

腫瘍の生化学的研究 (A 第二報)

家兎肉腫並に家鶏肉腫の Kathepsin 作用に就きて

醫學博士 内野仙治
吉岡政七

悪性腫瘍の蛋白分解機轉 (Proteolyse) は其の特異なる増殖又壊死現象の説明の根本をなすものとして注意され、Neuberg u. Gottschalk 氏等⁽¹⁾の腫瘍組織の Autolyse 乃至 Heterolyse 増強又 Abderhalden 氏⁽²⁾等の合成 Peptid (d-Alanyldiglycin) の atypische Spaltung の觀察はよく引用される所なり。最近 E. Waldschmidt-Leitz (1930) 氏⁽³⁾は Rattensarkom の Kathepsin 作用強大にして、しかも其の増殖旺盛時には其の賦活度大なるを觀察し、腫瘍の増殖時には、Kathepsin の賦活劑なる Sulfhydryl (Glutathion, Cystein etc) の増加を來し、従つて腫瘍組織細胞内の酸化還元系は還元系に傾向するに依る可しと論及せり。氏等は茲に悪性腫瘍組織細胞内の酸素缺乏より、還元系偏向を想像し、Sulfhydryl の増加により Kathepsin 賦活度の強大となり、次いで腫瘍組織内蛋白分解機轉の増強を來すと結論せり。

然るに H. A. Krebs 氏は Rattensarkom (Jensen) (又人癌腫) に就きて、其の Cystein 全賦活 Kathepsin 作用を、種々正常組織のそれと比較するに、之より強大なるものに非ず又特殊性 (Sonderstellung) を認めずと報告し、白鼠の Kathepsin 作用を強弱に依り次の順序に配列せり。

腎(最強)、脾、肉腫、肝、睪丸、心筋、骨格筋

氏は尙、組織浸出液を以つて生活細胞内の化学變化に比較論及するは當を得たるものに非ずと附言せり。

氏の觀察に依れば、Kathepsin の非活性度は混在する重金属(例へば銅)の阻止作用に依るものにして、Sulfhydryl (又 Blausäure) は Komplexbildner として重金属の阻止作用を除去する爲め、Kathepsin 作用の發揮を見るものなりと言ふ。甚だ興味ある研究成績と考ふ。

H. Kleinmann 氏⁽⁴⁾は Nephelometrie に依り Kathepsin 作用を比較研究し、人癌及人肉腫 Kathepsin 作用は脾(豚又は人)のそれに及ばず即ち腫瘍 Kathepsin 作用は正常實質性組織のそれに及ばず、實質性組織と非實質性組織との中間に位すとなし、尙又量的並に質的に悪性腫瘍組織と正常組織との間に何等差異なしと述ぶ。

P. Rondoni 氏⁽⁵⁾も Mäusekarzinom の Kathepsin 作用(自己蛋白分解試験)は既に一定度の活性を示し、Cystein 又 Lecithin は之を増強促進するを認むるも、正常組織に比較して

何等強大にあらず又特別の差異なしと述ぶ。但し、氏は生きたる悪性腫瘍組織細胞機能の中には、なほ特殊のものあるべしと想像せり。E. Maschmann 氏等⁽⁶⁾は Hühnersarkom, Mäusecarzinom 又 Mäusesarkom に就きて試験せる結果、悪性腫瘍組織の Kathepsin 作用は特に増強せりと認めず。又賦活度も 30% 内外 (Hühnersarkom は約 70%) にして、肝、腎又脾(70%)より低しとなし、尙 Cystein 賦活後もこれ等正常組織に比し特に大ならずとなす。此等成績より氏は、もし茲に観察せる Kathepsin 作用を以て、其の組織内の蛋白代謝を論じ得るも

表1 家兎肉腫 Kathepsin 作用(移植後卅日)
(4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

組織	消化時間	pH				
		4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
1%カゼインの分解 (N/10 NaOH ccm)						
肉腫	24	—	0.01	0.02	0.02	0.02
	72	—	0.09	0.12	0.09	-0.09
肝	24	-0.04	0.03	0.08	0.02	0.02
	72	0.52	0.30	0.38	0.03	0.04
筋	24	-0.01	-0.01	0	0	-0.02
	72	0.01	-0.02	-0.01	-0.02	-0.01
1%膠の分解 (N/10 NaOH ccm)						
肉腫	24	0.05	-0.01	0	-0.03	-0.03
	72	0.02	0	0.02	0.03	-0.01
肝	24	0.12	0.08	0.10	-0.02	-0.02
	72	0.47	0.31	0.36	0.02	0
筋	24	0.01	0.04	0	0	-0.02
	72	0	0.01	0.04	-0.01	-0.01

のとせば、腫瘍組織代謝は肝、腎又脾より低位に在るものなりと論述せり。

E. Waldschmidt-Leitz 氏等⁽⁷⁾も Sarkom Philadelphia A, Carzinom Walker 256 (Ratte)に就きて、其の Kathepsin 賦活度又賦活性も肝との間に特別の差異を認めず、従つて Sulfhydryl 量の多寡の差違も想像されずと述ぶ。Kathepsin 作用は腫瘍の壊死現出 (Alterung) とともに減少せしを以つて、Kathepsin は實質性細胞中に主在するものなる可しと言ふ。

表2 家兎肉腫 Kathepsin 作用に及ぼす Cystein の影響(移植後卅日)
(1%膠溶液 pH 4.5)
(4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

時間 (時)	Cystein (Mol)				
	1/15	1/30	1/45	1/75	1/300
24	0.47	0.37	0.35	0.33	0.27
72	0.90	0.60	0.70	0.36	0.33

表3 家兎肉腫 Kathepsin 作用 (Cystein 賦活) の至適 pH。
(4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)
(1%膠溶液)

Cystein (Mol)	時間 (時)	pH			
		3.0	4.0	5.0	6.0
1/8	24	0.27	0.29	0.24	-0.04
	72	0.27	0.49	0.38	-0.05
0	24	0.03	0.01	0.10	0.04
	72	0.03	0.03	0.10	0.05

尙種々酵素作用 (Phosphatas, Desamidase, Arginase, Aminopolyptidase, Dipeptidase 又 Katalase) も比較観察して、腫瘍組織は酵素學的に unspezifisches Gewebe なりと結論せり。

本報告は家兎又家鶏肉腫 Kathepsin 作用に就きて行へる實驗成績なり。家兎肉腫粥の三倍容量 Glycerin-Wasser (6:4) 濃浸液を使用し、基

表4 家兎肉腫 Kathepsin 作用 (pH 4.0)
(1%膠溶液, Cystein 量 1/7 Mol)
(2 ccm 中 NH₂-N 増加 NH₂-N mg)

時間 (時)	肉腫	肉腫 + Cystein	肉腫 + 膠	肉腫 + Cystein + 膠
24	0.016	0.016	0	0.079
72	0.045	0.057	0.032	0.216
120	0.046	0.060	0.088	0.285

表5 家鶏肉腫(移植後13日) Kathepsin 作用に及ぼす Cystein の影響 (pH 4.5, 1% 膠溶液) (4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

Cystein (Mol) 時間 (時)	1/8.5	1/17	1/34	1/68	1/136	0
24	0.22	0.37	0.14	0.03	0.02	0
72	0.29	0.42	0.19	0.08	0.06	0
120	0.42	0.52	0.19	0.13	0.09	0.06

* Mol 濃度 Cystein (鹽酸鹽を中和し使用す)を加へ、30分室温放置後基質液に加へ消化せしむるに、分解著明にして Cystein 量 1/15—1/45 Mol 添加のもの甚し(表2).

pH-Optima として pH 4.0—5.0 を示す(表3). Cystein 賦活に依る*

表7 家鶏肉腫 Kathepsin 作用 (1% 膠溶液, Cystein 量 1/10 Mol) (4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

移植後時間 日 数 (時)	pH							
	4.0			5.0				
七 日 目	A 肉 腫			B 肉腫+Cystein				
	24	0.10	0.12	0	0.02	0.17	0.07	
	72	0.15	0.23	0.05	0.02	0.27	0.07	
	120	0.20	0.23	0.07	0.02	0.30	0.07	
	C 肉腫+膠			D 肉腫+Cystein+膠				
	24	0	0.07	0.04	0.25	0.23	0.02	
	72	0.07	0.11	0.08	0.26	0.48	0.08	
	120	0.08	0.20	0.17	0.42	0.67	0.17	
	十三 日 目	A 肉 腫			B 肉腫+Cystein			
		24	0	0	0	0	0	0.02
		72	0	0	0	0.13	0.10	0.15
		120	0	0	0	0.13	0.15	0.15
C 肉腫+膠			D 肉腫+Cystein+膠					
24		0	0.04	0.02	0	0.85	0.48	
72		0.05	0.05	0.04	0.16	0.90	0.73	
120		0.05	0.05	0.07	0.22	0.90	0.78	
十八 日 目		A 肉 腫			B 肉腫+Cystein			
		24	0	0	0	0	0	0
		72	0	0	0	0	0	0
		120	0	0	0	0	0	0
	C 肉腫+膠			D 肉腫+Cystein+膠				
	24	0	0	0	0.30	0.66	0.03	
	72	0	0.01	0.02	0.55	0.76	0.30	
	120	0	0.02	0.03	0.70	0.78	0.30	

質1%蛋白溶液に對し1/10の割に加ふ. Casein 又 Gelatine の分解値は極めて微弱にして、賦活度は零に近し. 骨格筋の成績も亦之に類す. 但同動物肝は著明に分解能を發揮す(表1). 腫瘍酵素液に一定*

表6 家鶏肉腫 Kathepsin 作用 (Cystein 賦活) の至適 pH.

(1% 膠溶液, Cystein 量 1/18.6 Mol) (4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

時間 (時)	pH					
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
24	0	0.28	0.29	0.05	0	0
72	0	0.58	0.59	0.05	0	0
120	0.07	0.70	0.74	0.05	0	0

* 分解陽性成績の結果は尙アミノ窒素増加を觀察し證明を確定す(表4).

家兎肉腫潰浸液 1 ccm 中アセトン沈澱物を乾燥せしに、肉腫 0.0102 g, 筋 0.0311 g, 肝 0.0610 g を得たり.

家鶏肉腫に就きても同様の實驗を行ひ、Cystein 添加なきものは、家兎肉腫と同じく、分解極めて微弱なりき. Cystein 量は 1/10—1/20 Mol を適當となす. 即 1/15 Mol 内外を適合値として實驗の基礎となす(表5). pH-Optima 4.0—5.0 を得たり(表6). 家鶏肉腫は移植後7日、13日又18日目のものに就きて賦活度又賦活性を比較研究結果を表7に掲ぐ. 7日目の外13日又18日目のものも何れも賦活度は零に近きも、Cystein 添加後は著明に分解能を發揮す. 従つて賦活性は100%に近し. 全賦活分解値は初期のもの稍弱き觀あり.

表8 家鶏肝 Kathepsin 作用に及ぼす Cystein の影響 (pH 4.5)
(4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

Cystein (Mol) 時間 (時)	1/9.4	1/18.8	1/28.2	1/94	1/188	1/470	0	賦活度
24	0.20	0.30	0.43	0.48	0.41	0.24	0.24	50%
72	0.20	0.30	0.53	0.53	0.45	0.27	0.27	50%
120	0.32	0.33	0.53	0.61	0.47	0.32	0.32	50%

比較対照のため、同動物肝を以つてせし成績は Cystein 量 1/30—1/200 Mol 適當す。肝は賦活度 50%を示し、著明に分解す(表 8, 9)。従つて賦活性も 50%内外となれり。全賦活分解値は家鶏肉腫のそれに比し遙に大也。

以上、實驗成績によるに、家兔また家鶏肉腫の Kathepsin 作用は Autolyse 又 Heterolyse 極めて微弱にして、賦活度として殆んど見る可き値なく、Cystein 添加後は分解能著明に發揮せらるゝも、

同動物肝のそれに比し特に強大なりと言ふ能はず、又家鶏肉腫に就きて時期的觀察せしも特殊とすべき差違を認めず。

實 驗 部

家兔(移植後 30 日)又家鶏肉腫(移植後 7 日, 13 日又 18 日目)を粥狀にせしものに 3 倍容量 Glycerin-Wasser (6:4)を加へ濃浸液を調製し、氷室に貯へそのまゝ酵素液として使用する。壞死部は出来るだけ注意して除去す。Cystein 賦活は酵素液一定量に鹽酸鹽の中和したるものに加へ、一定 Mol 濃度となす。濃度の決定は窒素量を定量し計算す。Cystein 添加酵素液は 30 分室温に放置せし後、基質溶液に加へ 37° トルオール重層の許に消化せしむ。

20 ccm 1%蛋白溶液に對し附加酵素液量は 2 ccm (原液)の割合になさしむ。

試験液 4 ccm に就き Formol 滴定にて酸値を、又 2 ccm に就きアミノ窒素を測定す。表には試験直後値又基質を加へざる酵素液のみの對照試験値を引去りたる酸値増加又アミノ窒素増加をそれぞれ 0.1 n-NaOH ccm 又 NH₂-N mg にて示せり。

本研究に對し文部省自然科学獎學資金の下附を得たるを茲に感謝す。

(昭和十一年六月, 大阪電氣俱樂部に於て講演す)

文 獻

- (1) Oppenheimers Handb. Bioch., 4, 441 (2. Aufl).
- (2) E. Waldschmidt-Lietz u. A. Schöffner, Naturwissenschaften, 18, 280 (1930),

表9 家鶏肝 Kathepsin 作用
(1/13 Mol Cystein)
(4 ccm 中酸値増加 0.1 n-NaOH ccm)

時間 (時)	pH					
	3.0	4.0	5.0	3.0	4.0	5.0
	A 肝			B 肝+Cystein		
24	0.02	0.22	0.18	0.05	0.29	0.15
72	0.02	0.30	0.26	0.15	0.52	0.25
120	0.07	0.32	0.28	0.15	1.12	0.75
	C 肝+膠			D 肝+Cystein +膠		
24	0.36	0.57	0.62	0.05	0.76	0.56
72	0.42	0.63	0.82	0.45	1.20	1.04
120	0.49	0.75	0.87	0.45	1.75	1.26

- (3) H. A. Krebs, *Bioch. Z.* **220**, 281 (1930).
- (4) H. Kleinmann, *ebenda* **241**, 108 (1931).
- (5) P. Rondoni, *Biochem. J.* **26**, 1477 (1932).
- (6) E. Maschmann u. E. Helmert, *H-S. Z.* **218**, 142 (1933).
- (7) E. Waldschmidt-Leitz u. Mitarbeiter, *ebenda* **219**, 115 (1933).