

腫瘍の生化学的研究(A第八報)

家兔癌腫組織の蛋白分解酵素作用に就きて

内 野 研 究 室

醫學博士 内 野 仙 治
吉 岡 政 七

腫瘍の蛋白分解酵素作用，殊に家兔及び家鶏肉腫 Kathepsin (内野, 吉岡, 1937)¹⁾ に就きては既に報告せり。H. Kleinmann (1931)²⁾ の Nephelometrie に依る Kathepsin 作用の比較研究に依れば，腫瘍組織 Kathepsin 作用は正常實質性組織のそれには及ばず，之と非實質性組織との中間にありと云ふ又 E. Maschmann 等 (1933)³⁾ は Hühnersarkom 又 Mäusesarkom に就きて悪性腫瘍組織の Kathepsin 作用は正常組織に比し特に増強を認めず，且つ賦活に依る全活性度も著しく大ならずと発表せり。

H. Kleinmann (1931)²⁾ は悪性人癌腫組織に依る Diglycin (PH 7,0) 又 dl-Leucylglycin (PH 8,0) の分解陽性を報告せしが，吾等 (1935)⁴⁾ は家鶏肉腫 Dipeptidase 作用に就きて試験し，其の程度は肝のそれに及ばず，筋に近似なるを観たり。尙末期 (移植後十九日) に及び，その分解値は更に低下せり。家兔肉腫 Dipeptidase 作用 (内野, 吉岡, 1937)¹⁾ は同動物筋のそれより遙に強く，肝程度の分解を示せり。

Polypeptidase (dl-Leucyldiglycin 分解) 作用に就きては，E. Maschmann 等 (1933)³⁾ の Mäusecarzinom (Ehrlich) 又 E. Waldschmidt-Leitz 等 (1933)⁵⁾ の Rattencarzinom に就きて発表せる分解陽性成績とほぼ同様の結果を得たり。

更に腫瘍蛋白分解作用の知見を擴充すべく，動物癌腫殊に家兔睪丸癌腫 (Brown-Pearce) に就きて移植後三十日又六十日目二期に分ちて，その Kathepsin, Peptidase 又 Acylase 作用を観察せり。

Kathepsin 作用に関しては Cystein 賦活を考慮し，Casein 又 Gelatine の分解作用を観察せし成績は第1表の如き結果を得たり。E. Waldschmidt-Leitz 等 (1933)⁵⁾ の Sarkom Philadelphia 及び Ratten-Carzinom Walker 256 を材料とせるものに於て，壊死部増加に伴ひ Kathepsin

作用減弱すと報告せり。上述の如く家兔肉腫 Kathepsin 作用は筋と大差なく、肝より遙かに弱きものなりしが、移植後30日目の家兔睾丸癌腫 (Brown-Pearce) の Kathepsinaktivität は明に之を認め、その分解値は Cystein 添加に依り更に著しく増強せらる。対照とせし正常睾丸組織の Kathepsinaktivität は極めて微弱にして、Cystein 賦活に依り、著明に發現するも、その程度は癌組織に比し之より低弱なり、移植後60日目の癌組織 Kathepsin の Cystein 賦活に依る全活性度は甚だ弱し。

家兔癌腫 Kathepsin 作用は同動物肝のそれとほぼ同程度なりと云ふ可し。

Diglycin 又 dl-Leucylglycin の分解試験は表2の如く、何れも家兔肉腫 (内野, 吉岡, 1937)⁶⁾ 同様著明に家兔睾丸癌腫組織に依りて分解せらる。短時間消化 (3 時間) に於ては PH 8.0 に最高分解値を見るも、24 時間後に於ては PH 7.0 に最大酸値増加を得たり。dl-Leucyldiglycin は PH 7.5 に於て著明に分解せらる。

Pepton の分解試験も陽性成績を示し、正常睾丸組織の場合と大差を認めず。

Glycylsulfanilsäure は酵素作用に抵抗あり。

Acylase 作用は表3の如く何れも分解を認めず、肉腫組織と同じく陰性成績なり。

Halogenacylase 作用に關して市岡 (1937)⁷⁾ に依れば、Chloracetylphenylalanin 分解試験は家鶏肉腫に於て陽性を示し、家兔肉腫及筋は陰性にして、同動物肝又腎は著明に之を分解 (PH 6.5—7.5) すと云ふ。家兔癌腫に於ても或はかゝる特殊性を示すに非ずやと試験せしも、分解陰性にして又 dl- α -Bromisocapronylglycin も抵抗を示せり。但し正常睾丸組織の長時間作用の場合に、 $\text{NH}_2 \cdot \text{N}$ の増加を見たるは甚だ興味ある成績にして更にその特性に就きて研究すべし。

實 験 の 部

(1) 酵素液: 家兔睾丸に無菌的に移植せし家兔睾丸癌腫組織 (Brown-Pearce) の増殖せしものを用ふ。移植後2週間前後頃より睾丸組織は瀰漫性に癌腫組織化し、癌腫形成部と其の睾丸組織と分離する事困難なりしが、睾丸組織と見る可き部分は出来る限り除去せり。対照としては、移植せざりし健康家兔の睾丸組織を用ふ。移植後30日又60日の二期に就き腫瘍部を剔出し、之を細断し、よく磨潰す (末期の60日目のものは注意深く壊死部を出来るだけ除去す)。此の組織粥にその重量の3倍容量の Glycerin-Wasser (Glycerin 1 : Wasser 1 の割に混和し、0.05% Essigsäure を含有す) を加へ再び能く磨潰し、細目篩を篩したるものに Toluol を重層し氷室に貯ふ。此の潰浸液を酵素液として使用する。

(2) 基質溶液： 蛋白質又 Pepton は1%溶液又合成 Peptide は $\frac{1}{20}$ Mol 溶液となす。Acyl- 又 Halogenacyl 誘導體は計算量の n-NaOH を加へ溶解し更に Pufferlösung を加へて PH 7.3 に調節す。

(3) 賦活試験： 一定量の Cystein 鹽酸鹽溶液を NaOH 溶液にて中和調節し、一定調節液を加へ 8 ccm となし、之に 2 ccm の酵素液を混和したるものの Cystein 濃度は $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{15}$ Mol となす (濃度決定は Kjeldal 法に依る總 N に依り計算す)。此の Cystein 酵素液を室溫に 30 分間保置したるものに基質溶液を加へて消化す。

(4) 分解試験法： 消化液 20 ccm に對して 2 ccm の割合に酵素液を加へ、Toluol を重層し 37°C にて消化す。

一定消化時間後、消化液 4 ccm に就き Formoltitration に依り酸値測定をなす。或は 2 ccm に就き Van Slyke法 に依り $\text{NH}_2\text{-N}$ を測定す。

試験直後及び酵素液のみの測定値を對照値として引去りたる増加酸値 (ccm 0.1n-NaOH) 又は増加 $\text{NH}_2\text{-N}$ 値 (mgN) を分解値として表に記載す。

第 1 表 家兔癌腫の Kathepsin 作用

基 質		時 間	4 ccm中の酸値増加 (ccm 0.1 n-NaOH)											
			癌腫組織(30日)				癌腫組織(60日)				正 常 辜 丸			
			PH				PH				PH			
			4.0	5.0	6.0	7.5	4.0	5.0	6.0	7.5	4.0	5.0	6.0	7.5
Casein (1%)	}	24	0.05	0.16	0.21	0.04	0.06	0.02	0.18	0.12	0	0	0.05	0.06
		72	0.40	0.36	0.32	0.09	0.18	0.28	0.21	0.13	0.15	0.12	0.22	0.14
		120	0.48	0.41	0.40	0.10	0.32	0.35	0.34	0.18	0.15	0.12	0.24	0.16
Casein + Cystein ($\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{15}$ Mol)	}	24	—	(4.5) 1.09	—	—	—	(4.6) 0.24	—	—	—	(4.5) 0.04	—	—
		72	—	1.69	—	—	—	0.64	—	—	—	0.35	—	—
		120	—	2.09	—	—	—	0.64	—	—	—	0.40	—	—
Gelatine(1%)	}	24	0.18	0.18	0.15	0	0.04	0.10	0.04	0.05	0	0.08	0.08	0
		72	0.22	0.20	0.20	0.03	0.12	0.10	0.12	0.05	0.01	0.08	0.14	0.02
		120	0.22	0.20	0.21	0.06	0.17	0.13	0.15	0.05	0.01	0.08	0.14	0.02
Gelatine + Cystein ($\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{15}$ Mol)	}	24	—	(4.5) 0.25	—	—	—	(4.5) 0.27	—	—	—	(4.5) 0.43	—	—
		72	—	1.02	—	—	—	0.52	—	—	—	0.83	—	—
		120	—	1.01	—	—	—	0.52	—	—	—	0.83	—	—

第2表 家兔癌腫の Peptidase 作用

4 ccm 中の酸値増加 (ccm 0.1n-NaOH)

基 質	時 間	癌腫組織(30日) PH			癌腫組織(60日) PH			正 常 率 丸 PH		
		6.0	7.0	8.0	7.0	8.0	9.0	7.0	8.0	9.0
Glycylglycin	3	0.17	0.51	0.83	0.34	0.47	0.30	0.58	0.64	0.45
	8	0.21	1.02	1.08	0.84	0.79	0.48	0.92	0.84	0.62
	24	0.42	1.47	1.32	1.12	0.91	0.52	1.39	1.21	1.00
dl-Leucylglycin	3	0.17	0.58	0.77	0.20	0.71	0.70	0.23	0.67	0.70
	8	0.37	0.84	0.82	0.80	0.70	0.71	0.68	0.73	0.74
	24	0.86	0.95	0.83	0.85	0.72	0.74	0.74	0.76	0.74
dl-Leucyldiglycin	3	—	(7.5) 0.77	—	—	—	—	—	—	—
	8	—	0.82	—	—	—	—	—	—	—
	24	—	1.04	—	—	—	—	—	—	—
Glycylsulfanilsäure	24	—	(7.5) 0.10	—	—	(7.5) 0.11	—	—	(7.5) 0.08	—
	72	—	0.20	—	—	0.16	—	—	0.20	—
	120	—	0.20	—	—	0.13	—	—	0.17	—
Pepton	24	—	(7.5) 0.25	—	—	(7.5) 0.32	—	—	(7.5) 0.43	—
	72	—	0.33	—	—	0.48	—	—	0.49	—
	120	—	0.39	—	—	0.55	—	—	0.53	—

第3表 家兔癌腫に依る Acylderivate の分解

4 ccm 中の酸値増加 (ccm 0.1n-NaOH)
* 2 ccm中の増加 NH₂-N (mg)

基 質	時間	癌腫組織(30日)	癌腫組織(60日)	正常率丸
Benzoylglycin	24	0.01	-0.02	-0.02
	72	0.01	-0.02	-0.03
	120	0.01	-0.05	-0.06
Benzoyldiglycin	24	0	-0.02	-0.02
	72	0	0.01	-0.03
	120	0	-0.02	-0.06
*Chloracetyl-phenylalanin	24	0	0	0.012
	72	-0.011	0.005	0.068
	120	-0.012	0.005	0.078
*dl- α -Brom-isocapronylglycin	24	0	0.005	0.079
	72	0.006	0.006	0.107
	120	0.040	0.005	0.139

總 括

(1) 家兔癌腫組織(移植後30日目)は Casein 基質に對し著明に Kathepsinaktivität (PH 4.0—5.0)を發揮す。家兔癌腫の Kathepsin 作用は Cystein 添加に依り著しく増強せらる (PH 5.0). 之等の程度は同動物肝 Kathepsin 作用に近似のものなり。移植後 60日目の癌腫 Kathepsin の活性度は尙之を認むるも, Cystein 添加後の全活性度は甚だ低弱なり。

(2) 家兔正常辜丸組織の Kathepsinaktivität は極めて微弱にして, Cystein 添加によりて著明なる蛋白分解作用を認むるも, 其程度は癌腫組織より低弱なり。

(3) 家兔癌腫組織の Peptidase 及び Polypeptidase 作用は著明に陽性(PH 7.0—8.0)なり。Peptonase 作用も亦著明なり之等の作用は家兔辜丸組織にも著明にして, その間著しき差違を認めず。

(4) Glycylsulfanilsäure は家兔辜丸組織又癌腫組織酵素作用に對して抵抗あり。

(5) 家兔癌腫又正常辜丸組織に依る Acylaminosäure の分解を認めず。Halogenacylamino-säure も亦癌腫組織酵素作用に對して抵抗を示せり。但, 正常辜丸組織作用に依りてアミノ窒素の増加を觀たり。

文 獻

- 1) 内野仙治, 吉岡政七, 化學研究所講演集, 7. 134(1937).
- 2) H. Kleinmann u. F. Werr, Biochem. Zeits., 241, 103 (1931).
- 3) E. Maschmann u. E. Helmert, Zeits. f. physiol. Chem., 218, 142 (1933).
- 4) 内野仙治, 吉岡政七, 化學研究所講演集, 5. 159(1935).
- 5) E. Waldschmidt-Leitz E. Me Donald u. Mitarbeiter. Zeits. f. physiol. Chem., 219, 115(1933).
- 6) 内野仙治, 吉岡政七, 化學研究所講演集, 7, 139(1937).
- 7) 市岡冬太郎, 化學研究所講演集, 7. 224(1937).