

岡山医学会雑誌

第77巻2号(第843号)

昭和40年2月28日発行

618.19-006:616-008.9-092.18

乳腺腫瘍の酵素組織化学的研究

第1編

水解酵素について*

岡山大学医学部第I外科教室(指導:陣内伝之助教授, 田中早苗教授)

大学院学生 延 藤 栄 男

[昭和40年1月5日受稿]

第I章 緒言

各種乳腺疾患に関して生化学的, 生理学的, 病理組織学的研究は非常に多いが, 細胞あるいは組織単位において, それら生化学的機能状態を検索した研究は数少く, その歴史も浅い. 病理学的検索と同時にそれら組織の生化学的物質代謝の状態を検索する方法の一つとして組織化学は有要な方法である. この研究法は大別して代謝物質そのものを証明する方法と, その代謝過程に関与する酵素を証明する方法との二通に大別することが出来る. 前者の方法は代謝物質が迅速に変化しかつ微量である場合が多いため, 生体内における状態で把握するのに困難を伴うことが多いが, 後者の方法は酵素が直接代謝消費されることがなく, またその反応の特異性が厳格なため代謝過程を知るのに至便な方法であると考え. 近年, 染色法の進歩とともに各臓器について種々の酵素の組織化学的研究がなされるようになったが, 乳腺については未だ十分な系統的研究に乏しく, 諸家の実験成績も必ずしも一致していない.

著者は乳癌, 乳腺症, 線維腺腫, 女性乳房について,

それら組織及び細胞の代謝と比較的密接な関係にあると考えられる水解酵素5種, すなわち Alkaline-phosphatase (ALP), Acid-phosphatase (ACP), β -Esterase (β -EST), β -Glucuronidase (β -GL), 及び Leucine Aminopeptidase (AMP) を検索し, 次編において報告する8種の脱水素酵素とあわせ, それらの結果を総合し, 萎縮, 増殖, 前癌及び癌等の乳腺の病理学的変化と, これら種々の酵素活性の変化との相互的関連性を検索し, 正常乳腺及び乳腺腫瘍の組織及び細胞の代謝機能について考察を行なった.

第II章 実験方法

外科的に剔出した人の乳腺82例, 112の標本, すなわち乳腺症63, 線維腺腫8, 女性乳房7, 乳癌34について検索した. 剔出後肉眼的に病的及び正常と思われる部位を1~2ヶ所切除し組織小塊とし, 直ちに -30°C deep-freezer に一時保存後, -20°C クリオスタットで厚さ 20μ の凍結連続切片を作成し, 室温乾燥後10%中性ホルマリンで10分間固定し, 水洗後以下に記載する反応液中で反応させ, パルサム

* (本論文の要旨は, 第22回日本癌学会及び第64回日本外科学会に於て発表した)

或はグリセリン封入を行なつた。なお同時にクリオスタット切片によりヘマトキシリン・エオジン切片を作成した。

1) Alkaline-phosphatase: α -naphthyl phosphate 10mg, Diazo blue B 20mg, 1/5M Clark-Lub's buffer pH9.2 20cc.

20°C, 30 分間反応させバルサム封入を行なつた。酵素活性陽性の部位は紫褐色に着色する。

2) Acid-phosphatase: α -naphthyl phosphate 10mg, Diazo blue B 20 mg, Michaelis buffer pH5.8 20cc.

20°C, 1 時間反応させサバルサム封入を行なつた。陽性部位は紫褐色に着色する。

3) β -Esterase: β -naphthyl phosphate 10mg, Diazo blue B 20mg, Michaelis buffer pH 7.20cc. 20°C, 30 分間反応させグリセリン封入を行なつた。陽性部位は赤紫色に着色する。

4) L-Leucine-Aminopeptidase: L-leucyl- β -naphthylamine hydrochloride 8 mg, acetate buffer pH6.5 10mg, 2/100M KCN 1 cc, 0.85% NaCl pH6.5 10cc, Diazo blue B 10mg.

37°C, 30分～1 時間反応させ、次いで食塩水で洗い数分間 1/10M copper sulfate の溶液に浸した後グリセリン封入を行なつた。陽性部位は青紫色に着色する。

5) β -Glucuronidase: 先づ「I」の反応液中にて 37°C, 6 時間反応させた。「I」: 6-bromo-2-naphthyl- β -d-glucuronide 30mg. phospho-citric buffer pH 4.95 20cc. methanol 5cc, aq. dest. 75cc.

次で水洗し「II」の反応液にて 4°C, 5 分間反応させた。「II」: 0.02 M phosphate buffer pH 7.5 40cc, Diazo blue B 40mg.

反応後、冷水で水洗、0.1% 酢酸を通じグリセリン封入を行なつた。陽性部位は赤紫色に着色する。

第三章 実験成績

各乳腺疾患組織を上皮性要素すなわち腺房上皮細胞、末梢乳管上皮細胞、筋上皮細胞及び基底膜と、間質性要素すなわち線維芽細胞、線維細胞、膠原線維、毛細血管内皮細胞、その他に二大別し、その各組織における活性の分布状態を観察した。活性をほぼ以下の段階の基準により区分した。陰性(一)とは、その酵素特有の染色のみられないもの。微弱(±)とは、著しく弱い活性を示し、軽度の活性を示すに至らぬもの。軽度(+)とは、細胞が淡染し

なお細胞の核、原形質等が判明しうるもの。中等度(++)とは、細胞の核、原形質等その詳細不明な程度に染色され、なお細胞個々の識別可能なもの。高度(+++)とは、細胞全体が濃染し、細胞個々の区別不能で細胞集団として観察されるものとした。

乳腺症ならびに乳癌についての分類は、Stewart et al¹⁾、久留²⁾に準じた。前癌とは異常増殖及び細胞異型を認め、連続切片により検索するも基底膜の破壊、浸潤のみられない状態のものとした。なお同一標本についても異つた病理組織像を示すことがあるため、個々の病変部位について検索を試みた。

1) Alkaline-phosphatase (ALP) について: 正常乳腺の上皮性要素は腺房、乳管とも中等度の活性を示し (Fig.1), なかでも筋上皮細胞、基底膜に活性強く、腺上皮細胞ではやや活性の減弱が認められた。間質性要素では主として小葉内結合織中に樹枝状に分布した毛細血管内皮に中等度の活性を認め、一部膠原線維に中等度乃至軽度の活性を認めたほか一般に陰性を示した。

乳線症では、上皮性要素について duct epith. hyperplasia に中等度乃至高度の活性を示したが、一部の症例は微弱乃至陰性の活性を示すものがあつた。lobular hyperplasia に中等度の活性を示した。sclerosing adenosis ではその florid type に中等度乃至高度の (Fig.3), 硬化期では軽度乃至微弱な活性を示した。blunt duct adenosis は陰性より高度まで種々の活性を示したが (Fig.2), 主として乳管では活性強く、腺房では減弱していた。duct papillomatosis では重層性増殖を示す部位では一般に活性は不規則であつたが、特に上皮の増殖が著しく細胞異型度が著明で悪性化の傾向を示す部位では活性は陰性化し、毛細血管内皮、筋上皮にのみ活性を示した (Fig.5), 6)。cyt では一般に活性は弱く、未だ上皮細胞が立方性を呈する例では軽度の活性を示し、扁平萎縮化すると減弱した。apocrine epith. では陰性を示した。間質性要素では、lobular hyperplasia, duct epith. hyperplasia で上皮の活性の強い部位に比例して線維性要素に中等度より陰性の活性を示す程度であつた。毛細血管内皮は lobular hyperplasia, sclerosing adenosis の florid type で中等度の活性を示し樹枝状を呈したが、他の病変では不明瞭であつた。

線維腺腫 (Fig4) では上皮性要素に中等度の活性を示し、間質性要素では毛細血管内皮に中等度の活性を認めたほかは陰性を示した。

女性乳房では上皮性要素に中等度の、間質性要素では毛細血管内皮に軽度の活性を示したほかは陰性であった。

乳癌では活性は低下し、上皮性要素については lobular carcinoma の浸潤像の著明でない例で中等度の活性を示したが、papill. tub. carcinoma, scirrhous carcinoma (Fig.7), 及び comedocarcinoma では陰性或は軽度の活性を、medullary carcinoma では癌巣周辺に微弱な活性を示すほかほとんど陰性を示した (Fig.8)。間質性要素では線維細胞に軽度或は陰性の活性を認めた。

2) *Acid-phosphatase* (ACP) について：正常乳腺の上皮性要素は軽度の活性を示し (Fig.9)、間質性要素はほとんど陰性を示した。一部の腺細胞では細胞質内に顆粒状に色素の散在するのを認めた。ALP に比してその活性は弱く、腺上皮細胞、筋上皮細胞及び基底膜とも同程度の活性を示した。

乳腺症では、上皮性要素についてはその分布状態は ALP とほぼ同様で、lobular hyperplasia, duct epith. hyperplasia 及び sclerosing adenosis で軽度乃至微弱な活性を、blunt duct adenosis で中等度より陰性までの活性を示した。duct papillomatosis では軽度乃至中等度の種々の程度の活性を示したが、異常増殖を示し異型性のみられる前癌性と考えられる例では中等度乃至高度 (Fig.10) の活性を示した。cyst (Fig.11) 及び apocrine epith. では活性は低下し微弱かあるいは殆んど活性を示さなかつた。間質性要素は一般に陰性で sclerosing adenosis 及び duct papillomatosis の上皮性要素の活性の強い部位に相当して軽度の活性を示した程度であつた。毛細血管内皮は殆んど活性を示さなかつた。

線維腺腫では上皮に中等度の、間質に軽度の活性を認めた。

女性乳房では上皮に軽度の、間質に軽度乃至陰性の活性を認めた。

乳癌では上皮性要素について活性は一般に正常と同程度の活性を示し、papill. tub. carcinoma に軽度乃至中等度の (Fig.12)、scirrhous carcinoma (Fig.13) に軽度の活性を認め、comedocarcinoma 及び lobular carcinoma で中等度より軽度の活性を認めた。medullary carcinoma では微弱な活性を示したが、癌巣周辺には軽度の活性を認めることもあつた。間質性要素については papill. tub. carcinoma, scirrhous carcinoma に微弱な活性を認め、線維芽細胞或は線維細胞に活性が認められた。

3) β -Esterase (β -EST) について：正常乳腺の

上皮性要素では各腺葉によつて軽度より高度の種々の活性を示し (Fig.14)、乳管では腺房上皮細胞に比しやや活性が強く、腺腔に面した部位に強い活性を示した。間質性要素では主として基質に微弱な活性を示した。

乳腺症では上皮性要素について lobular hyperplasia 及び sclerosing adenosis に中等度の (Fig.15)、duct epith. hyperplasia に高度乃至中等度の活性を示した。blunt duct adenosis (Fig.16)、及び duct papillomatosis (Fig.17) では中等度乃至高度の活性を認め、腺腔に面し壊死性病変を示す部位では活性は増強する傾向を示した。また細胞異型が著しく前癌と考えられる部位では、活性はやや減弱し中等度乃至軽度の活性を示した。乳管の拡張した部位では中等度乃至高度の活性を示し、腺腔に面した腺上皮に活性の増強を認めた。cyst では活性は軽度であつたが、apocrine epith. では中等度乃至高度の活性を示した。間質性要素については一般に線維細胞に微弱な活性を示すほか特異な所見はみられなかつた。

線維腺腫では上皮性要素に軽度より高度の活性を示し、間質性要素では線維細胞、線維芽細胞及び基質に微弱な活性を示した。

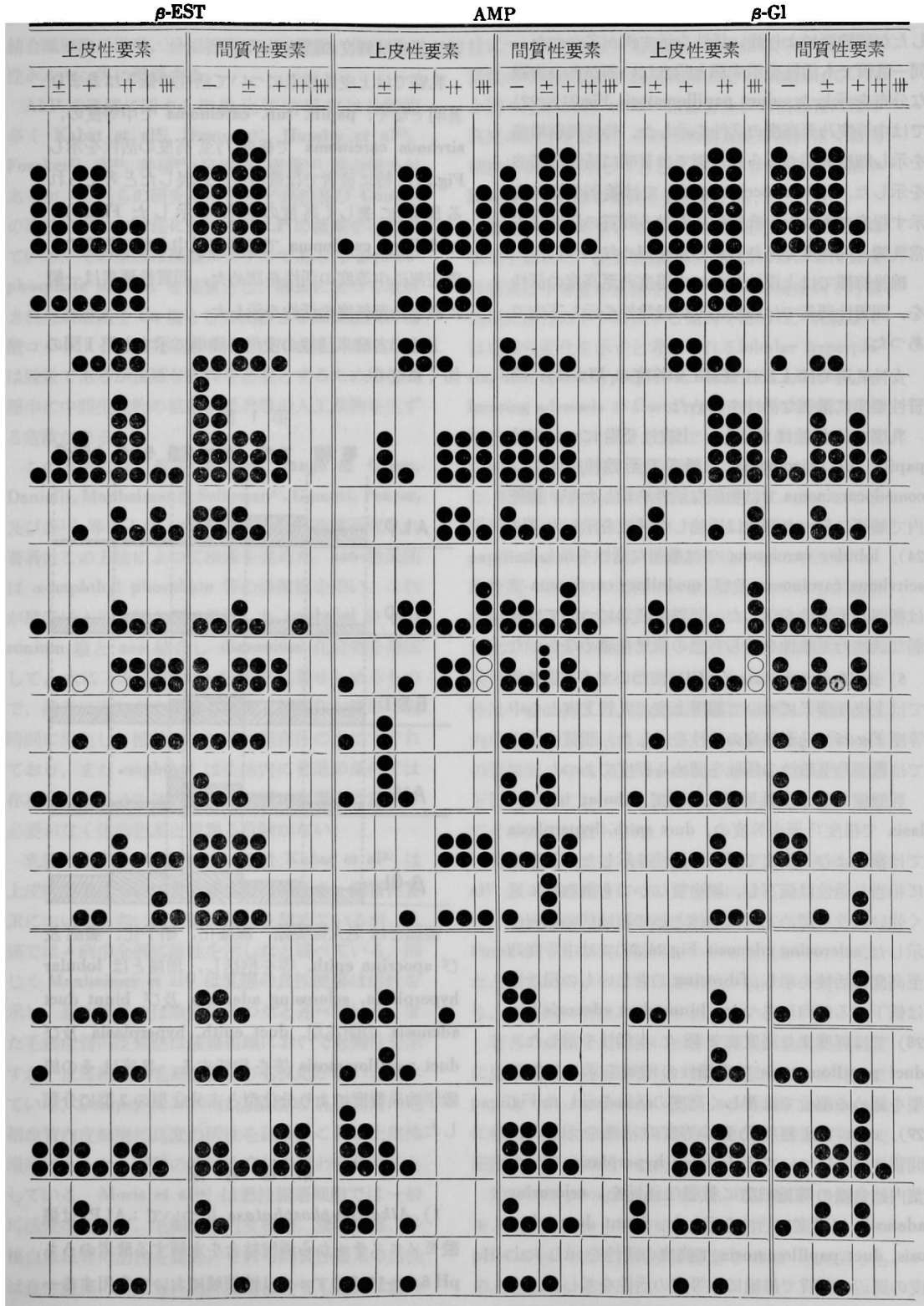
女性乳房では乳管上皮に高度の一部軽度の活性を示し (Fig.18)、内腔に面した部位あるいは乳頭状に増殖した部位に活性の増強を示した。間質性要素は殆んど陰性を示した。

乳癌の上皮性要素は papill. tub. carcinoma (Fig.19) で軽度乃至中等度の活性を示し、腺腔内にて壊死に陥つたと考えられる細胞には高度の活性を認めた。scirrhous carcinoma では中等度より陰性まで種々の活性を示したが、乳管内へ進展拡張したと考えられる部位は特異的に高度の活性を示した。comedocarcinoma は中等度の活性を示し、lobular carcinoma では中等度の活性を示した。medullary carcinoma では軽度の活性を示した。間質性要素については一般に微弱であつたが、scirrhous carcinoma では基質に中等度の活性を示す例もあつた。

4) *Amino-peptidase* (AMP) について：正常乳腺の上皮性要素は軽度より高度の活性を示し、小葉によつて活性の程度に差異がみられた (Fig.20)。間質性要素では基質に軽度より陰性の活性を示した。

乳腺症では上皮性要素について lobular hyperplasia で軽度の活性を、sclerosing adenosis 及び blunt duct adenosis では florid type に中等度乃至高度の

各 酵 素 活 性



活性を示し、fibrosing が進行すると活性は低下した。duct epith. hyperplasia では中等度の活性を示したが腺腔面により強い活性を示す例が多かつた。同一乳管でも活性を示す部と示さない部があり複雑な分布を示した。duct papillomatosis (Fig.21), 22) では中等度乃至高度の活性を示した。特に異常増殖を示し細胞異型のみられる例では著明に活性の増強を示した。cyst, apocrine epith. では微弱な活性を示す程度であつた。乳腺症における間質の活性は正常乳腺と同程度であり有意の差を認めなかつた。

線維腺腫では上皮性要素に中等度乃至高度の活性を、間質性要素では軽度あるいは陰性を示し不定であつた。

女性乳房では上皮性要素に中等度の (Fig.23), 間質性要素に微弱な活性を認めた。

乳癌では活性は低下し、上皮性要素については papill. tub. carcinoma で微弱乃至陰性を示し、comedocarcinoma では微弱な活性を示したが、腺腔内で壊死に陥つた部位は増強した活性を示した (Fig. 24)。lobular carcinoma では微弱な活性を示した。scirrhous carcinoma 及び medullary carcinoma では微弱乃至陰性を示した。間質性要素については微弱な活性乃至陰性を示し有意の所見を認めなかつた。

5) β -Glucuronidase (β -Gl) について：正常乳腺では上皮性要素について腺房上皮、乳管上皮とも中等度 (Fig.25) 乃至軽度の活性を示した。間質性要素では微弱乃至陰性の活性を認める程度であつた。

乳腺症では上皮性要素について lobular hyperplasia で軽度乃至中等度の、duct epith. hyperplasia では微弱より高度まで種々の活性を示した。細胞核に相当し活性は低下し、細胞質なかでも細胞膜に近く強い活性を認め上皮は全体として石垣状の配列を示した。sclerosing adenosis (Fig.26),27) では中等度乃至高度の活性を示し、fibrosing の著しいもの程活性は低下する傾向にあつた。blunt duct adenosis (Fig. 28) では軽度より高度まで種々の活性を示した。duct papillomatosis で重層性の増殖を示し細胞異型を認める部位では著しく高度の活性を示した (Fig. 29)。cyst では軽度乃至中等度の活性を示した。間質性要素については lobular hyperplasia では小葉内結合織の線維細胞に微弱な活性を、sclerosing adenosis に軽度の活性を示した。blunt duct adenosis, duct papillomatosis で高度の活性を示した上皮の周辺の間質で線維に中等度の活性を示した。

線維腺腫では上皮性要素に中等度乃至軽度の活性

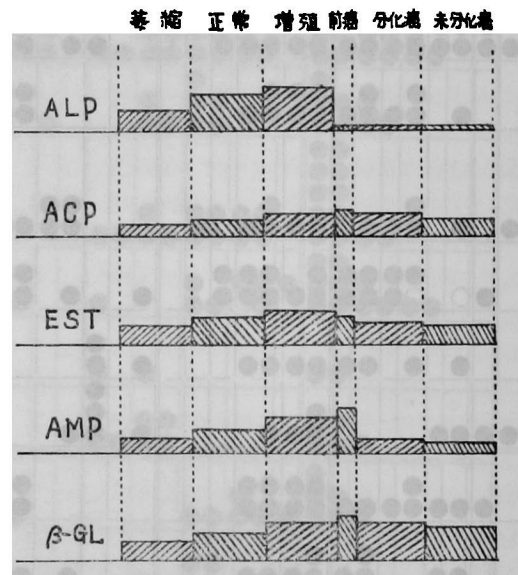
を示し、間質性要素は陰性を示した。

女性乳房では乳管上皮に中等度の活性を示し、間質性要素は軽度の活性を示した。

乳癌では上皮性要素について活性の低下はあまり著明でなく、papill. tub. carcinoma で中等度の、scirrhous carcinoma で軽度乃至高度の活性を示し (Fig.32), 特に後者では管内性に進展したと考えられる部位に著しく高度の活性を示した (Fig.30)。medullary carcinoma では癌巣中心部に軽度の、周辺部に中等度の活性を認めた。間質性要素は一般に微弱乃至軽度の活性を示した。

上述の各酵素活性の変化を簡単に示すと第 I 図の如くなる。

第 1 図



萎縮とは老人性萎縮、線維化、硝子化、嚢胞及び apocrine epith. 等を包括し、増殖とは lobular hyperplasia, sclerosing adenosis 及び blunt duct adenosis の開花期、duct epith. hyperplasia 及び duct papillomatosis 等を包括する。乳癌はその組織学的異型度により分化型と未分化型の2型に分類した。

第IV章 考 按

1) *Alkaline-phosphatase* について： ALP は磷酸モノエステルから磷酸結合を水解する酵素のうち $\text{pH } 8.6 \sim 10.3$ のアルカリ性領域において作用する一種のエステラーゼであり、エステルのアルコール基

に関して特異性が低い。本酵素は、腸、胆管、腎、¹⁰⁹肝、脾及び乳腺等生体内に広く分布し、細胞分裂、結合組織細胞の増殖、分泌細胞の分泌機能、骨形成、性ホルモン等に関係する。

ALP の乳腺に関する組織化学的研究は比較的多く Kabat et al⁹³, Drennan⁹⁵, Huseby et al⁹⁵, Foraker⁷², 南⁹², 井積⁹², 泉雄¹⁰⁰, 伊藤¹¹¹ 等の報告があるが、これらの研究はほとんど高松及び Gomori の原法に準じた方法によつて ALP の検索を行なつている。その原理は磷酸エステルである β -glycerophosphate sodium を基質とし、酵素によつて水解された磷酸基を Ca 塩として沈着させ鍍銀法或は硫酸コバルトとして発色させる方法である。この方法は鋭敏であるが複雑な操作を必要とするため染色過程中に中間生成物の拡散、吸着等の人工産物を生ずる危険がある。

この方法に対し近年 Menten, Junge & Green, Danielli, Manheimer & Seligman⁹⁷, Gomori, Pearse, 及び森¹² 等により azo-色素結合法が改良研究され、著者はこの方法によつて検索を進めた。azo-色素法は α -naphthyl phosphate 等の磷酸塩を用い、これが酵素により水解されて遊離した naphthol が diazonium 塩と azo 結合し diazonium 化合物を形成して、水に不溶性の azo 色素を沈着せしめるもので、前者に比しやや鋭敏さに劣るが操作が簡単で短時間に発色し、拡散を生じ難く局在性の点にすぐれており、また naphthol は生体内に普通の条件下では存在しないため生体内因性の基質の影響を考慮する必要がなく体内色素と見誤る危険がない。

乳腺に関する ALP については Kabat et al⁹³ は上皮性要素について良性腫瘍では陽性を、間質性要素においても若い結合織に陽性を認めているが、乳癌では4例中全例に陰性を示したと述べている。同じく Manheimer et al⁴ は乳腺の良性腫瘍は活性を示し、悪性腫瘍では陰性であつたと述べている。また毛細血管内皮細胞は腫瘍組織においても陽性を示すが、正常組織の毛細血管よりも反応が弱いと述べている。Dempey et al¹⁰³ は活動期の乳腺間質の毛細血管内皮細胞に高度の活性を認め、これは上皮性増殖にともなう間質の増殖性変化の現われであるとしている。Moris et al¹⁴ は悪性腫瘍細胞では一般に活性を認めず、毛細血管内皮細胞、膠原線維、多核白血球等に活性を認め、それら間質性要素の活性は良性腫瘍に於ても、悪性腫瘍に於ても差異は認められなかつたと述べている。南⁹² は悪性腫瘍に於け

る本酵素活性はまちまちで意義を有しないとしている。井積⁹² 及び泉雄¹⁰⁰ は乳腺症における ALP 活性について筋上皮、基底膜、毛細血管内皮細胞では活性の増強を認め、腺房乳管上皮では減弱していたと述べ、Huseby et al⁹⁵ は腺房及び末梢乳管に常に高度の活性を認め、そのうち筋上皮に活性強く上皮細胞に減弱を示したとしている。伊藤¹¹¹ も井積や Huseby と同様の傾向を認めている。

著者の症例においても井積、泉雄等とはほぼ同様の事実を認めた。正常乳腺腺房、乳管においては上皮性要素は中等度の活性を示し、数例の検索例で月経前期に活性のやや増強する傾向を認めた。乳腺症では増殖性変化を示すと考えられる lobular hyperplasia, duct epith. hyperplasia, blunt duct adenosis, sclerosing adenosis の florid type ではいずれも活性の増強がみとめられた。間質では上皮に隣接する幼若な線維細胞に活性の増強を認め中等度の活性を示した。毛細血管内皮は中等度の活性を示し、主として小葉内間質に樹枝状に分布しているのを認めた。duct papillomatosis においては活性は一般に不規則で、腺腔内へ増殖した部位では微弱な活性を示し基底層に軽度の活性を認め、腺腔内へレース状に増殖した部位では活性は微弱であつた。異型増殖及び細胞の異型性が認められる前癌性病変を示す例ではその活性は一般に低下し、基底部に筋上皮細胞、毛細血管内皮細胞のみに活性を認めた。sclerosing adenosis の萎縮型、cyst、及び apocrine epith. では活性は低下し、間質においても線維化、硝子化になるに従つてその活性は低下した。

乳癌については ALP の文献的記載は Kabat et al⁹³ が4例の乳癌について全例に陰性を示したと述べ、Drennan⁹⁵ は100例の乳癌中7例に活性を認め、Foraker⁷² は22例の腺癌について全例が陰性を示したとしている。本邦では井積及び泉雄等の報告があり、一般的に活性の低下を認めている。

著者の成績でも同様に正常乳腺及び乳腺症性病変に比し活性の低下が著しいことを認めた。間質では papill. tub. carcinoma 及び scirrhus carcinoma に軽度の活性を認めることがあつた。毛細血管内皮細胞は一般に減弱した活性を示した。

2) Acid-phosphatase について: ACP は磷酸のモノエステルから磷酸結合を水解する酵素のうち pH 4.6~5.8 にて作用する酵素で ALP とは異なるものとされている。

本酵素は体内の石灰沈着、Ca 代謝に重要な役割

を演じ、腎尿管に活性強く、腸管におけるブドウ糖の吸収、乳腺における乳汁の産生に関係し、前立腺癌患者に女性ホルモンを注射すると本酵素活性が低下することが知られており、ホルモンとの関係が深いことがうかがわれる。組織化学的証明法は Gomori の硫化鉛法に始るが近年 ALP と同じく azo 色素結合法が Grogg & Pearse¹⁵⁾; Burton¹⁶⁾ 等により使用されるようになった。本酵素の染色については ALP に比し比較的不安定であり、固定、封埋、染色液の種類等によつてその活性の低下をみる事が多く温熱的影響を受けやすい。森¹⁷⁾等は冷アセトン固定、パラフィン切片では凍結切片による如き優秀な発色を望みえないとしている。

本酵素に関する系統的研究は ALP に比し未だ十分でない。Wolf, Kabat & Seligman¹⁸⁾ は人の正常乳腺上皮及び癌に活性を認め、Reiner, Rutenburg & Seligman¹⁹⁾ は乳腺腫瘍について腫瘍細胞に正常より高い活性を認め、間質には軽度の活性を認めたとしている。Fanger & Barker²⁰⁾ は女性乳房、線維腺腫、fibrocystic disease, intraductal adenoma に強い活性を認め、44例の乳癌については、その癌細胞周囲の浸潤細胞に増強した活性を認めている。井嶺²¹⁾は家兎乳腺における研究で、正常乳腺では活性を欠き、妊娠するとその進行に従つて増強し授乳期に最も高い活性を示すと述べているが、エストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン等の投与によつても本酵素に著変を示さなかつたとしている。人の乳腺について、乳腺症ではその上皮に活性の低下していることを認め、乳癌では ALP で活性が低いのに反し、ACP では非常に高かつたと指摘している。泉雄¹⁰⁾は乳腺症における本酵素活性はいづれも正常乳腺組織における範囲を出ないが、duct epith. hyperplasia, duct papillomatosis の上皮に中等度の活性を示し、間質では陰性であつたと述べている。乳癌では癌細胞に中等度の活性を認め、正常に比し増強していたと報告している。

著者の検索結果では正常乳腺上皮で一般に軽度の活性を示し、間質では殆んど陰性を示した。乳腺症においては sclerosing adenosis 及び blunt duct adenosis 等の増殖病変では活性はやや増強し、apocrine epith., 及び cyst 等の萎縮病変では活性は殆んど陰性を示した。duct papillomatosis では種々の程度の活性を示したが、前癌性と考えられる部位では ALP は著明に低下するのに反し本酵素では増強し中等度の活性を示した。また乳癌においても

papill. tub. carcinoma に中等度の、scirrhous carcinoma に軽度の活性を認め、ALP とは異なり本酵素活性は癌においてもよく保たれており井嶺及び泉雄と類似の結果を得た。medullary carcinoma では全般的には軽度の活性を示したが、癌細胞各個は種々の活性を示した。間質性要素については scirrhous carcinoma 及び papill. tub. carcinoma でその線維細胞に軽度の活性を認めたが、ほかではほとんど活性を示さなかつた。

3) β -Esterase について： β -EST は一般に低級脂肪酸と一価のアルコールとのエステルを分解するものを称しているが、脂質を分解することも可能であり、lipase と組織化学的に劃然と区別することは困難である。尚 cholinesterase は β -naphthyl acetate に対して反応弱く、また凍結切片作成中に不活性化されるため、cholinesterase の活性を考慮する必要がない。本酵素は主として脾臓、肝臓に分布しその他脾臓、リンパ系、網内系、肺などにも分布する。esterase の組織化学的証明は Nachlas, Seligmann により β -naphthyl acetate を用いる azo 色素結合法が発表され、その後 Gomori により色々な変法が考察されたが Barnett, Seligmann は indoxyl を用い、Pearson²²⁾ は 5-bromo-indoxyl acetate, α -naphthyl acetate, naphthyl AS acetate を用いて esterase の証明をしている。著者は β -naphthyl acetate を使用して検索した。本法は最も強く発色する点、優れているが diffusion を生じ易い²²⁾。

乳腺に関する本酵素の研究は数少ない。Wachstein, Meisel & Falkon²³⁾ は正常乳腺の腺腔に面した上皮に活性を認め、癌については種々の程度の活性を線維腺腫、線維肉腫では上皮性要素に強い活性を認め、間質性要素に中等度の活性を認めている。Melnick & Bullock²⁴⁾ は well differentiated carcinoma は著明な、scirrhous carcinoma では微弱な、medullary carcinoma では全く活性を認めなかつたと報告している。Pearson & Defendi²⁵⁾ はマウス乳癌について本酵素活性を認めておらず、Murata et al²⁶⁾ は同じくマウス乳癌について cyst 及び乳頭状に増殖した部位に高度の活性を、間質性要素に軽度の活性を認めている。

著者の検索結果は正常乳腺でその活性の程度は種々であり一定の傾向を示さないが、乳腺症では lobular hyperplasia, sclerosing adenosis, duct papillomatosis 及び blunt duct adenosis 等の増殖性病変で活性の増強を、前癌で軽度の活性低下を示し

た。萎縮性病変では一般に活性は低下の傾向を示したが、*apocrine epith.* 及び拡張した乳管上皮に中等度乃至高度の活性を認めた。線維腺腫及び女性乳房ではそれぞれ中等度乃至高度の活性を示した。乳癌では軽度より中等度の活性を示した。尚本酵素は乳腺症及び乳癌とも内腔に面した上皮に活性強く、また変性ないし壊死に陥つたと考えられる細胞に増強した活性を示していた。

4) *Amino-peptidase* について：本酵素は *polypeptide* や蛋白の末端 *peptide* 結合に作用する。特に *leucine* 結合物の水解にあづかるものは *leucine amino-peptidase* と称する。本酵素の生理的意義は大別して二通の見解があり *Burstone*²⁹⁾ による蛋白分解過程において本酵素活性の増強を示すとする見解と、*Monis, Nachlas & Seligman*³⁰⁾ による *fibroblastic* な過程において増強を示すとする二つの見解がある。*Gomori* は *amino-peptidase* のための有色反応物質として *glycine* または *alanine* の *naphthylamine* 結合物をこの目的に使用することが可能であることを示した。*Burstone & Falk* は *L-leucyl-β-naphthylamide* と *DL-alanyl-β-naphthylamide* を基質に用いた *azo* 色素法を発表し、その後 *Nachlas, Crawford & Seligman*³¹⁾ はこの方法を改良し *Cu-chlolate* 法を行い有機溶媒に不溶性の青い有色性反応物質の沈澱とした。著者はこの方法にもとづいて検索した。一般に新鮮凍結切片において水解酵素の *azo* 色素結合法を行なう場合には、形成された *azo* 色素が脂肪組織へ移行することが多く、*Burston* らの方法はそれを防止出来ないが、*Nachlas* らの *Cu-chlolate* 法ではそれが可能であり、ややその局在性が明瞭である。しかし、*Diazo blue B* と銅との *chllating* の際、比較的大きい青色顆粒を形成することがあり検索に際して注意を要する。

乳腺の本酵素に関する報告は未だ十分でない。*Wachstein et al* は乳癌について中等度より高度の活性を認めている。*Monis et al*³²⁾ は乳腺の *fibrocystic disease* に於て、*duct* 及び *cyst* に活性を認め、かつその周囲の *fibroblast* に著しい活性を認めており、本酵素活性と *fibroblastic activity* との関係を強調している。*Murata et al*²⁶⁾ はマウス乳癌について *L-leucyl-β-naphthylamine* を基質とした場合は微弱な活性を、*DL-alanyl-β-naphthylamide* を用いた場合は強弱不同の活性を示し、なお壊死性病変を示す部位に高度の活性を認めている。泉雄¹⁰⁾ は乳癌細胞に正常よりやや強い活性を認めたが組織

型との関連性は明らかでなかつたとしている。*Finke* 著者の検索結果は正常乳腺については腺房ではば軽度の活性を示したが、小葉によつて活性は種々であつた。間質は小葉内結合織に軽度の活性を認めることがあつた。*sclerosing adenosis, duct epith. hyperplasia* 及び *duct papillomatosis* 等の増殖性病変で中等度乃至高度の活性を示し、*cyst, apocrine epith.*、及び *sclerosing adenosis* の硬化期では低い活性を示した。前癌性病変では特に活性は増強し高度の活性を示した。乳癌では、一般に活性は低下し微弱或は陰性の活性を認めた。

5) *β-Glucuronidase* について：本酵素はグルクロン酸結合物の水解に関与する酵素で解毒、発癌、悪性腫瘍、エストロゲン、ステロイドホルモン等と関係深い。1934年正宗、大島によつて酵素として確立され、*Manian* によつて *esterill-glucuronide* がマウス体内通過の際に *β-Glucuronidase* によつて分解されることが実証された。本酵素は肝、腎、脾及び内分泌臓器などで高い活性を示す。

現在組織化学的染色法には大別して次の二法がある。即ち一つは *Fishman & Baker*³³⁾ の *8-hydroxyquinolin glucuronic acid* を基質として利用する方法で鉄反応として証明し、他方は *Seligman, Tsou, Rutenberg & Cohen*³⁴⁾ によつて発表された *6-bromo-2-naphthyl-β-glucuronide* を用いる *post azo-coupling method* である。両方法についての比較検討は未だ十分でなく、今後の研究に期待するところが大きい。*Fishman* らが生化学的に癌組織で本酵素活性が高値を示すことを指摘して以来、臨床的に癌と本酵素との関係が注目されたが、乳腺組織における本酵素活性の研究は生化学的にも組織化学的にも未だ詳細なものは見当らない。乳腺症について、小池は本酵素との間に相関関係を見出し得なかつたと述べ、泉雄¹⁰⁾ は *duct epith. hyperplasia, duct papillomatosis* ではその増殖細胞に強い活性を認め、河瀬³⁵⁾ にも *lobular hyperplasia* に同様の傾向を認めている。癌組織については、*Cohen & Bittner*³⁶⁾ はマウス乳癌について癌により強い活性を認めたが、*Monis, Banks & Rutenburg*³⁷⁾ は12例の乳癌について検索し本酵素活性に強弱の差があり、一定の傾向を見出し得ないとしている。河瀬及び泉雄等も癌組織により一定しないが、むしろ正常或は良性腫瘍よりは強い活性を認めたとしている。

著者の検索結果では、増殖傾向を示す *sclerosing adenosis* で中等度乃至高度の活性を示した。 *duct*

epith. hyperplasia で細胞膜に近く活性の増強を認め石垣状の配列を示した。このことは Fishman et al.⁸⁸⁾の指摘した如く本酵素は一般に細胞質に高く細胞質顆粒中に多くみられ、核には存在しても少いとの説をうらづけるものである。duct papillomatosis で細胞の異型性を認め、前癌と考えられる部位では活性の増強を認めた。乳癌では一般に Cohen & Bittner⁸⁶⁾、河瀬⁸⁹⁾及び泉雄¹⁰⁾等の所見と同様に高度乃至中等度の活性を示した。特に duct papillomatosis の悪性化したと考えられる例は著しい活性を示したことは注目に値する。duct papillomatosis の上皮増殖の著明で中心部変性、壊死に陥つた部位及び scirrhous carcinoma の管内性に進展した部位では著しく増強した活性を示した。このことは de Duve⁴⁰⁾らによる本酵素が acid ribonuclease 及び cathepsin などの加水分解酵素と同様、本酵素も細胞質中のリボソーム中に大部分存在し顆粒中では不活性であり、細胞の障害或は機能失調により活性が上昇するという説を立証するものであると考えられる。

第V章 結 論

外科的に剔出した人の乳腺腫瘍 112 の標本につき Alkaline-phosphatase, Acid-phosphatase, β -Esterase, Aminopeptidase 及び β -Glucuronidase の 5 酵素につき組織化学的検索を行なつた。

1) Alkaline-phosphatase は正常乳腺で中等度の活性を示し、萎縮で減弱、増殖で増強した活性を示したが、blunt duct adenosis 及び duct papillomatosis では不規則な活性を示した。前癌状態では活性は著明に低下し、癌では殆んど陰性を示した。

2) Acid-phosphatase は一般に軽度の活性を示し、

Alkaline-phosphatase に比し、前癌及び癌における活性の低下は著明でなかつた。

3) β -Esterase は正常乳腺で小葉によつて種々の活性を示し、乳腺症では萎縮で減弱、増殖で増強した活性を示した。前癌では活性はやや減弱し、癌では中等度の活性を示した。乳腺症及び癌で管内性に増殖或は浸潤し、または変性、壊死に陥つたと考えられる部位では高度の活性を示した。

4) Aminopeptidase は正常乳腺で小葉によつて軽度から高度の活性を示し、萎縮で減弱、増殖で増強し、前癌ではさらに活性は増強し高度の活性を示した。乳癌では活性は低下し、微弱な活性を示す程度であつた。

5) β -Glucuronidase は正常乳腺で中等度の活性を示し、乳腺症では病変により種々の活性を示したが、前癌ではいずれも高度の活性を示した。癌では中等度の活性を示し、管内性に変性、壊死に陥つたと考えられる部位で高度の活性を示した。

6) 線維腺腫では β -Esterase に高度の Aminopeptidase, Alkaline-phosphatase 及び β -Glucuronidase に中等度の、Acid-phosphatase に軽度の活性を示した。

7) 女性乳房では、線維腺腫とはほぼ同様の活性を認めた。

稿を終るにのぞみ、御指導、御校閲下さいました恩師陣内教授・田中教授及び緒方講師に対し、また技術上多大の御援助をいただいた大阪大学歯学部、川勝教授及び森助教授に対し深甚の謝意をささげます。なお終始御懇篤なる御指導、御助力をいただいた当教室河島博士及び教室員諸兄に心から感謝いたします。

(文献は第II編末尾に一括記載する。)

研究論文

Histochemical Studies on Human Breast Tumors

Part I. On Hydrolytic Enzymes

by

Hideo Nobuto

The First Department of Surgery, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Dennyosuke JINNAI and Prof. Sanae TANAKA)

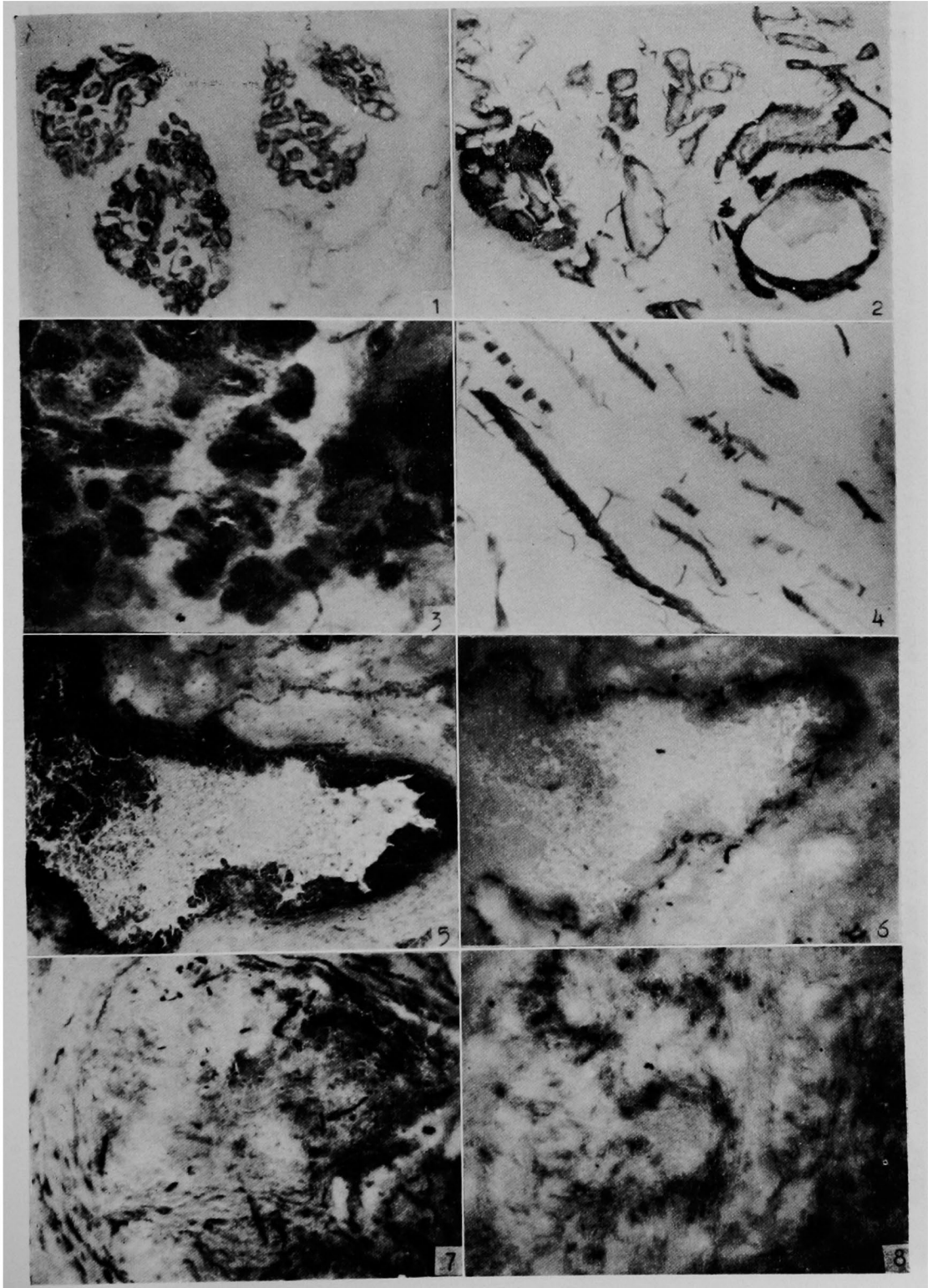
A histochemical study on alkaline phosphatase, acid phosphatase, β -esterase, aminopeptidase and β -glucuronidase has been carried out to clarify the relationship between the function and morphology of the human breast tumors; mastopathia:63, fibroadenoma:8, gynecomastia:7 and cancer:34. The surgically removed tumors were cut at 20μ in -20°C cryostat, then the sections were incubated in each histochemical reaction mixture. For the histochemical demonstration of hydrolytic enzymes, azo-coupling methods were employed, i.e., alkaline phosphatase, acid phosphatase and β -esterase were demonstrated by the methods described by Pearce,⁶⁰⁾ β -glucuronidase by Seligman et al,⁶¹⁾ and aminopeptidase by Nachlas et al.⁶²⁾

Alkaline phosphatase activity was the strongest in capillary vessels and myoepithelium and moderate in the normal lobulus and ducts. This enzyme activity increased in proliferating area, but in precancerous area and in cancer it decreased markedly. Acid phosphatase activity was usually low in normal glands and not prominently decreased in cancer than that of alkaline-phosphatase. β -Esterase activity was moderate in breast tumors but increased in periluminal region and necrotic tissue. Aminopeptidase activity was moderate in normal glands but strong in proliferating area. This enzyme activity was elevated in precancerosis, but decreased in cancer cells. β -Glucuronidase activity was increased in proliferating area and precancerous area, but slightly decreased in cancer. This enzyme activity was the highest in duct papillomatosis.

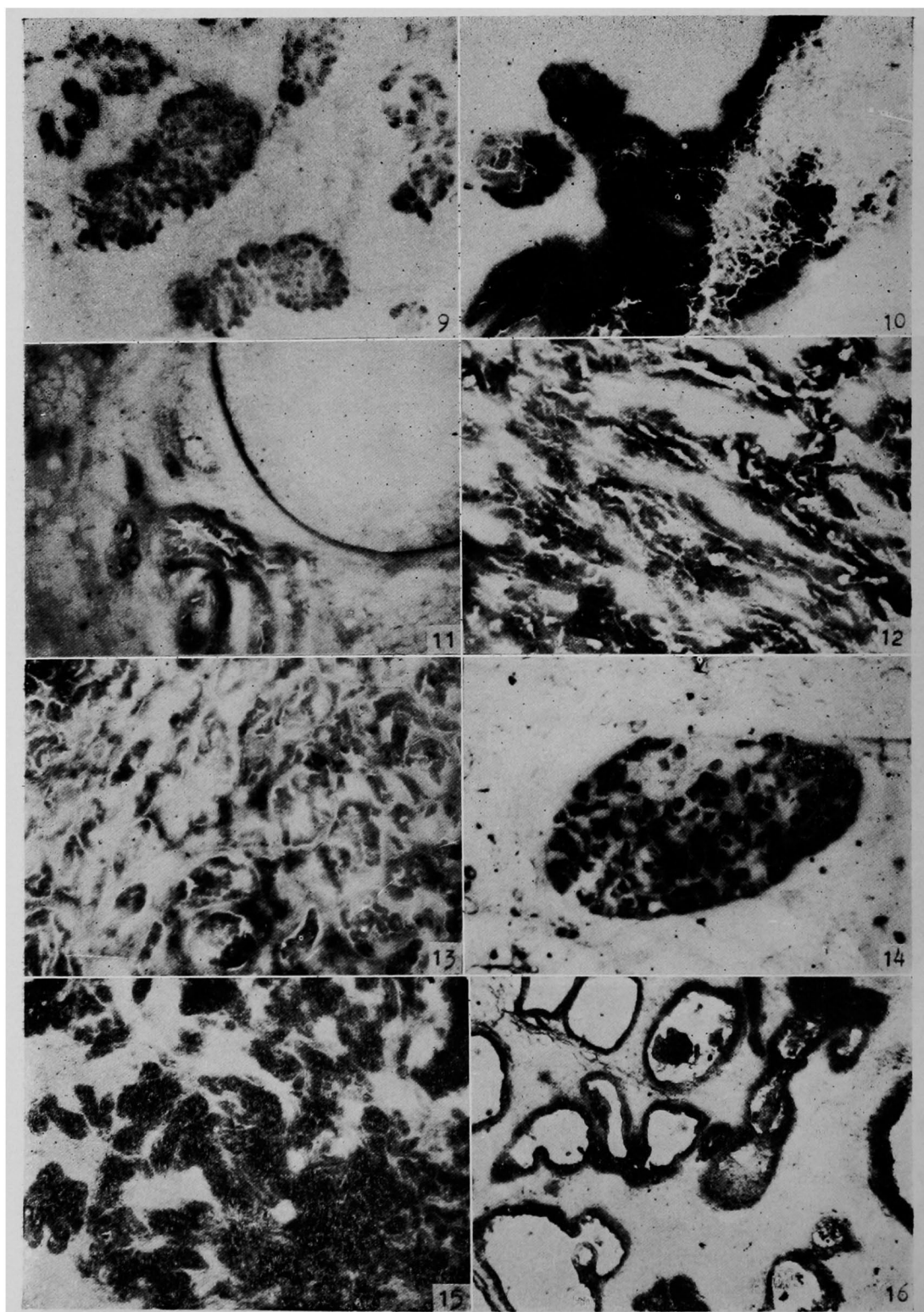
延藤論文附图説明

- Fig. 1) ALP : 正常乳腺腺葉, 中等度の活性を示し, 筋上皮細胞に増強した活性を示す. 10×4
- Fig. 2) ALP : blunt duct adenosis, 部位により種々の活性を示す. 10×4
- Fig. 3) ALP : sclerosing adenosis, (florid type), 高度の活性を示す. 10×10
- Fig. 4) ALP : fibroadenoma, 中等度の活性を示す. 10×4
- Fig. 5) HE : duct papillomatosis, 重層性の増殖を示し細胞異型の認められる前癌性と考えられる部位. 10×4
- Fig. 6) ALP : 前癌性と考えられる duct papillomatosis, Fig. 4 と同一部位で ALP 活性は筋上皮細胞, 毛細血管にのみ認められるに過ぎない. 10×4
- Fig. 7) ALP : scirrhous carcinoma, 癌細胞は殆んど陰性を示し, 毛細血管に軽度の活性を示す. 10×4
- Fig. 8) ALP : medullary carcinoma, 癌巣周辺に軽度の活性を示すに過ぎない. 10×4
- Fig. 9) ACP : 正常乳腺腺葉, 軽度の活性を示す. 10×4
- Fig. 10) ACP : 前癌性と考えられる duct papillomatosis, Fig. 4) と同一部位. 増強した活性を示す. 10×4
- Fig. 11) ACP : 泡末細胞嚢胞, 嚢胞壁基底部に中等度の活性を示し, 上皮細胞には殆んど活性を示さない. 10×4
- Fig. 12) ACP : papill. tud. carcinoma, 中等度の活性を示す. 10×4
- Fig. 13) ACP : scirrhous carcinoma, 軽度の活性を示す. 10×4
- Fig. 14) EST : 正常乳腺腺葉, 中等度の活性を示す. 10×4
- Fig. 15) EST : sclerosing adenosis, 増強した活性を示す. 10×4
- Fig. 16) EST : blunt duct adenosis, 中等度乃至高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 17) EST : duct papillomatosis, 中等度の活性を示し腺腔内面ほど増強した活性を示す. 10×4
- Fig. 18) EST : gynecomastia, 高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 19) EST : papill. tub. carcinoma, 中等度の活性を示す. 10×4
- Fig. 20) AMP : 正常乳腺腺葉, 小葉によつて活性の程度に差が認められる. 10×4
- Fig. 21) AMP : 前癌性と考えられる duct papillomatosis, 高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 22) AMP : duct papillomatosis, 中等度の活性を示す. 10×4
- Fig. 23) AMP : gynecomastia, 中等度の, 一部に高度の活性を認める. 10×4
- Fig. 24) AMP : comedocarcinoma, 腺腔中心部の壊死に陥つた部位に増強した活性を認める. 10×4
- Fig. 25) β -GI : 正常乳腺腺葉, 中等度乃至高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 26) β -GI : sclerosing adenosis, 高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 27) β -GI : sclerosing adenosis, 中等度乃至高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 28) β -GI : blunt duct adenosis, 高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 29) β -GI : 前癌性と考えられる duct papillomatosis, 高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 30) β -GI : scirrhous carcinoma の管内性に進展したと考えられる部位, 著しく高度の活性を示す. 10×4
- Fig. 31) β -GI : comedocarcinoma, 腺腔内の壊死に陥つた増強した活性を示す. 10×4
- Fig. 32) β -GI : scirrhous carcinoma, 中等度乃至高度の活性を示す. 10×4

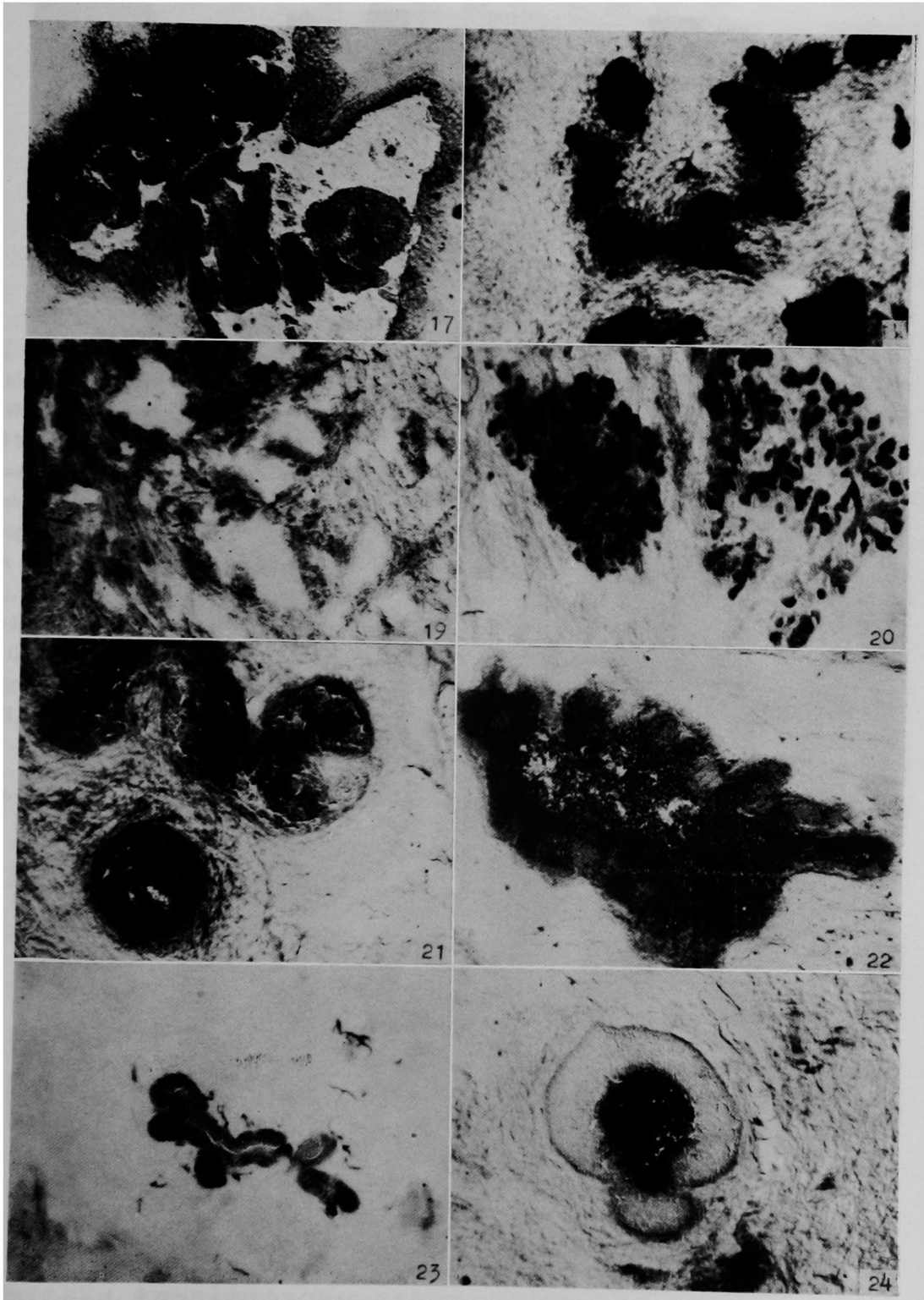
延 藤 論 文 附 図



延藤論文附図



延 藤 論 文 附 図



延 藤 論 文 附 図

