

アミラーゼ産生肺癌の研究

京都大学胸部疾患研究所 胸部外科

福田 治男, 伊藤 元彦

はじめに

高アミラーゼ血症を伴う肺癌は、1951年の Weiss の報告以来、これまでに多数あるが¹⁻⁶⁾、このような症例では、膵や唾液腺に疾患を認めないことや、腫瘍ホモジネート中に高いアミラーゼ活性が認められることなどから、本腫瘍では、腫瘍細胞自身がアミラーゼを産生していると考えられている。

また、このような症例のほとんどが腺癌であることや、isozyme pattern が唾液腺型を示すことなどは、この種の肺癌の発生母地を考える上で、重要な手がかりとなりうる。

ところで、このようなアミラーゼを肺癌細胞自身が産生しているか否か、また、正常な気管支肺胞系に、アミラーゼ産生細胞が存在しうるか否かは、重要な問題であるにも拘わらず、アミラーゼの局在を酵素組織学的に証明することが困難であったために⁷⁾、確実な証拠が得られていないのが現状である。そこで、アミラーゼ産生肺癌について、腫瘍細胞内のアミラーゼの局在を証明し、さらにその発生母地を究明する目的で、次に述べる研究を行なった。

I. 生化学的検討

A) 肺癌組織中のアミラーゼ活性

アミラーゼ活性についての検討を行なった肺腫瘍の材料は、肺切除により得た、腺癌 8 例、扁平上皮癌 7 例、未分化癌 3 例、腺様嚢胞癌 1 例の腫瘍組織であり、対照としては、肺切除時に得た成人の気管支と肺実質、および剖検時に

得た肝、膵などを用いた。

組織内アミラーゼ活性の測定は、blue starch 法によった。すなわち、腫瘍をホモジネートしたのち、その上清 0.1 ml に対して蒸溜水 4 ml を加え 37°C、5 分間静置後、blue starch polymer 錠 (Pharmacia Lab.) を加え、37°C 30 分間反応、反応後 0.5 N-NaOH 1 ml を加えて反応を停止させ、3000 回転にて 10 分間遠沈したのち、その上清の 620 m μ における吸光度からアミラーゼ活性を求めた。

結果は Fig. 1 はの通りで、対照としての正常肺や気管支よりもあきらかに高いアミラーゼ活性を示した肺癌は 2 例で、2 例とも腺癌であり、各々 2040, 5100 Somogyi 単位を示した。また、気管支組織中のアミラーゼ活性の方が、肺実質のそれよりも高値を示した。

B) 肺癌由来のアミラーゼアイソザイム

高アミラーゼ血症を伴った患者 2 例について、肺癌由来のアミラーゼアイソザイムパターンを Davies⁸⁾ らの方法に準じて検討した。

材料は高アミラーゼ血症を示した腺癌症例の腫瘍組織と、高アミラーゼ血症を示した癌性胸膜炎患者の胸水である。

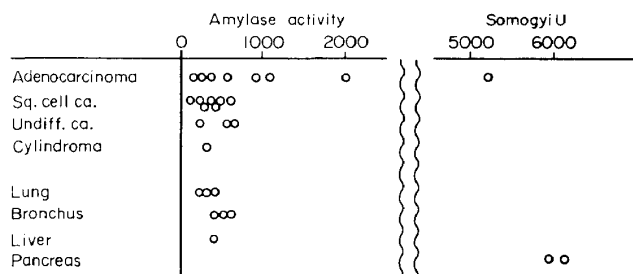


Fig. 1 各種組織中の Amylase 活性

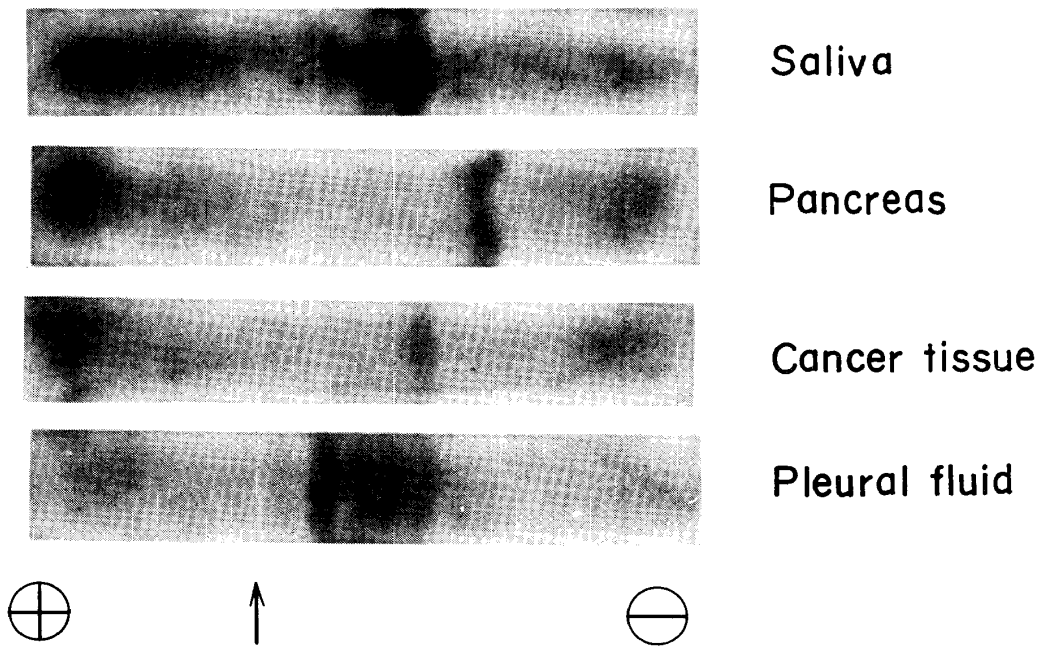


Fig. 2 アミラーゼ, アイソザイム

結果は Fig. 2 に示す通りである。すなわち、セルローズ、アセテート膜上で泳動を行なったのち、blue starch を含む agar plate 上で反応させると、唾液アミラーゼは3本、膵アミラーゼは1本の活性帯にわかれた。

癌組織例は1本の band を示し、唾液アミラ

ーゼの最も陰極側のものと一致した。癌性胸水例は5本の band を示し、そのうち3本は唾液アミラーゼと一致しているが、残る2本はより陽極側にみられた。

2例とも明らかに膵アミラーゼとはその易動度に異にしていた。

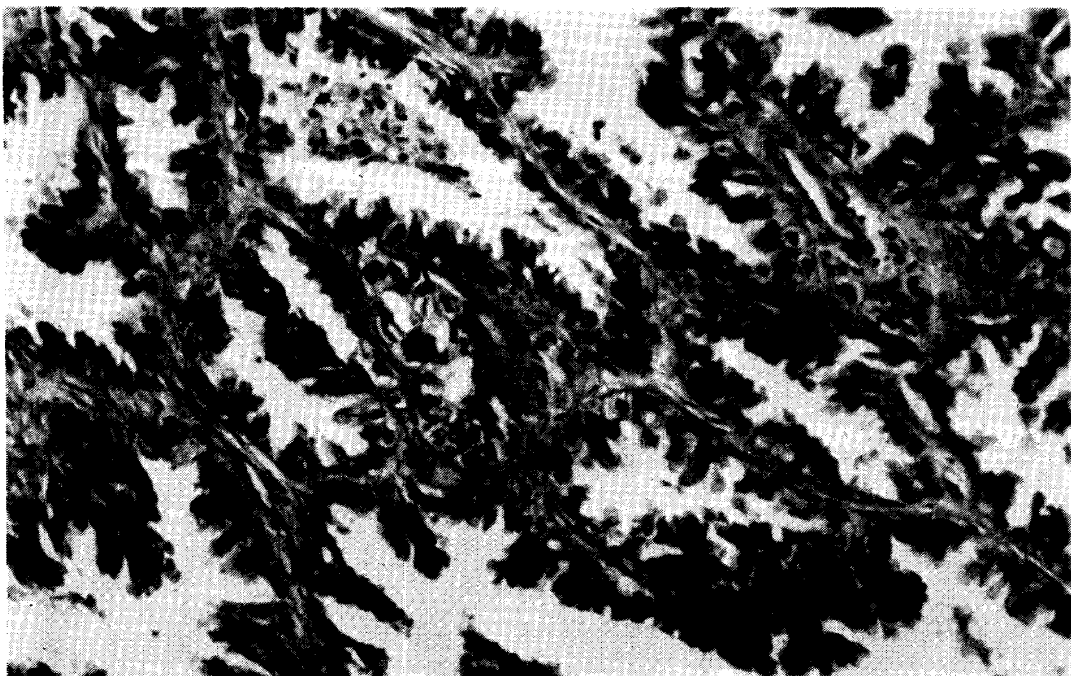


Fig. 3

II. 組織学的検討

A) アミラーゼ産生肺癌の光顕所見
組織内アミラーゼ活性の高かった2症例について、H. E. 染色, PSA 染色, alcian blue 染

色, toluidine blue metachromasia による検討を行なった。

30才男子にみられた末梢型腺癌 (Fig. 3) で, 5100 Somogyi 単位のアミラーゼ活性を示した症例は H.E. 染色でみると, Papillary adeno-

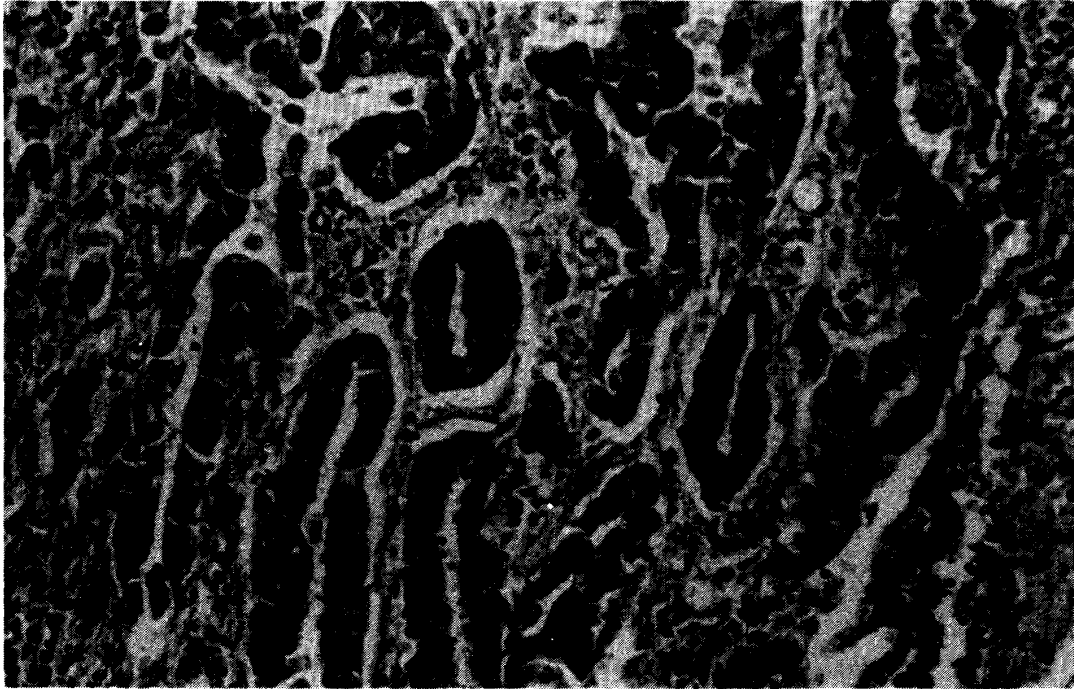


Fig. 4

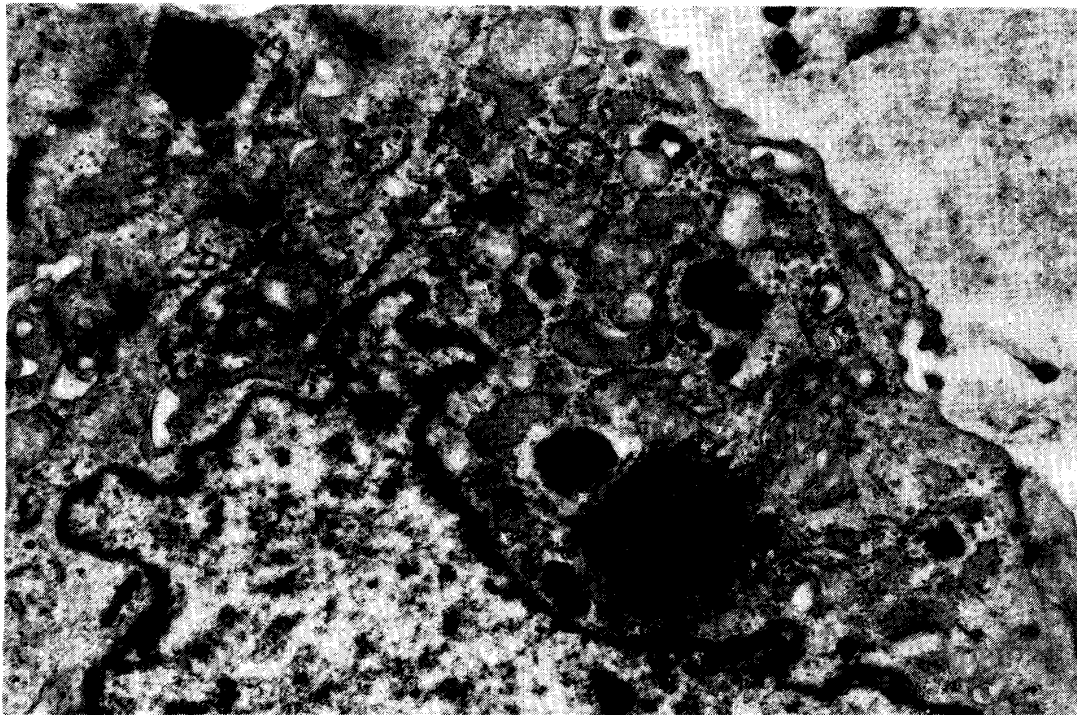


Fig. 5

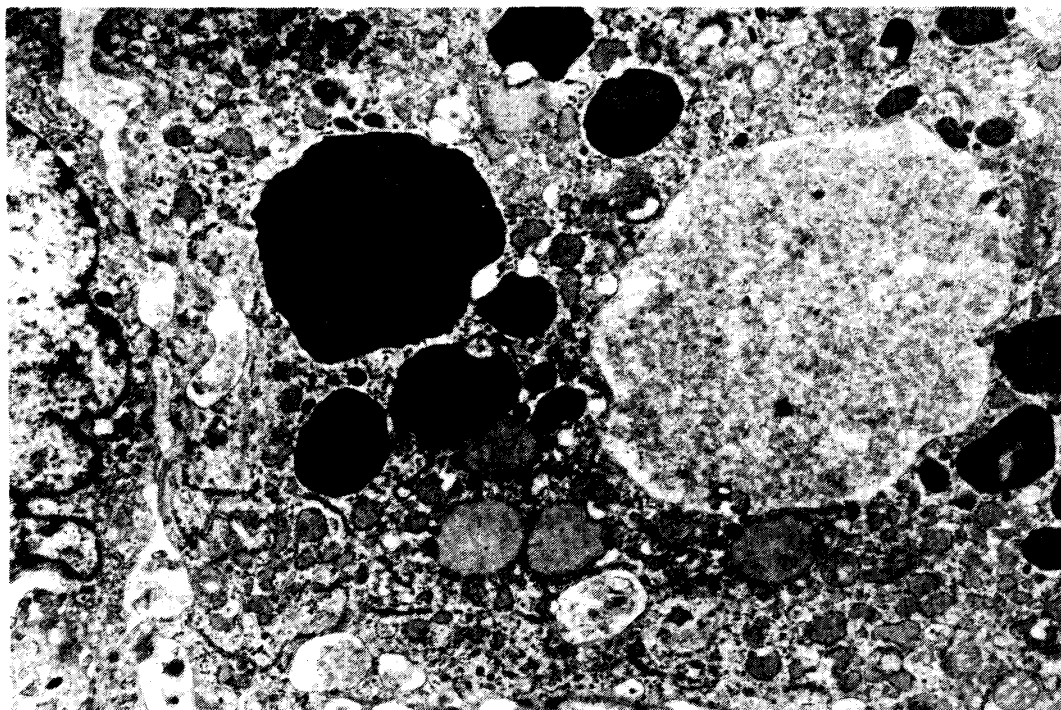


Fig. 6

carcinoma である。PAS 染色や alcian blue 染色を行なってみると両染色とも腫瘍細胞における染色性はきわめて弱い。

高アミラーゼ活性を示した別の 1 例 (Fig. 4) は tubular adenocarcinoma であり、PAS, alcian blue 両染色とも、前記症例と同じく染色性は極めて弱い。

これらの所見は、癌細胞内に含まれている多糖類の一部が、癌細胞内に内在するアミラーゼによって消化されている可能性を示すものと考えられる。

尚 toluidine blue による metachromasia を示す症例はみられなかった。

B) アミラーゼ産生肺癌の電顕所見

高アミラーゼ血症を示した肺癌症例を電顕的にみると、腫瘍細胞内には free の ribosome や粗面小胞体が豊富にみとめられ、粗面小胞体の一部は cisterna 状に拡大し、その中に分泌物を入れている所見がみられる。

典型的な部分では、癌細胞の中に 1 枚の限界膜を有し、その内容に種々の density をもった均質無構造な物質があり、その物質により粗面小胞体が圧排されている像がみられる (Fig. 5,

6)。

これらの所見は、正常の膵や唾液腺の腺房細胞における zymogen 顆粒の分泌サイクルにみられる諸所見と類似している^{10,11)}。すなわち、腫瘍細胞内でアミラーゼが産生されていると考えても矛盾しない所見である。

III. 免疫組織化学的所見

以上の検討結果から考えて、腫瘍細胞自身がアミラーゼを産生することは、ほぼ確実であろうと考えられる。

そこで、腫瘍細胞内のアミラーゼの存在を直接確認し、さらにその発生母地を究明する目的で、正常ヒト唾液よりアミラーゼを抽出精製し、家兎を用いて抗血清を作製し、肺癌組織および正常気管支肺胞系におけるアミラーゼの局在について、免疫組織化学的に検討を行なった。

A) アミラーゼの精製と抗血清の検定

(i) アミラーゼの精製

アミラーゼは Mesteccky らの方法¹²⁾により精製した。すなわち、正常ヒト唾液をみつめて遠沈したのち、その上清を凍結乾燥し、蒸留水溶

Sephadex G-200 Fractionation

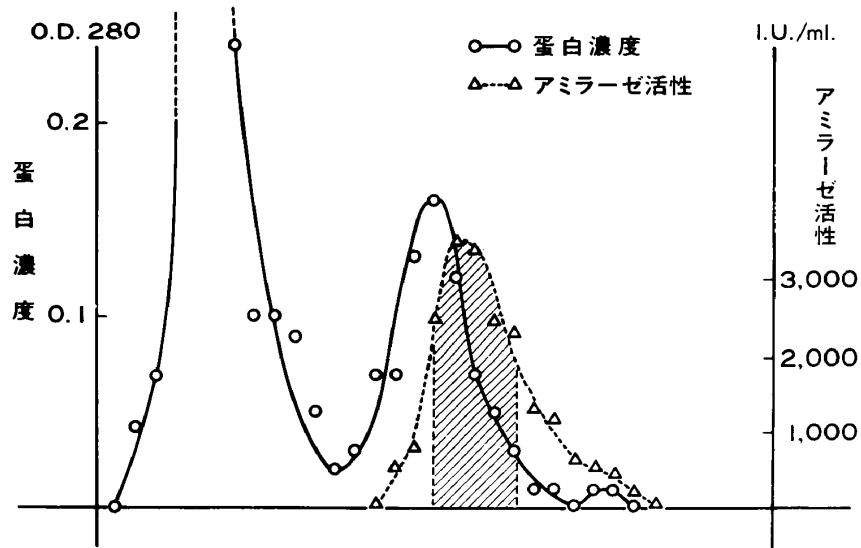


Fig. 7

Sephadex G-200 Re-fractionation

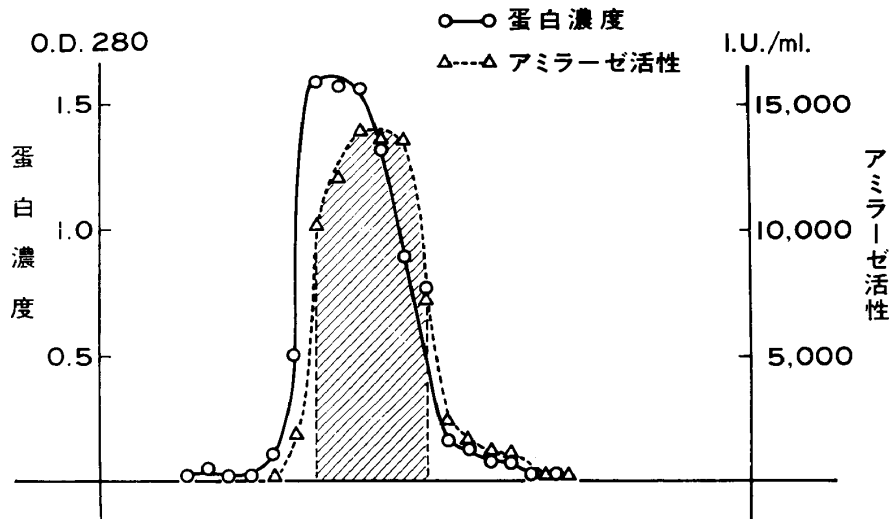


Fig. 8

解, ついで 0.14 N-NaCl 溶液にて一昼夜透析したのち, 0.4%リバノールを加える。これを 8000 g, 1 時間遠沈後沈渣を得, 蒸留水に溶解する。これに活性炭を加えてリバノールを吸着したのち, 95%エタノールを加えて再度遠沈後, 沈渣を蒸留水に溶解する。この溶解を CO₂ で飽和した 1%重炭酸アンモニウム溶液を緩衝液として, Sephadex G-200 にて分画し, アミラーゼ活性がピークを示す分画をとり (Fig.

7), それを再度 Sephadex G-200 にて分画したものを精製アミラーゼとした (Fig. 8)。

(ii) 抗血清の作成

この精製アミラーゼを Freund の complete adjuvant と共に家兎 foot pad に注射し, 4 週後に booster 注射を行なって, 抗ヒトアミラーゼ家兎抗血清を得た。

(iii) 抗血清の検定

抗血清は, Ouchterlony の double gel diffusion

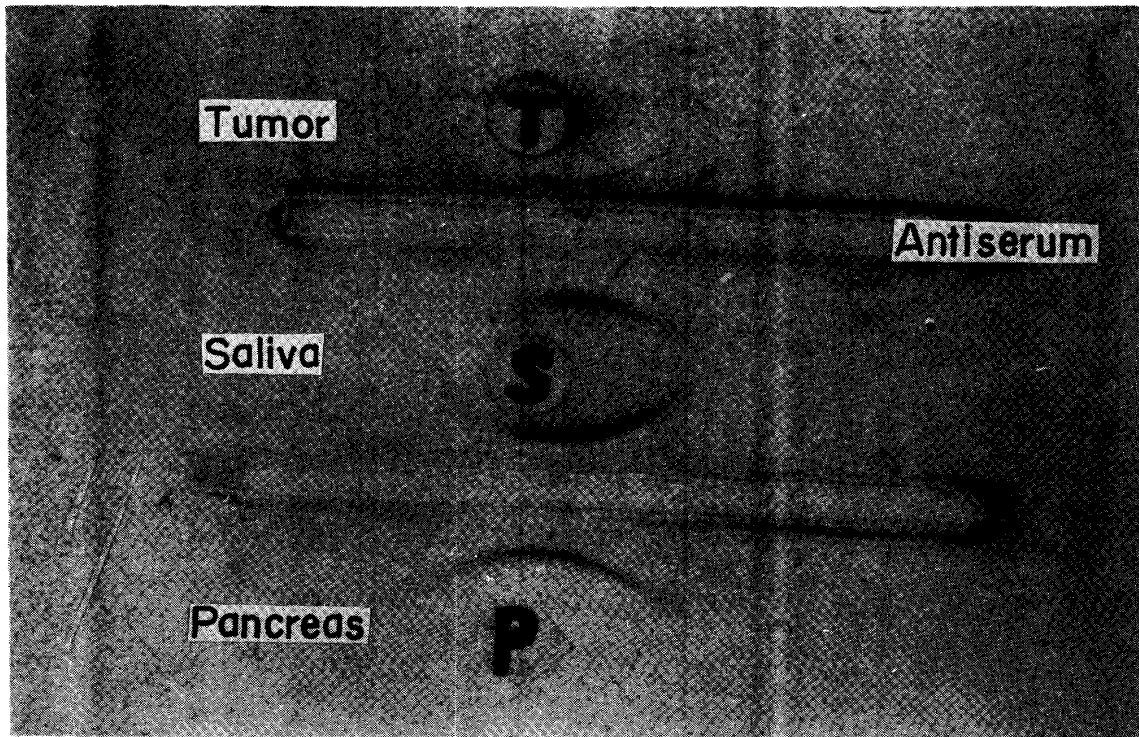


Fig. 9

法, immunoelectrophoresis, および吸収試験により検定を行なった。

Immunoelectrophoresis (Fig. 9) では, 特異的な抗血清の得られていることがわかる。また, 唾液アミラーゼと腫瘍アミラーゼは同一位置に泳動され, 膵アミラーゼとは易動度は異なるが, 抗原性に共通部分が存在していることがわかる^{13,14)}。

さらに, 抗アミラーゼ血清の倍数希釈列を作り, これとアミラーゼを反応させたのち, 残存するアミラーゼ活性を測定してみると, この抗血清がアミラーゼ活性を阻害していることがわかり, 明らかに dose response を示している。

以上のこととら, この抗血清はアミラーゼに対する特異性を有するものと考えられる。

B) 免疫組織化学的所見

この抗血清に型の如く蛍光色素 F.I.T.C. を標識した。

正常ヒト唾液腺, 肺癌組織や, 正常気管支, 肺組織は95%冷エタノールにて固定後, 軟パラフィンにて包埋し 5μ の切片とした。

この切片を, F.I.T.C. 標識抗アミラーゼ家

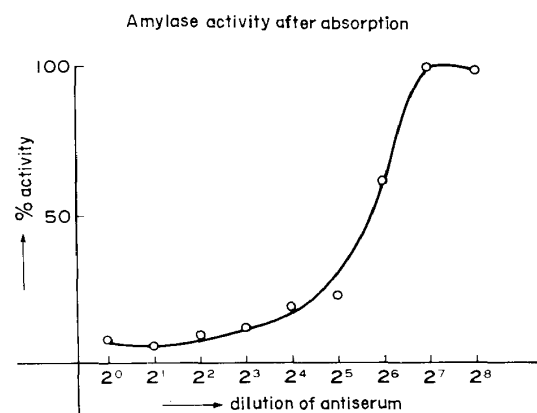


Fig. 10

兎抗血清による蛍光抗体法直接法により染色し, また抗アミラーゼ家兎抗血清とペルオキシダーゼ標識抗家兎 γ -globulin 山羊血清を用いた酵素抗体法によっても検討した。酵素抗体法の場合は counter stain に alcian blue を用いた。

(i) 正常ヒト唾液腺における免疫組織化学的所見

唾液腺では腺房細胞や導管細胞の一部にアミラーゼの特異蛍光がみられる。特に腺房細胞では管腔にむかうにしたがって強い蛍光がみられ

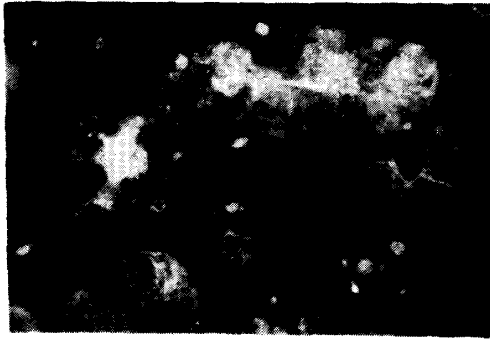


Fig. 11

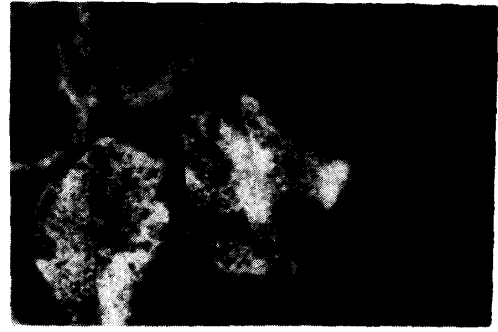


Fig. 13



Fig. 12



Fig. 14



Fig. 15

zymogen 顆粒に相当するものと思われる。腺房細胞相互間においても、螢光の強弱がみられる。これらの所見は、文献的に報告のある通りである^{15,16)}。

(ii) 肺癌組織における免疫組織化学的所見
高アミラーゼ血症を示した肺腺癌症例の組織では、癌胞巣、とくに管腔側に強いアミラーゼの特異螢光がみられた。

しかし、このような強い螢光は、すべての細胞にみられるわけではなく、螢光を示す細胞は散在性であり、その数も少なかった (Fig. 12)。

(iii) 発生母地に関する検討

a. 成人の気管支肺胞系

気管支腺細胞内にアミラーゼの特異螢光が認められる。腺房によっては、全く特異螢光のみられない細胞も存在する。螢光を示すものは形態からみて漿液腺細胞と考えられる (Fig. 13)。

酵素抗体法を行ない alcian blue による counter stain を行なっても、アミラーゼ陽性細胞は、alcian blue に染まる細胞とは明らかに区別され、漿液腺細胞と考えられる。

尚、正常気管支上皮や肺泡領域の細胞にはアミラーゼ陽性細胞は見出されなかった。

b. 胎児の気管支肺胞系

気管支腺細胞にアミラーゼの特異螢光がみられ、気管支上皮には螢光がみられない。

特異螢光を示す細胞は形態からみて漿液腺細胞と思われるが、成人に比し、螢光を有する細胞は多く、また螢光の程度も強いようである (Fig. 14)。

胎児の肺泡領域には、成人肺ではみられなかったアミラーゼの特異螢光が散在性が認められる (Fig. 15)。ただし、このような細胞がどの細胞の母細胞たりうるかについては不明である。

考 按

各種の肺疾患で、臨床的に高アミラーゼ血症を示すことがあることは、古くからよく知られており、肺癌についても、Weiss の報告以来、多数の症例が報告されている。

アミラーゼ産生肺癌については、その癌組織中のアミラーゼ活性が高いことや、電顕像で正常膵や正常唾液腺にみられる zymogen 顆粒に類似した顆粒をみることなどにより、癌細胞自身がアミラーゼを産生するのであらうと従来から推定されていた。

また、その産生部位は不明ではあるが、気管支分泌液中にアミラーゼの存在することも古くから報告されていた¹⁷⁾。

しかし、アミラーゼを酵素組織化学的に証明することが困難であることから、気管支肺胞系におけるアミラーゼ産生の直接の証拠は得られていないし、またアミラーゼ産生肺癌の発生母地について言及している報告もみられない。

そこで、アミラーゼ産生肺癌について、癌細胞内におけるアミラーゼの証明と、その発生母地の究明を目的として、肺癌組織や正常の気管支肺胞系において、アミラーゼの免疫組織化学的研究を行なった。

その結果、アミラーゼ産生肺癌の癌細胞内にアミラーゼが存在することを確認し、さらに、胎児と成人の気管支漿液腺細胞と、胎児肺胞領域の一部の細胞に、アミラーゼの特異蛍光をみとめた。

このことは、アミラーゼ産生肺癌が、気管支腺と末梢肺領域の両者から発生しうることを示していると考えられ、これまでのアミラーゼ産生肺癌の報告が、中心型の腺癌のみならず、末梢型の腺癌にもみられることをよく説明するものである。

尚、胎児肺胞領域にみとめられたアミラーゼ保有細胞が、どのような細胞の母細胞であるのについては、今後尚検討すべき課題である。

以上のわれわれの実験結果は、正常気管支肺胞系における、アミラーゼ産生能を有する細胞が、癌化によって顕在化したものであること、

すなわち、アミラーゼ産生肺癌のアミラーゼ産生能は、その母組織が本来持っている機能であって、“ectopic”ではないことを示すものと思われる。肺癌のセロトニンや ACTH 産生も“ectopic”ではないとされつつあることと規を一にするものであらう¹⁸⁾。

アミラーゼのアイソザイムパターンについては、検討しえたのは2例のみであるが、1例は1本のみの活性帯を示し、唾液腺型の1本と一致した。

一方、2例目は5本の活性帯にわかれ、3本は唾液腺由来の isozyme と一致したが、残る2本は、膵アミラーゼとも異なる全く未知の易動度を示した。

このことは、従来報告されているごとく、肺癌由来のアミラーゼは唾液腺型を示すもの以外に、全く未知の新らしいアイソザイムもみられることを示唆している。しかし、報告者により、あるいは泳動の方法により、結果が異なっていることや^{19,20)}、アミラーゼアイソザイムパターンが未だ確立されていないこともあり、今後に残された重要な課題である。

ま と め

肺癌における高アミラーゼ血症は、あきらかに癌細胞がアミラーゼを産生することにより生じ、アミラーゼ産生肺癌の発生母地としては、気管支の漿液腺細胞と肺胞領域のある種の細胞が考えられる。

しかし、胎児肺末梢領域におけるアミラーゼ保有細胞がどのような細胞の母細胞であるのかについては、今後の検討課題である。

本研究にあたり寄せられた、島根医科大学・森川茂教授の御助言に深謝する。なお、本研究の一部は、文部省科学研究費による。

引用文献

- 1) Weiss, M. J. et al.: Elevated serum amylase associated with bronchogenic carcinoma. *Am. J. Clin. Path.* 21: 1057, 1951.
- 2) McGeachin, R. L. and Adams, M. R. Serum amylase and lung cancer. *Cancer* 10: 497, 1957.

- 3) Ende, N. Amylase activity in body fluid. *Cancer* 14: 1109, 1961.
- 4) 本間日臣他：特異な isozyme pattern を認めた悪性腫瘍 日本臨床 29 : 2276, 1971.
- 5) Amman, R. W. et al.: Hyperamylasemia with carcinoma of the lung. *Ann. Int. Med.* 78: 521, 1973.
- 6) 西条長宏他：血清, 尿, 腫瘍組織中に唾液腺炎型 amylase の上昇を呈した肺癌の1例 日本胸部臨床, 34 : 233, 1975.
- 7) Shear, M. et al.: A starch substrate film method for the histochemical localization of amylase. *Exp. Cell Res.* 32: 174, 1963.
- 8) Davies, T. J.: A fast technique for the separation and detection of amylase isoenzymes using a chromogenic substrate. *Technical Method. J. Clin. Path.* 28: 266, 1972.
- 9) 北村元仕：amylase アイソエンザイム —肺癌— 内科 29 : 834. 1972.
- 10) Laird, A. K. and Barton, A. D. Protein synthesis in rat pancreas. *Biochim. et Biophys. Acta.* 27: 12, 1958.
- 11) 高橋喜重：膵における amylase 合成と分泌動態に関する研究, 日本消化器病学会雑誌, 70 : 1320, 1973.
- 12) Mestecky, J. et al. Rivanol ethanol fractionation of parotid fluid and colostrum. *Experientia* 25: 892, 1969.
- 13) Karn, R. C. et al.: Immunological relationships and post-translational modifications of human salivary amylase (Amy 1) and pancreatic amylase (Amy 2) isozymes. *Biochemical Genetics* 12: 485, 1974.
- 14) Aw, S. E. and Hobbs, J. B.: Immunokinetic differences among human pancreatic, salivary and milk alpha-amylases. *Immunochemistry* 5: 135, 1968.
- 15) Yasuda, K. and Coons, A. H.: Localization by immunofluorescence of amylase, trypsinogen and chymotrypsinogen in the acinar cells of the pig pancreas. *J. Histochem. Cytochem.* 14: 303, 1966.
- 16) Kraus, F. W. and Mestecky, J.: Immunohistochemical localization of amylase, lysozyme and immunoglobulins in the human parotid gland. *Arch. Oral Biol.* 16: 781, 1971.
- 17) Masson, P. L. et al.: Studies on the proteins of human bronchial secretions. *Biochim. et Biophys. Acta* 111: 466, 1965.
- 18) 伊藤元彦他：肺の functioning tumor 臨床医, 4: 513, 1978.
- 19) 大槻真他：amylase isoenzyme の臨床的研究 日本消化器病学会雑誌, 72 : 1282, 1975.
- 20) Norby, S.: Electrophoretic non-identity of human salivary and pancreatic amylases. *Exp. Cell Res.* 36: 663, 1964.

STUDIES ON AMYLASE-PRODUCING LUNG CANCER

Haruo FUKUDA and Motohiko ITO

Department of Thoracic Surgery, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

Biochemical, histological, electron-microscopical and immunohistochemical studies on amylase-producing lung cancer were carried out. The results are summarized as follows:

- 1) Only adenocarcinoma tissues showed high amylase activity.
- 2) When examined under electron microscope, zymogen granule-like structure were seen in the amylase-producing lung cancer cells.
- 3) Specific fluorescence for amylase was demonstrated in the cancer cells of amylase-producing lung cancer.

4) Specific fluorescence for amylase was also seen in the serous cells of the bronchial gland of adult and foetus. Certain cells in the peripheral area of foetal lung also showed the specific fluorescence.

5) Amylase-producing lung cancer may arise from cells in the bronchial gland and peripheral lung area. But the nature of the cells of the foetal peripheral lung which contain amylase must be investigated in future.