

脳腫瘍における FIBRINOGEN の役割に関する 免疫組織学的研究*

京都大学医学部脳神経外科学教室 (主任：半田 肇教授)

鍋 島 祥 男

〔原稿受付：昭和44年5月8日〕

The Fibrinogen-Fibrin System in Human Intracranial Tumor Tissues : An Immunohistological Study

by

SACHIO NABESHIMA

The Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. HAJIME HANDA)

In 1958, O'MEARA and coworkers described an abundant deposition of fibrin in human malignant tumors. They speculated that the cancer cells had "coagulating properties" and that the fibrin was laid down at the periphery of the neoplasm, generating a fibrin meshwork in which the cancer cells could grow further. Fibrin may act also as a stimulus on the mesodermal cells, promoting the development and organization of the tissues including the capillaries and stromal elements in association with the advancement of cancer tissue.

BALE, DAY, and PRESSMAN, using tracer technic, also showed the accumulation in vivo of the radioiodinated antifibrin antibody in the transplanted rat tumors. In their reports, they expressed the opinion that the fibrin deposit was due to a peritumoral inflammatory reaction in the host stroma or to the tissue injuries in the host tissue surrounding the developing tumors. Based on these reports, it seemed worthwhile to investigate the role of fibrinogen-fibrin system in human intracranial tumors and its possible diagnostic and therapeutic implications.

Various human intracranial tumors (50 cases) have been investigated for localization of fibrinogen by immunofluorescence technique with Fluorescein Isothiocyanate-conjugated anti-human fibrin monomer rabbit gamma globulin. In most of malignant tumors such as glioblastoma, sarcoma, metastatic carcinoma, and medulloblastoma, a large quantity of fibrin was localized in the interstitial spaces. On the other hand, there was no, or a trace of, fluorescence in the pituitary adenoma, meningioma and the normal brain tissues served as controls.

Also using an immunofluorescence method, localization of plasminogen was studied. The results were in good accordance with those of the fibrinogen-fibrin system and the intense fluorescence was found in the malignant human intracranial tumors.

These findings confirm the heavy accumulation of fibrinogen-fibrin and plasminogen systems in some of intracranial tumors as well. It seemed theoretically possible that the radioactive fibrinogen or anti-fibrinogen antibody might be used for diagnostic and therapeutic purposes in neurosurgical practice.

The results of scintillation scanning by use of radioiodinated human fibrinogen as a tracer have not been satisfactory so far. In 17 cases of brain tumors of various histology, 1 mCi of ¹³¹I-fibrinogen was administered intravenously and serial brain scannings were performed. Positive scans were obtained in 16 of 17 cases studied; however, the qualities of scintigrams were by no means better than those obtained with 99 m Tc pertechnetate.

結 言

血漿蛋白と腫瘍との関連については古くから多くの報告があるが特に最近Fibrinogenが腫瘍の増殖及び転移に密接に関連することが報告されている。

Pressman¹⁾らは移植性動物腫瘍の抗腫瘍抗体を精製して行くうちにこれがFibrinogen-Fibrin Systemと免疫学的に交叉反応を示すことを見出しFibrinogenが腫瘍構成成分の主要な部分をしめるものと推論している。この成績に基いてBale, Spar, Day,²⁻⁶⁾らは¹³¹I-labeled Anti-Fibrin Antibodyや¹³¹I-Fibrinogenが移植性動物腫瘍及び2～3の人腫瘍に選択的に集まることを見出し、これの診断、治療への応用の可能性を示唆した。

又O'Meara⁷⁾らは、腫瘍周辺部ではFibrin沈着が非常に早期から見られるが、これは腫瘍細胞特有の凝固因子によるものと考え、このFibrin沈着が腫瘍の増大、浸潤に不可欠であると述べている。更に腫瘍組織内におけるFibrinogenの局在及び分布については、移植動物腫瘍に関してはHiramoto⁸⁾, Back⁹⁾らの、又、人腫瘍についてはHiramoto¹⁰⁾らの蛍光抗体法による研究があり、これらによれば腫瘍組織内、ことに、間質組織にFibrinogenの局在を認めたと述べている。

しかし従来のこれらの報告には、人脳腫瘍は全く含まれていない。そこで著者は人脳腫瘍においても、移植性動物腫瘍あるいは、2～3の人の脳腫瘍以外の腫瘍と同様にFibrinogen系の存在が認められるか否か、又Fibrinogen系の存在と腫瘍種別あるいは悪性度との間に、何らかの関連性があるか否かを、主として蛍光抗体法を用いて検討した。更に生体においてFibrinogen系と密接な関連を持つPlasminogen系の存在についても同様蛍光抗体法を用いて追求し、最後にこれら

の脳腫瘍診断への応用の可能性をも検討した。

(I) 蛍光抗体法による腫瘍組織内 Fibrinogen 局在の検討

(A) 実験材料ならびに実験方法

a) 腫瘍組織

Table 1 及び Table 2 に示す如く Mouse 及び Rat の移植性腫瘍ならびに京大脳神経外科及び大阪日赤脳神経外科**において手術時採取した人脳腫瘍組織について検討した。対照として正常 Mouse, Rat, 人の脳組織及び Rat の肝、腎その他の組織についても検討した。

b) 蛍光抗体法操作

1) 抗原

人及び Rat 血漿より Blombäck & Blombäck¹¹⁾の方法でFibrinogenを精製した。人Fibrinogenについては更にDonnelly¹²⁾の方法でFibrin-Monomerとしたものを抗原として使用した。Plasminogenについては人血漿よりKleine¹³⁾の方法で精製したものをを用いた。

2) 免疫操作

体重2.0～2.5kgの成熟家兎2匹を1組として用いた。1匹あたり30mg (人-Fibrinogen), 24mg (Rat-Fibrinogen), 40mg (Plasminogen)の蛋白量の各抗原をIncomplete Freund Adjuvant と1:1に混合し、Water-in-Oil

Table 1 Experimental animal tumor studied

Species	Class. of tumor
Mouse	Ehrlich tumor, 20-Methylcholanthrene induced glioma
Rat	Yoshida sarcoma, subcutaneous and intracranial implantation

* 本研究の研究費は一部昭和43年度文部省科学研究費補助金（奨励研究A. 7072）によつた。

** 御協力頂いた大阪日赤脳神経外科（部長：安藤協三博士）に深謝する。

Table 2 Classification of 50 intracranial tumors studied

	No. of cases
1) Meningioma	5
2) Pituitary adenoma	4
3) Craniopharyngioma	1
4) Cholesteatoma	1
5) Pinealoma	1
6) Neurinoma	1
7) Myxofibroma	1
8) Granuloma	1
9) Astrocytoma	6
10) Oligodendroglioma	3
11) Glioblastoma	10
12) Sarcoma	5
13) Metastatic carcinoma	5
14) Medulloblastoma	1
15) Malignant neurinoma	1
16) Neuroblastoma	1
17) Squamous cell carcinoma	1
18) Choroid plexus carcinoma	1
19) Ependymoblastoma	1
Total	50

Emulsion にして 大腿皮下数ヶ所に分割注射した。1 ヶ月後 1 匹あたり 15 mg (人-Fibrinogen), 12 mg (Rat-Fibrinogen), 20mg (Plasminogen) の各蛋白量の同様抗原液を耳静脈より注入して Booster を施行し、1 週間後に抗体価の上昇を確認した後、頸動脈より全採血を行った。この際得られた抗血清は Ouchterlony¹⁴⁾ の Double Diffusion Test 及び Immunoelectrophoresis¹⁵⁾ で免疫操作を行った各抗原に対して、特異的に 1 本の明瞭な沈降線を示すことを確認した。

得られた各抗血清より、半飽和硫酸塩析法で抗体を含む Crude Globulin を分離し、これを十分透析した後 Woode & Cebra^{16,17)} の方法で Fluorescein Isothiocyanate (Baltimore Biological Laboratory, Inc., Baltimore, Md.) (FITC) を標識した。更に得られた蛍光色素標識抗体液を DEAE Cellulose Column^{18,19)} を通して精製した。更に再度 Ouchterlony 及び Immunoelectrophoresis で各抗原液に対してこの蛍光色素標識抗体が特異抗体を含むことを確認した。

3) 染色

上記動物腫瘍及び人脳腫瘍組織の試料は採取後直ちに 95% 冷 Alcohol 液にて 24 時間固定した。この際試料

は可能な限り薄い Block にして固定した。ついで Dehydrated Alcohol にて脱水, Xylol を通して Paraffin に包埋し 3 μ の切片を作製した。上記各操作は Saint-Marie²⁰⁾ の方法に準じ Paraffin 包埋を除いて Cold room で施行した。ついて精製した FITC 標識抗体を用いて 1 昼夜室温で染色を行った後、pH 7.4 の Phosphate Buffer で切片をよく洗滌し、余分の蛍光抗体液を洗い流した後 Glycerin Buffer で封入し、蛍光顕微鏡 (Carl-Zeiss, Fluorescein Microscope, equipped with an HBO 200 high pressure mercury vapor lamp, (Osram Company, Berlin, Germany)) にて観察及び写真撮影を行った。更に同一試料の連続切片にて Hematoxylin-Eosin 染色ならびに Acridin-Orange²¹⁾ による核酸染色を行うて組織学的検査及び腫瘍の悪性度を判別する参考に供した。

(B) 実験成績

1) 蛍光色素標識抗 Fibrinogen 抗体の特異的反応性の検討

a) 免疫学的検討

蛍光色素標識抗 Fibrinogen 抗体の免疫学的特異性については Ouchterlony の Double Diffusion Test 及び Immunoelectrophoresis で抗原として用いた Fibrin-monomer に対して明瞭な 1 本の Precipitin Arc を示すことを確認した (Fig. 1, 2)。更にこの抗体は Plasma に対し沈降線を認めたが Serum に対しては沈降線を認めなかった。

b) 組織学的検討

Fig. 3 に示す如き Blocking Test 及び FITC-labeled

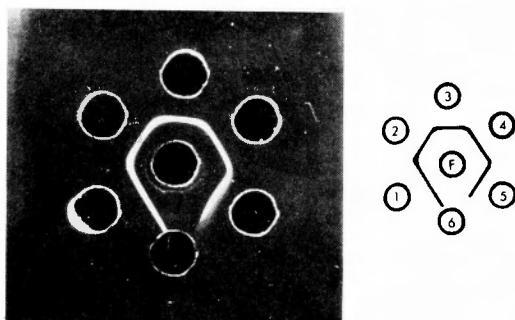


Fig. 1 Agar gel diffusion test of Ouchterlony.

Central well (F) was filled with human fibrin monomer. Periphery wells (1-5) were filled with anti-human fibrin monomer rabbit anti serum, which was serially distilled with saline, but lowest well (6) was filled with saline as control.

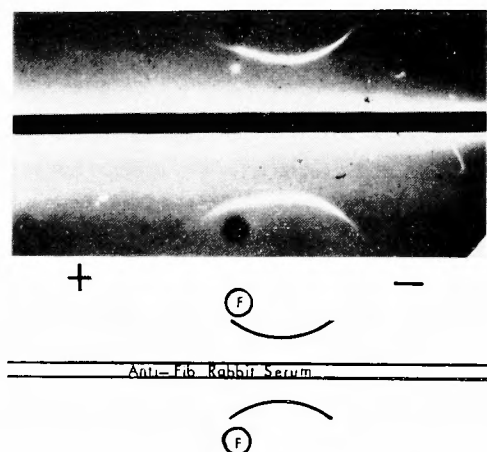
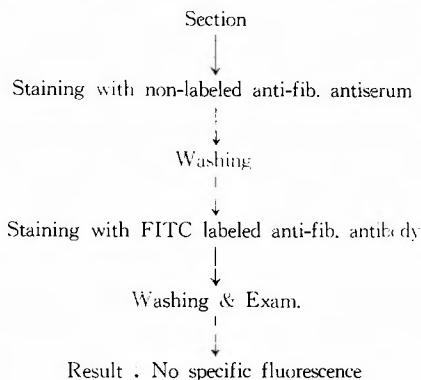


Fig. 2 Immunoelectrophoresis of human fibrin monomer. The upper and lower wells (F) were filled with human fibrin monomer. Only one precipitin arc was formed with anti-human fibrin monomer rabbit antiserum filled in the trench.

Anti- γ -Globulin Antibody を用いて検討したが、いづれも蛍光色素標識抗 Fibrinogen 抗体による染色標本に見られるような特異蛍光は認められなかった。

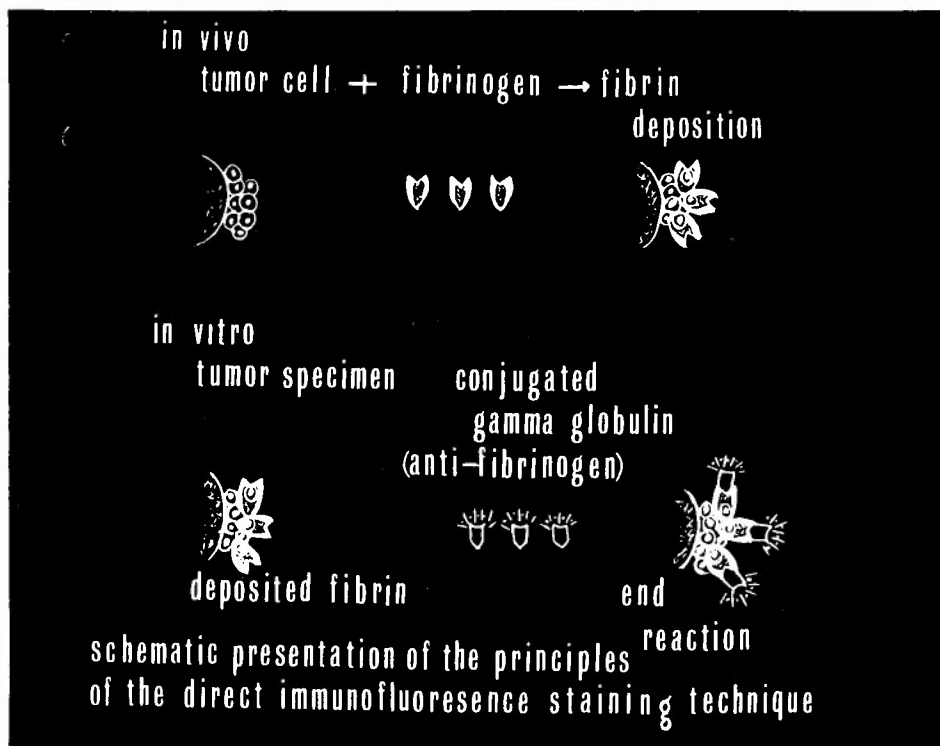
Fig. 3 Procedure of blocking test



2) Mouse 及び Rat の正常組織及び実験腫瘍における Fibrinogen 系の局在

a) Rat の肝組織

肝では散在性に肝細胞の細胞内に特異蛍光を認め一部の細胞では微細な Granule として認められた。この所見は Hamashima⁽²⁰⁾ が人の肝組織で認めた所見と一致した。



Eig. 4

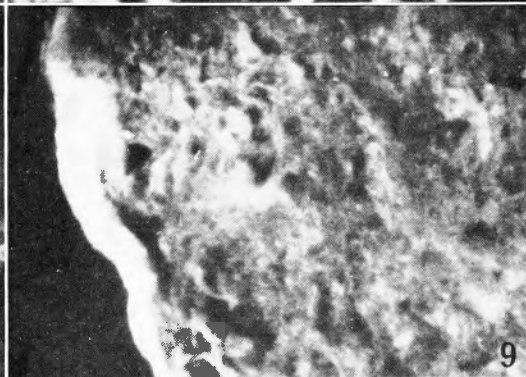
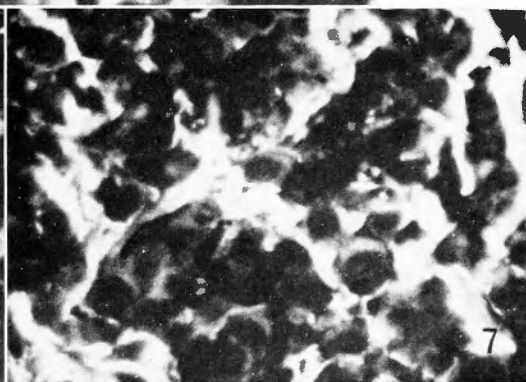
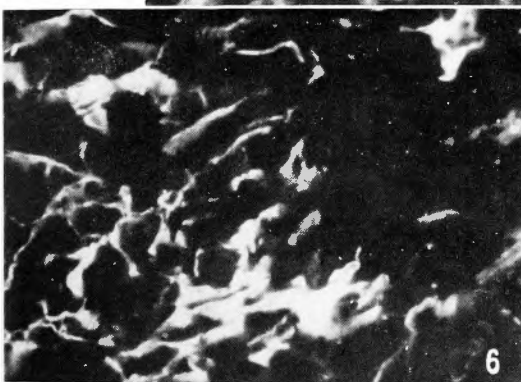
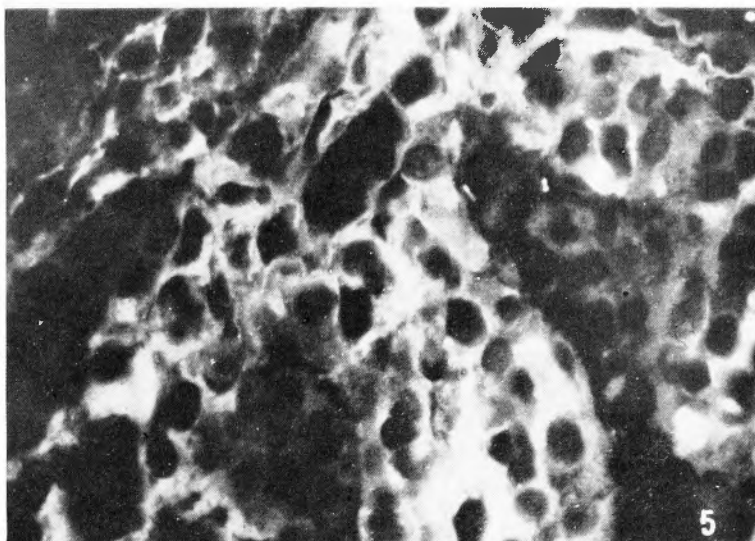


Fig. 5 Yoshida sarcoma : Intracranial tumor.

Fig. 6 Yoshida sarcoma : Subcutaneous tumor.

Fig. 7 Yoshida sarcoma : Intraabdominal tumor.

Fig. 8 Mouse glioma.

Fig. 9 Ehrlich tumor.

b) Rat の腎組織

腎では糸球体の毛細血管及び基底膜に特異蛍光が認められたが、細尿管部では血管外には特異蛍光は認められなかった。

c) Mouse 及び Rat の正常脳組織

これら正常脳組織では血管内には特異蛍光が認められたが、血管外には特異蛍光は認められなかった。血管内の特異蛍光は残存した Plasma Fibrinogen に由来

するものと考えられる。

3) 移植性動物腫瘍組織における Fibrinogen 系の局在

Mouse の Ehrlich 腫瘍, Mouse の Glioma 及び Rat の吉田肉腫の全例において細胞をとりまいて網目状あるいは放射状に高度の特異蛍光を認め、これは後述する人脳腫瘍中 Glioblastoma, Sarcoma で見られた所見に類似していた (Figs. 1~9)。更に一部では細胞間質のみならず腫瘍細胞内にも蛍光が認められた (Fig. 5) が核には蛍光は認められなかつた。この腫瘍細胞に認められた特異蛍光が細胞の表面に附着した Fibrinogen によるものか、あるいは細胞質にとりこまれた Fibrinogen 及至はその分解産物に由来するものかは明かにし得なかつた。

4) 人脳組織及び脳腫瘍試料における Fibrinogen 系の局在

正常人脳組織においては Mouse 及び Rat 正常脳組織で認められたと同様に、特異蛍光は血管内にのみ軽度に見られた。我々が検討した範囲では正常脳組織内血管壁及び血管外には特異蛍光は認められなかつた。血管内特異蛍光は組織固定時に血管内に残存した Plasma Fibrinogen に由来するものと考えられる。我々が検討した50例の頭蓋内腫瘍組織について FITC 標識抗 Fibrinogen 抗体による特異蛍光の強さを便宜上 (+) (++) (++) の三段階に、又蛍光の局在部位を血管内及び血管周囲組織と細胞間質とに分け Table 3 に総括してその成績を示した。

a) 良性腫瘍

病理組織学的に 良性であると考えられる Meningio-

ma, Pituitary Adenoma 等では 2, 3 の例を除いて正常脳組織とほぼ同様の所見が認められた。

Fig. 10は Sphenoid Ridge Meningioma で H.E. 所見では Angiomatous Component を持つた Meningocytic Meningioma で臨床組織学的には良性の組織像であつた。特異蛍光は血管内にのみしか認められず、正常脳組織で認められた所見と比較して殆ど差異を認めなかつた。

Fig. 11は Pituitary Adenoma で H.E. 所見では Chromophobe Adenoma であつた。これも前述の Meningioma と同様に血管壁に附着した血漿成分に由来すると思われる蛍光が認められたのみで、血管周囲及び間質には蛍光は認められなかつた。その他の Pituitary Adenoma, Meningioma, Cholesteatoma および Craniopharyngioma などとも 2~3 の例外を除いてほぼ同様の所見を示した。一部血管周囲組織に軽度の特異蛍光を認めた例においても、その分布は血管周囲の狭い範囲に限局されており、後述する Glioblastoma などに見られた所見とは全く異つたものであつた。

さらに腫瘍周囲の H.E. 所見で Gliosis など炎症反応を示した部分でも血管外に Fibrinogen の沈着を示す特異蛍光は認められなかつた。これは Fibrinogen の腫瘍への集積が単に腫瘍-宿主間の炎症反応に基づくものとしている Spar, Bale³⁰⁾らの仮説とは一致し得ない所見と思われる。

b) 悪性腫瘍

Figs. 14, 15はいずれも H.E. 所見では不規則な巨細胞をまじえた未熟な Glia 細胞が見られ、臨床組織学的にも Glioblastoma multiforme であつた。特異蛍光は

Table 3 Staining of intracranial tumor tissues with Anti-Fibrinogen conjugate

Class. of tumor	Intensity	Localization of fluorescence					
		No. of cases	Intra- & Perivascular		Interstitial		
			+	++	+	++	+++
Meningioma	5	2	3	2			
Pituitary adenoma	4		4	2			
Astrocytoma & oligodendroglioma	9		9	3	4	2	
Glioblastoma	10		10		1	9	
Carcinoma	7		7		1	6	
Sarcoma	5		5			5	
Miscellaneous benign	5		3	2	1		
malignant	5		5		3	2	
Total	50						

これら写真に見られるように、腫瘍細胞をとりまいて腫瘍固有の細胞間質に広く認められた。これら特異蛍光は網目状或いは放射状、又時に帯状に認められ、更に一部では Fig. 14 に見るように微細顆粒状に細胞表面或いは細胞間質に認められた。

Fig. 16は頭蓋内では橋脳・透明中隔さらに脊髄硬膜外にも多発性に腫瘍が認められた症例の脊髄硬膜外より得られた試料で H.E. 所見では Undifferentiated sarcoma の像を示した。蛍光所見では Glioblastoma と同様強い特異蛍光が細胞をとりまいて網目状に認められた。この例では細胞質及び核には特異蛍光は認められなかった。帯状を呈するこれら蛍光の中に微細顆粒状の Component も認められた。Fig. 17は左側頭部の肺原発の転移癌で、組織学的には Squamous cell carcinoma であった。蛍光所見は Glioblastoma, Sarcoma と同じく細胞間質に強い蛍光が認められた。

Fig. 13は H.E. 所見では Astrocytoma と思われた症例で石灰化も認められた。蛍光所見で非常に強い蛍光が帯状網目状に認められた。更に特殊染色を行つて検討した結果 Sarcoma と訂正された症例で顆粒状の蛍光も認められた。

Fig. 12は H.E. では Oligodendroglioma の像で細胞間質に細胞をとりかこんで網目状に特異蛍光が認められた。この例ではむしろ Glioblastoma などの所見に近い例であるが Astrocytoma, Oligodendroglioma と診断された症例のなかには、この様に高度の蛍光を認めたものの他、血管内及び血管周囲のみにしか特異蛍光を認

めず、むしろ Meningioma, Pituitary adenoma などに近い所見を示す例も少数ではあるが認められた。

5) 人脳腫瘍試料における Plasminogen 系の局在
Fibrinogen 系と密接な関係を有する Plasminogen 系の人脳腫瘍組織内の局在について Fibrinogen と同様、蛍光抗体法を用いて検討を試みた。その成績及び Fibrinogen において得た成績との比較を Table 4 に示した。

Fig. 18は Glioblastoma multiforme の症例である。抗 Plasminogen 抗体による蛍光所見でも、先に Fibrinogen で認めたものと同じ所見、すなわち細胞をとりまいて網目状に分布する特異蛍光が認められた。

これに対して Fig. 19は Pituitary adenoma で組織学的には Chromophobe adenoma であるが、血管内及びその周囲組織にのみ特異蛍光が認められた。その他の症例でも抗 Fibrinogen 抗体と抗 Plasminogen 抗体による蛍光所見を比較してみると Glioblastoma, Sarcoma などで細胞間質において抗 Plasminogen 抗体の方が抗 Fibrinogen 抗体の場合よりも強い蛍光が認められたが、両者の分布に差異は認められなかった。

(II) ^{131}I -Fibrinogen による検討*

(A) 材料ならびに方法

1) 動物の実験腫瘍における ^{131}I -Fibrinogen のとりこみについて

20-Methylcholanthrene で Mouse の脳内に発生させた Glioma の皮下継代移植腫瘍を用いた。移植後二週間目腫瘍直径約 1 cm になつたものに一匹あたり $30\mu\text{Ci}$

Table 4 Localization of fibrinogen and plasminogen in intracranial tumor tissues

Class of tumor	Intensity No. of cases	Intra- & perivascular				Interstitial					
		Plasminogen		Fibrinogen		Plasminogen			Fibrinogen		
		(+)	(++)	(+)	(++)	(+)	(++)	(+++)	(+)	(++)	(+++)
Meningioma	3	1			1	1	1		2		
Pituitary adenoma	2		1	1	1	1					
Pinealoma	1					1					1
Astrocytoma	2							2		2	
Oligodendroglioma	1						1			1	
Glioblastoma	6					1	5		3	3	
Sarcoma	3						3		2	1	
Metastatic carcinoma	3						3		2	1	
Total	21										

* 御協力頂いた京大中央放射性同位元素診療部（鳥塚莞爾助教授）に深謝する。

の ^{131}I -fibrinogen (Dinnabbot R.I. 研究所製造) を腹腔内に投与し、経時的に Fig. 20に示した時間に断頭し、腫瘍及び各臓器を採取し Bang's torsions balance で Wet weight を秤量し、その放射能 (cpm/gm) を Well-type scintillation counter (Shimadzu Co.) で測定した。そしてこれらの値より腫瘍臓器比を計算し、その平均値を求めた。

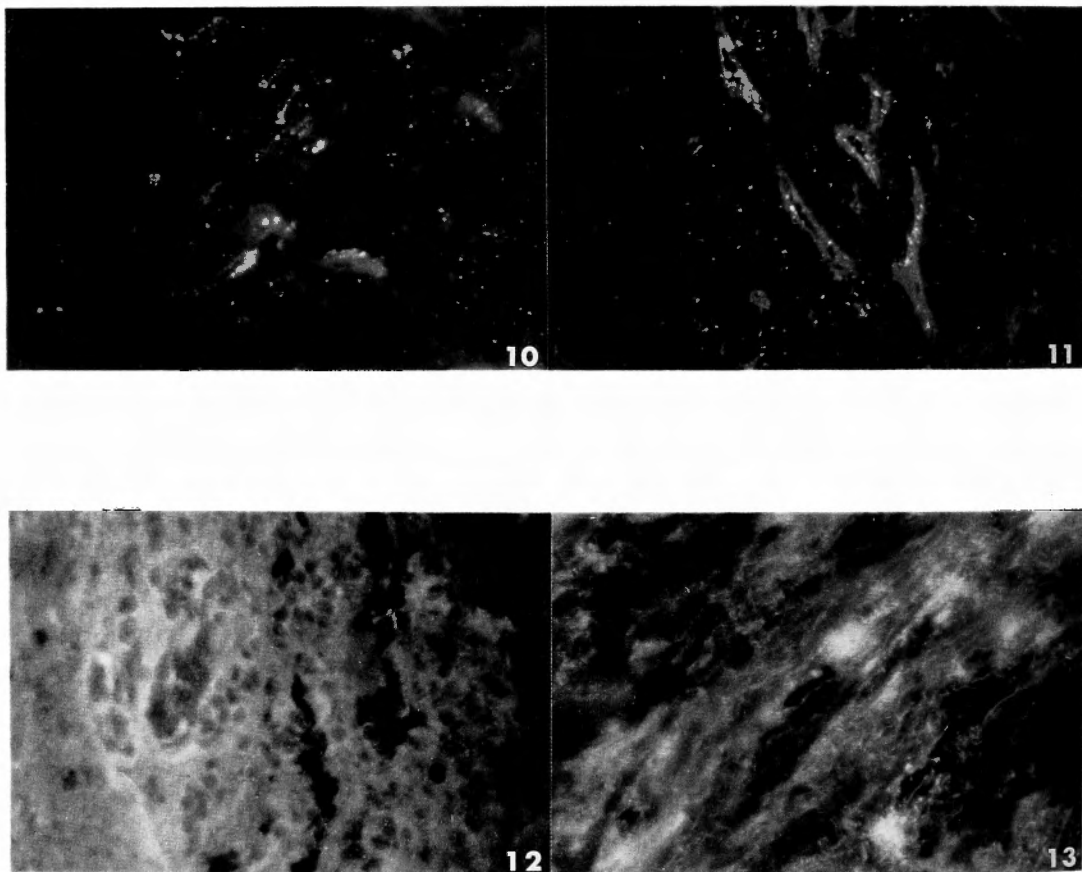
2) 人脳腫瘍症例の ^{131}I -Fibrinogen による脳 Scanning

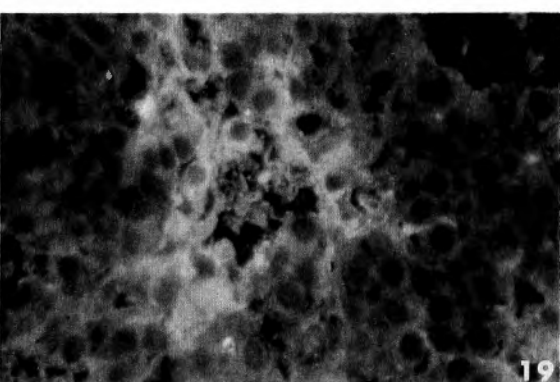
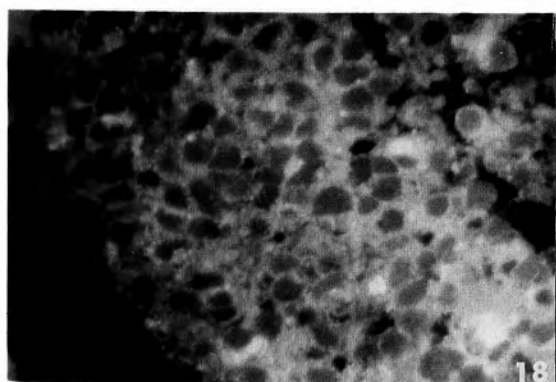
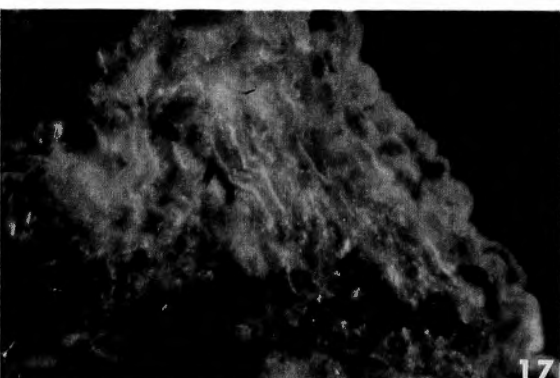
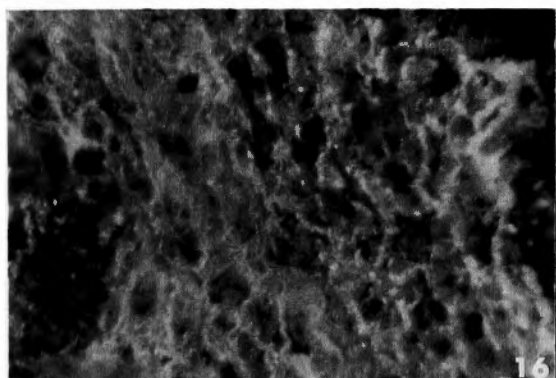
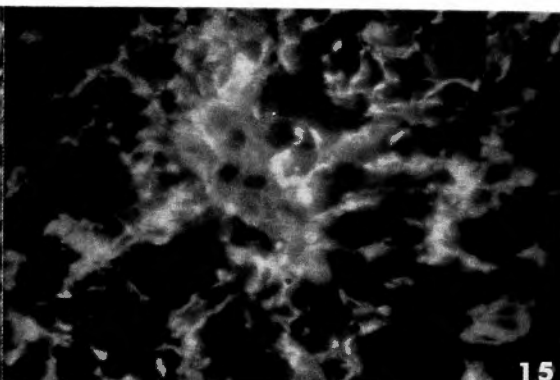
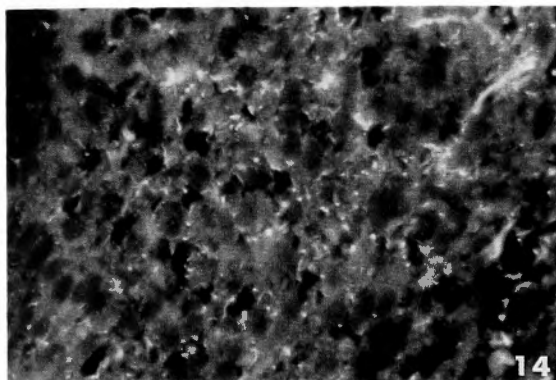
京大脳神経外科に入院した患者のうち脳腫瘍の疑いのある症例に ^{131}I -Fibrinogen 1 mCi (specific activity; 0.186mCi/mg) を投与し、直後及び12時間、24時間、48時間、時に72時間後に正面及び側面像の Scintillation

scanning を施行した。尚各症例とも RI 投与前に KI の経口投与により甲状腺の Block を行つた。Scanning には Nuclear Chicago 社製の PHO/GAMMA Ⅲ型 Gamma scintillation camera を用い更に 1600 channel multi-purpose analyzer 及び Memory scope を随時使用した。尚同一症例に一定期間を おいて $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 10mCi 静注直後から2時間にわたり Serial scanning を行い、その成績と ^{131}I -Fibrinogen による Scanning のそれと比較した。Scanning は ^{131}I -Fibrinogen は 30,000 ~ 50,000 Counts, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ は 100,000 Counts を集積して Scanning を施行した。

(B) 成績

1) Mouse glioma における ^{131}I -Fibrinogen の





とりこみについて

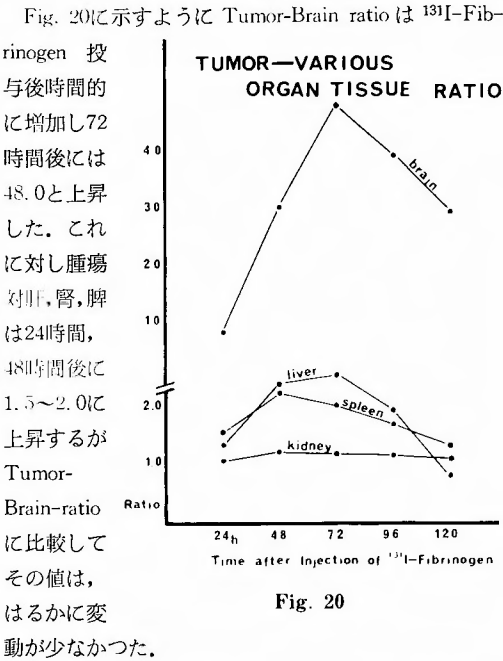


Fig. 20

2) 人脳腫瘍症例の ¹³¹I-Fibrinogen による
Scanning

18例の脳腫瘍の疑いのある患者に ¹³¹I-Fibrinogen による Scanning を施行した。このうち Positive scan が認められ手術により腫瘍の存在が確かめられたものは17例である。残り1例は他の神経放射線検査でも腫瘍は除外された。従つて ¹³¹I-Fibrinogen による Scanning の診断率はこの Series では100%となる。これらの症

例の組織学的診断及び ¹³¹I-Fibrinogen の成績を^{99m}Tc のそれと対比して Table 5 に示した。

Fig. 21は Cavernous angioma の症例の¹³¹I-Fibrino- gen 投与直後の Scinti-photo である。この例ではR.I. 投与直後より Positive scan が得られ時間の経過と共に像が不鮮明となつた。

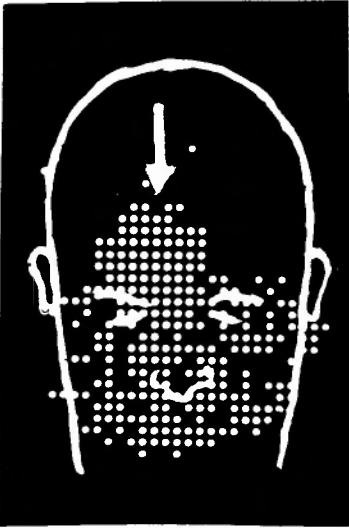


Fig. 21 Cavernous Angioma

Fig. 22は L-Temporo-occipital region の Glioblasto- ma の症例で ¹³¹I-Fibrinogen 投与後24~48時間で Posi- tive scan が得られた。一般に Meningioma では ¹³¹I- Fibrinogen 投与後比較的早い時間に Positive scan が得られ、しかも最も鮮明な像が得られ時間の経過と共に

Table 5 Result of brain scanning with ¹³¹I-Fibrinogen and ^{99m}Tc-Pertechnetate

		¹³¹ I-Fib.		^{99m} Tc			
Class. of tumor	No. of cases	Negative	Positive		Negative	Positive	
			(+)	(++)		(+)	(++)
Pituitary adenoma	1		1			1	
Meningioma	4		2	2		1	3
Cavernous angioma	1			1			1
Melanoma	1		1			1	
Abscess	1		1			1	
Pseudotumor cerebri	1	1			1		
Astrocytoma	3		3			3	
Oligodendroglioma	2		2			1	1
Glioblastoma	3		1	2		2	1
Total	17	1	11	5	1	10	6

不鮮明となつた。これに対し Glioblastoma などでは投与後48~72時間後に最も鮮明な Positive scan が得られた。



Fig. 22 Glioblastoma

考 察

腫瘍組織における Fibrinogen-fibrin 系の重要性については1958年 O'Meara⁷⁾ らによつて指摘されて以来いくつかの報告がある²³⁻²⁶⁾。彼らは腫瘍細胞には特有の凝固因子があつてこれによつて腫瘍細胞の表面及び周辺に Fibrin が沈着して網状構造が形成されこれが細胞の増殖、浸潤性発育に際して Matrix として積極的な役割をもつと述べている。

Scheffer²⁷⁾ は ¹³¹I-Fibrinogen の腫瘍への集積が Anti-coagulants の投与によつて阻害されることを認め腫瘍細胞は Coagulase type の Enzyme をもっておりこれが Fibrinogen に直接働いて腫瘍組織に Fibrin の沈着が起るのであらうと報告している。

Yancy²⁸⁾ も YCP-1 Mouse 皮下腫瘍を用いた実験で Fibrinogen 溶液中の腫瘍組織片は直ちに Fibrinogen 網でとりまかれるのに対し対照の正常組織片では、かかる現象が起らなかつたと述べている。更に Laki²⁹⁾ らはこの腫瘍から Thrombin と第Ⅲ因子を単離している。これが O'Meara の云う凝固因子と同一であるかどうかは明かでないが Laki らによると腫瘍から純化した第Ⅲ因子は血漿中に含まれるものに比し 100 倍以上の活性を示した。

Back⁹⁾ 等は更に Fibrin 沈着そのものが腫瘍細胞の増

殖を促すが、これと同時に起こる Fibrin 除去過程において生ずる Fibrin 分解産物としての Peptide も腫瘍細胞の蛋白合成源として利用され腫瘍細胞の増殖を促進するのではないかと考え、Rat の Murphy-Sturm lymphosarcoma において蛍光抗体法及び Radio-tracer 法を用いて Fibrinogen と同様に Streptokinase-activated plasmin の腫瘍内へのとりこみを観察し、両者がほぼ平衡関係を示すことを報告した。

一方 Bale, Spar, Pressman and Day¹⁻⁶⁾ 等は抗腫瘍抗体を精製していくうちにこれが Fibrinogen-fibrin system と免疫学的に交叉反応を示すことを認めた。更に ¹³¹I-標識抗 Fibrinogen 抗体が Rat の Murphy-Sturm lymphosarcoma に選択的に集まることを認め Fibrinogen が腫瘍抗原の主成分であると考えた。しかしながら彼らは腫瘍組織における Fibrinogen の意義について O'Meara らとは異り腫瘍増殖に伴つて起つた宿主と腫瘍組織との間の炎症反応や血管損傷の結果血管外に出た血漿 Fibrinogen が単に受動的に沈着したものにすぎないと説明している^{30,31)}。

一方 Fibrinogen の正常あるいは腫瘍組織内の局在部位に関しても従来いくつかの報告がある。例えば Gitlin³²⁾ は1953年に血管内、リンパ管内及び一部の結合組織を除いては一般に正常組織内には Fibrinogen は認められないと報告している。また腫瘍組織における Fibrinogen の局在についてすでに Hiramoto, Back⁸⁻¹⁰⁾ らが動物腫瘍及び一部の人腫瘍組織における成績を報告している。すなわち彼らは蛍光色素標識抗 Fibrinogen 抗体を直接担癌動物に注入し採取した腫瘍組織を観察した結果、腫瘍固有の間質の血管周囲に正常組織ではみられない Fibrinogen の蓄積像を認めており、この in vivo の実験の成績は Coons らの蛍光抗体染色法による in vitro の実験の成績と比較してほとんど差異を認めなかつたと報告している。尚、Hiramoto¹⁰⁾ らによると腫瘍の組織学的所見と Fibrinogen の分布との間には特別な関連は認められなかつたと述べている。Coons³³⁾ らによつて発展した蛍光抗体法は腫瘍組織内における蛋白質抗原を検索するには最も適当な方法であり、その特異性は種々の対照をとることによつて更に高くなる。RI 標識抗体による Autoradiography など RI による実験と比較しても局在に関しては RI による非特異的なとりこみを除外出来る点でよりすぐれていると考えられる³⁵⁾。又 Gitlin³⁴⁾ によると組織学的に他のいかなる Fibrin 染色法よりも抗 Fibrinogen 抗体による蛍光抗体染色法が最も特異的に Fibrin を検出す

ることが出来ると報告している。

そこで我々も蛍光色素標識抗 Fibrin 抗体を用い正常組織及び実験腫瘍ならびに人脳腫瘍の Fibrinogen の局在を検討したが、Rat の各種器官、組織の検索では Fibrinogen は肝細胞及び腎系球体毛細血管網に認められた以外は正常脳組織では血管外には全く認められずこの点は他の報告者の^{22,35)}の成績とよく一致した。

一方、動物腫瘍及び人脳腫瘍組織で検討した結果では Hiramoto³⁹⁾ らの報告とは少しく異なり臨床的に悪性で、浸潤性に増大する腫瘍と良性のものとの間に Fibrinogen の沈着及び分布に関して明らかな差が認められた。又脳腫瘍固有の新生血管周囲にも明らかに Fibrinogen の沈着が認められ、しかも腫瘍周辺部の正常組織で組織学的に Gliosis が認められた部分では Fibrinogen 沈着は認められなかった。

一方、線溶系に関しては Back⁹⁾ は Rat の腫瘍で Streptokinase-activated plasmin が Fibrinogen と同様に腫瘍にとりこまれることを RI 及び蛍光抗体法を用いて報告している。我々も人脳腫瘍で検討した結果同様に腫瘍内に Plasminogen のとりこみのあることを確認しさらにとりこみの程度・分布が先に述べた Fibrinogen の場合と同様腫瘍の悪性度と一定の関係を持つことが確認された。このような我々の実験及び検査成績から考えると Spar, Bale^{1-6,30,31)} らの推論する如く、単に腫瘍増殖に伴う腫瘍宿主間の類炎症反応や血管障害のみでは、腫瘍組織における高度の Fibrinogen の沈着は説明しえず、一方腫瘍新生血管の特異性によつて血管外に出た Plasma protein に由来するものとも考えられるか、対照として用いた抗 γ -Globulin antibody による染色所見では血管外にはこれらの蛋白は認められなかった。

このことは他の血漿蛋白と異り Fibrinogen が組織内にとりこまれる際には Fibrinogen から Fibrin への転換が起つており、この過程に O'Meara らの述べる如く、腫瘍細胞の積極的な働きが加つており、Fibrinogen の沈着が腫瘍の発育浸潤に何らかの意味を持つことを示唆するものと考えられる。一方 Plasminogen の腫瘍組織内における存在の意味を考えることは甚だ困難なことである。

O'Meara^{23,24)} の述べる如く腫瘍組織においては Fibrinolytic activity が欠如していると考えれば Plasminogen activating system の欠如があるのか或いはこれらの Activity の低下があるのか、それとも全体として Fibrin formation が除去過程より亢進しているのか、

いずれかであるが Fibrin degrading products は免疫学的に抗 Fibrinogen 抗体に対し同一反応を示す³⁷⁾ためこれら Degrading products の腫瘍組織における存在については免疫組織学的には明らかにし得なかつた。この点に関しては更に詳細な研究が必要であるか、これと関連して興味あることに Suda, Busch^{38,39)} らは腫瘍が蛋白合成源として血漿蛋白より Peptide に分解されたものを利用しているのではないかと述べていることと、Back⁹⁾ らが Fibrinogen が腫瘍の代謝、特に Nutritional に利用されているという推論と関係して腫瘍にとりこまれた Fibrinogen が一方では腫瘍細胞の発育のための支持組織になり、他方では Fibrinolysis によつて Fibrinopeptide に分解され腫瘍細胞にとりこまれ蛋白合成素材として利用されていると考えられる。

腫瘍内 Fibrinogen に関する一連の報告から、一方では抗 Fibrinogen 抗体や Fibrinogen そのものを RI の Carrier として用いて腫瘍の診断及び治療を行おうとし、他方では腫瘍細胞のもつ特異的凝固因子及び腫瘍組織内の Fibrin formation の機構を更に追求し、これと腫瘍増殖との関係を検討し真に腫瘍の増殖浸潤と関わりをもつならば、これを利用することによつて腫瘍治療を行い得るという考えのもとで、一連の研究が行われてきた。治療に関しては例へば O'Meara^{46,41)} らは Fibrinolytic enzyme で Fibrinolysis を促すか或いは彼らのいう Coagulating properties を中和することによつて腫瘍の増殖、浸潤を抑え、更に治療を行おうと述べており、又 Clifton⁴²⁾ らは Heparin や抗凝固剤で処置した担癌 Rat では転移形成が少いと述べている。更に Bale³¹⁾ らは ¹³¹I-anti-fibrin antibody 大量投与による腫瘍内照射を試み、更に Amiris⁴³⁾ らは Plasmin の投与によつて癌患者の症状改善を認めたことから、線溶系を介して有効に働くのではないかと述べている。この面から腫瘍治療を積極的に追求しているのは先に述べた O'Meara らである。彼らによると腫瘍細胞は先に述べた如く、Coagulating properties をもつが Fibrinolytic activity は欠如していると考え In vitro では Fibrinolysin によつて腫瘍細胞の Coagulating properties は抑制されるという。このことから彼らは In vivo で働く Fibrinolytic drug 或いは Coagulating properties を中和する物質の開発に力をそそぎ、これをもつて腫瘍治療の可能性があると述べている^{44,45)}。

他方 RI の Carrier として Fibrinogen 及び抗 Fibrinogen 抗体を用いて診断及び治療を行うとする試みは Bale, Monasterio, Murrack^{30,31,47-49)} 等、一連の報告が

みられる。又、大場らの報告⁴⁶⁾によれば ^{131}I -Fibrinogen を投与し Rat の吉田肉腫で検討した成績では投与後、24時間で腫瘍臓器比は筋肉16.50、腸15.00、腎7.86、肝5.50と高い腫瘍親和性が認められ48時間後には更にこれらの比が上昇する。我々の実験ではMouse gliomaを用い腫瘍-脳比は72時間後で30.0と非常に高い値を示したが他の臓器との比は1.0~2.0と上昇を示さず、大場らの報告と少し異つた成績が認められた。尚 ^{131}I -Albumin等による報告では投与後、24~48時間後に腫瘍臓器比のPeakが認められるのに反し ^{131}I -Fibrinogenが投与後、48~72時間後にPeakが認められる点は興味ある所見である。

臨床例においてもMonasterio⁴⁷⁾は腫瘍患者59例中42例に周囲より25%高い腫瘍RI Uptakeを認めたと報告している。DiChiro⁴⁸⁾は12例の脳腫瘍患者において ^{131}I -anti-fibrinogen antibodyを用いてScanningを行い1例のAstrocytomaを除いてはPositive scanが得られ特に2例のSarcomaでは満足すべき像が得られたと報告している。Marrack⁴⁹⁾も同様に ^{131}I -anti-fibrinogen antibodyを用いて腫瘍患者のScanningを施行し約80%に陽性Scanが得られたと述べ、更にこの成績はRISAよりすぐれ ^{203}Hg によるScanningの成績とは差異は認められなかつたと報告している。我々の人脳腫瘍のScanningの成績でも18例中17例でPositive Scanが得られしかもNegative scanの1例は他の検査でもついに腫瘍所見の得られなかつた例であり、陽性率としては満足すべき結果であつたが、現在我々がRoutineに用いている $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Pertechnetate⁵⁰⁾による脳Scanと比較してその陽性像は後者の方がより鮮明であり、しかも短時間で検査しようということから現在の段階では $^{99\text{m}}\text{Tc}$ によるものの方がすぐれていると云わざるを得ない。

我々が得た組織学的成績よりFibrinogenが腫瘍組織にとりこまれていると考えても1回の投与では腫瘍組織にとりこまれるFibrinogenのうち ^{131}I によつてLabelされたものはそのごく一部であることよりScanの精度をたかめるためには ^{131}I -Anti-fibrinogen antibodyや ^{131}I -Fibrinogenの頻回投与やAnti-fibrinolytic drugとの併用も考えられる。しかしながら先に述べた如く脳Scanに関しては $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 等短半減期のすぐれたRIが開発されており、むしろ腫瘍組織におけるFibrinogen系及び線溶系を通して腫瘍の発育、浸潤に対する抑制がなされ腫瘍治療への道が開けるのではないかと思われ、今後の詳細な研究が必要であると考え。

結 語

腫瘍組織のFibrinogen系及び線溶系に注目し種々の動物腫瘍及び人脳腫瘍組織についてFibrinogen及びPlasminogenの抗体を作製し蛍光抗体法を用いて免疫組織学的にその局在及び分布動態を観察した。

1) 動物腫瘍ではすべての例で広範囲なFibrinogenの分布が認められた。これに対して各臓器では、肝の肝細胞及び腎の糸球体基底膜以外にはFibrinogenの局在は認められなかつた。特に対照とした正常脳組織では血管外には認められなかつた。

2) 人脳腫瘍組織においては腫瘍の臨床的及び組織学的悪性度とFibrinogen及びPlasminogenの分布との間にはほぼ相関関係が認められた。Glioblastoma, Sarcoma, Metastatic carcinoma等では腫瘍細胞をとりまいて細胞間質にFibrinogenが沈着しているのが認められた。一方Pituitary adenoma, Meningioma, Neurinoma等ではほとんど血管内のみに認められ、ごくわずかに血管周囲組織に見られたものもあつた。

3) ^{131}I -Fibrinogenを用いMouse gliomaへの集中度を検討したが投与後72~92時間後にTumor-Brain ratio比は最高値に達した。

4) 同じく ^{131}I -Fibrinogenを用い脳腫瘍患者に脳Scanを試み18例中17例のPositive scanが得られた。陽性率はほぼ満足すべきものであつたが、鮮明度や短時間で検出出来る点より現在の段階では $^{99\text{m}}\text{Tc}$ による脳Scanがよくすぐれていると考えられる。

5) 腫瘍増殖とFibrinogen系及び線溶系の関連について考察し、これらの分布と腫瘍の悪性度が密接に関係することを明らかにし、これを通して腫瘍の治療への有用性について検討を試みた。

終りに臨み、終始懇切なる御指導及び御校閲を賜つた半田肇教授並に半田譲二講師に、深甚の謝意を表します。又、蛍光抗体法に関し御指導を賜つた前京大病理学教室助教授、現日大教授浜島義博先生に対し、心から感謝致します。

尚、本論文の要旨は、第27回日本脳神経外科学会に於て発表した。

文 献

- 1) Pressman, D., Day, E. D. and Planinsek, J. A.: Localization in vivo of radioiodinated anti-rat-fibrin antibodies and of radioiodinated rat fibrinogen in the Murphy rat lymphosarcoma

- and in other transplantable rat tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, **22** : 413, 1959.
- 2) Spar, I. L., Goodland, R. L. and Bale, W. F. : Localization of I-131 labeled antibody to rat fibrin in transplantable rat lymphosarcoma. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **100** : 259, 1959.
 - 3) Day, E. D., Planinsek, J. A. and Pressman, D. : Localization of radioiodinated rat fibrinogen in transplanted rat tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, **23** : 799, 1959.
 - 4) Spar, I. L., Bale, W. F. and Goodland, R. L. : Distribution of injected I-131 labeled antibody to dog fibrin in tumor bearing dogs. *Cancer Res.*, **20** : 1051, 1960.
 - 5) Bale, W. F., Spar, I. L. and Goodland, R. L. : Experimental radiation therapy of tumors with I-131 carrying antibodies to fibrin. *Cancer Res.*, **20** : 1488, 1960.
 - 6) Dewey, W. G., Bale, W. F., Rose, R. G. and Marrack, D. : Localization of antifibrin in human tumors. *Proc. 9th. Congr. Internat. Soc. Hemat. Moscow*, p. 94, 1962.
 - 7) O'Meara, R. A. Q. : Coagulating properties of cancers. *Irish J. Med. Sci.*, **394** : 474, 1958.
 - 8) Hiramoto, R., Yagi, Y. and Pressman, D. : Immunohistochemical studies in anti-Murphy lymphosarcoma sera. *Cancer Res.*, **19** : 874, 1959.
 - 9) Back, N., Shields, R. and Dewitt, G. : Uptake of fibrinogen and fibrinolytic enzymes by neoplastic tissue. *J. Nat. Cancer Inst.*, **36** : 171, 1966.
 - 10) Hiramoto, R., Berneckey, J. and Jurandowski, J. : Fibrin in human tumors. *Cancer Res.*, **20** : 592, 1960.
 - 11) Blombäck, B. and Blombäck, M. : Purification of human and bovine fibrinogen. *Arkiv För Kemi.*, **10** : 415, 1957.
 - 12) Donnelly, T. H., Laskowski, M. Jr. : Equilibria in the fibrinogen fibrin conversion. II Reversibility of the polymerization steps. *Arch. Biochem. & Biophys.*, **56** : 369, 1955.
 - 13) Kleine, D. L. : The purification and crystallization of plasminogen (profibrinolysin). *J. Biol. Chem.*, **204** : 949, 1953.
 - 14) Ouchterlony, O. : Antigen antibody reaction in gels. *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **26** : 507, 1949.
 - 15) Bennett, J. P. and Bournsnel, J. C. : Improvements in the method for the electrophoretic separation of proteins on agar gel. *Biochem. Biophys. Acta.*, **63** : 382, 1962.
 - 16) Wood, B. T., Thompson, S. H. and Goldstein, G. : Fluorescent antibody staining ; preparation of fluorescein-isothiocyanate labeled antibodies. *J. Imm.*, **95** : 225, 1965.
 - 17) Cebra, J. J. and Goldstein, G. : Chromatographic purification of tetramethylrhodamine immunoglobulin conjugates and their use in the cellular localization of rabbit- γ -globulin. *J. Imm.*, **95** : 230, 1965.
 - 18) Sober, H. A. and Peterson, E. A. : Protein chromatography on ion exchange cellulose. *Fed. Proc.*, **17** : 1116, 1958.
 - 19) McDevitt, H. O., Peters, J. H. and Pollard, L. W. : Purification and analysis of fluorescein-labeled antisera by column chromatography. *J. Imm.*, **90** : 634, 1963.
 - 20) Sainte-Marie, G. : A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J. Histochem. Cytochem.*, **10** : 250, 1962.
 - 21) Bertalanffy, F. D. : Evaluation of the acridine-orange fluorescence microscope method for cytodiagnosis of cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **93** : 717, 1962.
 - 22) Hamashima, Y., Harter, J. G. and Coons, A. H. : The localization of albumin and fibrinogen in human liver cells. *J. Cell. Biol.*, **20** : 271, 1964.
 - 23) O'Meara, R.A.Q. and Thornes, R. D. : Some properties of the cancer coagulating factor. *Irish J. Med. Sci.*, **423** : 106, 1963.
 - 24) Boggust, W. A., O'Brien, D. J., O'Meara, R. A. Q. and Thornes, R. D. : The coagulating factors of normal human and human cancer tissues. *Irish J. Med. Sci.*, **447** : 131, 1963.
 - 25) O'Meara, R.A.Q. : The growth pattern of carcinoma. *Arch. De. Vecchi. Anat. Path.*, **31** : 365, 1964.
 - 26) Clarke, N. and O'Meara, R.A.Q. : Intracellular location of thromboplastic activity in the cells of human chorion. *Brit. J. Haemat.*, **12** : 536, 1966.
 - 27) Shaeffer, J. R. : Interference in localization of I-131 fibrinogen in rat tumors by anticoagulants. *Am. J. Physiol.*, **206** : 573, 1964.
 - 28) Yancy, S. T. : Plasma cell neoplasm arising in a CAF mouse. characteristics and response to certain Chemotherapeutic agents. *J. Nat. Cancer Inst.*, **33** : 373, 1964.
 - 29) Laki, K. : Fibrinogen. p. 32, Merck Dekker Inc. N. Y.
 - 30) Bale, W. F., Spar, I. and Goodland, R. L. : Experimental radiation therapy of tumors with I-131-carrying antibodies to fibrin. *Cancer Res.*, **20** : 1488, 1960.
 - 31) Spar, I. L., Bale, W. F. and Marrack, D. : ¹³¹I-labeled antibodies to human fibrinogen,

- diagnostic studies and therapeutic trials. *Cancer.*, **20** : 865, 1967.
- 32) Gitlin, D., Landing, B. H. and Whipple, H. : The localization of homologous protein in the tissue of young human beings as demonstrated with fluorescent antibodies. *J. Exper. Med.*, **97** : 163, 1953.
- 33) Coons, A. H. and Kaplan, N. H. : Localization of antigen in tissue cells. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J. Exper. Med.*, **91** : 1, 1950.
- 34) Gitlin, D. and Craig, J. M. : Variations in the staining characteristics of human fibrin. *Am. J. Path.*, **33** : 267, 1957.
- 35) Barnhart, M. I. and Anderson, G. H. : Intracellular localization of fibrinogen. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **110** : 734, 1962.
- 36) Pressman, D., Yagi, Y. and Hiramoto, R. : A comparison of fluorescein and I-131 as labels for determining the in vivo localization of anti-tissue antibodies. *Int. Arch. Allergy.*, **12** : 125, 1958.
- 37) Berglund, G. : Immuno-electrophoretic studies of fibrinogen, plasmin and lytic products of fibrinogen and fibrin. *Int. Arch. Allergy.*, **21** : 193, 1962.
- 38) Ishikawa, E. and Suda, M. : A study on host-tumor relationship, with special reference to amino acid nutrition and protein metabolism. *Gann.*, **53** : 81, 1962.
- 39) Bosch, H. and Green, H.S.N. : The release of enzymes from ascites tumor cells into extracellular medium. *Biochem. Biophys. Acta.*, **30** : 444, 1958.
- 40) Claser, E. M., Spink, K. and O'Meara, R. Q. A. : A screening test for substances inhibitory the cancer coagulative factor. *Nature.*, **5014** : 1008, 1965.
- 41) O'Meara, R. A. Q. and O'Halloran, M. J. : Protamine derivatives in the treatment of advanced carcinoma of the breast. *Lancet.*, **2** : 613, 1963.
- 42) Clifton, E. E. and Agostino, D. : The effects of fibrin formation and alterations in the clotting mechanism on the development of metastases. *J. Vascular Dis.*, **2** : 43, 1965.
- 43) Amris, C. J. : Turnover and distribution of 131-I-labeled porcine plasmin in man and dog. *Dan. Med. Bull.*, **11** : 146, 1964.
- 44) Thornes, R. D. and O'Meara, R. A. Q. : A method of detecting and estimating inhibitors of the cancer coagulative factor. *Irish J. Med. Sci.*, **428** : 1961.
- 45) Boggust, W. A. and O'Meara, R. A. Q. : The thermolability of tissue thromboplastins. *Irish J. Med. Sci.*, **481** : 11, 1966.
- 46) Ohba, S. : Studies on the diagnosis of malignant tumors using radioisotope labeled compounds. *J. Nucl. Med.*, **7** : 41, 1966.
- 47) Monasterio, G., Bochini, M. and Giordani, R. : New indicator methodology for diagnosis of tumors by means of radioisotopes. *Minerva Nucl.*, **7** : 115, 1963.
- 48) DiChiro, G., Spar, I. L., Bale, W.F. and Laszkowski, E. J. : "RIAF" radio-iodinated anti-fibrinogen encephalography. Preliminary experiences. *Acta Radiol.*, **1** : 967, 1963.
- 49) Marrack, D., Kubala, M. and Corry, P. : Localization of intracranial tumors. Comparative study with I-131 labeled antibody to human fibrinogen and neohydrin Hg-203. *Cancer.*, **20** : 751, 1967.
- 50) Handa, H., Handa, J., Nabeshima, S., Sato, K., Kousaka, T. and Torizuka, K. : Technetium-99m and Indium-113m scans in 101 intracranial tumors. *Brain Nerve.*, **21** : 43, 1969.