

悪性腫瘍の異所性能に関する基礎的研究

(第 2 編)

悪性腫瘍ならびに腫瘍母組織の合成基質 TAmE 融解能, および casein 分解能に関する研究

岡山大学医学部第一外科 (指導: 田中早苗教授)

神 野 高 光

【昭和43年10月5日受稿】

第1章 緒 言

悪性腫瘍の一つの特徴である転移性格、とくに異所性能の要因として、わたしは腫瘍細胞より産出され、また腫瘍組織周辺部にも存在する蛋白分解酵素がその一端を荷負っているという想定のもとに腫瘍組織および腫瘍母組織の生理的食塩水による抽出液を主体として、これらの蛋白基質に対する溶解能を検討した。

すなわち、第1編においては基質として線維素 fibrin を選んで線維素溶解現象測定法にならつて各種腫瘍組織および各種腫瘍母組織の線溶現象を測定した。

ここで、第2編として第1編の線維素溶解能に関する結論をさらに基質を変更することにより同様の結果をうる事ができるか否か本実験を行なつた。

すなわち、標準平板 standard plate は plasmin 系の activator の測定用に用いられ、加熱平板は plasmin そのものの測定に使用されているが¹⁾、後者と同様、plasmin により分解を受けるとされている²⁾ 合成基質 TAmE、および casein を基質として選び、これらを plasmin 測定法になら³⁾⁻⁶⁾、各種腫瘍組織および各種腫瘍母組織の合成基質 TAmE 融解能、casein 分解能を測定した。

第2章 悪性腫瘍組織ならびに腫瘍母組織 の合成基質 TAmE 融解能および casein 分解能

第1節 実験目的

第1章緒言で述べたように、第1編における悪性腫瘍組織および腫瘍母組織の線維素溶解能の結果が合成基質 TAmE 融解能および casein 分解能と同一結果を示すか否かを検するを目的とした。

第2節 実験材料ならびに実験方法

【I】 悪性腫瘍組織および腫瘍母組織の合成基質 TAmE 融解能

A) 組織抽出液の作成

岡山大学医学部附属病院第一外科教室において、主として手術された手術摘出物の新鮮、あるいは -19°C 冷凍庫中に保存されたものを肉眼的病理所見に留意しつつ切出し、200mg を秤量し、0.9%生理的食塩水にてよく血液を洗いおとし、摘出諸組織200mg に対し、0.9%生理的食塩水2ml を加え、ガラス未を添加して氷水中にて約10~15分間、組織がよくホモジネートされるまでイボ付ホモジナイザーでよくホモジネートを施行する。

B) 0.1M. TAmE 溶液の作成

合成基質 TAmE、すなわち p-Toluenesulfonyl L-Arginine Methyl ester (Tosyl Arginine Methyl ester)、(ミノファーゲン製薬)、略称 TAmE、分子量378,884の1gを約16mlの蒸溜水に溶解し、0.1M TAmE 溶液を作成する。

C) pH 7.8 Tris Buffer の作成

0.2M トリス(オキシメチル)アミノメタン、 $(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2$ 25.0, 1/10N. HCl 7.5, H_2O 67.5の割合に混じてpH-meterでpH 9.0 Buffer solutionを作成する。

D) Streptokinase 溶液の作成

Varidase (streptokinase 100,000 u, streptodornase 25,000 u) を0.9%生理的食塩水10mlに溶解し、その1mlをpH 9.0 Tris Buffer Solution 9mlに溶解し、1ml中 Varidase (streptokinase) の約1000uを作成する。

E) 組織抽出液の分画作成

上記A)にてホモジネートされた組織抽出液を室

温に30分間放置して、よく抽出させ、2500回転、約10分間遠沈、上清を検体とする。この上清0.5mlにpH 9.0 Tris Buffer Solutionをよく混和し、この1ml宛を反応群と対照群とし、これを全分画とする。

ついで、上清0.5mlに上記D)にて作成したstreptokinase溶液を1.5ml加え、よく混和し、この各々1ml宛を反応群と対照群とし、これを全分画+streptokinase加群とする。

また、Dowuiiの冷醋酸法により作成したeuglobulin分画を0.9%生理的食塩水0.5mlとpH 9.0 Tris Buffer Solution 1.5mlに再溶解し、この各々1ml宛を反応群と対照群とし、これをeuglobulin分画とする。

このDowuiiの冷醋酸法により作成したeuglobulin分画を0.9%生理的食塩水0.5mlと上記D)で作成したstreptokinase溶液1.5mlに再溶解し、各々1ml宛を反応群と対照群とし、これをeuglobulin分画+streptokinase加群とする。

F) 反応

前述の四分画の反応群に上記B)にて作成した0.5mlの0.1M. TAME溶液を加え、よく混和し、37°C、20時間incubateし、その後、37%ホルマリンにて固定する。

対照群はincubateすることなく、ただちに37%ホルマリンにて固定し、0.5mlの0.1M. TAME溶液を加え、無反応とし、両者は一昼夜氷室中に保存し、1/40N苛性ソーダで滴定する。

G) 判定

0.01%フェノールレッド0.2mlを加えて、1/40N苛性ソーダで滴定し、その活性度は1/40N苛性ソーダの滴定量のml量で判定、表現する。

【II】 腫瘍組織および腫瘍母組織のcasein分解能

A) 組織抽出液の作成

岡山大学医学部附属病院第一外科において、主として手術された手術摘出物の新鮮、あるいは-19°C冷凍庫中に保存された手術摘出物を肉眼的病理所見に留意しつつ切出し、200mgを秤量し、0.9%生理的食塩水にてよく血液を洗い落とし、摘出諸組織200mgに対し、0.9%生理的食塩水2mlを加え、ガラス末を添加し、氷水中にて約10~15分間、組織がよくホモジネートされるまでイボ付ホモジナイザーでよくホモジネートを施行する。

B) Borate Saline Buffer の作成

大柴進の方法にしたがい、0.05M Sodium borate (19.108 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}/\text{lH}_2\text{O}$)と0.2M boric acid salt solution (12.404 mg H_3BO_3 , 2.925 mg $\text{NaCl}/\text{lH}_2\text{O}$)を作成し、前者約1.2量と後者8.8量を混和し、pH meterにてpH 7.4に調整し、pH 7.4 Borate Saline Bufferを作成する。

C) casein の精製

大柴進の方法にしたがい、casein nach Hammersten (made in Germany)のcasein powder 200mgを400mlの H_2O に懸濁して、ミキサーにて強く約1時間攪拌する。

懸濁液を遠心管に移し、約10分間、1500回転にて遠沈し、その上清をすてる。

沈渣を再度 H_2O に懸濁させ遠沈を繰返す。この操作を2回以上施行する。

えられた沈澱物に95%アルコール800mlを加え、攪拌したのち濾紙をとおして、アルコールを濾過する。

この沈渣を95%アルコールで2回以上、また無水エーテルで3回以上洗滌す。

エーテルを完全に蒸発させたのち、powdowを乳鉢にて細かく粉碎する。これを集めて冷凍庫中に保存する。

D) 4% casein solution の作成

4gのcasein powderを約70mlのpH 7.4 Borate Saline Bufferに懸濁し、強く攪拌する。

これに0.25ml N-NaOH/mg caseinを加えて、caseinをNa-saltにconvertする。

完全な溶液を作るために30分間、あるいはそれ以上攪拌する。この溶液にN-HClを緩徐に加えてpH meterで測定してpH 7.4に調整する。

これにpH 7.4 Borate Saline Bufferを追加して100mlとする。

少量の不溶解物質、沈澱物は遠沈あるいは濾紙にて濾過する。

E) Streptokinase 溶液の作成

Varidase (streptokinase 100,000U, streptodornase 25,000U)を10mlの0.9%生理的食塩水に溶解し、その1mlを7.4 Borate Saline Buffer 9mlに溶解し、1ml約1000Uのstreptokinase溶液を作成する。

F) 組織抽出液の分画作成

上記A)にてホモジネートされた組織抽出液を室温に30分間放置し、よく抽出させ、ついで2500回

転, 約10分間遠沈し上清をうる。

この上清 0.5 ml に pH 7.4 Borate Salline Buffer 1.5 ml を加え, よく混和し, この 1 ml 宛を反応群と対照群とし, これを全分画とする。

上清 0.5 ml に上記 E) にて作成した streptokinase 溶液を 1.5 ml を加え, よく混和し, この各々 1 ml 宛を反応群と対照群とし, これを全分画 + streptokinase 加群とする。

ついで, Dowuii の冷醋酸法にしたがい作成した euglobulin 分画を 2 ml の Borate Salline Buffer に再溶解し, 各々 1 ml 宛を反応群と対照群とし, これを euglobulin 分画とする。

また, 冷醋酸法でえた euglobulin 分画を pH 7.8 Borate Salline Buffer 1 ml に再溶解し, これに上記 E) にて作成した streptokinase 溶液を加え, よく混和して各々 1 ml 宛を反応群と対照群とし, これを euglobulin 分画 + streptokinase 加群とする。

G) 反応

上記 F) の各四分画に反応群には上記 D) で作成した pH 7.4, 4% casein 溶液を各々 1 ml を加え, 37°C, 1 時間, incubator にて incubate する。

その後, 10% 過塩素酸 3 ml 宛を各々に加え, 反応を固定させる。

対照群においては incubate することなく, ただちに 10% 過塩素酸を加え, その後に pH 7.4, 4% casein 溶液を 1 ml 宛加え, 無反応の状態とする。この反応群, 対照群は一昼夜氷室中に保存する。

H) 判定

Beckmann Spectrophotometer にて 280 m μ , 2800 Å で反応群と対照群を測定し, 両者の差を反応の量とする。

判定は後述の trypsin 各種単位の標準曲線を作成し, おのおののえた数値をこの曲線に対比して, trypsin 単位で判定, 表現する。

第3章 実験結果

A) 胃癌組織および非癌部胃粘膜組織の合成基質 TAmE 融解能

線維素溶解能と同様に胃癌は最も豊富に資料がえられるので, 各種胃癌組織と同時にえられた非癌部胃粘膜組織, とくに非癌部胃粘膜は粘膜のみを剥して用いた両者の比較実験を施行した。

合成基質 TAmE 融解能は反応後滴定に要した 1/40N-NaOH の使用量で表現しているものであるが, 癌部, 非癌部ともに融解能は 1.5~3.0 ml 前後

の使用量を示し, 両者の中で 3.0 ml 以上を示したものは表 1 のように症例 12 で癌部のそれである。

癌部も非癌部のものも, 全分画と euglobulin 分画を比較すると 2, 3 の症例を除けば全分画の方がやや融解能は強度のようであるが, 両者間に有意の差を示さない。

ついで, 全分画と全分画 + streptokinase 加群を比較すると修飾される場合もあるが, 逆に抑制すら受ける場合もあり, その修飾, 抑制の度合も極めて少なく, 表 2 のように両者間に streptokinase の添加は融解能にほとんど影響をあたえない。

ついで, euglobulin 分画と euglobulin 分画に streptokinase を添加した場合もまた同様で, 症例によりいささか修飾される場合もあるが逆に抑制すら受けることもあり, 両者間に有意の差は認められない。

streptokinase の修飾を受ける度合も癌部と非癌部との比較で両者間にほとんど差は認められない。

ついで, 癌部と非癌部の融解能の比較においては, 全症例の比較では表 2 のように非癌部の融解能が癌部のそれよりも強度の場合がかなりあるが, 同一症例の比較においては表 1 のようにそのほとんどが癌部の融解能が非癌部のそれより強度に出現している。

いまここに, 各々の症例を検討するに, 症例 1 は初期癌であり, 浸潤もなく伸展度も僅少であるが融解能は癌部のそれにやや強度である。

症例 2 は浸潤度は α であるがかなり癌部のそれに強度の融解能を示している。

症例 3 は浸潤度 γ , リンパ系, 静脈系への伸展も著しく, 融解能も有意の差で癌部のそれに強度に現われている。

症例 4 は浸潤度 γ , リンパ系, 静脈系への伸展も強度であり, 融解能は癌部も強く, また非癌部もかなり強度の融解を示している。

症例 5 は浸潤は γ であるがリンパ系, 静脈系の伸展はなく癌部と非癌部に融解能にほとんど差は認められない。

症例 6 は浸潤度 α であり, リンパ系, 静脈系の伸展もあり, 融解能もまた強度である。

症例 7 は浸潤度 γ , 強度のリンパ節転移が認められる症例で非癌部との比較で各分画とも融解能に明らかに差が認められる。

症例 8 は浸潤度 γ , リンパ管への侵入は強度であり, 各分画とも多少癌部の融解能が強くあらわれている。

表1 胃癌および非癌部胃粘膜の合成基質 TAME の融解能 (症例; (上) 非癌部 (下) 癌部)

| 症例 | 病理診断 | 細胞異型度 | 配列異型度 | 浸潤度 | 伸展度 | | | | 融解能 | | | |
|----|---------------|-------|-------|-----|-----|----|------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | | 壁深達 | 漿膜 | リンパ管 | 静脈 | 全分画 | 全分画+SK | Eug分画 | Eug分画+SK |
| 1 | C solid. simp | Ⅲ | 3 | — | M | — | — | — | 1.5 1.6 | 1.6 1.65 | 1.5 1.75 | 1.6 1.8 |
| 2 | Adc papillare | Ⅱ | 2 | α | PM | — | — | — | 1.55 2.0 | 1.7 2.1 | 1.4 1.7 | 1.55 1.9 |
| 3 | Adc papillare | Ⅱ | 2 | β | PM | — | + | + | 1.6 2.6 | 1.4 2.35 | 1.35 1.95 | 1.5 1.8 |
| 4 | Adc acinosum | Ⅲ | 3 | γ | SS | — | + | + | 2.1 2.5 | 2.0 2.4 | 1.8 2.3 | 1.8 1.95 |
| 5 | C solid. simp | Ⅲ | 3 | γ | SS | — | — | — | 1.4 1.7 | 1.45 1.75 | 1.55 1.55 | 1.4 1.6 |
| 6 | Adc tubullare | Ⅱ | 2 | γ | SS | — | + | + | 2.3 2.8 | 2.2 2.6 | 1.7 2.4 | 1.05 1.85 |
| 7 | C solid. simp | Ⅲ | 3 | γ | SS | — | + | + | 1.95 2.3 | 1.8 2.1 | 1.85 2.1 | 1.85 2.2 |
| 8 | Adc tubullare | Ⅲ | 3 | γ | SS | — | + | — | 1.8 2.1 | 1.7 2.5 | 1.7 1.9 | 1.7 1.8 |
| 9 | Adc tubullare | Ⅲ | 3 | γ | SS | — | + | — | 1.6 2.0 | 1.9 1.8 | 1.7 1.6 | 1.6 1.9 |
| 10 | C solid. simp | Ⅲ | 3 | γ | SS | — | + | — | 1.25 2.65 | 1.45 2.65 | 1.1 2.05 | 1.25 2.05 |
| 11 | Adc papillare | Ⅱ | 2 | α | SS | — | + | + | 2.3 2.4 | 2.4 2.1 | 2.2 1.8 | 2.1 2.1 |
| 12 | Adc tubullare | Ⅲ | 3 | β | SS | — | + | + | 2.3 3.1 | 2.5 3.0 | 2.2 3.0 | 2.2 2.9 |
| 平均 | | | | | | | | | 1.80 2.31 | 1.84 2.25 | 1.67 2.01 | 1.63 1.99 |

Eug; Euglobulin SK; Streptokinase

症例9は浸潤度γで、リンパ管内侵入も強く、リンパ節転移は強度であるが、融解能は非癌部のそれに強度の分画もある。

症例10は浸潤度γであり、リンパ節転移もとくに強度ではないが融解能は非癌部より癌部のそれがかなりの差で優位である。

症例11は浸潤度αで、リンパ系、静脈系の浸潤も強いが融解能には癌部、非癌部では差は認められない。

症例12は浸潤度βで、リンパ節、静脈系への転移も認められ、癌部のそれに全症例中もつとも強く融解能が現れているが、非癌部のそれもまたかなり強度である。

B) 正常脳組織および脳腫瘍組織の合成基質

TAME 融解能

多数症例についての検討は出来なかつたが、脳皮質および脳髄質をふくむ正常脳組織では合成基質 TAME の融解能は表3のように胃癌組織などに比較すると極めて低値であり、1/40 N苛性ソーダの滴定量は1ml前後である。

これらの全分画と Euglobulin 分画には融解能に有意の差はまったく認められない。

また、全分画と全分画に streptokinase を添加したものの比較でも融解能にほとんど差は認められない。

同様に、Euglobulin 分画とそれに streptokinase を添加したものでも融解能に差は認めない。

ついで、脳腫瘍組織である astrocytom では合成

表2 TAME (合成基質) を基質とする反応
胃癌および非癌部胃粘膜の融解能
○胃癌 ●非癌部

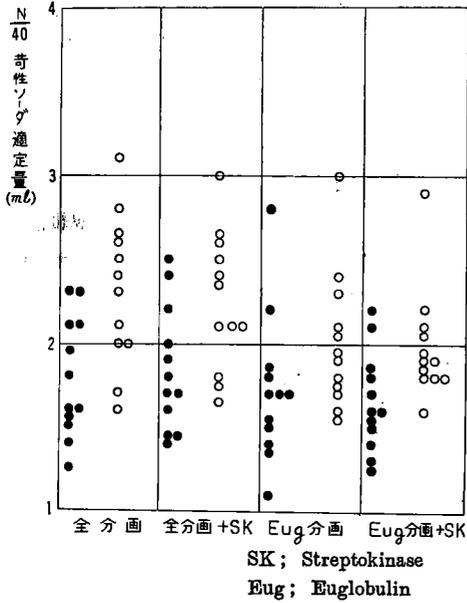
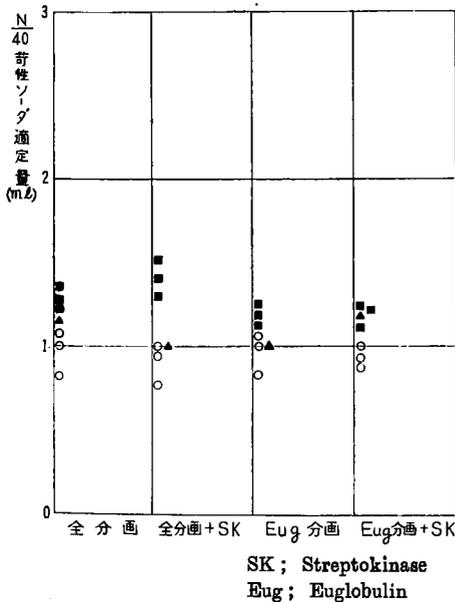


表3 TAME (合成基質) を基質とする反応
脳正常組織, および脳腫瘍組織
○ 脳正常組織 ▲ Astrocytom
■ Meningiom



基質 TAME の融解能は極めて低値であるが, 正常脳組織と比較するとやや高値を示した。

このものも全分画と euglobulin 分画との間にも融解能に有意の差はなく, また全分画および euglo-

bulin 分画に streptokinase を添加したものとくに活性を受けなかった。

ついで, meningiom ではこの種類の中でもつとも融解能が強く現われている。

全分画と euglobulin 分画を比較すると全分画の方がいくぶん高値を示した。

全分画と全分画に streptokinase を添加したものの比較ではかなり活性を受けた結果を示した。

しかし, euglobulin 分画に streptokinase を添加したものでは融解能に有意の差は認められない。

一般に脳組織は正常組織, 腫瘍組織を問わず上皮系組織の融解能と比較して融解能は低値である。

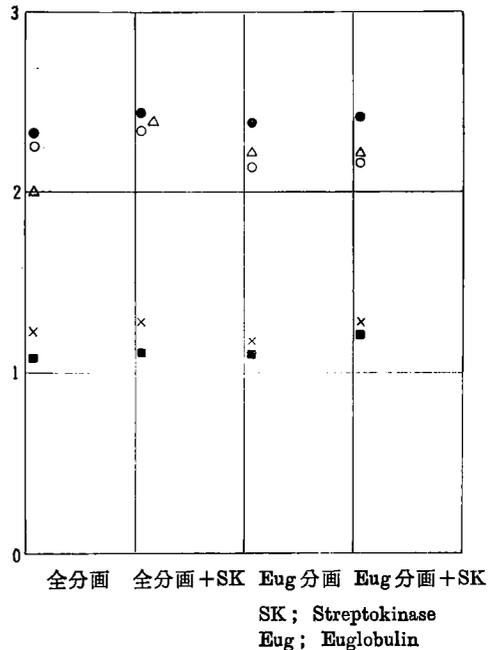
C) 上皮系組織の合成基質 TAME 融解能

症例が少ないので各々の症例について結果をみるに, 表4に示すように直腸粘膜組織は全分画および euglobulin 分画ともに融解能は胃組織同様にかなり高値を示しており, streptokinase 添加による影響はほとんどない。

ついで, 脾臓組織はもつとも融解能が強度で他の諸組織と比類出来ない。

表4 TAME (合成基質) を基質とする反応

○ 直腸正常粘膜 △ 乳癌 ● 直腸癌
■ Cystosarcoma phylloides mammae × 脾臓



しかし, streptokinase の添加による修飾は受けない。脾臓組織は融解能は低値を示しており, streptokinase の添加による影響はみられない。直腸癌組織

は正常直腸粘膜組織より融解能はやや高値である。また、streptokinase の添加によりその影響を受けない。

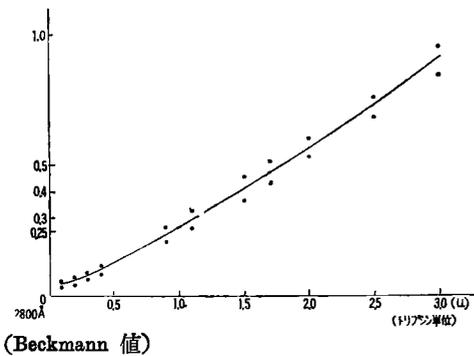
乳癌組織はかなり高値を示すが *Cystosarcoma phylloides mammae* においては融解能は極めて低値である。

D) 各種単位の trypsin の casein 分解能

判定の項で述べたように、各種組織抽出液の casein 分解能を trypsin 単位で表現するために trypsin 3 単位までの casein 分解能を検じ、表5のように trypsin 標準曲線を作成した。

標準曲線は表5のようにほぼ直線的であり、組織抽出液の casein 分解能は trypsin 単位で 0.5~1.5 単位の間に存在する。

表5 Casein 分解能 (Trypsin による標準曲線)



E) 胃癌組織および非癌部胃粘膜組織の casein 分解能

線維素溶解能、合成基質 TAME の融解能と同様に胃癌は最も豊富に資料がえられるので、各種胃癌組織と粘膜のみを剝した非癌部胃粘膜組織の両者の比較実験を施行した。

casein 分解能は Beckmann Spectrophotometer にて 280 mμ, 2800 Å で反応群と対照群を測定し、trypsin の casein 分解の標準曲線を作成し、この標準曲線に対比して表現した。

casein 分解能は表6に示すように、癌部、非癌部ともに trypsin 単位として 0.5~1.5 単位の間に存在し、もつとも分解能で高値を示したものは 1.5 trypsin 単位で癌部のそれである。

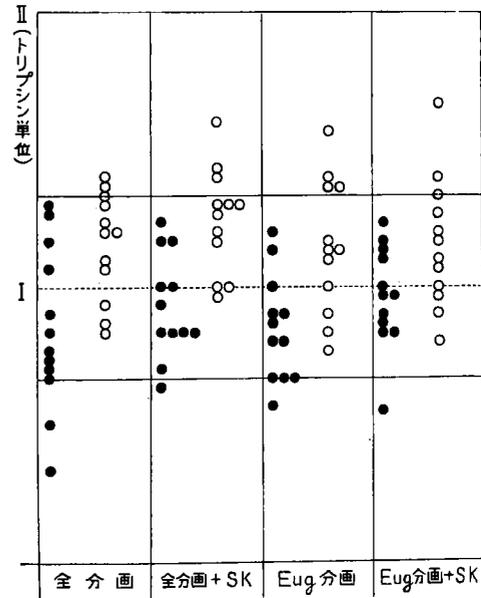
casein 分解能は癌部、非癌部を問わず、全分画と euglobulin 分画との比較において分解能はほぼ同程度で有意の差はみられない。

ついで、全分画と全分画に streptokinase を添加した場合、非癌部胃粘膜組織では streptokinase による活性は認められない。

しかし、癌部の場合は表6に示すようにいささか修飾を受けた結果を示した。

表6 Casein を基質とする反応 (胃粘膜組織、および胃癌組織の Casein 分解能)

● 正常胃粘膜組織 ○ 胃癌組織



SK; Streptokinase
Eug; Euglobulin

ついで、euglobulin 分画と euglobulin 分画に streptokinase を添加した場合をみると、全分画の場合と同様、非癌部では streptokinase による活性を全く受けていない。

しかし、癌部の分解能では僅少の活性をうけているがとくに有意の差は認められない。

つぎに、癌部と非癌部の casein 分解能を比較すると、全症例の比較では表7のように癌部の分解能が非癌部のそれよりも同程度か、あるいは凌駕している結果をえた。

平均では全分画においては癌部は 2.73 (0.82 trypsin 単位)、非癌部では 2.28 (0.67 trypsin 単位) である。

また、全分画および euglobulin 分画とも癌部、非癌部とも streptokinase 添加によりいくぶん修飾された結果を示した。

表7 胃癌および非癌部胃粘膜の Casein 分解能 (症例; (上) 非癌部 (下) 癌部)

| 症例 | 病理診断 | 細胞異型度 | 配列異型度 | 浸潤度 | 伸展度 | | | | 分解能 | | | |
|----|---------------|-------|-------|-----|-----|----|------|----|---------------|--------------|--------------|--------------|
| | | | | | 壁深達 | 漿膜 | リンパ管 | 静脈 | 全分画 | 全分画+SK | Eug分画 | Eug分画+SK |
| 1 | C solid. simp | III | 3 | - | M | - | - | - | 0.81 1.06 | 0.86 1.12 | 0.85 1.03 | 0.86 1.04 |
| 2 | Adc papillare | II | 2 | α | PM | - | - | - | 0.99 1.07 | 1.04 1.06 | 0.78 1.01 | 0.88 0.99 |
| 3 | Adc papillare | II | 2 | β | PM | - | + | + | 0.59 1.06 | 0.86 1.10 | 0.78 1.17 | 0.90 1.14 |
| 4 | Adc acinosum | III | 3 | γ | SS | - | + | + | 1.12 1.17 | 1.07 1.19 | 1.06 1.15 | 1.07 1.17 |
| 5 | C solid. simp | III | 3 | γ | SS | - | - | - | 0.83 0.92 | 0.86 0.94 | 0.90 0.83 | 0.94 0.85 |
| 6 | Adc tubullare | II | 2 | γ | SS | - | + | + | 0.86 0.99 | 0.92 1.12 | 0.90 1.03 | 1.01 1.06 |
| 7 | C solid. simp | III | 3 | γ | SS | - | + | + | 1.10 1.14 | 1.04 1.28 | 0.85 1.26 | 1.03 1.31 |
| 8 | Adc tubullare | III | 3 | γ | SS | - | + | - | 0.77 0.86 | 0.95 0.95 | 0.95 0.95 | 0.95 1.01 |
| 9 | Adc tubullare | III | 3 | γ | SS | - | + | - | 0.80 0.88 | 0.86 0.95 | 0.77 0.86 | 0.86 0.90 |
| 10 | C solid. simp | III | 3 | γ | SS | - | + | - | 0.69 1.01 | 0.76 1.04 | 0.73 0.90 | 0.71 0.95 |
| 11 | Adc papillare | II | 2 | α | SS | - | + | + | 1.04 1.12 | 0.95 1.12 | 1.03 1.04 | 1.04 0.94 |
| 12 | Adc tubullare | III | 3 | β | SS | - | + | + | 0.90 1.15 | 0.80 1.17 | 0.88 1.15 | 0.94 1.10 |
| 平均 | | | | | | | | | 0.875 1.04 | 0.91 1.09 | 0.87 1.03 | 0.93 1.04 |

SK; Streptokinase

Eug; Euglobulin

単位: トリブシン単位

F) 各種甲状腺疾患の casein 分解能

各種甲状腺疾患の資料がえられたので、これらの casein 分解能を検じ比較検討した。

これらの casein 分解能は表8に示すように好転移性と一般に考えられている甲状腺腫瘍、とくに悪性甲状腺腫をふくめて甲状腺疾患の casein 分解能は他の上皮系組織の casein 分解能より低値である。

腫瘍発生母体となる正常甲状腺組織も casein 分解能はきわめて低値であり、この分解能は各分画ともほとんど差はなく、streptokinase 添加による活性も認められない。

そのほか、甲状腺疾患のうち良性の疾患である Basedow 氏病は正常甲状腺組織と同様 casein 分解能は低値であり、全分画と euglobulin 分画の差も

なく、これらに streptokinase を添加したのもも融解能は同程度である。

そのほかの chronic Thyreoiditis, Follikulär Adenom, Hashimoto 氏病, Thyreotoxicose の分解能は正常甲状腺組織のそれよりはやや高値を示すが全体的にみて低値である。

また、これらの全分画, euglobulin 分画, これらに streptokinase を添加したもののいずれの群も分解能にほとんど差は認められない。

ついで、甲状腺疾患中悪性腫瘍である Struma maligna の3症例においては、全般に良性腫瘍と比較して casein 分解能は強度である。

しかし、これらの悪性腫瘍も全分画と euglobulin 分画の比較では casein 分解能にほとんど差は認め

表8 Casein を基質とする反応
各種甲状腺疾患の Casein 分解能

| 症例 | 病理診断 | 全分画 | 全分画+SK | Eug分画 | Eug分画+SK |
|----|-------------------|------|--------|-------|----------|
| 1 | Struma maligna | 0.95 | 1.01 | 0.96 | 0.97 |
| 2 | Struma maligna | 0.94 | 0.98 | 0.94 | 0.95 |
| 3 | Struma maligna | 0.91 | 0.95 | 0.83 | 0.84 |
| 4 | Chr Thyreoiditis | 0.76 | 0.78 | 0.71 | 0.72 |
| 5 | Folliculär adenom | 0.74 | 0.70 | 0.67 | 0.69 |
| 6 | Hashimoto krht | 0.74 | 0.69 | 0.68 | 0.69 |
| 7 | Thyreotoxicoose | 0.69 | 0.73 | 0.65 | 0.69 |
| 8 | Basedow krht | 0.44 | 0.46 | 0.48 | 0.48 |
| 9 | Thyreoid gland | 0.44 | 0.46 | 0.46 | 0.46 |

SK; Streptokinase
Eug; Euglobulin
単位; トリブシン単位

られない。

なお、この2分画に streptokinase を添加したのも全般にいくぶん分解能に高値を示してはいるが有意の差は認められない。

G) 直腸、結腸癌組織および直腸、結腸正常粘膜組織の casein 分解能

表9に示すように直腸、結腸の癌部、非癌部を問わず casein 分解能は胃癌および非癌部胃粘膜組織の casein 分解能と同程度か、やや高値を示した。

癌部と非癌部との比較では、癌部の分解能が高値を示しているがその差は軽度であり、症例によっては非癌部の分解能が高い場合もときどき出現する。

しかし、結腸癌の一例はとくに強度の分解能を示した。

ついで、全分画と euglobulin 分画との比較では癌部も非癌部も euglobulin 分画がやや高値を示したが、その程度差は僅少である。

また、全分画に streptokinase を添加すると癌部も非癌部もやや活性をうけている。

しかし、これも分解能に著明の差は認められなく、むしろ症例により逆の場合もあった。

euglobulin 分画とこれに streptokinase を添加した場合を較べてみても有意の差はみとめられない。

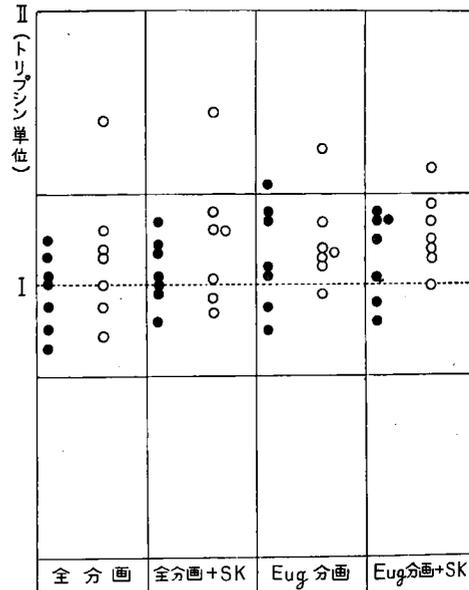
また、euglobulin 分画に streptokinase を添加した症例ではやや分解能が高度に現われている。

H) 上皮系組織の casein 分解能

表10に示すように上皮系組織の casein 分解能は十二指腸粘膜組織では胃粘膜組織と同程度の分解能を有する。

表9 Casein を基質とする反応
(正常直腸結腸粘膜組織と直腸結腸癌組織の Casein 分解能)

○ 直腸癌(結腸癌)
● 正常直腸結腸粘膜



SK; Streptokinase
Eug; Euglobulin

表10 Casein を基質とする反応
(上皮系組織および上皮系腫瘍組織の Casein 分解能)

| | 全分画 | 全分画+SK | Eug分画 | Eug分画+SK |
|-----------------|------|--------|-------|----------|
| Duodenum | 0.83 | 0.85 | 0.80 | 0.73 |
| Duodenum | 0.97 | 0.94 | 0.95 | 0.81 |
| Gallenblase | 0.94 | 0.99 | 0.90 | 0.95 |
| Gallenblase | 1.10 | 1.06 | 1.14 | 0.99 |
| Pankreas | 1.43 | 1.67 | 1.57 | 1.57 |
| Pankreaskrebs | 1.74 | 1.74 | 1.74 | 1.74 |
| Brustdrüse | 0.99 | 0.88 | 0.97 | 1.06 |
| Mastopathie | 0.80 | 0.88 | 0.86 | 0.83 |
| Mammakrebs | 0.99 | 1.06 | 1.01 | 1.12 |
| Niere (Rinde) | 0.56 | 0.77 | 0.80 | 0.77 |
| Niere (Medulla) | 0.95 | 0.86 | 0.85 | 0.90 |
| Leber | 0.73 | 0.76 | 0.67 | 0.59 |
| Leber | 0.48 | 0.67 | 0.67 | 0.67 |
| Placenta | 0.71 | 0.63 | 0.61 | 0.69 |

SK; Streptokinase
Eug; Euglobulin
単位; トリブシン単位

全分画と euglobulin 分画でも分解能に差はなく、streptokinase の添加により活性を受けることもない。

胆嚢粘膜は基質分解能はかなり高度である。しかし、この分解能も全分画と euglobulin 分画では差がなく、これらに streptokinase を添加した場合も分解能が増加することはない。

膵組織、膵癌組織も基質分解能は著しいが、癌部、非癌部でもほとんど差はなく、また全分画、euglobulin 分画にも分解能に程度差はなく、これらに streptokinase を添加したものとくに活性は受けない。

乳腺組織も基質分解能は十二指腸粘膜、胆嚢粘膜と比肩して強度である。

この分解能も全分画と euglobulin 分画では差は認められず、これらに streptokinase を添加しても活性は受けない。

乳腺症でも正常乳腺組織と分解能は同程度である。

乳癌組織では基質分解能はかなり強度である。

しかし、全分画、euglobulin 分画では程度差はないが、これらに streptokinase を添加した場合幾分活性を受けた結果を示した。

腎皮質、腎髄質も基質分解能はかなり高度であるが腎髄質がやや分解能が強い。これらも全分画、euglobulin 分画、さらにこれらに streptokinase を添加しても分解能に差は認められない。

肝臓、胎盤では基質分解能は他の上皮系組織に比較して弱度である。すなわち、全分画、euglobulin 分画も共に弱度で、streptokinase 添加による活性も受けない。

第四章 小 括

A) 胃癌組織および非癌部胃粘膜組織の合成基質 TAmE 融解能

実験結果で示したように胃癌および非癌部胃粘膜組織ともに合成基質 TAmE を融解する。

全分画と euglobulin 分画では有意の差はなく、両者に streptokinase を添加しても融解能の差は認められない。

癌部と非癌部の対比では癌部にやや優位の融解能を示している。

ついで、この実験結果より細胞浸潤度、あるいはまた、リンパ系、静脈系への転移と融解能の相関を観察したがとくに正の相関はみい出されなかつた。

以上のことより、線溶性における同様に腫瘍組織に plasminogen の増量は確言出来ないが、plasmin, あるいは protease 様の物質が増量していると結論する。この結果は線溶性における heated plate の結果とほぼ一致するものである。

B) 正常脳組織および脳腫瘍組織の合成基質 TAmE 融解能

実験結果で示したように脳正常組織および脳腫瘍組織の合成基質 TAmE 融解能はともに低値を示し、両者とも全分画、euglobulin 分画とも有意の差はなく、streptokinase の添加による融解能の差は認められない。

腫瘍組織は正常脳組織よりやや融解能に高値を示している。

この結果は線溶性における heated plate の結果と一致する。

C) 上皮系組織の合成基質 TAmE 融解能

実験結果に示すように直腸粘膜組織は胃粘膜組織と同様融解能は高値を示した。

膵臓組織も極めて融解能は強度であるが膵臓組織は低値である。

乳癌組織は融解能は強度である。

これらの融解能は全分画と euglobulin 分画では差はなく、両分画に streptokinase の添加による活性は認められず、結果は線溶性における heated plate の結果と一致をみる。

D) 各種単位の trypsin の casein 分解能

表5に示すように各種単位の trypsin の casein 分解能の標準曲線をえた。

E) 胃癌組織および非癌部胃粘膜組織の casein 分解能

実験結果に示すように胃癌および非癌部胃粘膜組織ともに casein 分解能を有する。

この casein 分解能も癌部と非癌部の比較では癌部のそれにおおむね強度であり、この結果は線溶性における heated plate, および合成基質 TAmE 融解能とその結果は一致し、全分画と euglobulin 分画、またこれらに streptokinase を添加したのもでも分解能に差は認められない。

以上の結果から、線溶性、および TAmE 融解能の推論と同様、plasmin, あるいは protease 様物質が腫瘍組織に増量しているものと考えている。

F) 各種甲状腺疾患の casein 分解能

実験結果で示したように腫瘍発生母地となる正常

甲状腺組織、および良性甲状腺腫は casein 基質分解能は軽度である。

しかし、悪性甲状腺腫ではおおむね基質分解能は高度である。

しかし、これらの casein 分解能は全分画, euglobulin 分画, またこれに streptokinase を添加した場合も分解能に差は認められない。

この結果は線溶性における heated plate, および合成基質 TAME への反応と一致する。

G) 直腸, 結腸癌組織および直腸, 結腸正常粘膜組織の casein 分解能

実験結果で示したように直腸, 結腸では癌部, 非癌部を問わず casein 分解能はかなり強度であるが, 全般に癌部の分解能が非癌部のそれと比較してわずかに上昇している。

なお, 全分画, euglobulin 分画とこれらに streptokinase を添加しても分解程度には差はなく, 腫瘍組織には plasmin, あるいは類似の protease 様物質が幾分増量しているものと考えている。

H) 上皮系組織の casein 分解能

上皮系組織の十二指腸粘膜, 胆嚢粘膜, 膵臓組織, 乳腺組織および腎髄質も casein 分解能は強度であり, この分解能は全分画, euglobulin 分画, あるいはこれらに streptokinase を添加したものでほぼ同様である。

肝組織, 結核は分解能は弱度であり, 乳癌組織はかなり強度の分解能を示した。

この結果は線溶性の heated plate, 合成基質 TAME 融解能の結果とほぼ一致する。

第五章 総括および考按

第一編の腫瘍組織および腫瘍母組織の線維素溶解能で述べたように, 線溶現象における plasmin の系統的研究には従来より線維素 fibrin が用いられてきたが, この fibrin の中には proactivator, activator が存在しており, Astrup, Müllertz⁷⁾ らの提唱する図式に示されるように fibrinogen の存在は plasmin (fibrinolysin) 活性化機構における proactivator, activator の発見をもたらせたものの, また反面, この plasmin 活性化機構に複雑懐疑の様相を呈するに至ったのである。

しかし, この plasmin 活性化機構は Sherry, Troll らの合成基質としての Lysine ethyl ester (LEe), TAME, Benzoyl arginine methyl ester などのアミ

ノ酸エステルの導入により明確となつた⁹⁾。

すなわち, Sherry は plasminogen activator = LEe esterase, plasmin = TAME esterase - proteolytic enzyme とのべ, TAME esterase は plasmin と主張している。

これらの観点から, proactivator, activator の測定には基質の選択として fibrin が妥当であるが, しかし一定恒常不変の fibrinogen の作成の困難な点, plasminogen activator, antiplasmin などの存在という分解能に及ぼす種々の影響, これらによる反応の煩雑さの点が指摘されており, これらの諸因子の影響のない合成基質 TAME が基質として合理的であると述べられている。

一方, 藤井⁹⁾らは casein 分解活性も同様の利点があり, casein 分解活性は esterase 活性とほぼ平行し, この両者の活性は plasmin に基づき惹起されることを言及している。

これらのことより, 第一編の線維素溶解能, とくに heated plate の結果と対比して, 腫瘍組織および腫瘍母組織の合成基質 TAME 融解能と casein 分解能の動向を観察した。

この実験結果は小括の項で述べたように, 合成基質 TAME 融解能, casein 分解能も癌部と非癌部では前者の方が全分画, euglobulin 分画ともにやや強度であり, また streptokinase の添加による融解能にほとんど差は認められない。

このことより, この融解能は組織 plasmin, あるいは plasmin 類似の他の蛋白分解酵素 (物質) が存在して惹起されるものと考え。しかし, proactivator, activator については論じえない。平田¹⁰⁾ 癌細胞破壊溶液の上清を Normann¹¹⁾¹²⁾ の方法で, casein を基質とした時の活性で streptokinase を加えなくとも, 分解能を有する傾向ありと述べている。また, これらの融解能は脳組織などにくらべて上皮系組織に強度である。

線溶現象と平行して, 好転移性を有する癌発生母組織に融解能が大であること, また癌化された組織の融解能が大であることは線溶現象における heated plate の溶解の結果と一致するものである。

以上のことより基質の蛋白融解能と転移性格および原発細胞種属との間に一定の関係があるものと結論し, これらの分解物質として plasmin そのもの, あるいは上述のように他の蛋白分解酵素 (物質) も同時に増量しているものと考えている。

第六章 結 語

第一編の線維素溶解現象において、悪性腫瘍の異所性能と発生母組織の蛋白基質 fibrin の溶解能との間に一連の関連を有することを結論とした。

この結果が基質を変更することによりいかなる結果をもたらすかを検索するため、基質に合成基質 TAmE および casein を用いて組織抽出液のこれらの反応を観察し、同時に上皮系組織、非上皮系組織の腫瘍部および正常組織についても検討した。

1) 合成基質 TAmE 融解能も casein 分解能も胃癌部と非癌部胃粘膜の比較では癌部のそれに強度である結果を示した。

2) 合成基質 TAmE 融解能も casein 分解能も胃癌の種類によらずみられた。

3) 脳正常組織と脳腫瘍組織も合成基質 TAmE 融解能、casein 分解能は上皮系組織と比較して低値を示した。

しかし、この両者の比較では腫瘍化されたものはいくぶん高値を示した。

4) 上皮系組織では直腸粘膜、直腸癌組織も合成基質 TAmE 融解能、casein 分解能も高値を示した。

両者の比較では casein 分解能においては直腸癌組織にやや強度の分解能を示した。

乳癌組織も同様高度の融解能を示した。

5) 甲状腺の正常組織、腫瘍組織とも全般に合成基質 TAmE 融解能、casein 分解能も低値であるが、悪性甲状腺腫ではこれらの中でも高値を示した。

6) かかる分解物質は正常組織では上皮系組織にもつとも多く存在している。またこれらが癌化することによって更らに強度となってくるものがある。

かかる分解物質は plasmin か、あるいは異質の蛋白分解物質によるものであろう。

7) 以上のことより冒頭にかかげた腫瘍組織の異所性能の成因の一因子として組織中に含まれるこれらの蛋白分解物質が一役を荷なっているものと考えられている。

稿を終るにあたり御指導、御校閲を下しました恩師田中早苗教授、岡島邦雄助教授、羽場喬一助教授、内海耕健助教授、中川定明博士、小林淳一博士に対し、深甚の謝意をささげます。

本論文の要旨は第23回日本癌学会、第4回、第5回岡山大学学内プラスミン学会において発表

文

- 1) 真木正博：線維素溶解酵素系の測定方法，プラスミン測定法文献集，第一製薬，16，1963.
- 2) 藤井節郎他：プラスミン活性化機構，最新医学，21，242，1966.
- 3) 安部 英：線維素溶解現象測定法，プラスミン測定法文献集，第一製薬，1966.
- 4) 岡本歌子：ヒト血清の whole plasmin 値の測定法と測定値の動揺範囲，プラスミン測定法文献集，第一製薬，1966.
- 5) 福武勝博：線維素溶解酵素の新しい臨床測定法，プラスミン測定法文献集，第一製薬，1966.
- 6) 線維素溶解現象測定法（プラスミン測定法）；関西地区プラスミン測定法研究会刊行，1962.
- 7) *Annals of the New York academy of science*，68，1，proteolytic enzyme and their clinical ap-

献

- plication.
- 8) Troll, W. and Sherry, S.; *J. Biol. Chem.*, 213, 881, 1955.
- 9) 藤井節郎他：最新医学，21，288，1966.
- 10) 平田稔郎：Ehrlich 腹水癌における線維素溶解酵素系の研究，神戸医科大学紀要，25，1~9，1963.
- 11) Normann, P. S. *Studies of the plasmin system. I. Measurement of human and animal plasminogen. Measurement of an activator in human serum. J. Exp. Med.*, 106, 423, 1957.
- 12) Norman, P. S. *Studies of the plasmin. system. II Inhibition of plasmin by serum or plasma. J. Exp. Med.*, 108, 53, 1958.

Basic Studies on Metastatic Activity of Malignant Tumors**Part II. A Study on TAME-Lysis and Caseinolysis
in the Malignant Tumors and the Host Tissues**

By

Takamitsu JINNODepartment of Surgery Okayama University Medical School Okayama Japan
(Director: Prof. Sanae Tanaka)**Abstract**

TAEM-lysis and caseinolysis are stronger in any carcinoma than in none-carcinomatous mucous membrane of the stomach. And those lytic activities, which are generally activated by malignant change such as carcinomas in alimentary tract, breast and thyroid, are marked in epithelial tissue in comparison with none-epithelial tissue and brain tissue. This lytic substance might be plasmin or protease-like substance, because it is not activated by streptokinase. This result presumably shows a certain relation among the proteolytic activity, metastatic ability and primary tissue of the tumors.
