

ヒ ト 腎 細 胞 癌 の 基 礎 的 研 究

第2報. 腎細胞癌組織内および患者血清中アルカリ
フォスファターゼアイソザイムについて

大阪大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 園田孝夫教授)

松 田 稔・長 船 匡 男・宇 佐 美 道 之
古 武 敏 彦・園 田 孝 夫

大阪大学医学部第3内科学教室 (主任: 山村雄一教授)

波 田 寿 一・渡 辺 信 一 郎
大 河 内 寿 一・東 野 一 彌

A FUNDAMENTAL STUDY ON RENAL CELL CARCINOMA

PART 2. TISSUE AND SERUM ALKALINE PHOSPHATASE
ISOZYME OF RENAL CELL CARCINOMAMinoru MATSUDA, Masao OSAFUNE, Michiyuki USAMI,
Toshihiko KOTAKE and Takao SONODA*From the Department of Urology, Osaka University Hospital
(Chairman: Prof. T. Sonoda, M. D.)*Toshikazu HADA, Shinichiro WATANABE,
Toshikazu OKOCHI and Kazuya HIGASHINO*From the Third Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital
(Chairman: Prof. Y. Yamamura, M. D.)*

A fundamental study was performed about alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase (E.C., 3.1.3.1.) activity and its isozyme patterns in 4 normal renal tissues, 24 renal cell carcinoma tissues and sera from patients with the tumor. The results obtained were as follows.

1) Alkaline phosphatase activity in four normal renal tissues was rather consistent and the isozyme pattern in polyacrylamide gel disk electrophoresis consisted of 3 or 4 components.

2) Alkaline phosphatase was not detected from renal cell carcinoma tissue in three cases. The other twenty-one had the activity of various degrees. The activity was rather high in well differentiated renal cell carcinoma compared with poorly differentiated ones, although the difference was not statistically significant. With respect to the cell type, i.e. clear, granular or mixed cell type, there was no correlation with the activity of the enzyme.

3) Renal cell carcinoma tissue was found to contain at least a component of alkaline phosphatase isozymes of kidney proper except a case with bone type and two cases with liver type alkaline phosphatase. In addition to this, several other isozymes were detected including Kasahara isozyme, fetal intestinal type alkaline phosphatase and two isozymes of unknown characteristics.

4) Including 3 cases with elevated serum alkaline phosphatase activity without any evidence of liver or bone metastasis, serum alkaline phosphatase isozyme in renal cell carcinoma patients was

regarded as the liver type.

These results rendered it difficult to support the modern concept of histogenesis of renal cell carcinoma stating that this carcinoma is developed exclusively from the proximal convoluted tubules. Further investigations will be needed for the establishment of this concept. The elevated serum alkaline phosphatase in patients with renal cell carcinoma was thought to be mainly hepatic origin as described by several authors.

は じ め に

現在腎細胞癌は一般的に腎近位尿管より発生する悪性腫瘍と考えられており、またその根拠をおもに形態学的観察および免疫学的研究によっている。しかしわれわれが経験する腎細胞癌の臨床像、病理組織学的所見、生物学的機能にはきわめて多彩なものがあ

り、その発生母細胞は決して単一のものとは考えられない。一般に癌細胞はその癌の由来細胞の生物学的性質を消失あるいは一部維持するが、一方その細胞の胎児期の生物学的性質に類似したものも表現するといわれる。そこで細胞の機能的分化と密接な関係を有する生物学的、生化学的性質をマーカーとし、悪性化にともなうその変化を観察すれば、ある1つの癌の生物学的性質あるいは脱分化の状態などを把握できる可能性がある。またその癌の発生母細胞確認の裏付けともなるであろう。腎細胞癌と腎近位尿管をむすぶこのような生化学的マーカーとして alkaline phosphatase (orthophosphoric monoester phosphohydrolase, EC 3. 1. 3. 1, 以下 Al. P-ase と略す) は腎近位尿管における活性が高いこと、および肝、骨、小腸、胎盤などの分化した組織ではそれぞれ異なった性質を有するアイソザイムがみられることより、この酵素の生理的意義はいまだ不明の域にあるが、きわめて有意義なものであると考えられる。また Al. P-ase は腫瘍組織により特異なアイソザイムがみられる場合があり (c. g. Regan isozyme¹⁾, Nagao isozyme²⁾, Kasahara isozyme^{3,4)}, fetal intestinal type Al. P-ase⁵⁾), 腫瘍発生、分化異常の面からも非常に興味をもたれる。

さらに近年腎細胞癌にともない可逆性肝機能障害が症例の一部にみられ、そのおもな臨床所見として BSP 排泄遅延、プロトロンビン時間延長、血清 γ -GTP および Al. P-ase の上昇 (GOT, GPT の上昇することは少ないという) をもたらすとされている⁶⁾。その成因として腎細胞癌組織からのなんらかの肝毒物質の遊離、あるいは腫瘍による肝静脈環流の障害が推定されているが、詳細は不明のままである。血清 Al. P-ase 上昇に関しては腫瘍組織より Al. P-ase が血中に遊離するためであるとの考えもみられる⁷⁻⁹⁾。腎細胞癌組織な

らびに患者血清中 Al. P-ase を詳細に検討することはこの問題に対してもわれわれの理解をさらに深めることになり重要であると考えられ、以下の研究をおこなった。

研究対象および方法

1) 研究対象

1975年10月以降、当院泌尿器科ならびに関連病院 (大阪府立成人病センター、大阪厚生年金病院、大阪府立病院、大阪警察病院、住友病院) において手術的治療がなされ、またその腫瘍組織および血清が以下の研究に使用された腎細胞癌症例は24例である。これらの症例の年齢、性別、組織学的悪性度、細胞型、および血清 Al. P-ase 上昇 (15 King-Armstrong unit 以上、肝、骨への転移巣を有する症例はのぞく) の有無を Table 1 にまとめて示した。男女比は3:1と男子に多く、平均年齢54.4歳 (22~74歳、中間値58.0歳) であった。対照として事故または他疾患にて死亡し剖検に付された4例より得られた正常腎組織を使用した。

2) 研究方法

A. 病理組織学的診断

腫瘍の病理組織学的診断は通常の10%ホルマリン固定、ヘマトキシリン・エオジン染色標本よりおこなわれ、細胞型の分類は腫瘍細胞の2/3以上が細胞質の明るい透明な細胞より成る場合を clear cell type, 2/3以上が細胞質が均一に、または細顆粒状に好酸性に染まる細胞より成る場合を granular cell type とし、この中間に位置する腫瘍を mixed cell type と分類した。また腫瘍の組織学的悪性度は Table 2 に示すように腫瘍細胞の核の異型性に注目した Skinner ら¹⁰⁾の基準により grade 1~grade 4 に分類し、さらに比較検討のため grade 1~grade 2 を low grade, grade 3~grade 4 を high grade とした。

B. 組織ならびに血清の保存

生化学的研究のため、腫瘍組織ならびに正常腎組織は生理食塩水にて充分洗滌したのち -70°C に保存し、使用時室温にて解凍研究材料とした。患者血清は -20°C にて保存されたものを使用した。

Table 1. Patient profiles, serum Al. P-ase activity, histopathological findings and Al. P-ase activity in renal cell carcinoma tissue.

No.	Age	Sex	Serum Al. P-ase	Grade**	Cell type***	Tissue Al. P-ase (mu/g. wet weight)
1	65	male		2	c	2,760
2	47	male		3	m	5,130
3	61	male		2	c	1,296
4	73	male		4	m	5,732
5	52	female	elevated*	4	g	1,362
6	56	male		3	c	2,684
7	50	male		4	g	912
8	71	male		3	c	(-)
9	22	female		3	g	922
10	51	male		2	c	1,365
11	65	male		4	c	216
12	44	male		3	g	432
13	74	male		2	c	1,538
14	41	male	elevated*	3	c	600
15	72	male		2	m	970
16	32	female		3	c	1,596
17	64	male		3	m	(-)
18	54	male		3	m	1,166
19	68	male	elevated*	3	c	5,222
20	55	female		2	c	1,036
21	62	male		3	c	(-)
22	60	male		2	c	2,160
23	54	female		2	c	14,604
24	67	female		2	g	13,006

* Elevated serum Al. P-ase without any evidence of liver or bone metastasis.

** Grading is based on the criteria advocated by Skinner, D.G. et al.¹⁰

*** c: clear cell type, m: mixed cell type, g: granular cell type

Table 2. Criteria for histological grading.

Grading	Nuclear atypism
Grade 1	Nuclei are indistinguishable from those of normal tubular cells.
Grade 2	Nuclei are often pyknotic and slightly irregular in shape, but only slightly enlarged and without abnormal nucleoli.
Grade 3	Nuclei are moderately enlarged irregular and pleomorphic, and often with large nucleoli, but there are no bizarre forms.
Grade 4	Bizarre and giant nuclei are numerous.

C. 組織 Al. P-ase の抽出

腫瘍組織を3倍量の 50 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 とともに充分にホモジナイズする。この一部は粗ホモジネイトとして Al. P-ase 活性ならびにタンパク質量の測定に使用した。残部に最終濃度 30% (v/v) となるように冷 n-butanol を加えさらに充分ホモジナイズする。これを 37°C にて1時間保温したのち 4°C にて1夜放置し、3,000 rpm, 45分の遠心により上清分画を採取した。この butanol 分画はさらに氷冷下アセトンによる分画により30~70%アセトンにて沈澱する部分を得、これを 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.9

に溶解し、さらにこの緩衝液に対し24時間の透析をおこない、これを組織 Al. P-ase の粗酵素液とした。

D. Al. P-ase 活性およびタンパク質の測定

D-1. Al. P-ase 活性

Higashino et al.¹¹⁾の方法により測定したが、その概略は次のようなものである。20 mM disodium phenyl phosphate, 4 mM 4-aminoantipyrine および 2 mM MgCl₂ を含む 0.2 M carbonate-bicarbonate buffer, pH 10.0, 1 ml に適量の酵素を加えて全量を 2 ml とし、37°C にて15分間保温する。これに 6 mM K₃Fe(CN)₆ を含む 65 mM acetic acid 2 ml を加え発色せしめ、500 nm にて吸光測定した。酵素活性は 37°C にて1分間に 1 nmol の phenol を遊離せしめる活性を 1 mU とした。

D-2. タンパク質の測定

ウシ血清アルブミンを標準として Lowry et al.¹²⁾の方法により比色定量した。

E. 薄層電気泳動

5%ポリアクリルアミドゲルを使用し、荻田¹³⁾の方法に従い、巾1 cm あたり1 mA の定電流にて3時間半の泳動をおこない、活性帯の検出は disodium α -naphthyl phosphate を基質として 37°C にて保温し、fast blue BB salt にてジアゾカップリングせしめる方法によった。

F. ディスク電気泳動

Davis¹⁴⁾の方法により7.5%ポリアクリルアミドを支持体とし、1チューブあたり2 mA の定電流で約90分の泳動をおこない、活性帯の検出は薄層電気泳動の場合と同様の方法でおこなった。

G. DEAE cellulose カラムクロマトグラフィー

1.2 cm×10 cm の DEAE cellulose カラムを 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.9 にて平衡化し、試料を apply したのち同じ緩衝液で洗滌後、50 mM から 300 mM の NaCl 濃度勾配 (全量 1,250 ml) にて溶出し、5 ml ずつの分画を採取した。

H. Neuraminidase 処理

10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.9 にて酵素標品のタンパク質量の20倍のタンパク質を含む neuraminidase (*Cl. perfringens*) を加え、室温にて16時間反応せしめた。

I. 耐熱性および各種阻害剤による影響

耐熱性は 56°C 30分および60分の加温後に残存する Al. P-ase 活性として測定した。

酵素阻害剤としては、L-phenylalanine, L-leucine, L-homoarginine, L-tryptophan および無機燐 (K_2HPO_4) を用い、それぞれの阻害剤が酵素反応液中で最終濃度 5 mM, 10 mM となるように添加し、残存する活性を測定した。

結 果

1) 正常腎組織 Al. P-ase

正常腎組織 Al. P-ase は粗ホモジネイトおよびアセトン分画のそれぞれで Table 3. に示するような活性を示す。以下の検討はこのアセトン分画を使用しておこなったものである。

A. 薄層電気泳動像

Fig. 1 に示すように正常腎組織 Al. P-ase は対照として置いた肝型 Al. P-ase にほぼ一致する泳動帯から β - γ -globulin 位に位置する泳動帯を示すが、明確な活性帯として確認できるバンドは肝型 Al. P-ase にほぼ一致するもの以外に少なくとも2つ確認される。しかしそれらの分離は決して良好なものではない。

B. ディスク電気泳動像

Fig. 2 に示すように4本の泳動帯に分離される。別に対照として置いた肝型 Al. P-ase は最陽極には泳動されず、ほぼ陽極より2番目の泳動帯と一致する。標品により陰極側の2本の泳動帯が1本の場合もあるが、これが個体差による (micro-heterogeneity による) ものかどうかは不明である。これらのアイソザイムは肝、骨、小腸に胎盤などの Al. P-ase との異同が問題となるが、すべて腎組織より抽出されたものであり、任意的に陽極側より K_1 , K_2 , K_3 , K_4 と名付けた。なおすでに述べたように肝型 Al. P-ase はほぼ K_2 の位置に泳動されるが、 K_2 がすべて肝型 Al. P-ase による活性帯であるのか、あるいは腎固有の Al. P-ase を含むものかは今後さらに検討の必要がある。

C. DEAE cellulose カラムクロマトグラフィーによる腎組織 Al. P-ase の分離

カラムクロマトグラフィーにより腎組織 Al. P-ase のそれぞれの単独成分への分離を試みたが、Fig. 3 に示すように Fraction No. 12~25 に含まれる Al. P-ase は K_4 のみから成ると考えられるが、Fraction No. 26以降にも K_1 , K_2 , K_3 とともに K_4 も混在し、完全な分離を示すにはいたっていない。

D. 耐熱性および各種阻害剤による影響

K_1 ~ K_4 の混合標品および K_4 単独標品についての検討結果を Table 4 の左半に示した。腎組織 Al. P-ase の耐熱性はかなり低く、また各種阻害剤に対する態度は肝型あるいは骨型に類似した性質を示す。

2) 腎細胞癌組織内 Al. P-ase

A. 組織内 Al. P-ase 活性

Table 3. Al. P-ase activity in normal renal tissue.

Material	Enzyme	Crude homogenate (mu/g.wet weight)	30-70% acetone fraction (mu/mg.protein)
Normal kidney No.1		7,888	960
No.2		6,196	672
No.3		6,308	628
No.4		6,766	864

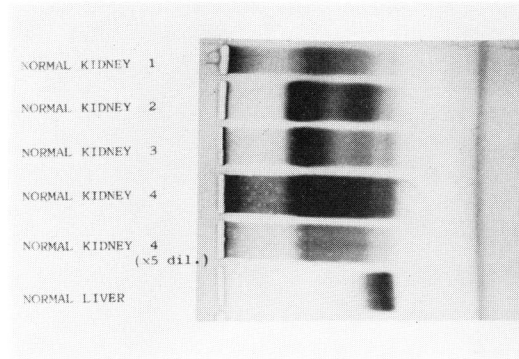


Fig. 1. Isozyme pattern of normal renal tissue Al. P-ase on polyacrylamide gel thin layer electrophoresis.

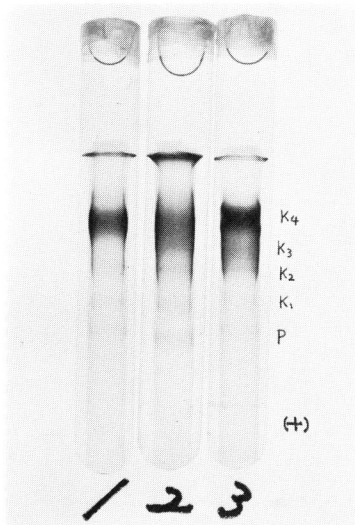


Fig. 2. Isozyme pattern of normal renal tissue Al. P-ase on polyacrylamide disk electrophoresis. Three out of four normal renal tissue Al. P-ase preparation are presented. P: Band visible because of contamination of pigmet in the enzyme preparation. K₁, K₂, K₃, K₄: Normal renal tissue Al. P-ase isozymes.

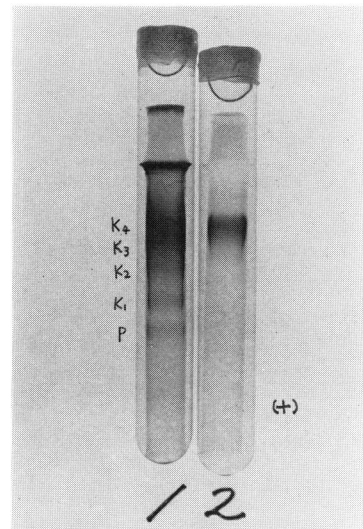


Fig. 3. Isolation of K₄ component by DEAE cellulose column chromatography. 1: normal renal tissue Al. P-ase. 2: isolated K₄ component.

24例の腎細胞癌組織の検討より得た粗ホモジネイトにおける Al. P-ase 活性を Table 1 に記載した. 3 例においては Al. P-ase 活性はほとんど認められず, また他の21例における活性値もきわめて統一性にかけており, 最も高い症例 (症例 No. 23) では 14,604 mU/g. wet weight とほぼ正常腎組織の2倍に達する活性を示すが, 別の高値を示す1例 (症例 No. 24) をのぞき, 他はおおむね正常腎組織よりも低値を示す. Fig. 4, Fig. 5 には腫瘍の細胞型および悪性度と組織内 Al. P-ase 活性との関係を示したが, 細胞型との間

にはとくに関係は認められず, また悪性度との間には high grade の腫瘍で低値を示す傾向がみられるが, 統計学的には有意差は認められなかった ($0.1 < p < 0.2$).

B. Al. P-ase アイソザイム

正常腎組織 Al. P-ase について良好な分離能を示したディスク電気泳動をおもに採用し, またさらに薄層ゲル電気泳動をも併用し検討した. まずディスク電気泳動によるアイソザイムの分析の結果を Table 5 に示すが, きわめて多彩な様相を呈している. K₁~K₄ を正常腎固有のアイソザイムと考えると, K₂とK₃の

Table 4. Thermostability and effect of some inhibitors on Al. P-ase of normal kidney or renal cell carcinoma. Activity remaining is expressed as the percentage of value for untreated control.

Enzyme		ALP-ase in normal kidney		ALP-ase in renal cell carcinoma			
		K1 + K2 + K3 + K4	K4	Liver type (pt. No.24)	Bone type (pt. No.9)	Intes-tinal type (pt. No.23)	Pure K4 type (pt. No.15)
Treatment	heating						
	56°C, 30 min.	18.5	13.7	32.2	17.7	43.0	18.0
	56°C, 60 min.	14.3	3.5	16.8	13.5	34.6	9.1
inhibitors*	L-phenylalamine 5mM	72.8	91.0	88.0	87.0	32.5	84.3
	10mM	63.7	80.0	77.2	72.8	21.9	74.0
L-leucine	5mM	56.9	73.3	73.2	72.5	43.2	69.3
	10mM	48.2	57.7	55.3	56.8	27.9	55.2
L-homoarginine	5mM	41.9	43.8	36.1	32.5	73.5	26.4
	10mM	28.3	27.8	22.6	23.0	78.7	26.2
L-tryptophan	5mM	64.9	71.5	78.3	81.5	25.2	74.9
	10mM	53.8	49.3	61.5	59.3	18.4	59.9
inorg. P**	5mM	85.3	88.4	91.3	83.7	85.2	87.8
	10mM	82.2	85.9	83.7	73.0	78.4	81.8

* Inhibitor was incorporated in the assey mixture to give the final concentration indicated.

** Inorganic phosphate

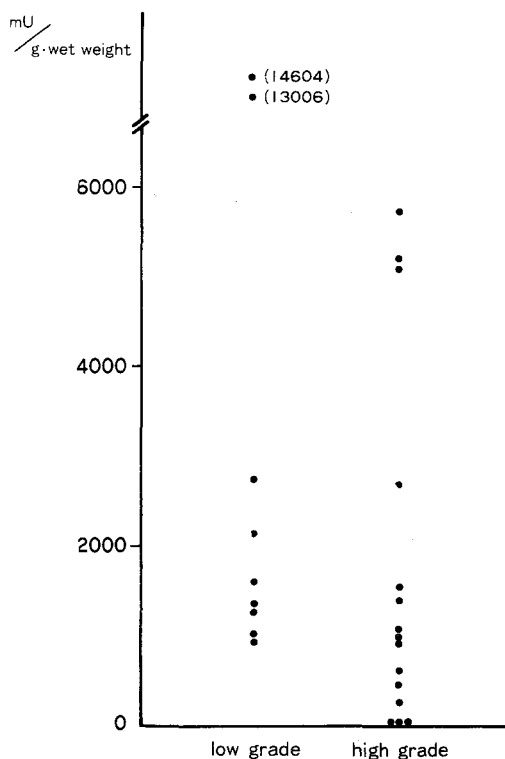


Fig. 4. Grade of malignancy and Al. P-ase activity in renal cell carcinoma (RCC) tissue.

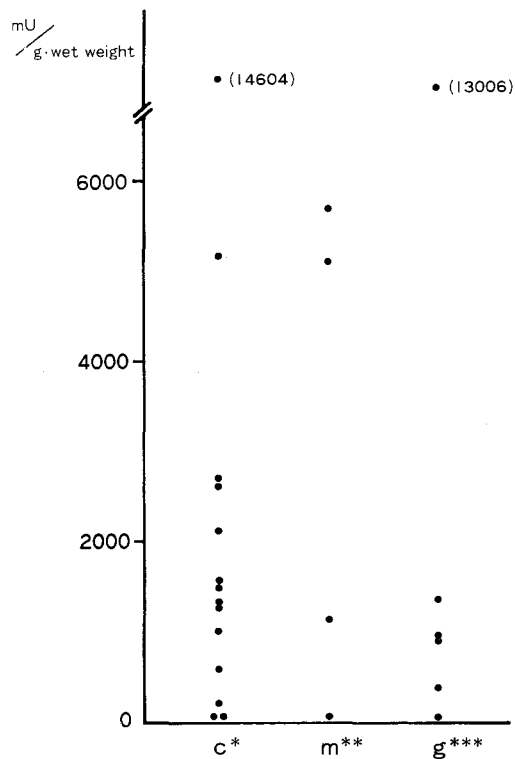


Fig. 5. Cell type and Al. P-ase activity in renal cell carcinoma (RCC) tissue.

* clear cell type.

** mixed cell type.

*** granular cell type.

Table 5. Isozyme pattern of Al. P-ase in renal cell carcinoma by polyacrylamide gel disk electrophoresis.

Group	Al-Pase	Isozyme	Pattern	No. of cases
1	K ₁	K ₂	K ₃₊₄ *	4
2	K ₁	K ₂		1
3		K ₂		2
4		K ₂	K ₃₊₄ *	2
5			K ₃₊₄ *	4
6	K ₀ **	K ₂	K ₃₊₄ *	1
7	K ₁ -K ₂ ***		K ₃₊₄ *	2
8	K ₁ -K ₂ ***		K ₃₊₄ * K ₅ **	2
9			K ₃₊₄ * K ₅ **	2
10			K ₂ -K ₃ ***	1

* Isozyme detected from K₃ to K₄ region, but the separation is not enough to identify as K₃ or K₄.

** Isozyme not detected in normal renal tissue. K₀ moves faster than K₁ and K₅ slower than K₄.

*** Isozyme detected between K₁ and K₂ (K₁-K₂) or K₂ and K₃ (K₂-K₃).

間に泳動される1本だけの活性帯を示す1例をのぞき、腫瘍組織においてもこれらのすべてまたはその一部が保存されていた。しかしこれ以外にも K₁ よりさらに陽極に泳動されるアイソザイムを有する症例や、K₁ と K₂ の間に認められる活性帯、K₄ よりさらにおくれて泳動される活性帯も検出された。

薄層電気泳動による結果はアイソザイムパターンとして示すには正常腎組織の場合と同じく、やはり分離が不十分であったが、非常に興味ある泳動像が示す場合もみられ、この併用により肝型、骨型、(胎児)小腸型、および Kasahara isozyme を同定することが可能となった。以下これら特異な泳動像を示した Al. P-ase について簡単にのべる。

C. 特異な泳動像を示した腎細胞癌組織内 Al-Pase について

i. Kasahara isozyme

Table 5 において group 1 に含まれる4症例中の1例(症例 No. 16)では、その薄層電気泳動像は Fig. 6 に示すように肝型 Al. P-ase とそのさらに陽極側に位置する活性帯がみられた(肝型におくれて泳動される弱い活性帯も認められる)。56°C 30分の加熱標品の泳動像ではこの最陽極の活性帯のみが残存し、また neuraminidase 処理によっては易動度の変化は比較的少なく、これが大きく変化する肝型 Al. P-ase と明らかに区別されるようになった。このアイソザイムはこのような易動度および耐熱性より、Warnock and Reisman¹⁵⁾, Higashino et al.^{3,4)} により見出された carcino-fetal antigen の1つとされる Kasahara isozyme と考えられるが、今後さらに詳細に検討する予定であ

る。ディスク電気泳動像においては肝型 Al. P-ase は K₂ として、Kasahara isozyme は K₁ として認識されたものと思われる。しかし K₁ がすべて Kasahara isozyme に相当するものではないことは正常腎組織には Kasahara isozyme が存在しないことより明らかであろう。

ii. 骨型 Al. P-ase

Table 5 において group 10 として示した1例(症例 No. 9)の Al. P-ase はディスク電気泳動により K₁ と K₂ の間に泳動される1本の活性帯を示し、またその薄層電気泳動像も Fig. 6 に示すように肝型にやや遅れて泳動される骨型 Al. P-ase の易動度を示した。Table 4 にはその酵素化学的性質を示したが、耐熱性はきわめて低く、また L-homoarginine により強く阻害されることから骨型 Al. P-ase と同定された。

iii. 肝型 Al. P-ase

Table 5 において group 3 として示した K₂ 単独型を示す2症例(症例 No. 14, No. 24)の Al. P-ase は薄層電気泳動において肝型 Al. P-ase と一致した(Fig. 6)。症例24より得た標品による検討結果を Fig. 7 に示すが、この Al. P-ase は neuraminidase 処理により正常肝 Al. P-ase とまったく同じ易動度の変化を示し、Table 4 にも示すように耐熱性はなく、L-homoarginine に対し sensitive であることより肝型 Al. P-ase 単独型と同定された。しかしすでに述べたように他の酵素標品において認められる K₂ がすべて肝型 Al. P-ase と同一であるかについては今後検討されなければならない点の1つである。

iv. (胎児)小腸型 Al. P-ase

(胎児)小腸型 Al. P-ase が主成分と考えられる症例はまず酵素標品の耐熱性および各種阻害剤に対する態度よりその存在が認められたものである。このアイソザイムが見出された症例は Table 5 に group 1 として示したうちの2症例(症例 No 4, No. 23)である。そのディスク電気泳動像は K₁, K₂, K₃₊₄ とほぼ正常腎と同じアイソザイムパターンを示したが、薄層電気泳動像は肝型およびこれにやや遅れて泳動される活性帯を中心とし、これより陰極側に活性を認められる(Fig. 8)。そしてその諸性質の検討結果は Table 4 にも示すように耐熱性はかなり高く、56°C 30分の加温によっても53%の活性が残存し、また L-phenylalanine, L-leucine, L-tryptophan に sensitive であることから小腸型 Al. P-ase が主体であると考えられた。またこの標品は neuraminidase 処理により Fig. 8 に示すように、わずかに易動度がおそくなる成分を主体とし、別に肝型 Al. P-ase と同じような易動度の変化を

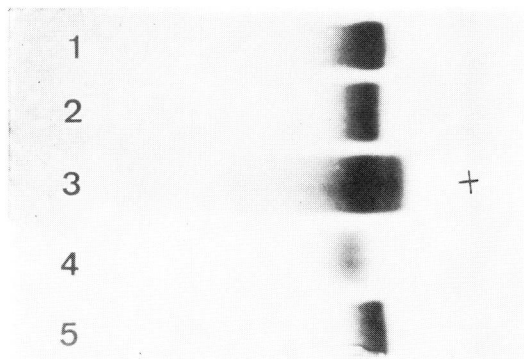


Fig. 6. 1 and 5: normal liver Al. P-ase as a control.
2: liver type Al. P-ase detected in RCC tissue (patient No. 24).
3: liver type Al. P-ase and Kasahara isozyme detected in RCC tissue (patient No. 16).
4: bone type Al. P-ase detected in RCC tissue (patient No. 9).

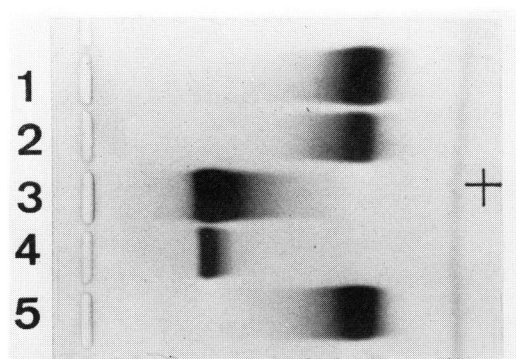


Fig. 7. 1 and 5: normal liver Al. P-ase as a control.
2: liver type Al. P-ase detected in RCC tissue (patient No. 24).
3: enzyme preparation of patient No. 24 after the treatment with neuraminidase.
4: enzyme preparation of normal liver after the treatment with neuraminidase.

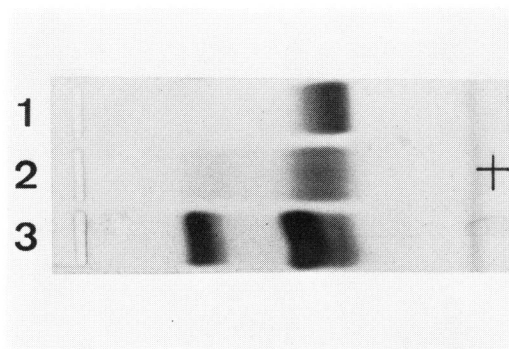


Fig. 8 1: normal liver Al. P-ase as a control.
2: enzyme preparation of RCC tissue from patient No. 23. The electrophoretic mobility of the main component of the enzyme is slightly slower than the normal liver Al. P-ase.
3: enzyme preparation from patient No. 23 after the treatment with neuraminidase.

示す部分も混在しているようである。この主成分はこのような薄層電気泳動による易動度からみて成人の小腸組織にみられる Al. P-ase とは異なり、Higashino et al.⁵⁾ により報告されている fetal intestinal type Al. P-ase に類似しているものと思われる。

v. K₄ 単独型 Al. P-ase

K₃ の領域から K₄ にかけての Al. P-ase だけを示す症例は4例であるが、このうちの1例(症例 No. 15)はほぼ K₄ 単独(きわめて弱い K₃ も含まれている)

の成分より成るものと考えられ、またその酵素化学的性質も Table 4 に示すように正常腎組織に含まれる K₄ 成分ときわめて類似した性質を示すことが確認された。

3) 腎細胞癌患者血清中 Al. P-ase

組織 Al. P-ase を検討した24例中血清 Al. P-ase を検討することのできた症例は18例であった。これらのうち明らかな肝、骨への転移が認められないにもかかわらず、血清 Al. P-ase の上昇を示したものが3例認

められた。しかしこの3例を含め、腎細胞癌患者血清中の Al. P-ase は薄層電気泳動のすべて肝型 Al. P-ase の泳動像を示していた。なお血清 Al. P-ase 高値を示した3症例の組織内 Al. P-ase アイソザイムパターンはそれぞれ肝型単独、 $K_1 \sim K_2$ と K_{3+4} 、および K_{3+4} と K_5 であったので、肝型単独例において腫瘍組織からの Al. P-ase の遊出の可能性は想像されるが、他の2例では血中 Al. P-ase は正常血清同様、肝に由来したものと考えられる。

考 察

1) 正常腎組織 Al. P-ase について

腎は他の諸臓器と比較しても、その有する Al. P-ase 活性はかなり高い臓器であり、またその分布は酵素組織化学的検討ではおもに近位尿細管の brush border, apical invagination, apical vacuole に存在することが確認されている¹⁶⁾。しかしながらこの腎に含まれる Al. P-ase の生理的意義、および酵素化学的性質の研究はいまだ決して十分なものではなく、肝、骨、小腸、胎盤などの Al. P-ase との異同が現在論じられている。

1968年 Butterworth¹⁷⁾はヒト腎および尿中 Al. P-ase につきその分子量はそれぞれ15万～17万、および7.5万であることを示し、また1969年 Smith et al.¹⁸⁾は電気泳動によりその移動度は肝と同一のものであると述べている。最近 Sugiura et al.¹⁹⁾は腎の Al. P-ase の純化を試み、電気泳動にて単一の泳動帯を示す標品を得、その性質を分子量18万、等電点4.7、至適pH11.4、Michaelis 定数0.21 mM、耐熱性は極めて低く、EDTA、L-cysteine、L-tryptophan、L-homoarginine に sensitive であるとの報告をおこなっている。一方、Korngold²⁰⁾(1977年)は腎組織内にはその抗原性は肝 Al. P-ase と共通であるが電気泳動移動度は異なる分子量15万の K_{L1} と、小腸 Al. P-ase と抗原性において共通する分子量8万および12万の K_{L2} と、少なくとも3つの Al. P-ase が含まれることを示している。著者の検討において腎 Al. P-ase は、ディスク電気泳動において、3本または4本に分離されている。そしてそれぞれの単独成分への分離にはいまだ成功していないが、少なくとも K_4 の移動度は肝、骨、小腸、胎盤などの諸臓器にみられる Al. P-ase とは異なっており、抗原性において他に共通するものがあるのかもしれないが、腎に特異なものと考えられる。

2) 腎細胞癌組織内 Al. P-ase について

Korngold²¹⁾により腎細胞癌 Al. P-ase の抗原性が肝に共通するものであることはすでに報告されているが、そのアイソザイムパターンについての報告はき

わめて少なく、正常腎組織と同一のものであるとの報告²²⁾や、腫瘍に特異なものが存在するとの報告⁷⁻⁹⁾などきわめて断片的なものであった。しかしながら著者の24例における検討結果は、腎細胞癌組織内 Al. P-ase は量的にも質的にもきわめて多様性に富むことを明らかにし、さらには腎細胞癌の発生、脱分化に関し新たな示唆を与えるものであった。そこで以下にすでに述べたような腎細胞癌の組織発生、すなわち近位尿細管由来であるという現在の認識が、ここで得られた知見からみて妥当なものであるかにつき論じてみたい。

3) 腎細胞癌の発生について

Benington and Beckwith²³⁾は腎細胞癌は腎近位尿細管より発生した腫瘍であると定義えしている。このような結論に導かれた過程はすでによく知られているように1883年 Grawitz が腫瘍発生の迷芽説にならい、“いわゆる腎の lipoma”を副腎組織の腎内迷入によるとの考えを呈示したことを端緒としている。この説に対し、Sudeck が腎細胞癌の尿細管由来を示唆し、Oberling et al.²⁴⁾(1960)が電子顕微鏡的観察から尿細管上皮との類似性を、Seljelid and Ericsson²⁵⁾(1965)が尿細管のうちでもとくに近位尿細管との微細構造の類似性を示した。さらに決定的には Wallace and Nairn²⁶⁾(1972)が腎遠位尿細管特異抗血清および近位尿細管特異抗血清を作成し、腎細胞癌組織は大部分が近位尿細管抗血清と反応することを示したことが現在の認識の大きな根拠となっている。Yokoyama¹⁶⁾(1972)は電子顕微鏡組織化学を用い、正常腎近位尿細管および腎細胞癌の Al. P-ase, acid phosphatase, thiamine pyrophosphatase の分布を比較検討し、とくに Al. P-ase が腎細胞癌の細胞膜の一部にみられる brush border 様構造に認められることから近位尿細管由来の考えをさらに支持している。このような研究の経過が腎細胞癌発生母組織を解明したのであるが、著者はもう一度これらの文献を再検討してみたい。Oberling et al. の電子顕微鏡的観察は対象症例がわずか8例であり、またその微細構造に microvilli や basal plasma membrane の multiple infolding を認めることから尿細管上皮由来を示唆したものであるが、決して近位尿細管と限定したものではない。Seljelid and Ericsson は同様に微細構造を追及し、microvilli 様構造をはじめとする細胞膜の分化構造が近位尿細管の形態学的特長にきわめて類似していることを明確に示しているが、その対象症例はわずか5例である。また観察した腫瘍細胞もとくに clear cell を重点的にピックアップして検討したものであり、多彩な病理組織学的構造を示す腎細胞癌がすべて近位尿細管に由来するものであると一

癌化することはやや困難であろう。Wallace and Nairn による免疫学的研究においても対象症例はやはり少なく11例であり、またさらにこのうちの2例は遠位尿管は特異な抗体と陽性反応を呈している。彼らはきわめて未分化な癌細胞は異分化 (disdifferentiation) を示すことがあることを理由にこのような腫瘍も近位尿管由来であると考えているが、遠位尿管に由来したものであると考えても無理はないであろう。さらに Yokoyama の研究は対象症例7例とこれも少なく、また近位尿管の brush border, apical invagination, apical vacuole に特異的に存在する Al. P-ase を、7例中5例に示してはいるが、この酵素活性を示さなかった2例もきわめて未分化なもの、あるいは検討組織の不適切な処理にあったのではないかとし、近位尿管以外の部分からの組織発生に否定的な見解をのべたものであるが、ここでもこの2例の組織由来に関する決定的な根拠をみることはできない。組織化学的に Al. P-ase を欠如する腎細胞癌が、腎近位尿管以外の部分に由来するものではないかという考えはすでに Braunstein and Adelman²⁷⁾ により示唆されていた。最近、Mancilla-Jimenez et al.²⁸⁾ は組織学的構造から papillary renal cell carcinoma と呼ばれる一群の腎細胞癌につき検討し、その全腎細胞癌に占める割合は15%、男女比は2:1、レ線学的には血管造影で vascularity の低いものが大部分を占め、石灰化や骨化を伴うことも多く、肉眼的には massive necrosis、およびこれによる cystic degeneration をきたしやすく、大部分が単発性であることを特長とし、顕微鏡的にはマクロファージ、好中球、リンパ球の浸潤を著明に伴い、予後の比較的良好な一群の腫瘍として位置づけている。この腫瘍のもう一つの特長は一部ではあるが、腫瘍組織以外の正常腎組織の検索にて集合管に atypical hyperplasia を伴っていたことが指摘され、これら一群の腫瘍の組織発生に集合管が関与しているのではないかと報告されている。

また Pfeleiderer et al.²⁹⁾ (1975) は腎細胞癌の生化学的研究を aldolase を対象としておこない、正常では遠位尿管に存在する aldolase A monomer が1例ではあるが腎細胞癌組織に認められたことを観察し、この現象の考え方として母細胞が遠位尿管細胞である可能性と、aldolase B monomer をもっていた近位尿管細胞が、癌化にともない aldolase A monomer を有する細胞に変化した可能性を挙げている、この研究は Wachsmuth and Stoye³⁰⁾ によりさらに進められ、腎細胞癌組織の aldolase A, aldolase B の分布のみならず、Al. P-ase, aminopeptidase の分布もあわせ検討さ

れ、aldolase B monomer はたしかに20例中19例の腎細胞癌では存在が認められなくなり、また Al. P-ase, aminopeptidase も腫瘍の発育とともに活性を失う傾向を有するとの結果を示した。しかしラット腎の未分化近位尿管から分化近位尿管への成熟に伴うこれら酵素の分布と対比せしめると、このような酵素の変動は大部分の腎細胞癌が近位尿管に由来するものと考えられるとしているが、他の尿管部分に由来する腫瘍の存在を否定していない。

現在までのこのような腎細胞癌の組織発生に関する研究をふり返り、また著者の観察した様々な Al. P-ase アイソザイムの存在をみると、最初に述べた Benington and Beckwith による定義は決して十分な根拠をもっているとは言い難いものと考えられる。腎細胞癌組織にみる Al. P-ase はたしかに大部分が正常腎にみられるアイソザイムのすべて、あるいはその一部を有してはいるが、他にも肝型、骨型、小腸型など分化という側面からみれば、dedifferentiation (脱分化) だけでなく、disdifferentiation (異分化) を示す (細胞膜の) 生化学的構造を有する場合もあり、単にある種の酵素の活性からだけでは生化学的にその母細胞を推定することは危険であることを示唆している。われわれは腎細胞癌の組織発生を理解するには、その大部分が近位尿管に由来するものであることは事実としても、さらに基礎的なデータを積み重ねる必要があると考えている。

4) 腎細胞癌における血清 Al. P-ase

腎細胞癌患者において、明らかな肝転移、骨転移を伴わないにもかかわらず、血清 Al. P-ase の異常高値を示す場合のあることは近年よく知られている事実である^{6,31-35)}。この現象については ①腎細胞癌組織からの Al. P-ase の遊出、②腎腫瘍による肝静脈還流障害によるうっ血肝、③腎腫瘍組織からのなんらかの肝毒性物質の遊離、のおもに3つの要因が示唆されている。村橋ら⁷⁾、Nakagawa et al.⁸⁾、Girmann et al.⁹⁾ は患者血清中にそれぞれ腎腫瘍組織に由来する Al. P-ase を証明、あるいは想定し、高 Al. P-ase 血症の現象を説明している。しかし本症の発生頻度は、報告によりその差異は大きい、決して低いものではなく³²⁾、また同時に肝腫大、プロトロンビン低値、BSP 排泄遅延など、たしかに別の肝機能障害を示唆する結果を有する場合が多く、このような特異な Al. P-ase が血清中に発見される場合はむしろ稀なものであると考えた方が妥当なようである。著者の経験では、Al. P-ase 異常高値を示した症例は3例であったが、それらの血清 Al. P-ase はいずれも肝型に一致し、またそのうちの

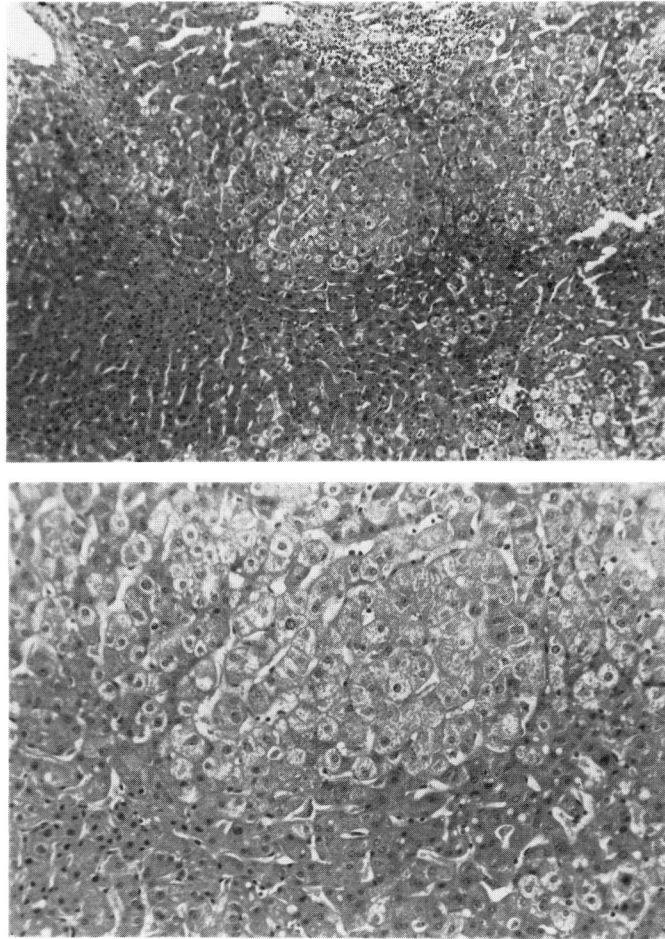


Fig. 9. Histological examination of the liver biopsy specimen from the RCC patient with elevated serum Al. P-ase revealed non-specific reactive hepatitis.

1例（症例 No. 29）では肝生検も施行され、Fig. 9に示すような nonspecific reactive hepatitis が病理組織学的に確認されている。このようなことから腎細胞癌における血清 Al. P-ase の上昇は、トキシホルモンを含め、何らかの肝毒性物質の遊離、あるいは不明の機序による免疫学的な肝実質障害などによるものと考えるのが最も妥当なものであると推定される。今後このような可逆性肝機能障害を呈した腎細胞患者における腫瘍組織内肝毒性物質についてもさらに研究を進めたいと考えている。

結 語

正常腎組織、腎細胞癌組織、および腎細胞癌患者血清 Al. P-ase アイソザイムをおもに電気泳動をもちいて検討し、以下の結果を得た。

1. ポリアクリルアミドディスク電気泳動法により、

正常腎組織には肝型 Al. P-ase にはほぼ一致する泳動帯（K₂）のほかに3本（標品により2本）のバンドが検出される。それらの単離はいまだ不十分であるが、少なくとも最陰極のバンドは易動度、耐熱性、各種阻害剤に対する態度よりみて腎組織に固有のものと考えられる。

2. 腎細胞癌組織内 Al. P-ase 活性は悪性度の高いものほど低くなる傾向は認められるが、統計学的有意義差はなく、また細胞型との間にはとくに関係は認められない。それらのアイソザイムパターンは腎組織にみられるアイソザイムのすべて、またはこの一部を有する場合が大部分を占めるが、これ以外にも高度の活性を呈する肝型単独例や、骨型、（胎児）小腸型および性質の不明なアイソザイム（2種類）の検出される場合もあり、さらに carcino-fetal antigen の1つとされる Kasahara isozyme の検出される場合も認められ

た。

3. 腎細胞癌患者血清中 Al. P-ase は、肝、骨に転移を認めないにもかかわらず、高 Al. P-ase 血症を呈した3例を含め、検討した17例ではいずれも肝型を呈し、腫瘍より特異な Al. P-ase が血中に遊出されていることを確認できた症例はみられなかった。このことから腎細胞癌にともなう高 Al. P-ase 血症は、文献的にみられる一部の例外を除き、肝障害に起因するものであると考えられた。

御協力をいただいた大阪厚生年金病院、大阪府立病院、大阪警察病院、住友病院、大阪府立成人病センター各泌尿器科に感謝いたします。

文 献

- 1) Fishman, E. H., Ingris, N. R., Stolbach, L. L. and Krant, M. J.: *Cancer Res.*, **28**: 150, 1968.
- 2) Nakayama, T., Yoshida, M. and Kitamura, M.: *Clin. Chim. Acta*, **30**: 546, 1970.
- 3) Higashino, K., Hashinotsume, M., Kang, K.-Y., Takahashi, Y. and Yamamura, Y.: *Clin. Chim. Acta*, **40**: 67, 1972.
- 4) Higashino, K., Kudo, S., Ohtani, R., Yamamura, Y., Honda, T. and Sakurai, J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **259**: 337, 1975.
- 5) Higashino, K., Otani, R., Kudo, S. and Yamamura, Y.: *Clin. Chem.*, **23**: 1,615, 1977.
- 6) Strickland, R. C. and Schenker, S.: *Amer. J. Digest. Dis.*, **22**: 49, 1977.
- 7) 村橋 勲・井上 昇・菱田 明・阿曾佳郎：日泌尿会誌, **67**: 14, 1976.
- 8) Nakagawa, S., Sagara, K. and Nagashima, H.: *Kumamoto Medical J.*, **29**: 210, 1976.
- 9) Girmann, G., Gratzel, M., Pees, H., v Seebach, H.-B. and Scheurlen, P. G.: *Deut. med. Wschr.*, **100**: 480, 1975.
- 10) Skinner, D. G., Colvin, R. B., Vermillion, C. D., Pfister, R. C. and Leadbetter, W. F.: *Cancer*, **28**: 1,165, 1971.
- 11) Higashino, K., Hashinotsume, M., Yamamura, Y. and Fujioka, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**: 792, 1972.
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**: 265, 1951.
- 13) 荻田善一：代謝, **2**: 67, 1965.
- 14) Davis, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**: 404, 1964.
- 15) Warnock, M. L. and Reisman, R.: *Clin. Chim. Acta*, **24**: 5, 1969.
- 16) Yokoyama, M.: *J. Urol.*, **108**: 62, 1972.
- 17) Butterworth, P. J.: *Biochem. J.*, **107**: 467, 1968.
- 18) Smith, I., Perry, J. D. and Lightstone, P. J.: *Clin. Chim. Acta*, **25**: 17, 1969.
- 19) Sugiura, M., Hirano, K., Iino, S., Suzuki, H. and Oda, T.: *Chem. Pharm. Bull.*, **24**: 1,698, 1976.
- 20) Korngold, L.: *Int. Archs. Allerg. appl. Immun.*, **54**: 300, 1977.
- 21) Korngold, L.: *Int. Arch. Allergy*, **37**: 366, 1970.
- 22) Waghe, M. and Kumar, S.: *Brit. J. Urol.*, **49**: 189, 1977.
- 23) Benington, J. L. and Bechwith, J. B.: *Tumors of the Kidney, Renal Pelvis, and Ureter, Second Series*, p. 93, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D. C., 1975.
- 24) Oberling, C., Rivier, M. and Haguénau, F.: *Nature*, **186**: 402, 1960.
- 25) Seljelid, R., Ericsson, J. L. E.: *Lab. Invest.*, **14**: 435, 1965.
- 26) Wallace, A. C. and Nairn, R. C.: *Cancer*, **29**: 977, 1972.
- 27) Braunstein, H. and Adelman, J. U.: *Cancer*, **19**: 935, 1966.
- 28) Mancilla-Jimenez, R., Stanley, R. J. and Blath, R. A.: *Cancer*, **38**: 2,469, 1976.
- 29) Pfeleiderer, G., Thöner, M. and Wachsmuth, E. D.: *Beitr. Path.*, **156**: 266, 1975.
- 30) Wachsmuth, E. D. and Stoye, J. P.: *Beitr. Path.*, **159**: 229, 1976.
- 31) Stauffer, M. H.: *Gastroenterology*, **40**: 694, 1961.
- 32) Utz, D. C., Warren, M. M., Gregg, J. A., Ludwig, J. and Kelalis, P. P.: *Mayo Clin. Proc.*, **45**: 161, 1970.
- 33) Axelsson, U., Hogerstrand, I. and Zettervall, O.: *Acta Med. Scand.*, **195**: 227, 1974.
- 34) 坂田安之輔：日泌尿会誌, **67**: 941, 1976.
- 35) 増田富士男・佐々木忠正・渡辺秀雄・荒井由和、町田豊平：泌尿紀要, **22**: 91, 1976.

(1978年5月17日受付)