

実験的脳腫瘍組織の生化学的分析

東邦大学医学部第2 外科学教室 (指導: 栗津三郎教授)

松 元 幹 郎

〔原稿受付: 昭和54年4月12日〕

The Biochemical Analysis of the Experimental Tumor Tissues of the Rat Brain Induced by Etylnitrosourea

Mikiro Matsumoto

Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University
(Director : Prof. Dr. SABURO AWATSU)

The experimental tumors of rat brain induced by etylnitrosourea have been studied histopathologically, because of their histological similarity to human glioma, but their biochemical studies are rare. In this paper, a comparative study of gliosis tissues of the rat taken by frontal lobotomy and glioma tissues induced by a single intraperitoneal injection of etylnitrosourea to pregnant SD rat on the 14th day of gestation, was performed biochemically.

The results were as follows.

1) The incidence of induction of experimental tumors of the nervous system was over 90%, and their histological findings were classified chiefly into mixed glioma, anaplastic glioma and oligodendroglioma.

2) The tissue protein contents both of the glioma and gliosis tissues were within the normal control level.

3) In the gliosis tissues, RNA and DNA contents were within the control level in one week, and slightly decreased in one month and also RNA/DNA ratio decreased. Of the glioma tissues, RNA and DNA contents were apparently increased and RNA/DNA ratio was extremely decreased compared with the control and the gliosis tissues.

4) Of free amino acid contents of the gliosis, aspartic acid and GABA were less than the control and glutamic acid, glutamin, glycin and alanin were within the control level one week after the frontal lobotomy and all amino acids at one month were decreased. In the

Key Words : Experimental brain tumor, Etylnitrosourea, Nucleic acids, Free amino-acid, β -glucuronidase.

索引語: 実験的脳腫瘍, エチルニトロソウレア, 核酸, 遊離アミノ酸, β -グルクロニダーゼ

Present Address : Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University 6-11-1 Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo, 143, Japan.

glioma tissues, aspartic acid, glutamic acid and GABA decreased and glutamine, glycine and alanine increased and GABA were not determined in 50% cases of it.

5) Lysosomal enzyme activities, especially β -glucuronidase and acid-phosphatase were higher than the control in both of the gliosis and the glioma tissues and β -glucuronidase activities of the glioma tissues demonstrated fifteen times higher than the normal control.

I. 緒 論

近年、脳腫瘍、特に悪性神経膠腫に対する手術療法の限界が明らかとなり、種々の補助療法が再び行なわれ、その基礎的研究としての生化学的、病理組織学的、血清学的検索が行なわれている。

特に生化学的研究は広範囲にわたり、その進歩はめざましく、脳腫瘍、殊に神経膠腫の生化学的特徴の幾つかは解明されてきた。一方、de Duve⁴⁾ により生化学的概念として提唱された Lysosome は Allison²⁾ により腫瘍学に導入され腫瘍細胞分裂機構の解明の新たな分野を開拓したが腫瘍の本質を究めるものではなかった。このように行きづまりつつあった脳腫瘍の研究に新たな実験の手段を提供するものとして実験的脳腫瘍の作製が試みられてきた。

1965年、Druckery⁷⁾ らにより始められた Nitrosourea の投与により作製された実験的脳腫瘍はヒト脳腫瘍との類似性を有し、しかもそのほとんどがグリア系腫瘍であるためにヒトのグリア系腫瘍の病理学的研究に多大な貢献をしている。

本研究では Etylnitrosourea (以下 ENU とよぶ) の投与によりラットに作製した実験的脳腫瘍組織を試料として、組織蛋白、核酸、各種遊離アミノ酸、および Lysosome 酵素について生化学的分析を行い、ラット外傷脳に作成したグリオーグス組織の生化学的特徴とを比較することにより、腫瘍組織と反応性細胞増殖組織との生化学的な違いの一端を解明することを試みた。

II. 実験方法

1. 実験動物の作製

1) 実験的脳腫瘍の作製

実験動物は日本 CLEA 産の Sprague-Dawley 系ラットの10週令の雌を用い同系の雄と同居させ、腔栓形成を確めた日を妊娠第1日とし、妊娠14日目の雌を使用した。

ENU は生理食塩水にて 10mg/ml の溶液とし、更にアラビアゴムを加えて 5% 懸濁液としたものを用い、母ラットの体重に対して 50mg/kg を1回のみ腹腔内に注射にて投与した。生れた仔ラットは4週間母ラットと同居させ、以降は仔ラットを雌雄隔離飼育し、生後120日頃より毎日ラットの外観、挙動を含めて神経症状を観察し、腫瘍の発生したと思われるラットは一匹ずつ隔離し、腫瘍死すると思われる数日前まで飼育した。

2) 実験的外傷脳の作製

教室の中野²¹⁾の報告した方法に従い、ラットの左前頭葉に切歯手術を加えて損傷脳を作製した。

2. 試料の調製

腫瘍の発生したと思われるラットは断頭し、可及的速やかに全脳および脊髄を馬尾まで損傷しないように摘出、肉眼的に腫瘍を確認し、附着している血管、血液を除去した後に腫瘍を鋭的に採取した。試料としたのは大脳実質腫瘍のみで、脳神経、脊髄腫瘍はこれに含めなかった。

本研究では試料の 50~100mg を要したために比較的大きな腫瘍のみを用い、肉眼的に出血、壊死部を出来得る限り除去した腫瘍組織のみを試料としたが症例によってはこのことは必ずしも容易ではなかった。また組織蛋白測定用の 0.32M Sucrose、アミノ酸抽出用の 4% PCA、酵素活性測定用の酵素標品調製用緩衝液は冷却しておき直ちに分析操作に供した。

腫瘍の組織学的検索は HE, Mallory の PTAH 染色、渡銀染色を行い神経膠腫系腫瘍のみを対象とした。

3. 核酸の分離定量

試料の 50~100mg を除蛋白の目的で直ちに冷却した 4% PCA にて homogenate し Schmidt-Tannhauser の変法¹²⁾に従って核酸の抽出を行い、RNA は Orcinol⁵⁾、DNA は Burton³⁾ の方法により定量した。また組織蛋白量の測定には Lowry¹⁹⁾ の変法に準じて行った。

4. 遊離アミノ酸の分離定量

遊離アミノ酸含有量の測定には、試料の 50~100mg を除蛋白の目的で直ちに冷却した 4% PCA で homogenate した後、3000rpm にて15分間遠沈し、その上清部分に抽出されてくる遊離アミノ酸を定量に供した。上清は液量を 4% PCA にて一定量として凍結保存し、測定時に中和した後一定量を取り、アミノ酸自動分析装置（日本電子製 Amino-Acid Analyzer, JLC-6 AH）にかけ分析定量した。

5. Lysosome 酵素の測定

β -glucuronidase の測定には、試料の 50~100mg を 0.05% Triton-X 0.5ml で homogenate し完全に活性化を行った後に Fishman⁹⁾、加藤¹⁶⁾の変法にて測定した。すなわち、sample 0.1ml に対して 0.2M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 0.3ml、および基質として P-nitrophenol-glucuronide 0.05 ml を混じり、37°C、4時間 incubation した後、アルカリ試薬として 0.4M glycine 緩衝液 (pH 10.45) 1.0ml を追加、10分間室温放置後、精製水 3.0ml にて希釈した後 3000 rpm にて15分間遠沈し、その上清を光電比色計（日立 101型）、400m μ にて比色定量した。標準液として P-nitrophenol を用い単位は遊離 P-nitrophenol 数を蛋白量当りとして求め、時間当りの γ 数として算出した。

Acid-phosphatase の測定には β -glucuronidase と同様に標準標本を作製し King-Armstrong の変法¹⁷⁾で酵素活性を測定した。すなわち、クエン酸緩衝液 1.0ml、基質としてフェニールリン酸ナトリウム-4P アミノアンチピリン 1.0ml を加え、37°C、3分間 preincubation した後、sample 0.1ml を加え、37°C、1時間 incubation 後フェリシアン化カリウム 2.0ml を加

え 3000rpm にて15分間遠沈し、その上清を光電比色計 570m μ にて比色定量した。標準液として phenolphthalein を用い β -glucuronidase と同様単位時間当り、ならびに蛋白量当りの γ 数として算出した。

Ⅲ. 実験成績

ENU の投与により作製した実験的脳腫瘍組織のうちグリア系腫瘍を撰び、その組織と、同時に作製した実験的外傷脳でみられるグリオーグス組織とを生化学的に比較検討し、実験的脳腫瘍組織の生化学的特徴を追求した。

1. 実験的脳腫瘍の発生

生後約 200 日目頃より腫瘍の発生をみたが、本研究の目的が生化学的特徴を捉えることにあるために可及的に腫瘍を大きくする必要があり、神経症状の経過を観察しつつ死亡すると思われる数日前に屠殺した。

神経系への腫瘍の発生率は約93%であり、その大半は生後270日前後の約1ヶ月間に集中していた。

中枢神経および脳神経への腫瘍の発生率は、大脳 74.3% (photo 1)、脳神経（第5脳神経）10.5% (photo 2)、脊髄神経15.2% (photo 3) であり、発生時期には大差はみられなかった。

大脳に発生した腫瘍の組織学的分類頻度は、Mixed Glioma 約44%、(photo 4)、Oligodendroglioma 約28% (photo 5)、Anaplastic Glioma 約28% (photo 6) で Ependymoma like Tumor は1例もみられなかった。

2. 組織蛋白量

比較対照とする外傷脳組織では、外傷脳作製後1週目で既に急性期の浮腫は消退していることが判明して

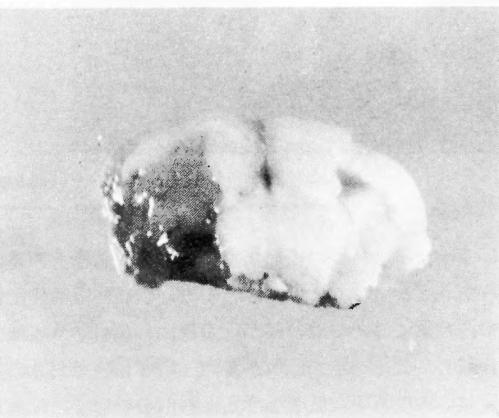
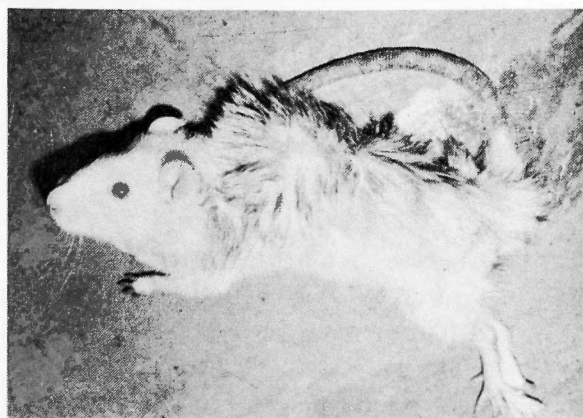


Photo. 1 Hemiplegia caused by brain tumor.

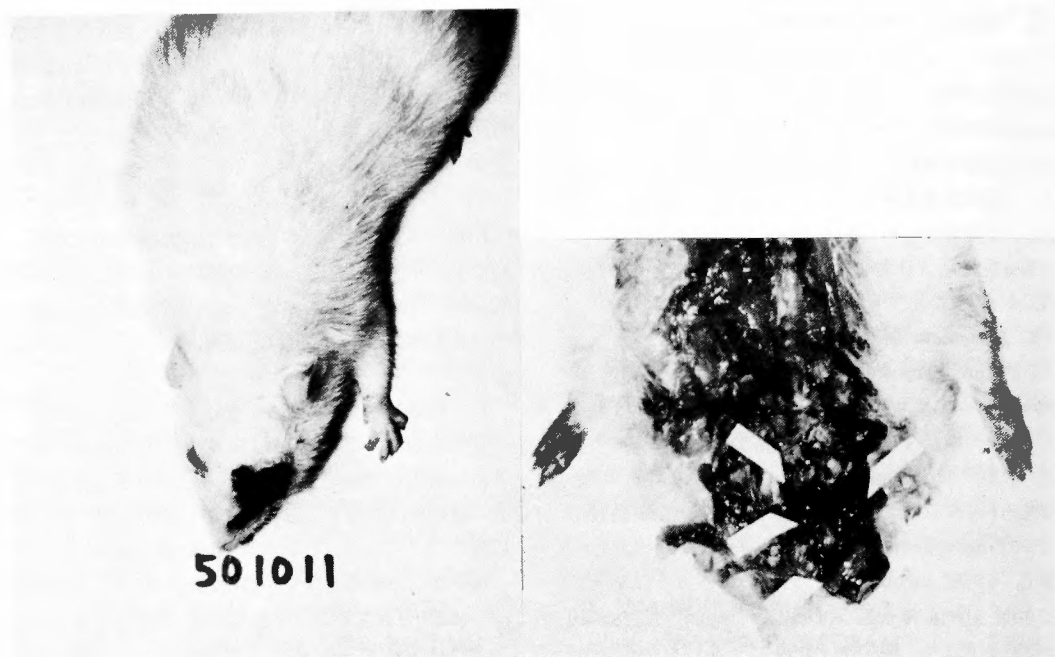


Photo. 2 Exophthalmus and corneal bleeding caused by trigeminal tumor.

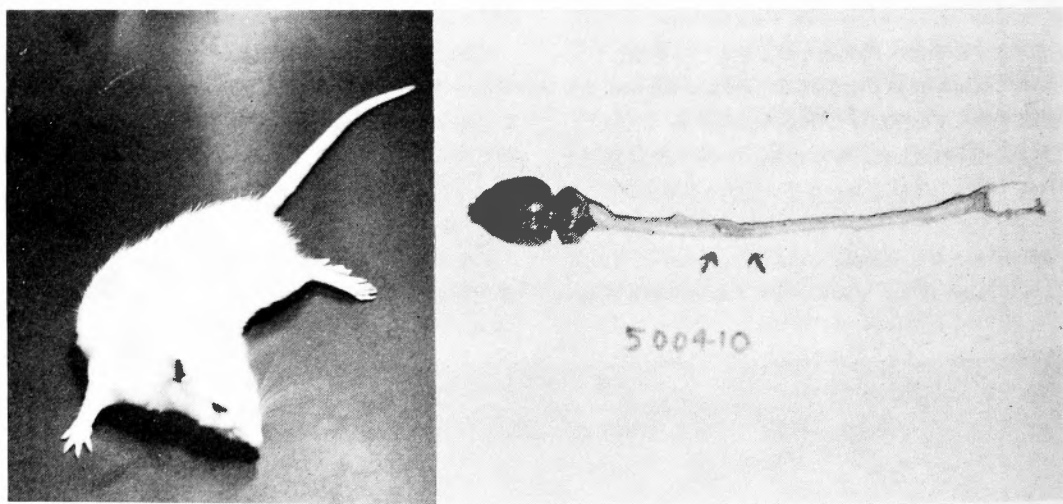


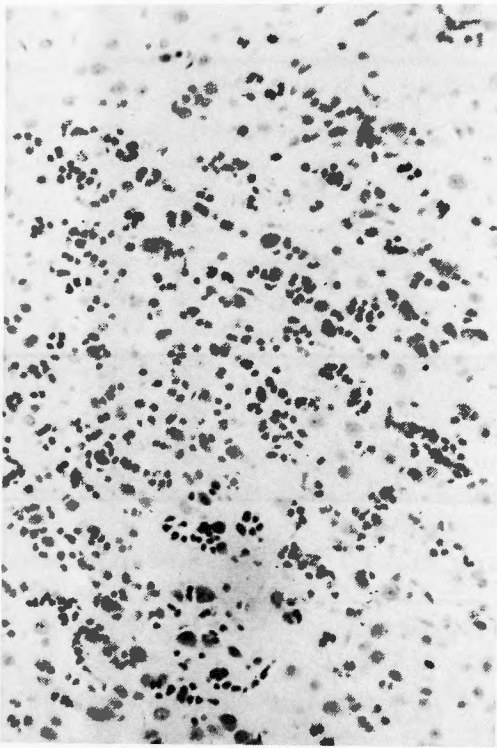
Photo. 3 Paraplegia caused by spinal tumor.

いるが、その時期の組織蛋白量と正常脳組織との差はみられなかった (Table 1). 一方、実験的脳腫瘍組織の測定値にはかなりの幅がみられ、しかも対照組織に比較して低値を示す症例が多い (Fig. 1). これらの測定値の内で著明な低値を示した数例を組織学的に検索してみると相当の出血および壊死をみとめた。そこで

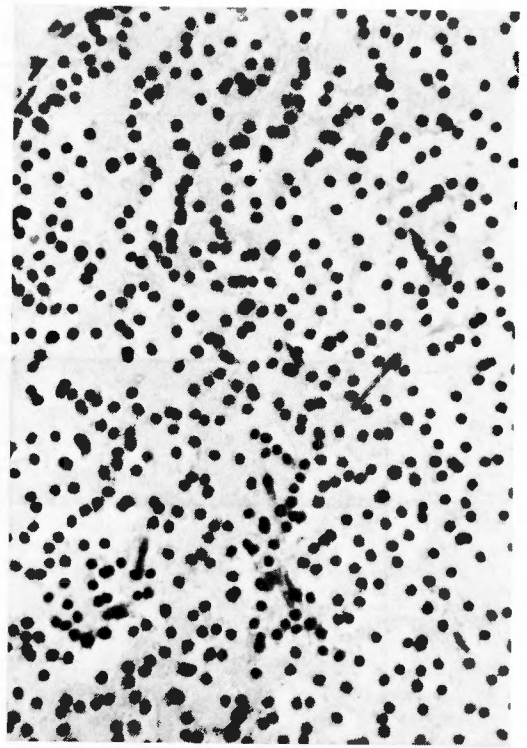
これらを除外したものがほぼ正確な腫瘍組織の蛋白量を示すものと考えたが、その結果は正常脳組織と比較して著明な差はみられなかった (Table 1).

3. 核 酸

Table 2 は各組織の核酸含有量を示す。外傷脳作製後1週間グリオーグス組織の核酸は、RNA $1.97 \pm$



(4)

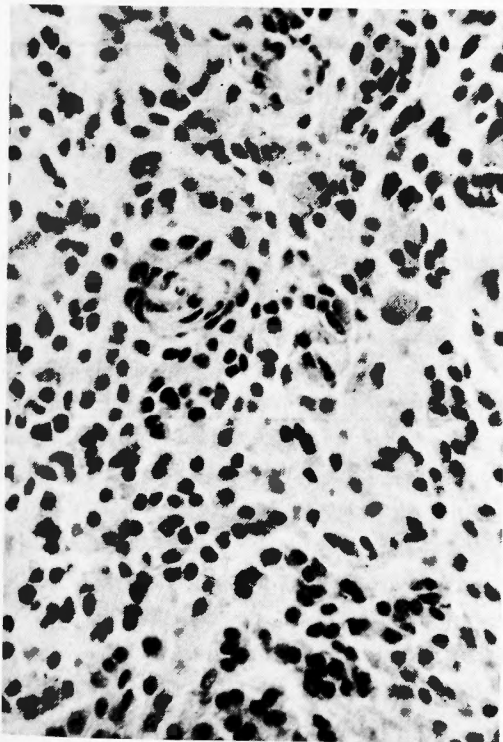


(6)

Photo. 4 Mixed glioma (large number of small darkly-staining nuclei mixed with rather gemistocytic astrocytes).

Photo. 5 Anaplastic glioma (highly cellular frequently poorly differentiated glial tumor with rather polymorphic cytology. Gemistocytic astrocytes were seen in scattered fashion).

Photo. 6 Oligodendroglioma with typical honey-combed appearance.



(5)

Table 1. Protein contents

Conditions	Total Protein (mg/g. w. w.)
Normal rat brain cortex (5)	106.5 ± 8.21
Injured rat brain cortex (15) 1 week after injured	114.5 ± 9.90
Experimental rat brain tumor (15)	105.8 ± 17.97

Values represent as mean ± S. D. with experimental number in parentheses.

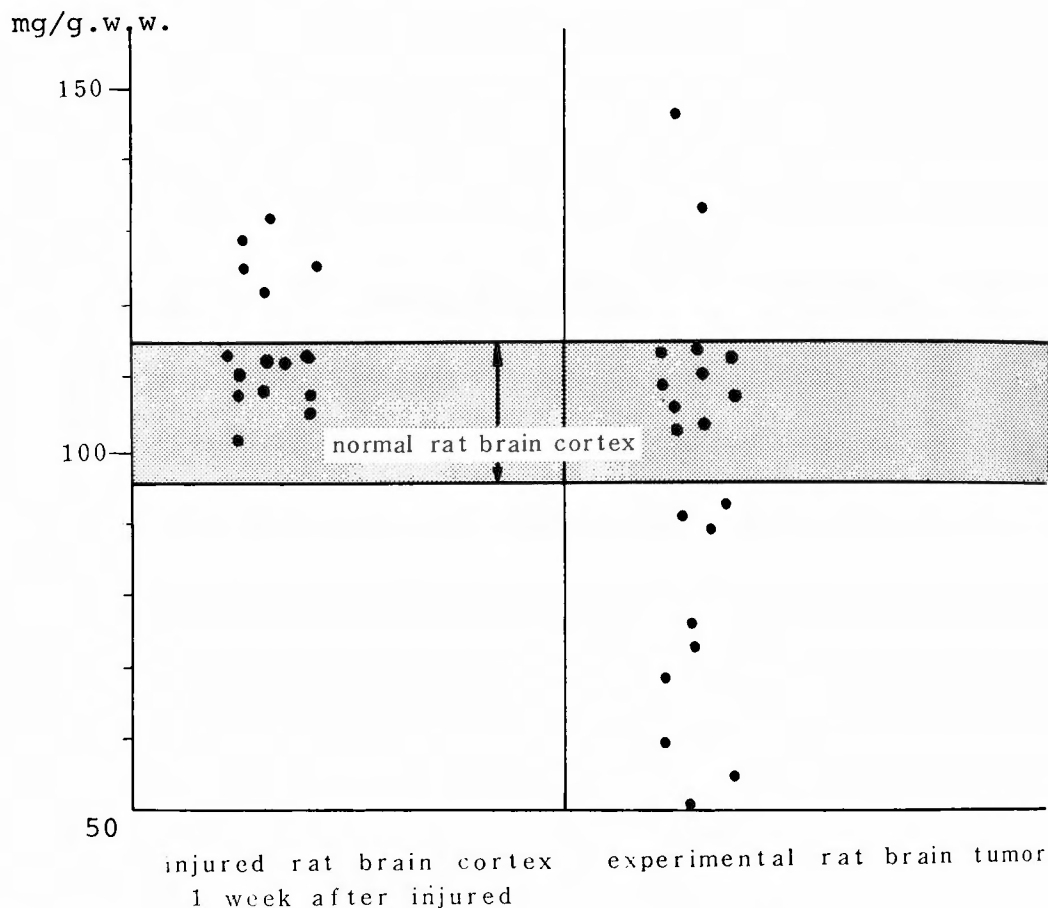


Fig 1. Protein contents

0.05mg/g. w. w., DNA 0.59 ± 0.09 mg/g. w. w. で正常脳組織に比較して著明な差はみられず, RNA/DNA 比は 2.93 で軽度の高値を示している. 一方, 1ヶ月目グリオーゼ組織では, RNA 2.34 ± 0.21 mg/g. w. w., DNA 0.83 ± 0.10 mg/g. w. w. で共に高値傾向を示し, RNA/DNA 比は 2.82 と 1週目の組織と比較して低値を示し, 明らかに細胞増殖が進んでいることを示している.

実験的脳腫瘍組織においては, RNA 3.93 ± 0.12 mg/g. w. w., DNA 4.86 ± 1.41 mg/g. w. w. と共に著明な高値を示し, 正常脳組織に比較して夫々約 6 倍であった. RNA/DNA 比は 0.81 と著明な低値を示し旺盛な細胞増殖を示していた.

グリオーゼ組織, 実験的脳腫瘍組織ではいずれも充分な核酸合成が行なわれており, 更に細胞増殖が明

らかに行なわれていることが生化学的に示されていた. しかもこの傾向は脳腫瘍組織で著明であった.

4. 遊離アミノ酸

グリオーゼ組織の遊離アミノ酸は正常脳組織に比較して全般的に低値を示す傾向にあったが, 1週目, および 1ヶ月目グリオーゼ組織の間には明らかな違いがみられた. すなわち Table 3 に示すように, 1週目グリオーゼ組織では, アスパラギン酸, GABA が正常脳組織に比較して夫々, 19%, 16%の減少率を示したが, 他の遊離アミノ酸は正常値を維持していた. 一方, 1ヶ月目グリオーゼ組織では全般的に低値傾向を示し, 正常脳組織に比較して夫々, アスパラギン酸, 43%, グルタミン酸 22%, グルタミン酸 22%, グリシン 41%, アラニン 40%の減少率を示し, 特に GABA は 115%もの減少率を示した.

Table 2. RNA, DNA contents

Conditions	RNA (mg/g. w. w.)	DNA (mg/g. w. w.)	RNA/DNA Ratio
Normal rat brain cortex (5)	1.82±0.15	0.75±0.05	2.42
Injured rat brain cortex (8)			
1 week after injured	1.97±0.05	0.59±0.09	2.93
1 month after injured	2.34±0.21	0.83±0.10	2.82
Experimental rat brain tumor (5)	3.93±0.12	4.86±1.41	0.81

Values represent as mean ±S.D. with experimental number in parentheses.
RNA content was measured by Orcinol's method.
DNA content was measured by Burton's method.

Table 3. Amino acid contents (μmoles/g. w. w.)

Conditions	Asp.	Glu-NH ₂	Glu.	Gly.	Ala.	GABA
Normal rat brain cortex (10)	4.76±0.71	3.62±0.77	11.14±1.23	2.04±0.14	1.30±0.11	3.40±0.17*
Injured rat brain cortex (10)						
1 week after injured	3.88±0.50	3.73±0.63	12.60±2.20	1.84±0.30	1.46±0.09	2.84±0.31*
1 month after injured	2.72±0.07	2.81±0.09	8.71±0.61	1.26±0.27	0.78±0.19	2.93±0.08
Experimental rat brain tumor (10)	0.82-2.69 (1.91)	1.81-7.24 (4.61)	1.77-6.02 (3.59)	1.24-5.16 (4.02)	1.23±4.14 (2.82)	0-4.77** (1.34)

* : Values represent as mean ±S.D. with experimental number in parentheses.
* * . Values represent minimum to maximum with mean and experimental number in parentheses.

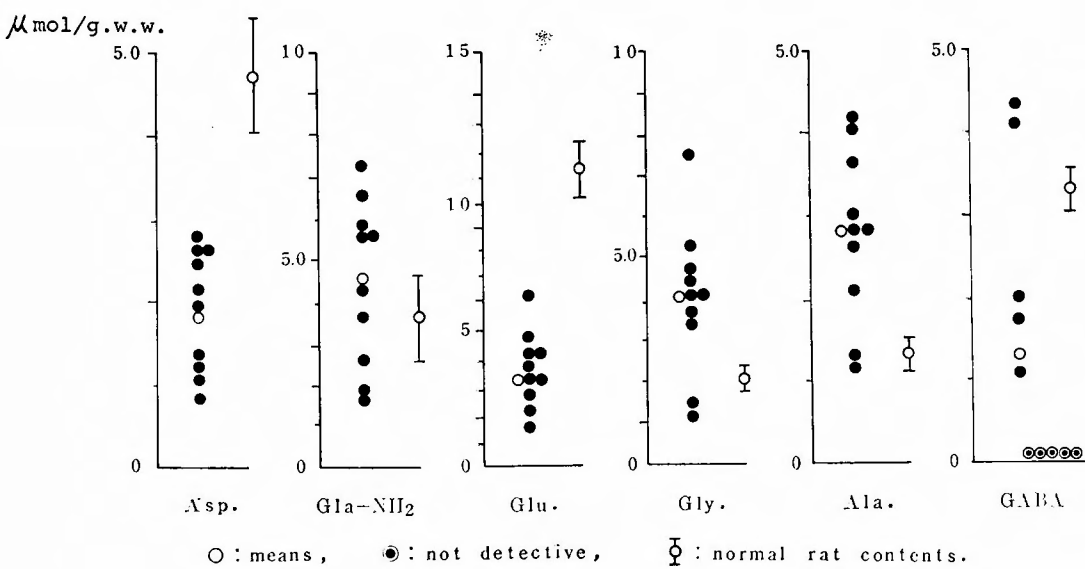


Fig. 2 Amino Acid Contents

Table 4. Lysosomal enzymes

Conditions	β -glucuronidase (γ g mg. protein/h)	Acid-phosphatase (γ g/mg. protein/h)
Normal rat brain cortex (5)	2.11 $\pm$ 0.10	66.43 $\pm$ 3.04
Injured rat brain cortex (10)		
1 week after injured	5.21 $\pm$ 0.42	111.73 $\pm$ 9.51
1 month after injured	2.29 $\pm$ 0.42	65.14 $\pm$ 5.50
Experimental rat brain tumor (10)	32.60 $\pm$ 10.76	205.23 $\pm$ 37.8

Values represent as mean $\pm$ S.D. with experimental number in parentheses.

実験的脳腫瘍組織における測定値にはかなりの幅がみられるが正常脳組織に比較すると明らかな特徴的パターンを示していた (Fig. 2). すなわち, Table 3 に示すごとく, アスパラギン酸, グルタミン酸は夫々60%, 68%の減少率を示し, 逆にグルタミン, グルシン, アラニンは夫々, 27%, 97%, 117%の増加率を示した. また GABA は測定値の幅が特に広く, しかも半数において微量のため検出不能であり, 他の遊離アミノ酸とは異った態度を示していた.

以上のごとく, グリオージス組織においても遊離アミノ酸組成に明らかな経時的变化がみられ, また実験的脳腫瘍組織においてはグリオージス組織とは明らかに違ったパターンを示したが, このことは異った細胞増殖機転を有する両組織のアミノ酸代謝の特徴を反映しているものと考えられる.

5. Lysosome 酵素

Table 4 は Lysosome 酵素活性を示している. グリオージス組織では, 外傷脳作製後5日目では急性期の脳浮腫が消退しグリア細胞の増殖が活発に起こっている時期と考えられるが, この時期に一致して β -glucuronidase, Acid-phosphatase ともに最高値を示し, グリオージスが完成されると考えられる1ヶ月後には正常脳組織の値へと復する傾向がみられた.

実験的脳腫瘍組織では両酵素共に明らかな高値を示し, 特に β -glucuronidase は正常脳組織の15倍以上の酵素活性を示した.

このように反応性グリア細胞の増殖時期にも, また悪性腫瘍細胞分裂においても共に酵素活性は高値を示すが, 明らかに実験的脳腫瘍組織の方がより高値を示し, かつ持続的であった.

IV. 考 察

1. 実験的脳腫瘍について

実験的脳腫瘍の研究は形態学的研究の面で多大な貢

献をするのみでなく, 細胞の腫瘍化, 腫瘍細胞の増殖機序の解明を目的とする生化学的分野にも新たな手段をもたらすものである.

実験的に動物に脳腫瘍を作ろうとする試みは, 1939年 Seligman²⁴⁾ が Methylcholanthrene を用いて作製に成功して以来, 種々の発癌性炭化物質が試みられてきたが, これらの方法は全て pellet 法であり, 脳実質に発癌物質を挿入するという物理的影響を無視し得ないだけでなく, 脳腫瘍の発生率も不満足なものであった. 1956年 Magee²⁰⁾により Dimethylnitrosoamine の経口投与によりラット肝癌の作製に成功して以来吸収性発癌物質が広く試みられ, 1964年 Druckery⁶⁾ は Methylnitrosoamine が胎盤通過性発癌物質であることを発見した後種々のアルキル化剤を試み, 1966年⁸⁾, Etylnitrosoarea の経静脈的投与により経胎盤的に選択的な中枢神経系への腫瘍の発生を報告した. この方法は妊娠ラットに ENU を投与することによりその仔ラットの90%以上に中枢神経腫瘍を作製することが可能である. また脳実質内に発生する腫瘍のほとんどがグリア系腫瘍であること, pellet 法に比較してより生理的発生に近いことなどにより腫瘍病理学分野で広く応用され, 最近ではこの方法による腫瘍発生機序に関する研究も始められている. すなわち, Druckery⁸⁾, Wechler³²⁾ による ENU の toxic-, tetragenic-, oncogenic effect の報告, 坪本³¹⁾によるラットの neurogenesis にもとづく matric cell の腫瘍化への可能性を含んだ報告, また, この方法で作製した脳腫瘍組織の染色体異常³⁰⁾, およびウイルス様の異常封入体の発見の報告¹⁸⁾などもあり, ENU の腫瘍誘発機序の一面も解明されようとしている.

ENU 投与による腫瘍の発生について鈴木²⁹⁾らは約80%に腫瘍の発生をみとめ, 神経系腫瘍は全腫瘍の82.5%であり, また脳脊髄実質内に形成された腫瘍の組織像は全てグリア系由来のものであるとし, ヒト

グリア系腫瘍の組織と比較して Mixed Glioma, Oligodendroglioma, Anaplastic Astrocytoma, Ependymoma like Tumor, Un-classified Tumor と分類し、この内前2者の頻度が最も高いと報告している。

本報告における腫瘍の組織学的分類には、Oligo 様, astroglia 様あるいは異形の強いグリア細胞の混合構成を示すものを Mixed Glioma とし、円形の核周囲に明るい空隙を有し、細胞の境界が比較的明瞭で honey comb 様の像を示す Oligodendroglioma, 比較的均一な細胞構成を示し血管中心に Pseudo Rosette を形成するものを Ependymoma like Tumor とした。Anaplastic Astrocytoma は円形、または腎形の核を有し、細胞突起に富む星状グリア細胞類似の腫瘍で Anaplastisty が存在する。著者のこの分類は鈴木、石田²⁹⁾の分類に準ずるものである。

2. 生化学的分析について

ENU の投与で作製された実験的脳腫瘍組織の生化学的分野での研究報告は極めて少なく、ただ Paoletti¹¹⁾ 阿部¹⁾の報告があるのみである。

(i) 組織蛋白

実験的脳腫瘍組織における組織蛋白量の測定値にはかなりの幅がみられ、それは低値への広がりを示した。この事は腫瘍組織に必然的に含まれる出血、壊死組織のためと考えられた。一方、外傷脳作製後1週目グリオーグス組織には腫瘍組織程の測定値の幅はみられず、中野の報告しているごとく、この時期では外傷による二次的浮腫が既に消褪していることを示すものと思われた。

グリオーグス組織の組織蛋白量をみると、反応性グリア細胞が活発に増殖し始めていることが判明している1週目グリオーグス組織においても、また反応性細胞増殖機転が安定しグリオーグスが完成された1ヶ月目グリオーグス組織でも蛋白合成能は正常脳組織と大差なく維持されていると考えられる。

実験的脳腫瘍組織の組織蛋白量はグリオーグス組織と同様、正常脳組織と比較して著明な変化はみられず Paoletti¹¹⁾ の報告と一致するものであり、脳腫瘍組織においても蛋白合成能は正常に保たれていることを示している。

すなわち、夫々異った細胞増殖機序を有すると考えられるグリオーグス、および腫瘍組織においても、蛋白合成能に関しては充分その機能が保たれていることが判明した。

(ii) 核酸

核酸は全ての生命現象の源として腫瘍学で広く研究され、RNA は細胞機能、特に蛋白合成能に関して、DNA は腫瘍化、ならびに腫瘍細胞の増殖に関して注目されている。

グリオーグス組織における RNA, DNA は、外傷脳作製1週目では正常脳組織と比較して著明な変化はみられず、1ヶ月後では高値を示す傾向をみとめている。この変化は、反応性グリア細胞増殖期と考えられる1週目で蛋白合成能が正常に保たれていることにより、RNA の代謝回転が極めて円滑に行なわれていることを示すとも考えられる。一方、DNA においては、外傷脳作製後1ヶ月目で高値を示したことは細胞増殖の1つの根拠となるがそれ以降の増加はみとめられず、グリア細胞増殖機転が安定したことを示している。

実験的脳腫瘍組織における核酸は RNA, DNA ともに高値を示しており、特に DNA は特徴的に高い値を示し、RNA/DNA 比は明らかに低下しており、細胞増殖が旺盛であることを示している。同様に旺盛な細胞増殖を示す1週目グリオーグス組織と比較してもその値は異常に高く、反応性細胞増殖、および悪性細胞増殖組織の細胞密度の違いのみでなく、腫瘍細胞における多核性のためとも考えられ、米増³³⁾、Paoletti¹¹⁾の組織学的悪性度に比例して DNA は高値を示し、その結果 RNA/DNA 比は低値を示すとの報告と一致するものである。また、RNA も1週目および1ヶ月目のグリオーグス組織と比較して明らかに高値を示している。しかし組織蛋白量を検討するとあまり差をみとめないことは、腫瘍組織における RNA の増加が直ちに蛋白合成能の亢進を意味するものでないとも考えられる。細胞の腫瘍化の機序を生化学的な一面より考えることは勿論危険であるが、今回得られた RNA および蛋白含有量より考えれば腫瘍細胞における細胞当りの RNA の蛋白合成能はむしろ低下しているとも考えられる。また、種々の腫瘍組織と同様に本組織も浮腫状態が強いものであり、かつ出血、壊死などの複雑な病態像を有することが考えられ、核酸定量が湿重量当りで算出されている点も充分考慮しなくてはならない。しかし、後述する腫瘍組織のアミノ酸代謝上の著明な変化とも考えあわせると、RNA の蛋白合成能には、反応性グリア細胞や正常脳組織とは明らかに異った代謝が形成されているものと考えたい。

(iii) 遊離アミノ酸

外傷作製後1週目、および1ヶ月目グリオーグス組

織における遊離アミノ酸組成、またその経時的変化、さらに実験的脳腫瘍組織にみられる特異な組成は、各々の組織におけるアミノ酸代謝の特徴を反映しているものと考えられる。

外傷脳作製後1ヶ月目グリオーグス組織にみられる遊離アミノ酸組成の全般的低値傾向は、グリオーグス組織固有のアミノ酸代謝の特徴を表わしていると考えられる。すなわち、1週目の反応性グリア細胞の増殖に伴い、アスパラギン酸、GABAの低値傾向が出現し、その後他の遊離アミノ酸も全般的な低値傾向を示すにいたる。この事実より、少なくとも反応性グリア細胞の活発な分裂、増殖が起る1週目頃の組織では、まずアスパラギン酸、GABAを中心とするアミノ酸代謝機構に正常脳組織とは異なる代謝変化が起きることとは確実と考えられる。

中野²¹⁾は、1ヶ月目のグリオーグス組織における遊離アミノ酸組成の全般的低値傾向について、グリア細胞における嫌気的解糖系の活性が高いとするHeden¹³⁾の報告にもとづき、その特異な解糖系のためと推論している。また、本研究におけるグリオーグス組織の蛋白合成能が正常であるという結果を考慮すると、グリオーグス組織における遊離アミノ酸の全般的低値傾向は、アミノ酸代謝回転が極めて旺盛なためにアミノ酸含有量としては低値傾向を示したとも考えられる。

柴田²⁶⁾は、グリオーグス組織におけるU-¹⁴C-glucoseのアミノ酸への組み込みをみた研究で、アミノ酸の活発な生合成がみられると報告している。これらの事実は著者の考えを裏づけている。

実験的脳腫瘍組織とグリオーグス組織における遊離アミノ酸組成を比較してみると、アスパラギン酸、グルタミン酸の低値傾向は共通しており、グルタミン、グリシン、アラニンは相反する傾向を示している。しかもグリオーグス組織において、明らかに反応性グリア細胞増殖に伴う特徴と考えられたアスパラギン酸、グルタミン酸の低値傾向は実験的脳腫瘍組織においても同様にみとめられた。これは腫瘍組織および反応性グリア細胞増殖に伴うアミノ酸組成の共通の現象とも考えられる。

脳腫瘍組織にみられたGABAの特異な動きと、グルタミン酸の低値、グルタミンの高値は、脳腫瘍組織の特徴的アミノ酸代謝回転の一面を反映している可能性がある。TCAサイクルにおける各アミノ酸代謝回転を考えると、GABAの動きは密接な関係をもつグルタミン酸、グルタミンと 관련된代謝の結果であ

り、これが腫瘍組織とグリオーグス組織の明らかな相異点となっているようである。

実験的脳腫瘍組織にみられるGABAの特異的な変化が、グルタミン酸、グルタミンに影響を与えているものか、また逆にGABAの変化はグルタミン酸、グルタミンの変化による二次的なものであるか、または、DNAの変化にみたような著明な腫瘍細胞分裂増殖の際の、グルコース代謝の好氣的、嫌氣的な変化に起因したものなのか、あるいはNH₃処理能力の変化による一連の現象であるのかは不明であるが、いずれにしろGABA、グルタミン、グルタミン酸にみられたこの一連の変化は、腫瘍組織の特徴的アミノ酸代謝を反映していると思われる。

(iv) Lysosome 酵素

Adamesにより細胞分裂の際、何んらかの形でDNA合成に関与すると報告されているLysosome酵素が、グリオーグス組織においても、反応性グリア細胞の増殖に伴って活性値の上昇をきたすことは、われわれが数年来報告してきた¹⁵⁾²⁵⁾²⁷⁾。

悪性腫瘍組織における β -glucuronidaseの高値傾向についてはFishman¹⁰⁾の報告があり、またヒト悪性脳腫瘍組織についての同様な傾向は著者らも報告²²⁾し、悪性度の判定、抗腫瘍剤の治療効果判定の有用な手段としての可能性を強調してきた。

Lysosome 酵素は、実験的脳腫瘍組織でグリオーグス組織に比較して著明な活性値の高値を示したが、この傾向は、反応性細胞増殖および腫瘍性細胞増殖の機構の違いを反映しているかも知れない。しかし、この違いは活性値の違いにだけ由来するかは疑問である。すなわち、教室の佐藤²³⁾によると、反応性グリア細胞増殖に伴うLysosome 酵素の変化はbound型の増加が主体であろうと推察しており、またヒト悪性脳腫瘍組織においてはfree型の増加が主体であることが著者らの研究²⁸⁾で判明している。

この両組織のLysosome 酵素活性変動の相違が何を意味するかは不明であるが、細胞分裂、および増殖機構が腫瘍細胞で異なることに起因したものか、あるいはまたLysosome 酵素と細胞分裂、増殖機構の関連性に関して引き金となる何か不明な要因が存在するためとも考えられる。しかしいずれにせよ、Lysosome 酵素が細胞分裂、増殖に密接に関連した重要な酵素の1つであることは確実と思われる。

今回、実験的脳腫瘍の細胞レベルで得られた生化学的な幾つかの特徴が、腫瘍細胞の分裂、増殖機構の解

明への小さな糸口の1つになるとすれば、さらにより多岐にわたる腫瘍細胞レベルでの代謝機構へのアプローチへと広がっていくものと思われる。

V. 結 語

Etylnitrosourea の投与により作製したラット実験的脳腫瘍のうち神経膠腫と診断された大脳半球腫瘍組織を用い、ラット正常脳組織、およびラット外傷脳に作製したグリオーゼ組織との比較を行うことにより、実験的脳腫瘍組織の生化学的特徴を追求した。

1) 組織蛋白含有量は、グリオーゼ組織、実験的脳腫瘍組織ともに正常脳組織と比較して明らかな差はみられなかった。

2) 核酸は、1週目グリオーゼ組織では、RNA, DNAともに正常脳組織と比較して著明な差はみられず、1ヶ月目グリオーゼ組織でRNA, DNAともに軽度の高値を示し、RNA/DNA比は1週目に比較して軽度の低値を示した。

一方、実験的脳腫瘍組織では、RNA, DNAともに著明な増加をみとめ、正常脳組織と比較して夫々、約2倍、6倍、1週目および1ヶ月目グリオーゼ組織と比較しても、RNAは夫々、約2倍、1.7倍、DNAは夫々約9倍、6倍の高値を示した。RNA/DNA比は0.81と著明な低値を示した。

3) 遊離アミノ酸組成は、1週目グリオーゼ組織で正常脳組織と比較して、アスパラギン酸、GABAは低値を示し、1ヶ月目グリオーゼ組織では全般的な低値傾向へと変化を示していた。実験的脳腫瘍組織では、アスパラギン酸、グルタミン酸、GABAは低値を、グルタミン、グリシン、アラニンは高値を示した。また、GABAは症例の半数が測定不能であり特異な態度を示した。

4) Lysosome 酵素は、1週目グリオーゼ組織で正常脳組織と比較して、 β -glucuronidase, Acid-phosphataseともに夫々、2.8倍、1.6倍と高値を示したが1ヶ月目グリオーゼ組織では正常脳組織の値へと復する傾向がみられた。実験的脳腫瘍組織では両酵素ともに著明な高活性を示し、特に β -glucuronidaseは正常脳組織と比較して15倍以上の高値を示した。

本論文の要旨は、第17回日本神経学会総会(1976年、東京)、および第6回国際脳神経外科学会(1977年、ブラジル)において発表した。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師栗津三郎教授、吉井信夫助教授、ならびに第2生理学教室平野修助教

授に深甚なる謝意を表わすとともに、本研究について終始御協力、御鞭撻を頂いた柴田家門講師に深謝し、併せて種々御協力下さった第2外科、脳神経外科学教室員各位に厚く感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) 阿部 弘, Allen N, et al: Nitrosourea 投与による実験的脳腫瘍の Lysosome 酵素の研究. 脳神経外科 2: 629-636, 1974.
- 2) Allison AC: The possible role of lysosomes in carcinogenesis. Proc Roy Soc Med 59: 868-871, 1966.
- 3) Burton K: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colrimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochemical J 62: 315-323, 1956.
- 4) de Duve C, Wattiaux R: Function of lysosomes. Ann Rev Physiol 28: 435-492, 1966.
- 5) Dishe Z: In the nucleic acid, ed. Chrgatt E, Davidson JN: 300, Academic Press 1955.
- 6) Druckery H, Ivankovic S, et al: Selektive Erzeugung von Hirntumoren bei Ratten durch Methylnitrosourea. Naturwissenschaften 5: 144-145, 1964.
- 7) Druckery H, Ivankovic S, et al: Selektive Erzeugung maligner Tumoren in Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl-Nitrosourea. X Krebsforsch 66: 389-408, 1965.
- 8) Druckery H, Ivankovic S, et al: Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. Nature 210: 1378-1379, 1966.
- 9) Fishman WH, Anlyan AJ: β -glucuronidase activity in human tissues, some correlation with processes malignant growth and with the physiology of reproduction. Cancer Res 7: 808-817, 1947.
- 10) Fishman WH, Springer B, et al: Application of an improved glucuronidases assay method to the study of human blood glucuronidase. Biological Chemistry 173: 449-456, 1948.
- 11) Grossi PE, Paoletti S, et al: The nervous system tumors induced by ethylnitrosourea administered either intracerebrally or subcutaneously to new born rats. Morphological and biochemical characteristics. J Neurosurg, 37: 580-590, 1972.
- 12) Hutchinson WC, Munro HN: The determination of Nucleic acids in Biological Materials. A Review Analyst 86: 768-813, 1961.
- 13) Hyden H, Cummings J: Adenosin triphosphate level and adenosine triphosphatase in neurons, glia and neuronal membranes of the vestibular

- nucleus. *Biochemi Biophys. Acta* **60** : 271-283, 1962.
- 14) Shibata I, Sato K, et al : Lysosomal enzyme and dibutyl 1 3-5 adenosine monophosphate, basic and clinical studies on lysosomal enzyme activities in glioma tissues and glial cells. *Neurologia Medico-Chirurgia* **15** : 27-33, 1975.
- 15) Shibata I, Sato K, et al : Changes of lysosomal enzyme activity in injured brain tissues. Fifth international meeting of the international society for neurochemistry, Spain, 1975.
- 16) Kato K, Yoshida K, et al : Synthesis of P-nitrophenyl β -glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for the assay of β -glucuronidase activity. *Chem Pharmac Bull* **8** : 239-242, 1960.
- 17) King EJ, Armstrong AR : Convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Canad MAJ* **31** : 376-381, 1934.
- 18) Lantos PL : Virus-like particle in brain tumors induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats. *Acta Neuropath* **29** : 211-222, 1974.
- 19) Lowry OH, Rosenbrough NJ, et al : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biochem*, **193** : 265-275, 1954.
- 20) Magee PN, Barnes JM : The production of malignant primary hepatic tumor in rat by feeding dimethyl-nitrosoamine. *Brit J Cancer* **10** : 114-122, 1956.
- 21) 中野重徳 : 外傷脳の生化学的研究——特に切截脳グリア組織の代謝的特徴について——日外宝, **37** : 177-187, 1968.
- 22) 長沢貞継, 柴田家門, 他 : グリオーマ細胞の生化学的分析. 脳研究会会誌 **2** : 94-95, 1976.
- 23) 佐藤克之 : 損傷脳における Lysosome 酵素の変動について. 日外宝 **46** : 396-405, 1977.
- 24) Seligman AM, Shear MJ, et al : Studies in carcinogenesis. Experimental production of brain tumors in mice with methylcholanthrene. *Amer J Cancer* **37** : 364-399, 1939.
- 25) 柴田家門, 西田有二, 他 : 外傷脳の修復過程に伴う lysosomal enzyme の変化に関する研究. (第1報), 第32回日本脳神経外科学会口演抄録集, p. 76, 1973.
- 26) 柴田家門 : 損傷脳に発生する反応性グリオース組織の生化学的研究. 脳と神経 **25** : 329-336, 1973.
- 27) 柴田家門, 佐藤克之, 他 : 切截脳における Lysosome 酵素活性の変動について. 日本神経化学会誌, **13** : 202-205, 1974.
- 28) 清木義勝, 柴田家門, 他 : 外傷脳, 脳腫瘍, 加齢脳などにおけるライソゾーム酵素変動について, 基礎的ならびに臨床的研究. 第19回日本神経学会総会口演集 臨床神経学 **18** : 916, 1978.
- 29) 鈴木豊, 石田陽一, 他 : ENU 経胎盤投与によるラット神経系腫瘍の病理形態研究. 神経研究の進歩, **20** : 476-485, 1976.
- 30) Tanaka M : Chromosome analysis of experimental rat glial tumor, (1)-correlation of chromosome changes between glial tumors and fetal brain tissue of rat after a transplacental exposure to ethylnitrosourea. *Neurologia Medico-Chirurgia* **16** : 35-42, 1976.
- 31) 埜本勝司 : Ethylnitrosourea (ENU) の経胎盤投与による実験的脳腫瘍 (第1報)——micro tumor の経時的, 部位的考察と組織学的性状について——脳と神経, **28** : 1319-1326, 1976.
- 32) Wechsler W, Kleihues P, et al : Pathology of Experimental neurogenic tumors chemically induced during prenatal and postnatal life. *Ann NY Acad Sci* **159** : 360-408, 1969.
- 33) 米増裕吉 : 脳腫瘍の燐化合物, 特に核酸について, その含有量および代謝. 医学研究 **37** : 127-145, 1967.