3	17.3	11.4	5.6	11.4
CQ 治療群	1	蒸溜水	1070	7000	52.1	20.7	18.2	3.8	5.2
	2		Ⓝ 440	5500	62.2	17.0	15.0	4.6	1.2
	3	4週間	600	3000	62.9	18.0	13.3	3.8	2.0
	平均値		703	5167	59.1	18.6	15.5	4.1	2.7
		CQ	1040	6000	54.1	23.7	18.2	1.1	2.9
	4		Ⓝ 5260	8000	43.0	26.2	20.8	5.3	4.7
平均値		580	3500	57.1	25.1	13.5	1.7	2.6	
平均値		2293	5833	51.4	25.0	17.5	2.7	3.4	

Ⓝ印 壊死傾向の強いもの

図8 担 Bashford 癌マウスの血清 LDH isozymepattern に及ぼす抗癌剤の効果

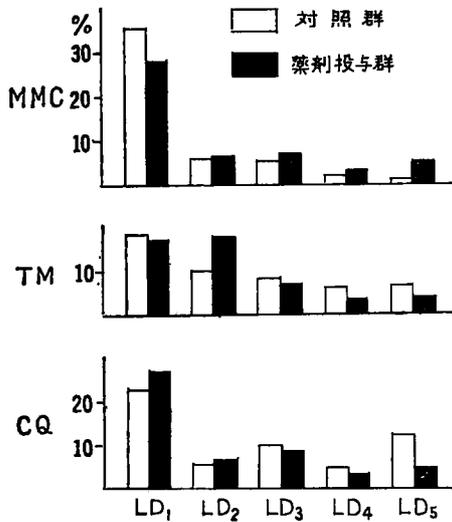
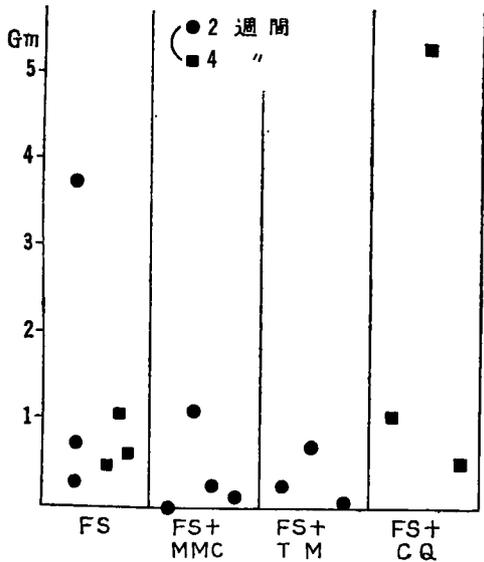


図9 担 Fibrosarcoma マウスの腫瘍重量に及ぼす抗癌剤の効果



isozyme pattern では MMC 治療群では治療による腫瘍重量の減少及び血清 LDH 活性の低下に伴い LD₃, LD₄ はわずかに増加した。TM 治療群では LD₃, LD₄ は明らかに減少した。CQ 治療群では LD₃, LD₄ は対照群より低値を示した。

第5節 Fibrosarcoma 移植マウスの血清 LDH に及ぼす各種抗癌剤の効果

(表6, 図9, 図10, 図11)

担 Fibrosarcoma マウスにおいても血清 LDH 活

図10 担 Fibrosarcoma マウスの血清 LDH 活性に及ぼす抗癌剤の影響

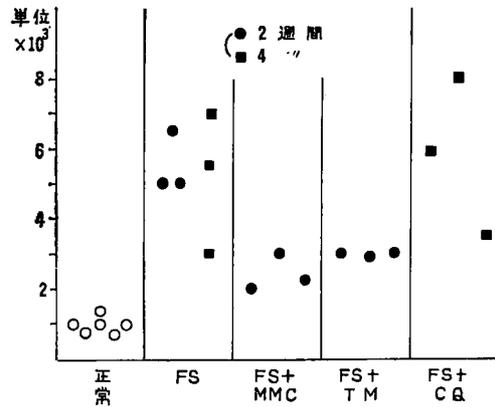
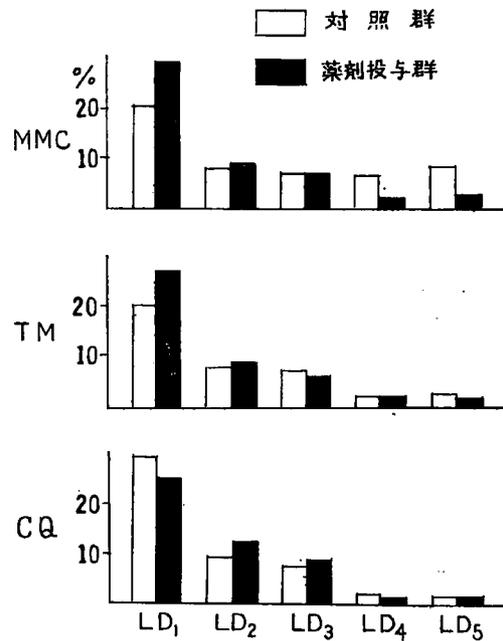


図11 担 Fibrosarcoma マウスの血清 LDH isozymepattern に及ぼす抗癌剤の効果



性は対照群では変動はみられず、CQ 治療群でも腫瘍の発育抑制、血清 LDH 活性の低下はみられなかった。一方 MMC 及び TM 治療群では腫瘍の発育抑制とともに血清 LDH 活性も対照群に比し有意の低下を示し、治療効果と血清 LDH 活性の間に相関関係の存在することが認められた。

isozyme pattern では MMC 治療群では治療による腫瘍重量の減少及び血清 LDH 活性の低下に伴い LD₁, LD₂ の増加, LD₄, LD₅ の減少が認められたが LD₃ には有意の差が認められなかった。TM 治療群では LD₁, LD₂ の増加, LD₁ の減少が認めら

れた。CQ 治療群では LD₁ の減少, LD₂, LD₃ の増加が認められ, LD₄, LD₅ には有意の差は認められなかった。

第4章 総括及び考按

癌化学療法は従来種々の薬剤及び投与方法が考按され, それぞれ基礎実験あるいは臨床応用面において検討されており, その効果判定についても多数の方法が用いられているが, 尚決定的な効果判定方法は見出されていない。一方教室の浅野らはさきに担癌生体においては血清 LDH 活性が上昇して, その測定は比較的高い診断的価値を有し, とくに白血病患者においてはしばしば治療経過とよく平行して変動することを報告した¹⁷⁻²⁰⁾。また Brindley²¹⁾ らは癌患者における血清 LDH は腫瘍重量とよく相関して変動し, 治療効果も反映するものであることを, Stark²²⁾ らも血清 LDH 活性の上昇した癌患者に Endoxan, Trenimon を使用するとき, 活性が低下することを報告している。更に最近では isozyme の研究が進み²²⁾, isozyme 測定 of 臨床的意義について Starkweather²³⁾ はヒト肺癌治療中の isozyme pattern の変化を測定し, それが治療効果判定に役立つことを示唆している。又 Kampschmidt²⁴⁾ は担癌生体における血清 LDH 上昇の機序について腫瘍組織の LDH isozyme pattern と血清 LDH isozyme pattern が類似していることから腫瘍組織が主要な役割を果していることを述べている。従つて血清 LDH 活性及び isozyme pattern の変動の測定が, 癌化学療法の効果判定規準の一つとして用いられる可能性を有するものと考えられる。

私はさきに第一編で白血病患者の血清 LDH 活性及び isozyme pattern について検索し, 血清 LDH の活性値及び isozyme pattern 特に LD₃ がその臨床経過をよく反映することを述べたが, 本論文では更に, 実験的に動物の移植癌を用い作用機序の異なる3種の抗癌剤について, 治療による血清 LDH 活性及び isozyme pattern の変動を測定し, その治療効果判定における意義について検討を行った。

実験に使用した抗癌剤の中, MMC^{25), 26)} は DNA 生合成の阻害, deoxyribonuclease 活性化, 及び DNA の崩壊をその作用機序とし, TM^{26), 27)} は, RNA 特に S-RNA の生合成阻害, 及び核 RNA の代謝回転阻害をその作用機序とするといわれている。また CQ^{28), 29)} は従来の抗癌剤の作用機序とは全く異り, 癌の間質に作用するものと考えている。すなわち平

木らは癌組織における間質の重要性に着目し, 癌細胞の増殖に必須の間質を障碍することにより間接的に抗癌作用を発揮するとの理念に基づいて実験を行い, その結果線維芽細胞抑制剤である本剤が癌の増殖に対して抑制的に作用することを見出し, すでに実験的あるいは臨床的に有効であることを報告している。

一方, 担癌生体における血清 LDH 活性の上昇機序は, 癌細胞における異常な酵素産生の増加, 細胞膜透過性の変化による血中への逸脱の増加, 変性又は壊死細胞からの血中への放出, 血中におけるクリアランスの問題及び活性化または阻害物質の影響などが一般に考えられている^{21), 24), 30), 31)}。したがつてもし正常動物にこれらの抗癌剤を投与し, 血清 LDH 活性の上昇がみられる場合は, 当然その細胞に対する障害, すなわち副作用があるものと考えられ, 活性上昇が大であればある程副作用が強いということが出来よう。Strong A 系マウスを用い活性値についてのみ行つた実験では MMC, TM で活性は約2倍に上昇し, CQ では全く活性に変動はみられなかった。これは平木らのいう如く, CQ は他の抗癌剤に比しはるかに副作用が少ないという成績とよく一致する。従来抗癌剤の副作用をみる方法として, 白血球数, 栓球数に及ぼす影響, 骨髓に対する作用, 胃腸管系に対する作用, 肝及び腎機能に及ぼす作用などが用いられてきているが LDH ような逸脱酵素の変動を測定することも一法と考えられる。

一方 Bashford 癌を Strong A 系マウスに, Fibrosarcoma を Swiss 系マウスに移植し, 各週毎に血清 LDH 活性及び isozyme pattern を測定すると, 腫瘍の増大とほぼ平行して活性の上昇がみられ, 又 isozyme pattern では Strong A 系マウスでは LD₃, LD₄ の増加, それに伴う LD₁ の低下が認められた。Swiss 系マウスでは正常マウスに比し担癌マウスでは LD₃ が増加し, LD₁ は低下したが, 一定した平行関係は認められなかった。

これらの担癌マウスにそれぞれ MMC, TM, および CQ を投与し, 腫瘍重量に対する生物学的効果を血清 LDH 活性及び isozyme pattern に対する生化学的効果と比較したが, 両者の間には, 腫瘍組織壊死がある場合, 重量測定値が重量として不正確であるという問題を考えにいれるとき, 密接な相関関係が認められ, 抗癌剤スクリーニングの一法として血清 LDH 活性の変動をみることの有用性が実証された。すなわち, 担 Bashford 癌マウスにおいては

MMC 群が制癌効果が最も強力であるとともに血清 LDH 活性の低下も最も著しく治療後の活性は正常マウスとの間に差が殆んどみられず、TM 治療群でも腫瘍の縮小と血清 LDH 活性の低下がみられた。これに対し、CQ 群では腫瘍重量の減少及び血清 LDH 活性の低下がみられなかつた。また Fibrosarcoma 移植マウスにおいては、MMC 及び TM の制癌効果に有意の差がみられず、血清 LDH 活性上昇の抑制の程度にも差がみられなかつた。一方 CQ 群では腫瘍重量の減少がみられず、血清 LDH の低下も認められなかつた。

次に isozyme pattern については、Bashford 癌の TM 治療群においては腫瘍の縮小及び血清 LDH 活性の低下に伴つて LD₃ は低下し、MMC 治療群では LD₃ は対照群より高値を示した。

Fibrosarcoma の TM 治療群では Bashford 癌と同様 LD₃ の低下が認められたが、MMC 及び CQ 治療群では有意の変化が認められなかつた。すなわちいずれの腫瘍の場合にも TM 治療群において高い LD₃ が治療により正常に近づいただけで、MMC 及び CQ 治療群では治療により腫瘍が縮小し、活性が低下した場合でも isozyme pattern は正常マウスのそれに近づいているとはいえない。因に Hershey³²⁾ らはラットの乳癌組織の LDH isozyme pattern を測定し、腫瘍が縮小しても isozyme pattern は正常のそれに近づかないことを報告している。

しかしながら isozyme についての成績は腫瘍の種類、使用薬剤の種類によつて異なるため、今回の成績によつて腫瘍一般について論ずるのは危険であるが、これはマウスの isozyme pattern では LD₁ が主活性を有し、他の分割は非常に活性が低いため、それらのわずかな変化は技術上とらえ難いことによるものと思われる。

しかし大体に於て腫瘍の増大に伴つて LD₁ が減少し、その他の分割が増加し、逆に縮小する場合には LD₁ が増加し、他の分割が減少するものと考えられ、ヒトにおける LD₃ を中心とした isozyme pattern の変動とよく一致する。

本実験においては制癌作用が認められず、血清 LDH 活性の変動もみられなかつた CQ については、平木らは Bashford 癌、Brown-pearce 癌において有効であり、Ehrlich 固型癌、吉田肉腫では効果を認め難いことを報告している。このように腫瘍の種類により同一の薬剤でも、その制癌作用に相違が

みられるが、これは抗癌剤の効果判定には慎重を要することを意味するものといえる。また同一の腫瘍でもときに薬剤感受性が異なることが知られており^{33), 34)}、さらに CQ についてはその直接癌細胞障害はきわめて微弱であり、平木らがこれを癌の治療に用いている理由も前述の通りまず癌間質への障害をねらつたものであることも十分考慮に入れる必要がある。したがつて今回私の行つた実験から、使用した薬剤の制癌効果について判定することは難しいが、Bashford 癌と Fibrosarcoma の二つの腫瘍について得られた成績より、効果判定の一基準として血清 LDH 活性の変動を用いることの有用性は認められた。

第 5 章 結 語

マウスの移植腫瘍を用いて、3 種類の抗癌剤の制癌効果と血清 LDH 活性及び isozyme pattern に及ぼす効果を検討し、さらに抗癌剤の効果判定基準としての血清 LDH 活性及び isozyme pattern 変動の意義について考察を行つた。

1) Strong A 系マウスに Mitomycin C, Chromomycin A₃ 及び Chloroquine phosphate を注射すると、前二者では血清 LDH 活性が約 2 倍に上昇し、副作用を疑わせる成績が得られた。Chloroquine phosphate では活性の変動は認められなかつた。

2) Strong A 系マウスに Bashford 癌を、Swiss 系マウスに Fibrosarcoma を移植すると、血清 LDH 活性は 4 週まで漸次上昇した。isozyme pattern では、担 Bashford 癌マウスでは 4 週目まで LD₃ が漸増し、LD₁ が漸減し、担 Fibrosarcoma マウスでは 4 週間 LD₃ は正常より高かつた。

3) Bashford 癌及び Fibrosarcoma 移植マウスを Mitomycin C, Chromomycin A₃ 及び Chloroquine phosphate で治療すると、前二者、特に mitomycin C に最も強い制癌効果が認められ、血清 LDH 活性もそれらの生物学的効果とよく平行して低下した。isozyme pattern は TM 治療群で LD₃ が血清 LDH 活性低下に伴つて減少したが、その他については一定した傾向は認められなかつた。

4) これらの成績により、抗癌剤の効果判定に血清 LDH 活性及び isozyme の測定が有用であることが認められた。

摺筆するに当り恩師平木潔教授並びに浅野健夫講師のご指導ご校閲に深謝します。

参 考 文 献

- 1) Wieland, T. & Pfele: dere, G: Advances in enzymology and related subjects of biochemistry. 15: 330-332, 339-340, 357, 1963.
- 2) Stark, G. & Iwanov, K.: Das Verhalten der Transaminase (GOT, GPT) und Dehydrogenase (LDH, MDH) in Serum nach Cytostatica behandlung bei Carcinoma patientinnen. Klin. Wschr., 42: 375-379, 1964.
- 3) Yakulis, V. J. et al: Agargel electrophoresis for the determination of isozymes of lactic and malic dehydrogenase. Am. J. Clin. Path., 38: 378-382, 1962.
- 4) Friend, C. & Wr'oblewski, F.: Lactic dehydrogenase activity of serum in mice with transplantable leukemia. Science, 124: 173-174, 1956.
- 5) Vessel E. S. & Bearn, A. G.: Localization of lactic acid dehydrogenase activity in Serum fractions. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 94: 96-99, 1957.
- 6) Hill, B. R. & Levic, C.: Elevation of serum component in neoplastic disease. Cancer Res., 14: 513-515, 1954.
- 7) Zimmermann, H. J. et al: Lactic dehydrogenase activity in human serum. J. Lab. & Clin. Med., 48: 607-616, 1956.
- 8) Hill, B. R., et al: Serum lactic dehydrogenase activity in mice with transplantable leukemia. Cancer Res., 17: 144-147, 1957.
- 9) Bierman, H. R., et al: Correlation of serum lactic dehydrogenase activity with the clinical status of patient with cancer, lymphomas, and leukemias. Cancer Res., 17: 660-667, 1957.
- 10) White. L. P.: Serum enzymes. II Glycolytic enzymes in patients with cancer and other diseases. J. Nat. Cancer Inst., 21: 671-684, 1958.
- 11) Nishio, K. et al: Studies on plasma lactic dehydrogenase in mice with myeloid leukemia. I. Relation of enzyme level to course of disease. Cancer Res., 23: 340-342, 1963.
- 12) Blanchaer, M. C, et al: Plasma lactic dehydrogenase and phosphohexose isomerase in leukemia. Blood, 13: 245-257, 1953.
- 13) Magill, G. B. et al: Serum lactic dehydrogenase and serum transaminase in human leukemia. Blood, 14: 870-881 1959.
- 14) Cornelia Hoch-Ligoti, M. D.: Effect of irradiation and operation on serum lactic dehydrogenase and glutamic oxalacetic transaminase in patients with malignant tumors. Caneer, 15: 813-824, 1962.
- 15) Hiraki, K., Irino, S. & Miyoshi, I.: Development of subcutaneous sarcomas in Swiss mice given repeated injections of benzene in olive oil. Gann, 54: 427-431, 1963.
- 16) Riley, V.: Adaptation of orbital bleeding technique to rapid serial blood studies. Proc. Soc. Exp Biol. & Med., 104: 751-754, 1960.
- 17) 浅野健夫, 新谷善治, 松浦孝典: 担癌生体にかんする酵素化学的研究—Lactic dehydrogenaseにかんする実験的臨床的研究, 日内会誌, 51: 101-109, 1962.
- 18) 浅野健夫, 松浦孝典: 担癌生体の血清乳酸脱水素酵素に関する実験的研究, 総合医学, 19: 905-909. 1926.
- 19) 浅野健夫, 松浦孝典, 小野昌利: 実験白血病ハツカネズミの血清乳酸脱水素酵素, 医学と生物学, 68: 79-83, 1964.
- 20) 浅野健夫他: 血液疾患におけ血清乳酸脱水素酵素とそのアイソザイムの臨床的意義について, 臨床血液, 5: 326-332, 1964.
- 21) Brindley, C. O. & Francis, F. L.: Serum lactic dehydrogenase and glutamic oxaloacetic transaminase correlations with mesurements of tumor masses during therapy. Cancer Res., 23: 112-117, 1963.
- 22) 大橋望彦: 癌とアイソザイム, 代謝. 2: August 30, 1965.
- 23) Starkweather, W. H., et al. Alterations of serum lactate dehydrogenase isoenzymes during therapy directed at lung cancer. J. Lab. & Clin. Med., 68: 312-323, 1966.
- 24) Kampschmidt, Ralph, F, et al: Plasma enzymes in tumor-bearing rats. Cancer Res., 26: Part I, 237-240, 1966.
- 25) 芝 茂: マイトマイシンの作用機序, 最新医学, 14: 1831-1837, 1959.

- 26) Hall, T. C.: *Chemotherapy of Cancer. The New England Journal of Medicine*, 266: 129, 1962.
- 27) 三浦義彰, 矢野征多: カラムクロマトグラフィによる腹水肝癌細胞の核酸代謝の研究, *Toyomycin Symposium*, 2: 15-23, 1963.
- 28) 木村郁郎他: 線維芽細胞抑制剤クロキニンによる悪性腫瘍の治療にかんする基礎的ならびに臨床的研究, *日内会誌*, 52: 213-222, 1963.
- 29) 平木 潔, 他: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究, *岡山医学会誌*, 75: 297-316, 1963.
- 30) Amelung, D. et al: *Klinische und Experimentelle Untersuchungen zur Frage der Felment-elimination aus der Serum. Klin. Wschr.*, 36: 963-970, 1958.
- 31) Burns, F. M. et al: *Studien über die Ursachen des Enzymverlustes der geschädigten Zellen, Klin. Wschr.* 39: 342-346, 1961
- 32) Hershey, F. B. et al: *Pyridine nucleotide-linked dehydrogenases and isozymes of normal rat breast and growing and regressing breast cancers. Cancer Res.*, 26: Part I. 265-268, 1966.
- 33) Stock, C. C.: *Studies in experimental cancer chemotherapy. Can. Res. Cancer chemother.*, 3: 3, 1955
- 34) 小谷秀成: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究, *岡山医会誌*, 77: 949-981, 1965.

Studies on Lactic Dehydrogenase Activity and Isozyme in Malignant Disease

Part 2 Effects of Chemotherapy on Serum Lactic Dehydrogenase Activity and Isozyme of Tumor-Bearing Mice

By

Yukiko ŌSHIMA

Department of internal medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Alterations of serum lactic dehydrogenase (S-LDH) activity and isozyme during therapy in tumor-bearing mice were assayed.

1. Normal Strong A mice receiving Mitomycin C (MMC), Chromomycin A₃ (TM), and Chloroquine phosphate (CQ) respectively were evaluated for S-LDH activity. S-LDH activities of the mice receiving MMC and TM were about twice as high as normal, this seems to be the side effects of chemotherapeutic agents. The strong A mice receiving CQ showed no changes in S-LDH activity.

2. The strong A mice bearing Bashford carcinoma and the Swiss mice bearing fibrosarcoma were evaluated at weekly intervals for SLDH activity and isozymes. S-LDH activities gradually elevated for 4 weeks. In the Strong A mice bearing Bashford carcinoma LD₃ increased and LD₁ decreased gradually. In the Swiss mice bearing fibrosarcoma LD₃ was higher than normal at every week.

3. SLDH activities in tumor-bearing mice undergoing therapy with MMC and TM, especially MMC, markedly decreased correlating with tumor regression. As to the S-LDH isozyme, LD₃ in mice receiving TM decreased correlating with decrease of S-LDH activity. In mice receiving others no characteristics were observed.

4. In conclusion, the assay of S-LDH activity and isozymes during therapy directing at tumors are useful in determining wheather or not a chemotherapeutic agent affects the tumors.