

泌 尿 器 腫 瘍 と 酵 素

IV Dimethylnitrosamine による実験的腎腫瘍における
Lactic Dehydrogenase, Alkaline Phosphatase,
Leucine Aminopeptidase, Total Acid Phosphatase
活性および LDH isozymes の変動について

広島大学医学部泌尿器科学教室（主任：仁平寛巳教授，指導：加藤篤二前教授*）

石 部 知 行

UROLOGICAL NEOPLASMS AND ENZYMES

IV. STUDIES ON THE ALTERATION OF LACTIC DEHYDROGENASE,
ALKALINE PHOSPHATASE, LEUCINE AMINOPEPTIDASE, AND
TOTAL ACID PHOSPHATASE ACTIVITIES AND LDH
ISOZYMES IN EXPERIMENTALLY INDUCED RENAL
TUMORS WITH DIMETHYLNITROSAMINE

Tomoyuki ISHIBE

*From the Department of Urology, Hiroshima University School of Medicine**(Chairman: Prof. H. Nihira, M. D.)**(Instructed by the Former Prof. T. Kato, M. D.)*

In order to induce renal tumors, Wistar strain rats were given special food containing 500 ppm of dimethylnitrosamine for 2 weeks. Renal and serum activities of lactic dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (A_lP), leucine aminopeptidase (LAP), total acid phosphatase (TAP) and LDH isozymes were determined successively.

The results are summarized as follows.

1. Both of serum and renal LDH activities markedly increased after the 7th month of the experimental period. At the same time the LDH isozymes pattern showed increases of M type and the fraction III with a decrease of H type.
2. Both of serum and renal A_lP activities slightly decreased during the latter half of the experimental period.
3. LAP activity slightly decreased in the kidney and increased in serum along with the elapse of time.
4. TAP activity showed no definite trend both in the kidney and in serum.

Dimethylnitrosamine (DMNA) が強い発癌性を有することはよく知られ，ラットその他の動物に肝癌，腎癌，肺癌などの悪性腫瘍を比較的短期間に高率に発生させるものである。近代

生活における発癌性化学物質による汚染の増加とともに発癌物質による発癌機構の解明が重要な意味をもつもので，多くの研究がなされてきた。

* 現京都大学教授

この目的のためには形態学のみならず機能面

での検討も必要であると考えられる。ラットを用い DMNA 発癌時の血清および臓器について 2, 3 の酵素活性変動を経時的に検討したのでその結果をここに報告する。

実 験 法

DMNA の投与法は城野 (1967) の方法に従った。すなわち 500 ppm の割合に DMNA (東京化成) を含有する日本 Clea 社製 CE-2 固形飼料を作製し、これを 2 週間にわたって体重 100g 前後の雄ウィスター系ラットに経口的に投与した。以後は CE-2 固形飼料のみで飼育し、経時的変動を追求する目的で 1 カ月経過するごとに 3~5 匹を 1 群として断頭瀉血後腎を取り出してその皮質を実験に供した。水は自由飲水とし比較的恒温、恒湿の下に飼育した。

酵素活性の測定法および単位は前報と同様の方法に従った。

成 績

I Lactic dehydrogenase (LDH)

A. 組織

対照の LDH 活性は $3.00\sim 5.16\times 10^5$ WU の間にあり、わずかではあるが加令とともに活性の増大を示した。DMNA 投与によりその活性は $2.40\sim 7.42\times 10^5$ WU の間に分布したが 7 カ月以後では対照より高く、特に 10 カ月以降この傾向が明らかであった。これに対し前半では逆に LDH 活性の低下がわずかながら認められ、全体の平均でみれば対照の 4.19×10^5 WU に対し、DMNA 投与群では 4.54×10^5 WU と実験腫瘍群でやや高いといった成績であった。

B. 血清

対照群では $3.9\sim 7.1\times 10^2$ WU に分布し加令に伴う活性の増加は明らかでなく、その平均は 5.7×10^2 WU を示した。DMNA 投与群では $3.8\sim 15.3\times 10^2$ WU であって 3 カ月以降対照より高い活性を示し、特に実験後半でこの傾向が明らかにみられ、また平均でも 7.5×10^2 WU と対照より高い活性を示していた。

II LDH isozymes

陰極側の分離が悪いので M 型および H 型に分けて検討した。

A. 組織

対照群では M 型が 9.4~14.9% にあり、加令とともに増加の傾向にあってその平均は 11.2% を示した。これに対し DMNA 投与群では 8.6~26.8% に分布したが、実験開始 3 カ月以降その増加は著明であった。第 III 分画は対照群では 21.3~29.4% にあり、その平均は

24.9% で一定の変動を示さなかったが、DMNA 投与群では 13.2~45.1% に分布し、実験開始 8 カ月以降ではその占める割合の増加が著明でその平均値においても 30.0% と増加していた。H 型は対照は 60.9~68.8% を示し、その平均は 63.9% と加令に伴ってやや減少傾向を認めたが、DMNA 投与群では 72.4~32.3% と広く分布し、平均は 51.3% で実験日時の経過とともに減少が明らかにみられた。

B. 血清

対照は M 型が 84.0~87.7% でその平均は 85.5% を示し、加令に伴う変化はみられなかった。DMNA 投与群では 79.7~91.1% と M 型の占める割合の変動は対照に比し大であったが、その平均は 85.5% と同値を示した。第 III 分画についてみても対照群と実験群の間に平均値では大差を示さなかったが、その分布にはばらつきが大きかった。H 型についても同様の傾向がみられたことから、DMNA 投与群では血清 LDH isozymes の分画比が対照群に比較するとかなり変動するが一定の傾向はないといえる成績を得た。

III Alkaline Phosphatase (A&P)

A. 組織

対照は $2.08\sim 4.12\times 10^3$ KAU に分布しその平均は 3.05×10^3 KAU であったが、加令により増加する傾向を認めた。これに対し DMNA 投与群では $2.76\sim 3.73\times 10^3$ KAU を示してその平均は 3.12×10^3 KAU であったことは、加令に伴う増加が認められず、したがって DMNA 投与によりやや減少するといえる成績であった。

B. 血清

対照は $3.8\sim 6.1$ KAU に分布してその平均は 5.0 KAU となり、加令に伴う変化は明らかでなかった。DMNA 投与群では $2.8\sim 9.5$ KAU に分布してその平均は 5.1 KAU と対照と変りはないが、同一時期における両群を比較すると DMNA 投与群では実験期間の前半にやや高く、後半でやや低い傾向を認めたが、有意の変動とは考えられなかった。

IV Leucine Aminopeptidase (LAP)

A. 組織

対照は $7.60\sim 13.13\times 10^3$ GRU に分布してその平均は 10.25×10^3 GRU であり、加令に伴う活性の増加がみられた。DMNA 投与群では $8.37\sim 11.32\times 10^3$ GRU でその増加割合は対照に比し小であった。このことは腫瘍の発育に伴って組織内 LAP 活性の低下がみられたといえる成績である。

B. 血清

対照は $1.8\sim 2.8\times 10^2$ GRU に分布してその平均は

Table 1 Enzyme activities of the kidney along with development.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^5$ wu	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	AlP $\times 10^3$	LAP $\times 10^3$	TAP $\times 10^3$
1	3.05	9.8	22.6	67.6	2.37	7.60	1.05
2	3.00	9.6	24.8	65.6	2.19	7.81	1.12
3	3.23	9.9	21.3	68.8	2.08	6.64	1.44
4	3.48	9.6	22.2	68.2	2.16	8.33	1.52
5	3.92	10.7	27.6	61.7	2.14	9.31	1.47
6	3.98	10.1	24.0	65.9	2.95	9.19	1.50
7	4.59	10.8	27.4	61.8	3.32	9.88	1.65
8	4.78	9.8	29.3	60.9	3.44	12.27	1.59
9	4.85	9.4	29.4	61.2	3.72	12.59	1.34
10	5.16	13.3	25.6	61.1	4.12	12.26	1.69
11	5.11	14.4	22.0	63.6	4.11	13.13	1.09
12	5.08	14.9	23.1	62.0	3.99	13.04	1.34
Means	4.19	11.2	24.9	63.9	3.05	10.25	1.40

Table 2 Enzyme activities of the serum along with development.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^2$ wu	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	AlP KAU	LAP $\times 10^2$ GRU	TAP KAU
1	5.5	85.4	4.2	10.4	5.0	2.3	12.4
2	7.1	84.8	5.4	9.8	4.2	1.9	11.8
3	6.1	85.2	5.3	9.5	5.0	1.8	9.8
4	4.8	84.0	6.4	9.6	4.8	1.8	11.0
5	5.1	84.2	6.3	9.5	5.8	1.8	11.8
6	3.9	86.4	4.4	9.2	4.7	1.9	11.5
7	5.8	85.1	6.8	8.1	4.9	2.4	10.9
8	5.1	85.3	7.4	7.3	6.1	2.6	9.4
9	4.7	87.7	4.7	7.6	4.1	2.7	9.8
10	6.8	87.1	5.5	7.4	3.8	2.5	10.0
11	6.9	85.6	6.5	7.9	5.7	2.8	10.4
12	6.3	85.2	6.8	8.0	5.7	2.7	10.3
Means	5.7	85.5	5.8	8.7	5.0	2.3	10.8

Table 3 Enzyme activities of the kidney during dimethylnitrosamine carcinogenesis.

Treatment Months	LDH, total $\times 10^5$ wu	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	AlP $\times 10^3$ KAU	LAP $\times 10^3$ GRU	TAP $\times 10^3$ KAU
1	2.53	8.6	19.0	72.4	2.89	8.53	0.93
2	2.40	9.0	22.3	68.7	2.76	8.37	0.84
3	2.83	16.0	13.2	70.8	2.84	8.98	1.23
4	2.88	15.5	23.2	61.3	2.85	8.83	1.62
5	3.62	15.8	32.8	51.4	2.82	8.37	1.32
6	3.38	14.9	22.7	62.8	3.50	8.84	1.84
7	5.25	21.3	21.7	57.0	2.97	11.32	1.45
8	4.94	20.1	42.5	37.4	3.73	11.04	1.47
9	5.17	27.9	39.8	37.3	3.23	10.48	1.20
10	6.64	22.4	45.1	32.5	2.96	10.94	1.01
11	7.38	25.7	40.1	34.2	3.51	11.24	1.50
12	7.42	26.8	38.4	34.8	3.37	10.90	1.65
Means	4.54	18.7	30.0	51.3	3.12	9.82	1.34

Table 4 Enzyme activities of the serum during dimethylnitrosamine carcinogenesis.

Treatment Months	LDH, total ×10 ² WU	LDH-M %	LDH-III %	LDH-H %	ALP KAU	LAP ×10 ² GRU	TAP KAU
1	3.8	80.3	8.1	11.6	9.5	3.2	14.2
2	6.4	80.9	6.7	12.4	6.2	2.5	14.5
3	8.2	82.6	8.9	8.5	4.3	2.1	11.1
4	5.3	79.7	9.4	10.9	6.4	2.3	9.3
5	5.7	81.8	6.2	12.0	7.9	2.7	13.8
6	4.9	82.4	9.4	8.2	5.5	3.4	12.2
7	7.3	89.8	3.6	6.6	2.8	2.0	9.0
8	6.0	88.0	2.6	9.4	3.7	3.0	9.8
9	7.5	90.7	3.8	5.5	4.4	3.5	11.1
10	9.2	91.1	2.9	6.0	4.5	5.2	10.4
11	10.9	89.2	4.2	6.6	3.0	5.9	9.1
12	15.3	88.9	5.1	6.0	3.3	5.9	8.0
Means	7.5	85.5	5.9	8.6	5.1	3.5	11.0

2.3×10² GRU であり、加令に伴う変化は明らかではなかった。DMNA 投与群は 2.0~5.9×10² GRU に分布し、その平均は 3.5×10² GRU を示した。そして腫瘍群は7カ月の例を除けばいずれも対照より高い活性を示しており、特に実験後半でその傾向が明らかであった。

V Total Acid Phosphatase (TAP)

A. 組織

対照は 1.05~1.69 KAU に分布し加令に伴う増加は著明でなく、その平均は 1.40 KAU を示した。DMNA 投与群では 0.84~1.84 KAU にあって実験期間に伴う変化は対照と大差を示さなかったが、その平均は 1.34 KAU で対照に比しやや低い活性を示すものが多かった。

B. 血清

対照は 9.4~12.4 KAU に分布してその平均は 10.8 KAU であり、加令に伴う変化は明らかではないがやや低下する傾向を認めた。これに対し DMNA 投与群では 8.0~14.5 KAU に分布し、飼育期間の延長に伴ってやや減少する傾向を認めたがその平均をとれば 11.0 KAU で対照と同様の値を示した。

考 按

女性ホルモン, DMNA, methylcholanthrene, thorotorast, 酢酸鉛などの化学物質によって実験的に腎腫瘍を発生せしめ得ることがすでに知られ、多くの動物実験が行なわれてきた。このうち DMNA については、Zak が投与後 80 日と述べているごとく比較的早い時期に腎に腫瘍性変化を認める。そしてその頻度は伊藤、城野

などが毎日 500 ppm, 1 週間の連続投与によって 6 カ月後には 79.5% に腎腫瘍の発生がみられると報告しているの、著者はこの方法を追試して腎腫瘍の発生に伴う酵素学的変化を追究した。

あの種の疾病に際しその経過とともに血清中酵素活性の変動することはよく知られ、その原因としては前述のごとく組織内での酵素産生の増加、組織崩壊に基く酵素の release, 細胞透過性の増加、血中よりの消失時間の延長などがあげられている。DMNA 投与による腎腫瘍ラット尿についての酵素学的検討を Murphy, Schmidt などが行なっているが、実験腫瘍群で特に高い活性を示すわけではなく、尿中 LDH 活性の増加は非特異性炎症の合併した場合にもみられ両者の鑑別は LDH 活性のみからでは不可能であるとした。しかし血中 erythropoietin level は腫瘍がある場合その圧迫による ischemia ないし hypertension が原因で高くなると述べている。

腎組織内の LDH 活性はその機能と関連があって、集合管に比較的多いがここだけではなくさらに広範囲に分布しており、Stolk は組織化学的に腎腫瘍で高いと報告している。腎組織 LDH isozymes については Wroblewski や Vesell などの研究があり、皮質、髄質で異なったパターンを示すことも小林などによって報告されている。この両者の差に対して ontogenic

な説明がなされ、metabolic condition に対する適応の差がこのような結果をもたらすものであるとされてきた。また腫瘍組織においては LDH isozymes pattern が胎児型になることも、Webber が述べるように組織の適応機構の障害の結果であるとされている。

以上の点から著者の実験成績をみると、腫瘍を有するラットでの血清 LDH 活性は7カ月以後明らかに増加の傾向を示した。このような事実は腎組織においても同様であり、血清中 LDH 活性の増加の大部分が腫瘍組織に由来するものと考えられる。しかし isozymes の分画比では腫瘍組織において7カ月以後にH型の著明な減少がみられるとともにM型の増加、第Ⅲ分画の著明な増加がみられたのに対し、血清では実験期間の前半低かったM型が後半やや増加の傾向を示したとはいえ、有意の変化は認められなかった。これは Kampschmidt, Burgess などが血清と組織の LDH isozymes pattern に類似性ありとした事実と反する成績であるが、腫瘍組織での LDH isozymes pattern は Starkweather, Pfeiderer の述べるごとく胎生型への移行がみられ、また Magee が述べるように早期、すなわち若いラットに発生する腫瘍がより悪性であるという形態学的所見との一致はみられず、Zak の成績と同様著者の場合も長期間飼育した例に組織上悪性のものを多く認めたが、これは投与量、使用する動物などの実験条件の差によるものと考えられる。著者の場合最初に腫瘍を肉眼的にみとめたのは5カ月であり、以後順次悪性となるにつれて LDH 活性の増大、LDH isozymes 分画比の変動が強く出たことになり、Zak の説を支持する成績かと思われる。また壊死の関与については、Kampschmidt はほとんどこれが見られないが感染がある場合は clearance rate に影響して LDH 血清活性が高くなるとしているが、著者の実験では腫瘍組織に感染を認めた例はなく、また壊死部を除いて測定したのでこのような面からの検討の要はないと考える。

腎における ALP は HCO_3^- の再吸収、 NH_4^+ の形成などとともに glucose の再吸収にも関係

し、hexokinase から phosphorylated glucose を脱リン酸する作用を有するといわれているが、Pollak が phlorizin 投与犬の腎を組織化学的に検討した成績では近位尿管内の ALP に変化がみられなかったとした。しかし lysosome 中に存在することからみて、尿管機能に何らかの意義を有するものと考えられる。そして Pollak は諸種疾患における近位尿管中 ALP 活性の関係を検討した結果、実験的 nephrosis における所見と臨床の所見は一致せず、形態学的な変化、治療などと酵素活性値の間に何らの関係もみられなかったとした。これに対して Mori は実験腫瘍における ALP 活性を組織化学的に検討し、炎症を伴った上皮に多いことを明らかにした。著者の成績をみると、腎皮質全体としての活性であるが実験後半では組織 ALP は Mori などに反して低くなっており、血清でもやや減少の傾向にあって、Pollak などのいうように一定した成績を示さないといえよう。

LAP は proteolytic enzyme として peptide を分解して遊離アミノ酸である L-leucine をつくり、さらに L-leucyl- β -naphthylamide となり β -naphthylamine に分解される。LAP は Nachlas などの組織化学的な検索によると近位尿管内腔に接した部分に多いとされ、また電子伝達系に関係があるといわれている。したがってこの部分の障害で尿中に LAP が多量に排泄され、診断に有用であるとされている。また血中への移行も当然考えられるところであるが、血中での診断的価値はないとする者も多い。Gomori は腎癌組織で陽性となるとし、Burstone は腫瘍に接した結合織に多くみられるといい、Monis にも LAP は腫瘍細胞に含まれずに間質に多くあることを報告した。しかし Glenner は悪性度の強い腫瘍の場合活性が強くなるとし、これは invasive character として間質の proteolytic destruction の強さに関係すると説明している。著者の成績では実験の後半に組織内 LAP は減少の傾向にあり、逆に血清では増加の傾向を認めた。このことは今後の検討が必要であるとしても血中への移行があり得ると考えられる成績である。

慢性腎不全に際し NPN の増加とともに血清 TAP 活性の上昇があるとされてきたが, Truss は尿毒症の場合高くないと報告している. 腎腫瘍についての検討は少ないが, 今までの報告では腎での局在性はなく腫瘍診断の価値もないとされてきたところであるが, 著者の成績も腫瘍, 血清いずれにおいても一定の傾向を認めなかった.

ところで DMNA 投与によって肝などにも同時に腫瘍が発生するから, これら臓器の血清酵素活性への関与も無視できない. この点に関しては, 本実験では肉眼的に明らかな肝腫瘍を有する症例を省いたのみにとどまったが, Magee らが腎腫瘍をみとめた場合は肝腫瘍の発生を伴わなかったとしているように, 著者の実験においても肝の肉眼的所見としては萎縮性の変化が大半を占めた. DMNA 投与により発生する腫瘍の組織型については Zak, Murphy は典型的には腺癌であるとしたが, Magee, Yang, 城野などは尿細管由来と間質由来がみられ, おのおのに良性, 悪性のものがあると報告した. しかし本実験ではこれらを考慮することなく 3 匹以上の平均でもって実験を行なったので, この点についての検討は今後必要であると考え. また RES の血清酵素活性に関する報告として Wakim は各種酵素ないしその isozymes は異なる割合で clear されるとしたが, この点についても今後の検討が必要であると考え.

結 語

腎腫瘍発生の目的でウイスター系ラットに対し 500 ppm の dimethylnitrosamine を含む飼料を 2 週間投与し, 以後経時的に腎および血清 LDH, LDH isozymes, A/P, LAP, TAP 活性を検討して次の結果を得た.

1. LDH 活性は血清, 臓器ともに実験期間の 7 カ月以降著明に増加し, 同時に isozymes pattern では M 型, 第三分画の増加, H 型の減少がみられた,
2. A/P 活性は血清, 臓器ともに実験期間の後半でやや減少を認めた.
3. LAP 活性は実験期間とともに臓器では

やや低下し, 血清では逆に増加した.

4. TAP 活性は臓器, 血清ともに一定の傾向をみとめなかった.

(終るにあたり恩師加藤前教授の御指導ならびに仁平教授の御校閲を感謝致します. また DMNA 投与方法について御教示いただいた 奈良医大 城野博士に感謝致します.)

本論文の要旨は 1967 年 3 月, 第 55 回日本泌尿器科学会総会において発表した.)

文 献

- 1) Burgess, E. A. & B. Sylvén : *Cancer Res.*, **23** : 713, 1963.
- 2) Burstone, M. S. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **16** : 1149, 1956.
- 3) Glenner, C. G., M. S. Burstone & D. B. Meyer : *J. Nat. Cancer Inst.*, **23** : 857, 1959.
- 4) Gomori, G. : *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, **87** : 559, 1954.
- 5) 城野逸夫 : *日泌尿会誌*, **58** : 17, 1967.
- 6) Kampschmidt, R. F., H. F. Upchurch & H. L. Johnson : *Cancer Res.*, **26** : 237, 1966.
- 7) 小林快三・加藤克巳・前田憲志・今井常喜 : *日腎誌*, **9** : 489, 1967.
- 8) Monis, B., M. M. Nachlas & A. M. Seligman : *Cancer*, **12** : 1238, 1959.
- 9) Murphy, G. P., E. A. Mirand, G. S. Johnston, J. D. Schmidt & W. W. Scott : *Invest. Urol.*, **4** : 39, 1966.
- 10) Schmidt, J. D. & G. P. Murphy : *Invest. Urol.*, **4** : 57, 1966.
- 11) Stolk, A. : *Naturwiss.*, **47** : 188, 1960.
- 12) Vesell, E. S. & A. G. Bearn : *J. Clin. Invest.*, **40** : 581, 1961.
- 13) Wakim, K. G. & G. A. Fleisher : *J. Lab. & Clin. Med.*, **61** : 107, 1963.
- 14) Webber, G. : *Adv. Cancer Res.*, **6** : 403, 1961.
- 15) Wroblewski, F. & K. F. Gregory : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **94** : 912, 1961.
- 16) Yang, Y. H. : *Urol. Int.*, **21** : 229, 1966.
- 17) Zak, F. G., J. H. Holzner, E. J. Singer & H. Popper : *Cancer Res.*, **20** : 96, 1960.

(1968年2月6日受付)