

グリオーマの生化学的研究

—DBc-AMP の腫瘍細胞に対する役割を中心として—

東邦大学医学部第2外科学教室（指導：栗津三郎教授）

長 澤 貞 継

〔原稿受付：昭和54年5月10日〕

The Biochemical Studies on Glioma

—The Analyses Round about Role of DBc-AMP in Tumor Cell—

SADATSUGU NAGASAWA

Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University.

(Director : Prof. Dr. SABURO AWATSU)

Glioma cells were studied by biochemical analysis for the purpose of chemotherapy of cerebral malignant tumors. As shown below, analysis of protein, nucleic acids, amino acids and lysosomal enzymes which are said to show peculiar movements as an intracellular enzyme, revealed that Ac-P. & β -Glu. showed a specific activity in cerebral malignant tumors and that they can be used as indicators of histological changes. Therefore, in patients suffering from astrocytoma Grade-IV, Dibutyryl adenosine-3, 5-cyclic monophosphate (DBc-AMP) was given. Using the above technique, biochemical changes in tumor cells were studied. As a result, Glioma cell divisions and growth were clearly arrested and it was shown that this chemical study has a high possibility of being used in the treatment of cerebral tumors.

1. As astrocytoma spreads, total protein content decreases and soluble protein shows exactly the same tendency.

2. Free amino acid

Compared to normal brain tissue, in astrocytoma grade-III and IV, decrease in aspartic acid and cystathionine is characteristic. In addition, in astrocytoma grade-IV, glutamic acid and GABA decreased greatly.

3. Nucleic acid

RNA in astrocytoma grade-III and IV showed over 50% increase and DNA, 6 to 7

Key words : Astrocytoma grade-IV, Cyclic-AMP, Dibutyryl adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate, Lysosomal enzyme, Non-operative therapy.

索引語：悪性神経膠腫，サイクリック AMP，ライソゾーム酵素，非手術的治療。

Present address : Division of Neurological Surgery, Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University, 6-11-1, Omori, Ota-ku, Tokyo, 143, Japan.

times more than that of normal standard. RNA/DNA ratio in astrocytoma grade-IV is 1.23 and with increase in DNA content, the pattern of lowered RNA/DNA ratio was noted.

4. Lysosomal enzyme

With spread of tumor, both β -Glu. & Ac-P. activities increased, reflecting their changes in activities. Also, intracellular free activity was 75% of total.

5. Change due to DBc-AMP administration Protein content increased approximately 30%, nucleic acids ; RNA, DNA, RNA/DNA ratio were lower and free amino acid values were all very close to that of normal brain tissue. With lysosomal enzyme, Ac-P. activity was approximately 1/6 and β -Glu. activity was held to 1/8 of normal.

緒 言

脳腫瘍に対する治療法は、良性腫瘍に対する手術的療法を除き、悪性脳腫瘍に対しては、手術療法に加え、放射線療法、化学療法、免疫療法などを行なっても十分に満足する結果を得るには到っていない。

そこで近年、あらためて脳腫瘍の化学療法に対する基礎的研究の洗い直しが行なわれつつある。著者は脳腫瘍の化学療法の基礎となる生化学的分析を、特にグリオーマ細胞について検討した。すなわち、細胞構成々分の分析、ならびに細胞代謝の面よりグリオーマ細胞の特徴を調べ、更に最近腫瘍細胞分裂に密接に関連する細胞内酵素として注目されて来ているライソゾーム酵素の動態を詳細に検討した。

また、細胞分裂・増殖の際に、細胞内で特徴的な変動を示すことから近年注目を集めている cyclic-AMP がグリオーマ細胞の分裂・増殖時に極めて特異な変動を示すことが、in vitro の実験で報告され、さらに Dibutyl adenosine-3',5'-cyclic monophosphate (DBc-AMP と略す) が培養条件下で、グリオーマ細胞の分裂・増殖を抑制し、細胞内 cyclic-AMP 濃度を増加させることが明らかとなった^{8,16)30)41)}。

この様な現状から著者は DBc-AMP が in vivo でグリオーマ細胞に如何なる影響を与えるかを、生化学的に分析し、細胞分裂・増殖機構に密接に関連する Lysosome 酵素への DBc-AMP 効果を臨床症例につき検討し、グリオーマ治療への応用の可能性について研究を行なった。

実 験 方 法

1) 試料の調整

a) 人脳腫瘍組織は手術時摘出された直後、血液成分を可及的速やかに清拭し、プラスチック容器中に密封の上、 -20°C で冷凍保存したものを用いた。また摘出組織の中で、組織学的検索で正常と思われる部分を対照として用いた。

b) 実験の外傷脳ラットのグリオーマ組織は、全脳摘出後冷却しつつ酵素調整用緩衝液で血液を洗浄後、灰白質のグリオーマ組織のみを 30~50mg 摘出し試料とした。

II) 生化学的分析

A) 核酸の定量

試料を 4% Perchloric acid (PCA) にて除蛋白後 Schmidt-Thannhauser の変法³⁹⁾に従い、遊離アミノ酸、核酸を分離抽出し、RNA は Orcinol 酸、核酸を分離抽出し、RNA は Orcinol 法⁶⁾、DNA は Burton 法³⁾により比色定量した。また蛋白質量の測定は Lowry の変法²⁷⁾によった。

1) RNA の定量 (Orcinol 法)⁶⁾

鉄ミヨウバン 0.27g、オルシン 0.4g を再蒸溜水にて 10ml とし、この 0.5ml に濃塩酸 8.3ml および再蒸溜水 1.2ml を加え試薬とし、試料 1ml に対し 3ml を加え、 100°C 、20分煮沸後、日立 101 型光電比色計を使用して $670\text{m}\mu$ で比色定量した。

2) DNA の定量 ((Burton 法)³⁾

精製ジフェニールアミン 0.6g、酢酸 40ml、濃硫酸 1ml を混和し、これに稀釈 Acetaldehyde を加え試料 2ml に倍量の試薬を用いて 30°C 、20時間恒温温槽で反応させ、RNA 定量と同様に $600\text{m}\mu$ で比色定量を行なった。

B) 蛋白質の定量 (Lowry の変法)²⁷⁾

試薬 A : Na_2CO_3 10g, NaOH 2g を再蒸溜水で

500ml とする。試薬 B・2% Tartaric acid 溶液、試薬 C・1% Cupper sulfate 溶液を作成し、A・B・C 各々100:1:1の割合で混合液を作る。試料は pH=7.3 に調整した 0.32M, Sucrose 液 1.5ml で homogenize し、その0.5ml を A・B・C 混合液 3ml と混和後、10分間放置し、phenol 試薬 0.15ml を加え、更に室温で30分間反応させた後、750m μ で比色定量した。可溶性蛋白の定量は植村らの方法⁴²⁾によった。

C) アミノ酸分画定量

遊離アミノ酸の定量は 4% Perchloric acid で除蛋白し、酸抽出して得られた試料を水酸化カリウムにて pH=7.4 に中和した後、アミノ酸自動分析器(日本電子製 JLC-6AH 型)を用いて測定した。

D) ライソゾーム酵素の測定

1) β -Glucuronidase の定量

Kato らの方法¹⁷⁾を利用して全活性 (total activity) 及び遊離活性 (free activity) を測定した。遊離活性は pH=7.3, 0.32M Sucrose 1.5ml にて homogenize した約 50mg の試料の 0.1ml を用いて、また全活性の測定には 0.05% Triton X-100 で homogenize した試料 0.1ml を用いて pH=4.5, 0.2M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 0.35ml, p-nitrophenyl- β -glucuronidase 0.05ml と混和し、37°C 4時間孵置後、アルカリ試薬として pH=10.45 0.4M Glycine buffer 1.0ml を加え、10分間室温にて反応後、再蒸留水 3.0ml で稀釈、2500 r. p. m. 15分間遠沈後 400m μ で比色定量した。標準液には p-nitrophenol を用い、蛋白量当たり μ g 数として $-\mu$ g/mg $\cdot$ Protein/hour—で表示した。

2) Acid-phosphatase の定量

β -Glucuronidase の測定と同様の試料を用いて全活性および遊離活性を測定した。King-Armstrong 法の変法²⁰⁾に従い、Citrate buffer (pH=4.8) 1.0ml 及びフェニル磷酸 2ナトリウムと4-アミノアンチピリンとにより作製した基質液 1.0ml を混和する。37°C, 60分間恒温反応させ、発色剤として特級フェリシアン化カリウム液 (2.4g/dl 溶解液) を加え、2500r. p. m. 15分間遠沈後、570m μ で被検液の吸光度を測定した。標準液には Phenolphthalein 液を用い、蛋白量当たりの μ g 数として表示した。

III) DBc-AMP 投与方法 (Table-3)

di butyryl 3',5'-adenosine monophosphate を 2mg/kg $\cdot$ Body $\cdot$ weight/day の割合で連続 2~3 週間、内頸動脈持続動脈内注入法により投与することを原則と

した。その後 3 週間休止した後、点滴静注法にて 2 週間を 1 クールとし、連日投与を行ない、以後 30~45 日間隔で出来る限り長時間にわたり、投与を継続した。

実験結果

1) グリオーマ細胞の生化学的分析

1) 蛋白質含有量

総蛋白量は Kernohan 分類¹⁹⁾ の Astrocytoma Grade-I で湿重量当り 154~317 (平均 247) mg/g, Grade-II 型で 83~789 (平均 233)mg/g, Grade-III 型で 148~300 (平均 191)mg/g, Grade-IV で 93~284 (平均 142)mg/g と悪性度を増す毎にその含有量は減少し、各々開きはあるものの明らかに差異を認めることができる。

一方、可溶性蛋白は各々湿重量当り 39.3~40.2mg/g, 36.8~38.8mg/g, 34.1~35.9mg/g, 31.6~33.2mg/g と、これも明らかな分類による違いが認められた。(Table-2)

2) 遊離アミノ酸 (Table-4)

悪性度の低い Glioma を正常脳組織に比較すると、グルタミン酸、チスタチニオン、GABA が著明な低下を示し、グリシンが逆に軽度の増加を認めたが、他のアミノ酸には変化はみられなかった。これを Grade-III の 8 例とて検討すると、アスパラギン酸、チスタチオニンが著しく低下するが、グルタミン酸、アラニン、GABA は有意差なく、グルタミン、グリシンは逆に増加の傾向を示した。更に、Grade-IV の 8 例と比較すると、アスパラギン酸、チスタチオニンが同様に低下すると共に、グルタミン酸及び GABA が著しく低値を示した。グリシン、アラニンは軽度の上昇がみられた。

3) 核酸 (Table-5)

Astrocytoma について対照群と対比しつつ、蛋白量当たりの含有量を測定した。RNA についてみると、Grade-I で 1.13mg/g, Grade-II では軽度減少して 0.79mg/g, Grade-III では 2.55mg/g, Grade-IV では 2.66mg/g と悪性度の高い腫瘍では対照群に比して約 50%以上含有量が増加していた。

DNA は悪性度の低いものでは、余り変化を認めないが、Grade-III, IV では各々 6 倍、7 倍と高値を示した。

これらを単位細胞当たりの含有量として、RNA/DNA ratio をみると、対照群 5.40 に対し Grade-III では 1.82, Grade-IV では 1.23 と RNA 量が相対的に

Table 1. Protein content in human brain tumors

Tumor		mg/g wet weight (mean values)
Astrocytomas		(Experimental No.)
Grade I	(9 cases)	154—317 (247)
Grade II	(15 cases)	83—789 (233)
Grade III	(13 cases)	148—300 (191)
Grade IV	(12 cases)	93—284 (142)
Benign Tumors		
Meningioma	(12 cases)	55—372 (160)
Hemangioblastoma	(4 cases)	105—176 (142)
Pituitary adenoma	(2 cases)	96—112 (104)
Acoustic neurinoma	(2 cases)	235—274 (255)
Malignant tumors		
Pinealoma	(4 cases)	102—338 (212)
Ependymoma	(4 cases)	51—143 (92)
Medulloblastoma	(2 cases)	633—735 (685)

Table 2. Soluble protein content in human astrocytoma

Astrocytoma (Cases)	Soluble protein (mg/g wet weight)
Grade - I (4)	39.3—40.2
Grade - II (4)	36.8—38.8
Grade - III (4)	34.1—35.9
Grade - IV (4)	31.6—33.2

Table 3. Method of dibutyryl 3', 5'-adenosine monophosphate (DBc-AMP) administration

- I. Injection into the internal carotid artery continuously
dibutyryl cyclic-AMP :
2 mg/kg body weight/day during for 2-3 weeks
injective speed : 5 ML / 24 hours
- II. Intravenous injection
dibutyryl cyclic-AMP :
2 mg/kg body weight/day for 2 weeks
injective speed : 500 ml 2 hours

Table 4. Amino acid content

Conditions (Cases)	ASP.	GLU.-NH ₂	GLU.	GRY.	ALA.	CYSTA.	GABA
Astrocytoma Grade - III (8)	1.03-1.32	1.00-11.43	4.69-9.75	0.88-6.23	1.69-3.21	0.52-1.26	0.52-1.74
	(1.14)	(8.04)	(7.87)	(2.73)	(2.22)	(0.91)	(1.62)
Astrocytoma Grade - IV (8)	0.54-2.73	1.47-7.45	1.00-3.35	1.10-4.21	0.98-4.38	0.59-3.68	0.30-0.48
	(1.64)	(4.46)	(2.18)	(2.66)	(2.68)	(2.14)	(0.39)
Grade - IV (8) (DBc-AMP treated)	1.18-3.18	4.14-5.56	2.58-3.20	1.09-2.30	1.32-2.23	1.39-2.86	0.91-1.39
	(1.73)	(4.95)	(2.87)	(1.61)	(1.66)	(2.05)	(1.14)
Normal (5)	2.54-3.74	3.53-6.35	6.45-9.27	0.57-2.37	1.15-2.33	2.59-4.35	1.38-1.94
	(3.14)	(4.94)	(7.86)	(1.47)	(1.74)	(3.47)	(1.66)

(μ moles/ g wet weight) (mean values)

Table 5. Nucleic acid content in astrocytoma

Conditions (Exp. No.)	RNA mg/g wet-weight (mean values)	DNA mg/g wet-weight (mean values)	RNA/DNA Ratio (mean)
Grade I (5)	0.65-2.18 (1.13)	0.31-1.07 (0.69)	0.61-2.10 (1.63)
Grade II (7)	0.43-1.14 (0.79)	0.09-0.61 (0.35)	1.87-4.78 (2.24)
Grade III (8)	2.18-4.12 (2.55)	0.72-3.53 (1.79)	0.90-3.22 (1.82)
Grade IV (8)	1.05-4.10 (2.66)	0.63-5.20 (2.16)	0.69-2.62 (1.23)
Grade IV (8) (DBc-AMP treated)	1.30-3.47 (2.41)	0.89-1.89 (1.45)	0.68-3.89 (1.95)
Control (5)	1.56-1.68 (1.62)	0.29-0.31 (0.32)	5.17-5.63 (5.40)

Table 6. Acid phosphatase activity in human brain tumors

Astrocytomas (Cases)	$\mu\text{g}/\text{mg}$ protein/hour (mean values)
Grade I (4)	114.4-274.4 (194.4)
Grade II (12)	63.6-245.8 (140.6)
Grade III (12)	125.0-463.3 (310.4)
Grade IV (11)	69.1-785.6 (411.3)
Benign tumors	
Meningioma (12)	18.0-366.9 (144.8)
Hemangioblastoma (4)	105.4-299.7 (170.7)
Pituitary adenoma (2)	93.8-182.7 (138.2)
Acoustic neurinoma (2)	11.0-17.5 (14.2)
Malignant tumors	
Pinealoma (4)	335.3-630.0 (421.3)
Ependymoma (4)	41.9-189.9 (106.0)
Medulloblastoma (2)	103.9-108.8 (106.4)

Table 7. Beta-glucuronidase activity in human brain tumors

Astrocytomas (Cases)	μg mg protein/hour (mean values)
Grade I (4)	6.4-15.9 (11.0)
Grade II (12)	2.3-17.9 (7.5)
Grade III (12)	2.4-39.6 (22.1)
Grade IV (11)	11.1-66.2 (40.8)
Benign tumors (Cases)	
Meningioma (12)	2.0-25.4 (10.6)
Hemangioblastoma (4)	29.9-46.6 (35.0)
Pituitary adenoma (2)	7.8-15.6 (11.7)
Acoustic neurinoma (2)	3.2-5.1 (4.2)
Malignant tumors (Cases)	
Pinealoma (4)	12.5-20.6 (17.7)
Ependymoma (4)	5.7-19.8 (12.5)
Medulloblastoma (2)	9.1-12.9 (11.0)

減少していた。一方、実験的に作製したラット脳の反応性細胞増殖を示しているグリオージス組織 1 ヶ月目のものと対比すると、RNA : 2.34, DNA : 0.83, RNA/DNA 比 : 2.82 と含有量は腫瘍細胞分裂組織とは異なり、高値を示さなかった。

4) ライソゾーム酵素 (Table-6, 7)

数種類のライソゾーム酵素について人脳腫瘍組織を試料として検討した結果、特徴ある所見を呈した Acid-phosphatase (Ac-P), β -Glucuronidase (β -Glu.) の 2 種の水解酵素を取りあげた。

a) Astrocytoma

Kernohan 分類に従い、組織学的に診断し得た試料

Table 8. Effect of DBc-AMP treatment on lysosomal enzymes (Astrocytomagrade-IV)

Conditions	Acid-phosphatase μg/mg protein/hour (mean values)	Beta-glucuronidase μg/mg protein/hour (mean values)	Protein mg/g wet weight (mean values)
Non treated (8 cases)	69.1-785.6 (411.3)	11.1-66.2 (40.8)	93-284 (142)
DBc-AMP treated (8 cases)	33.4-136.4 (66.4)	2.2- 8.8 (4.7)	60-298 (156)

Table 9. Lysosomal enzymes activity in astrocytoma (Grade-IV) of human brain

	Total activity μg/mg protein/hour (mean values)	Free activity μg/mg protein/hour (mean values)
Beta-glucuronidase (5 cases)*	45.2-64.8 (52.7)	38.5-41.7 (39.8)
Acid phosphatase (5 cases)*	105.6-121.9 (111.7)	84.1-94.1 (87.6)

* These cases were measured in another samples of astrocytoma grade-IV.

のみを用いた。

Acid-phosphatase (Ac-P) は全活性でみると平均値で Grade-I : 194.4μg/mg・Protein/hour, Grade-II: 140.6, Grade-III : 310.4, Grade-IV : 411.3 と悪性度が高くなるにつれ活性値が上昇している。β-Glucuronidase (β-Glu.) は平均値で同様に, Grade-I : 11.0 Grade-II: 7.5, Grade-III: 22.1, Grade-IV: 28.8 と Ac-P 値と同じ傾向を示し, Grade-IV は Grade-I に比し2倍以上の活性値上昇を認めた。しかし, Ac-P 値各群の変動は悪性化するに伴って, その活性値のばらつきが大きくなっており, その傾向はβ-Glu. についても同様であった。これらのうち, 5例について腫瘍組織に多く存在する遊離型活性を検討した。Ac-P では全活性平均値 111.7 に対し 87.6μg/mg・Protein/hour と78%を占め, β-Glu. も同様に全活性平均値 52.7 に対し 39.8μg/mg・Protein/hour と75%を占めることが判明した。

b) その他の脳腫瘍

Hemangioblastoma, Pinealoma は両酵素とも高値を示し, 平均で前者は β-Glu. : 35.0, 後者は Ac-P. : 421.3μg/mg・Protein/hour と各々 Grade-IV よりも更に高値を示した。Meningioma は典型的な良性腫瘍であるが, その活性値は各種の脳腫瘍中では、中間位に属する。しかし, 先に述べた Grade-IV にみられる如く, Ac-P 18.0~366.9, β-Glu. : 2.0~25.4μg

mg・Protein/hour と試料により著しいばらつきがみられ, 上限値は下限値に対し Ac-P で20.4倍, β-Glu. で12.7倍と言う変動幅があった。今回検討した各種脳腫瘍の中でも生命予後の極めて不良な Medulloblastoma の2例は, 共に小児より得た組織であるが, Ac-P : 平均106.4, β-Glu. : 平均11.0μg/mg・Protein/hour と Astrocytoma に比べると, ほぼ Grade-I に相当する程度の活性を呈したに過ぎなかった。更に, Ependymoma も比較的悪性度の高い脳腫瘍と看做されるが, やはり Grade-I に類する値を示した。一方, 良性腫瘍である pituitary adenoma は Ac-P 138.2, β-Glu. : 11.7 と前二者よりやや高めの値を得た。しかし acoustic neurinoma では両酵素とも著明な低値を示した。

Ⅱ) 臨床的検討 —— Dibutyl 3', 5' - adenosine monophosphate (DBc-AMP) の効果について (Table-8)

1) 蛋白質含有量の変化

非投与群 8例平均 123mg/g wet weight に対し, DBc-AMP 投与群 8例平均 156mg/g wet weight と約30%の増加を示したが, やはり試料によるばらつきが多くみられた。

2) 遊離アミノ酸構成の変化 (Table-4, Fig.-1, 2)

一般に悪性化する腫瘍組織では前述の様に, アスパラギン酸, チスタチオン, グルタミン酸, GABA等

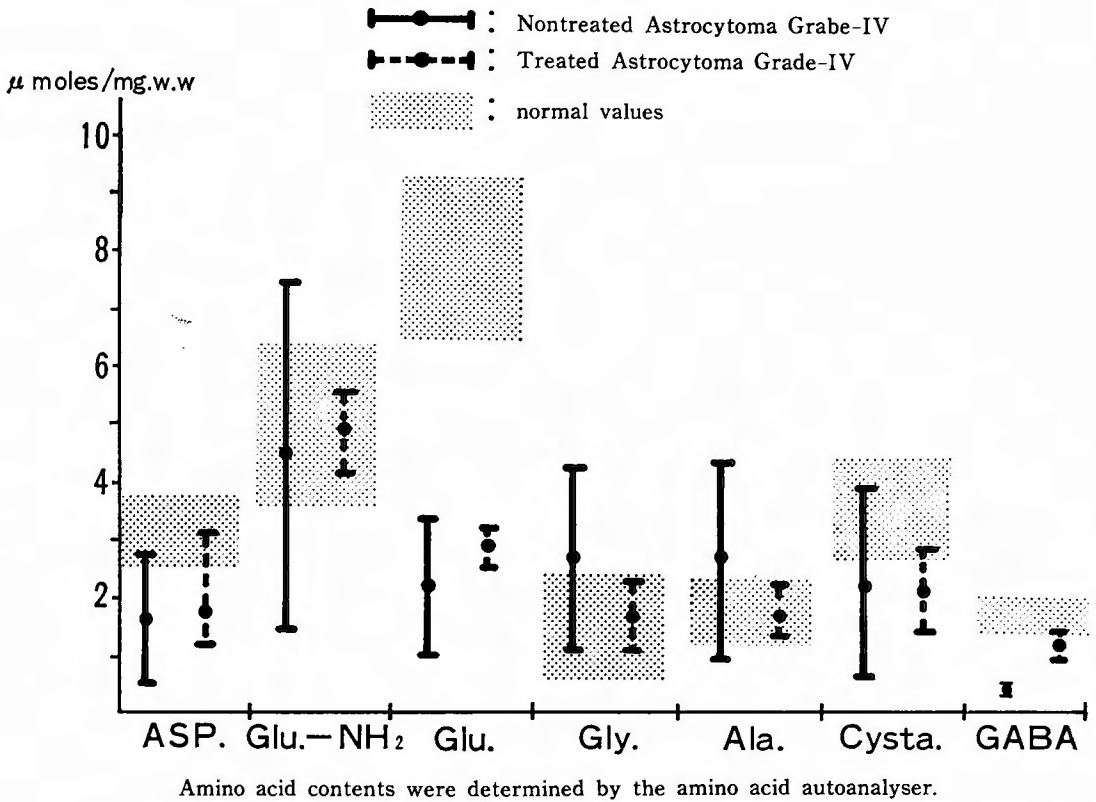


Fig. 1. Effect of DBc-AMP Treatment on Amino acid

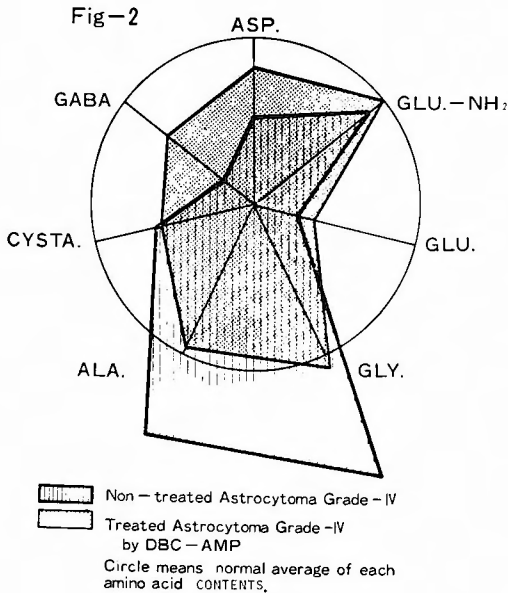


Fig. 2.

の低下、グルタミン、グリシン、アラニンの増加等のパターンを示すが、DBc-AMP 投与群では GABA、グルタミン、グリシン、アラニンは正常脳組織と近似した値を示し、正常化への傾向を強く伺わせた。

3) 核酸への効果 (Table-5)

非投与群 6 例の平均に対し、DBc-AMP 投与群では極めて特徴的な変化を示し、RNA, DNA, RNA/DNA 比は、いずれも低値を示した。

4) ライソゾーム酵素の変化 (Table-8)

Ac-P は全活性で、非投与群平均 $411.3 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ であるのに対し、DBc-AMP 投与群は平均 $66.4 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ と約 $1/6$ の活性抑制がみられた。β-Glu. では非投与群平均 $40.8 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ に対し、 $4.7 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ と約 $1/8$ の活性低下を示した。

考 按

1) 腫瘍細胞悪性度と酵素活性変動

細胞内の機能に対応して代謝系を調節する酵素が細胞内顆粒の1つに含まれていることから、Ribonuclease, Deoxyribonuclease, Cathepsin, β -Glucuronidase, Acid-phosphatase の水解酵素を Lysosome 酵素と命名し、生化学的にその存在を明らかにしたのは C. de Duve ら⁷⁾の業績である。翌年、Novikoff ら³⁵⁾と共に P・V・P-sucrose homogenate から microsomal membrane よりは遙かに小さい $56 \times 76 \text{ \AA}$ の dense body を電顕的に確認し、これが Lysosomal 顆粒であることを同定するに到り、形態学的な説明はもとより、酵素化学領域における研究は長足の進歩を遂げることとなった。

A) β -Glucuronidase

1961年 Allen¹⁾は各種の脳腫瘍について、 β -Glu. 活性を測定した結果、一般的に未分化型腫瘍が、より分化した腫瘍に比べすべて高値を示すとは言えないが、Astrocytoma に関しては、Kernohan 分類で悪性度を増す毎に明らかな高値を示すことを認めた。その詳細な分析により、各腫瘍に応じて活性変動を示したと報告した。即ち Grade-IV > Ependymoma > Medulloblastoma > Grade-III > Meningioma > Grade-II > Grade-I の順に活性は低値を示し、これは奇しくも著者の成績と一致するものである。(Table-7)

今回、対照とした全脳腫瘍組織の酵素活性をみると、最も低値から最高値までに広く分布するのは、やはり Astrocytoma であり、 $2.3 \sim 66.2 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ と開きがある。これは Lehrer²⁵⁾の Glioblastoma multiforme 2例の組織で6~30倍の酵素活性の違いが存在した結果と同様の傾向を示した。この理由として Glia 細胞の増殖期には通常 β -Glu. 活性の増加が認められるので、これらの腫瘍の成長の度合と何らかの関係があるのではないかと述べている。事実、当教室の佐藤³⁸⁾によれば、ラット脳の切截実験で術後第5病日を頂点とする著しい β -Glu. の活性上昇と30日以上持続する高値を証明している。

このような活性値の変化を Mullan²⁸⁾の悪性度分類を応用し、所謂良性・悪性に分け検討した。Hemangioblastoma は平均 $35.0 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ と著しい高値を示す例外的良性腫瘍であり、これを除いた Meningioma, pituitary adenoma, acoustic neurinoma の良性腫瘍群は平均 $8.8 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$

であるのに対し、Pinealoma, Ependymoma, Medulloblastoma の悪性腫瘍群の平均は $13.7 \mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ であり、約1.6倍の差が存在する。この事は一般に分化の程度が進んだ腫瘍では低値を示し、未分化な腫瘍では高値を示す傾向があるのではないかと一応言い得る様である。

B) Acid-phosphatase (Table-6)

一方、Ac-P は変性に関して良い指標となる、とする数編の報告があるが⁴¹⁾²³⁾³²⁾、それらは全て組織化学領域のものであり、生化学的検討を主とした論文は僅かである³⁷⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾。且つ、いずれも未だ酵素活性変動の機序と変性との相関性を明確にするには到っていない。

今回、著者の得た Ac-P の結果は、先に述べた β -Glu. 以上に悪性度および腫瘍組織の違いに相関する活性値変動が得られた。即ち、前者に倣い列举すると、Pinealoma > Grade-IV > Grade-III > Grade-I > Hemangioblastoma > Grade-II > Meningioma > pituitary adenoma > Medulloblastoma > Ependymoma > acoustic neurinoma の順となる。 β -Glu. で高値を示した Medulloblastoma 及び Ependymoma は軽度の上昇に留まっている。Astrocytoma は分化の程度により明瞭に活性値の変化を示し、Grade-I・II群に比し Grade-III・IV群では明らかな活性上昇が認められ、 β -Glu. と同様の傾向を示した。

これは Wollemann ら⁴⁵⁾の結果とは、同様の傾向を示した。一方、河島ら¹⁸⁾らは腫瘍の悪性度と酵素活性変動とは相関しないとしている。著者のデータを見ても脳腫瘍組織は形態的にも極めて変化に富み、病理学的に Grade-III に属すものでも、その部位によって活性値は異なり、又測定方法や処置方法によっても影響されるものである為、結論的評価は慎重を要する。しかし、Grade-I・II群と Grade-III・IV群との活性値の差異は明らかである。

acoustic neurinoma 2例では極端な低値を示したが、Wollemann ら⁴⁵⁾、Müller ら²⁹⁾は活性の上昇があったとしており、Lolova ら²⁶⁾も組織化学的に血管周囲の偽黄色腫細胞に驚く程濃厚に染色した、と報告している。しかし、活性上昇は殆んど無かった⁹⁾¹⁸⁾とするものもある。このような差異が生じたのは試料として聴神経より発した腫瘍だけでは無く、それ以外の神経鞘腫をも含めていることが、その理由かも知れない。

Pinealoma 4例では、平均した高値を示したが、本腫瘍でのこれに比較すべき結果は未だ報告を見ない。

本酵素を二群に分ち、平均値を各々求めると、良性腫瘍群は $117.0\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ 、悪性腫瘍群では $211.2\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Protein}/\text{hour}$ と前者に比べ1.8倍の活性上昇を示し、 β -Glu.と同様各種脳腫瘍の特徴を比較的良く反映する、水解酵素であると考えられる。Ac-Pに関して比較される報告をみないが、Allenの β -Glu.を検討した結果とも非常に良く相関することがわかる。40数種類のライソゾーム酵素のうち、臨床的に脳腫瘍組織の種類、更に悪性度を良く反映するものとして β -Glu.が取り上げられていたが、著者の研究ではPinealoma, Medulloblastoma, Pituitary adenoma, acoustic neurinomaなどでのAc-Pが比較的平均した活性値を示したことは、 β -Glu.と同様に重要なLysosome酵素であると言えよう。

Ⅰ) Lysosome 酵素の活性型の相違 (Table-9)

一般に腫瘍組織内のライソゾーム酵素は、遊離型活性が極めて高い値を維持しているものが多い。又、損傷或いは炎症時に細胞内でライソゾーム酵素は結合型活性が著明に上昇し、それらの障害が除かれた後は急速に活性が低下し正常域にもどることも確かめられている。正常脳組織の細胞分裂時におけるライソゾーム酵素変動については、野口ら³⁴⁾はラット小脳のDNase, DNA-polymeraseを測定し、神経細胞やグリア細胞の分裂期に酵素活性変動があることを報告している。清木ら⁴⁰⁾は新生仔ラット脳の発育に伴う β -Glu. Ac-Pを経時的に検討し、酵素活性の発育に伴う変動を詳細に報告している。

Lysosome 酵素は、同一酵素に2種の存在様式を有している。細胞が正常な状態にある時、細胞質中に遊離して存在する部分があり、これを測定したものが遊離型活性又はFree activityと言われるものである。Lysosomeの膜構造は極めて敏感で、種々の細胞条件や外力により透過性亢進や膜損傷を受け易く、膜に存在するresting stageにあったLysosome酵素が遊離され、活性化される。これが全活性又はtotal activityと呼ばれ、生化学的にはTriton X-100などにより賦活させて測定している。

正常ラット脳組織で β -Glu., Ac-Pを全活性、遊離活性で測定した結果は既に報告したが、遊離型活性が約50%を占めた。又、佐藤³⁸⁾が報告している通り、損傷脳におけるライソゾーム酵素活性は明らかにrepairing enzymeとしての働きを示し、resting stageにあった結合型活性(全活性より遊離活性を差引いた部分)が著明な高値を示し、しかも修復に伴って正

常値へと復することも明確となった。著者の検討した脳腫瘍組織では、前二者とは全く異なった態度を示した。全活性は正常の数倍より10数倍と増加している。遊離型活性は80~90%を占めており、この傾向は β -Glu., Ac-P いずれも同様であった。しかも、損傷脳や発育過程の脳組織と異なり、余り消長は無く、常に高値が持続するのが特徴であり、正常化への推移は全くみられなかった。今回の結果より、腫瘍細胞分裂時におけるライソゾーム酵素の存在様式は遊離型活性であることが、腫瘍細胞にとって必要条件となっている様である。機能的にも、“細胞損傷時におけるrepairing mechanismに密接に関連する働き”として捕えられるライソゾーム酵素の機能の他に、本来はresting stageにおかれるべき部分の酵素が何らかの細胞内環境の変化によって活性化され、しかも誘導され、かつ合成され続けると言う新たな細胞環境ができ上がったのが、腫瘍細胞であるとの現象が得られた。細胞分裂・増殖の機構にライソゾーム酵素が同一酵素でありながら、明らかに異なった2つの存在様式(遊離型と結合型)をとって関与しており、しかも正常細胞分裂と異常細胞分裂、即ち腫瘍細胞分裂とで存在様式型の比率が明らかに異なることが証明できたことは、分裂・増殖機構の解明につながるものと考えられる。

Ⅱ) 蛋白質含有量 (Table-1)

Gerhardtら⁹⁾によれば、Gliomaでは良性、悪性の区別無く、蛋白質含有量は増加しており、Medulloblastomaでもその傾向があったとしている。Paolettiら³⁶⁾はMeningiomaでAlbuminの増加を指摘している。著者の成績では総蛋白量でみると、Medulloblastomaの著しい高値を除いて約100~250mg/g·wet-weightの範囲にある。此処で注目したいのはAstrocytomaにおける含有量の違いである。Grade-I平均247mg/g·wet-weightに対しGrade-IV平均142mg/g·wet-weightと50%以上減少している。一般に脳組織に含有される蛋白質は、脂質・多糖体などと殆んどが結合した形で存在し、更に酸性蛋白が多い為、方法によって回収率に多少の差があるが、悪性度との逆相関が認められた点は重要であろう。しかし、他の悪性腫瘍群と良性腫瘍群とを比較すると、各々平均152.0, 165.3mg/g·wet-weightと有意差は認め難い。

細胞構成成分の1つとして取り上げた蛋白質は、総蛋白量として考えるときには、腫瘍の悪性度との相関は症例に応じて異なり、その主たる原因が個々のedemaなどに強く影響されると考えられる。よって

酸可溶性部分としての分析や電気泳動による各分画とを、同時に検討することが必要であろう。

Ⅱ) 核酸 (Table-5)

蛋白合成における核酸の役割が注目されて以来、脳腫瘍組織の核酸に目が向けられたのは Heller ら¹¹⁾が正常脳と腫瘍との DNA を測定したことが大きな契機となった。彼らは、Glioma の DNA 量が悪性度々に比例して上昇すること、また Meningioma で高値を示すことを確かめた。其後、正常脳組織と脳腫瘍組織とを検討した報告が相次いで発表されている⁵⁾¹²⁾²⁴⁾³³⁾が、いずれも Glioma で DNA 含有量の上昇を認めている。

DNA 量の増加を蛋白質含有量当たりで、検討すると、Glioma の Grade が進むにつれて、明らかに DNA は増加を示し、悪性度と良く相関することがわかる。Heller ら¹¹⁾も、malignant Glioma と benign Glioma とを細胞単核当たりの DNA 量で比較し、明らかに悪性腫瘍群に増加を認めた。又、良性腫瘍の Meningioma にも増加を認め、良性腫瘍では細胞密度の高い腫瘍が、悪性腫瘍では旺盛な細胞増殖をしている腫瘍が、各々高値を示すと考えている。

RNA 含有量は DNA とは多少異なった傾向を示した。Grade-IV で 2.66mg/g·wet·weight と高値を示したが、対照群及び Grade-I に比し著しい差は無い。一般に悪性腫瘍では比較的高値を示す傾向がある様に思われるが、Grade-IV では最も低値を示した例も報告されており、DNA の変化に見合う程の変動は無いと考えられる。従って悪性化の段階を RNA/DNA 比で示すと、悪性度の高い組織程この比は小となり、DNA 含有量の増加を伴った RNA/DNA 比の低下は腫瘍組織に特徴的であると述べた Cohen の命題⁹⁾は、明らかにこの結果を裏付けており、悪性化する腫瘍、殊に Astrocytoma において、その程度を弁別することができるように思われる。そして、RNA・DNA 共に悪性度が高くなるに従い、その含有量が増加し、DNA でその傾向が顕著である。即ち腫瘍が悪性化するに従い、DNA 量が増加する様であり、極めて有用な生化学指標であると考えられる。

Ⅲ) 遊離アミノ酸構成 (Table-4)

Wender ら⁴⁴⁾は正常脳組織と比較して Glioma で cystine の減少と phenylalanine の増加とを報告しているが、組織診断および悪性度との相関は無い様である。本研究では Grade-IV でグルタミン酸と GABA の著明な低下と、グリシン・アラニンの軽度上昇があ

り、Grade-III でアスパラギン酸、グリシン、グルタミンの増加とチスチオニンの著明な低下を認めたが、各症例により幅がある様であった。

脳組織に特有な高値を示すグルタミン酸が、GABA と共に悪性脳腫瘍で著しい低下を示した点は、細胞分裂増殖の盛んな悪性新生物の細胞内アミノ酸の代謝的特異性を示唆するものと考えられる。

以上の結果より、脳腫瘍組織において悪性度分類に対応する一定の特徴を見出すことはできないが、正常中枢神経系組織に特異的高値を示すこれら遊離アミノ酸に明らかな構成々分布の変化が認められたことは、注目すべき事実であろう。

Ⅳ) DBc-AMP のグリオーマ細胞への効果

これ迄、脳腫瘍組織について神経化学的分析を進めて来たが、治療に難渋する Grade-IV 8例に腫瘍摘出術後、或いは再発前または深部の腫瘍摘出不能例に、非手術的治療として DBc-AMP 療法を行った結果をまとめた。DBc-AMP は Glioma 細胞の分裂増殖を抑制するのみならず、未分化細胞をより分化した細胞へと変化させ、更には腫瘍細胞の特異な細胞内代謝を正常化させる傾向を有する¹⁰⁾¹³⁾¹⁵⁾¹⁶⁾³⁰⁾⁴¹⁾、と報告され神経化学領域、脳神経外科でも一躍脚光を浴びて、脳腫瘍治療剤として期待されている Dibutyl 3', 5'-adenosine mono-phosphate を臨床応用し、前述した生化学の実験項目の検討を行なった。治療群は開頭術後、本剤を計画投与し得た 8例である。

Glioma 細胞内で高値を維持するライソゾーム酵素に対して如何なる影響を及ぼすか、について検討を行なった (Table-8)。ライソゾーム酵素は脳の発育に伴う細胞増殖や腫瘍細胞増殖等の際に、活性値が上昇することは確実となった。それらの細胞に直接作用する DBc-AMP を投与することにより、細胞内で高度に活性化しているライソゾーム酵素に対して、どの様な効果を及ぼしているかは、ライソゾーム酵素が細胞分裂機構の重要な因子とも考えられる為、興味もたれた。

DBc-AMP を投与した 8例は非治療群 8例に比べ、Ac-P で 66.4 μ g/mg·Protein/hour (15.4%)、 β -Glu. では 4.7 μ g/mg·Protein/hour (11.5%) と予期した通り著明な活性値の低下を来し、いずれも今回検討した脳腫瘍組織中、最も低値を示すグループに属することとなった。

これに比し、蛋白含有量は非治療群の 10%上昇したにとどまったが、Grade-I は Grade-IV に比べ約 75%

含有量が多いことから考えると、この増加はやはり薬物投与による細胞内での変化の1つと考えることができる様に思われる。

一方、核酸についてみると (Table-5), RNA, DNA 共に Grade-I 及び II よりもやや高い程度の値となり、各々平均 $2.41\text{mg/g}\cdot\text{wet}\cdot\text{weight}$, $1.45\text{mg/g}\cdot\text{wet}\cdot\text{weight}$, RNA/DNA 比1.95を示し、いずれも DBc-AMP 投与により非治療群との差を認め、高度に抑制された値を示したことは、極めて注目すべき事実であろう。

更に、アミノ酸構成の変化をみると (Table-4, Fig. -1, 2), Grade-IV で低下していた GABA は $1.14\mu\text{Mole/g}$ と明らかに増加、グリシン・アラニンは $1.61.1.66\mu\text{Mole/g}$ と各々ほぼ正常範囲迄減少しており、アミノ酸構成の面からも正常化への変換が想定された。

Heidrick ら¹⁰⁾は各種の腫瘍細胞の組織培養実験で DBc-AMP をそれらに作用させ、70~89%増殖抑制がみられた一方で、正常細胞は僅か13%しか抑制されなかったとして、正常細胞への影響は著しく弱いことを確認している。

Hsie ら¹³⁾は腫瘍性の線維芽細胞に DBc-AMP を作用させた所、正常な細胞と見分けがつかない形態となり、正常な増殖形態に戻ったことを見出している。

これら細胞の形態学的変化は DBc-AMP が腫瘍細胞を正常細胞の性格に近づける作用を有することを証明したが、著者のライソゾーム酵素を始めとする生化学的分析は、生体内でも確実にその作用が発揮されていることを明らかにしたものと考えられる。一般に glioblastoma multiforme は摘出術を行なった後において、半年前後には再発がしばしば観察されるが、臨床的に内頸動脈内持続動注を行い得た症例では、現在もなお再発無く経過している例が多々あることをみても、その治療効果の有意性が十分に示唆される。

しかし、一応症状の寛解は得られたものの、ライソゾーム酵素活性は未だ正常値の2~3倍の高値が維持しているのは、如何なる理由によるものなのであろうか。僅かな腫瘍組織で細胞分裂が残存している為のライソゾーム酵素活性の上昇なのか、或いはまた、今回のデータにみられた様に、遊離型活性と結合型活性の分布の相違に起因したものなのかは、不明である。又、腫瘍細胞でみられた10数倍の高活性を示すライソゾーム酵素の働きは、腫瘍細胞の分裂増殖の原因となっているのか、結果なのか。しかもこの現象が、細胞

内 cyclic-AMP 濃度に影響を与える DBc-AMP によって、明らかに抑制を受け、形態学的にも分裂・増殖が静止ないし停止することは、細胞内 cyclic-AMP 代謝とライソゾーム酵素との相関が、細胞分裂増殖の重要な因子であることに間違い無いものと推測される。

もし、腫瘍細胞内ライソゾーム酵素活性を正常レベルに保つことができるならば、腫瘍細胞の増殖は止まり、ひいては消滅乃至正常細胞化への可能性が引き起されるものと期待される。

この様な推論が正しいとするならば、今後は DBc-AMP を用いた臨床治療の方策が大いに検討されるべきであろう。

結 語

脳腫瘍の化学療法の基礎となる生化学的分析を、主としてグリオーマ細胞について、下記の各構成成分を検討した。またこれらの結果から、臨床的に Dibutyladenosine-3', 5'-cyclic monophosphate (DBc-AMP) の応用を試み、それによって得られた成績は以下の通りである。

1. 総蛋白質量は Astrocytoma で悪性度を増すに従い、その含有量は低下し、可溶性蛋白も全く同様の傾向を示した。

2. アミノ酸分画

正常脳組織に比較すると Grade-III, IV 共にアスパラギン酸、チスタチオニンの低下が特徴的であり、且つ Grade-IV ではグルタミン酸、GABA が著しく低下していた。

3. 核 酸

RNA は Grade-III, IV で正常に比し、約50%以上の増加を、DNA は6~7倍もの高値を示した。RNA/DNA ratio でみると、Grade-IV では1.23となり、DNA 含有量の増加を伴った RNA/DNA ratio の低下、というパターンを示した。

4. ライソゾーム酵素

Ac-P. も B-Glu. も共に悪性度が高くなるにつれ活性値が上昇し、両酵素とも活性変化が良く反映された。なお、細胞質中の free activity は各々その75%以上を占めた。

5. DBc-AMP 投与による変化

蛋白含有量は約30%の増加、核酸では、RNA, DNA, RNA/DNA ratio、いずれも低値を、アミノ酸分画では、いずれも正常脳組織に近似した値を各々示した。

ライソゾーム酵素は Ac-P. で約1/6に、B-Glu. で約1/8迄に活性が抑制された。

6. DBc-AMP の臨床効果

上記の成績から Ac-P. と B-Glu. が脳腫瘍で明瞭な活性を示し、組織変化の指標として用いることが可能と考えられた。また現在難治である Astrocytoma Grade-IV の患者に対し全身的投与を行ない、前述の Ac-P. と B-Glu. を指標として検索を行なった結果、グリオーマ細胞の分裂増殖を抑制していることが判明した。このことは、今後 DBc-AMP が脳腫瘍の治療に応用される可能性が高いことを示している。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師栗津三郎教授、並びに平野修助第2生理学教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、終始直接の御教示、御協力を頂戴した柴田家門講師に感謝すると共に多くの助言を頂いた串田良昌講師、第2外科教室員、および検体の一部を提供して頂いた静岡日赤病院脳神経外科、の諸先生方に厚く感謝致します。

なお本論文の要旨は第2回脳研究会 (1975年、福岡)、6th. Int. Congress of Neurological Surgery (1977. São Paulo, Brasil)、第36回日本脳神経外科学会総会 (1977年、大阪)、第37回日本脳神経外科学会総会 (1978年、熊本) に於て発表した。

参 考 文 献

- 1) Allen N : Beta-glucuronidase activities in tumors of the nervous system. *Neurology* **11** : 578-596, 1961.
- 2) Anderson PJ, Song SK : Acid phosphatase in the nervous system. *J Neuropath Exp Neurol* **21** : 263-283, 1962.
- 3) Burton K : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochemical J* **62** : 315-323, 1956.
- 4) Büttger HW, Scarlato G, et al : Über das Vorkommen und die Verteilung der alkalischen und sauren Phosphatase in Meningiomen. *Deutsche Zeitschrift f Nervenheilkunde* Bd 176, s. 67-76, 1957.
- 5) Cohen MM : Quantitation of phosphorus compounds in the normal and pathologic human brain. *J Neuropath Exper Neurol* **14** : 70-83, 1955.
- 6) Dische Z : In the Nucleic Acid, E. Chargatt and J.N. Davidson eds. I : 300, Academic Press 1955.
- 7) de Duve C, Pressman BC, et al : Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *Biochem J* **60** : 604-617, 1955.
- 8) Frattola L, Carenzi A, et al : Regulation of the Cyclic Guanosine 3', 5' -monophosphate system in human brain tumors. *Acta Neurol Scand* **54** : 382-390, 1976.
- 9) Gerhardt W, Clause J, et al : Changes of LDH-isoenzymes, esterases, acid-phosphatases and proteins in malignant and benign brain tumors. *Acta Neurol Scand* **39** : 85-111, 1963.
- 10) Heidrick ML and Ryan WL : Cyclic Nucleotides on Cell Growth in vitro. *Cancer Research* **30** : 376-378, 1970.
- 11) Heller IH and Elliott KAC : Desoxyribonucleic acid content and cell density in brain and human brain tumors. *Canad J Biochem Physiol* **32** : 584-592, 1954.
- 12) Hess HH, Embee LJ, et al : Biochemistry of normal astroglia and of virally and chemically induced astrocytomas grown subcutaneously. Second International Meeting of the International Society for Neurochemistry. (R. Paoletti Fumagalli R and Galli C) p. 42, Tambrini Milano. 1969.
- 13) Hsie AW and Puck TT : Morphological transformation of chinese hamster cells by dibutyladenosine cyclic 3', 5'- monophosphate and testosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **68** : 358-361, 1971.
- 14) Hutchinson WC, Munro HN, et al : The determination of nucleic acids in biological materials. *Analyst* **86** : 768-813, 1961.
- 15) Johnson GS, Friedman RM, et al : Restoration on several morphological characteristics of normal fibroblasts in sarcoma cells treated with adenosine-3',5'-cyclic monophosphate and its derivatives. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **68** : 425-429, 1971.
- 16) 神野哲夫, 中沢恒幸, 他 : Cyclic AMP と悪性神経腫瘍—第1報 Dibutyladenosine cyclic 3', 5'-monophosphate の悪性神経腫瘍細胞に及ぼす影響— *臨床神経* **12** : 584-595, 1972.
- 17) Kato K, Yoshida K, et al : Synthesis of P-nitrophenyl beta-D-glucopyranosiduronic acid and its utilization as a substrate for the assay of beta-glucuronidase activity. *Chem Pharmac Bull* **8** : 239-242, 1960.
- 18) 河島隆男, 中村正人, 他 : 脳腫瘍組織の酵素活性とその臨床所見との関連性. *脳と神経* **18** : 243-248, 1966.
- 19) Kernohan JW, Mabon RF, et al : A simplified classification of gliomas. *Proc Mayor Clin* **24** : 71-75, 1949.
- 20) King EJ and Armstrong AR : A convenient method for determining serum and bile phosphatase activity. *Canad Med Associ J* **31** :

- 376-381, 1934.
- 21) Kirsch WM, Leitner JW, et al : Energy metabolism of malignant tumors : chemotherapeutic implantations. In Second International Society for Neurochemistry, (Paoletti R. Fumagalli R and Galli C) p. 242, Tamburini editor, Milano 1969.
 - 22) Laird AK and Barton AD : Consistent biochemical pattern in malignant tumors. *Science* **124** : 32-34, 1956.
 - 23) Lantos PL : Fine structural localisation of acid phosphatase in neural tumours induced by N-ethyl-N-nitrosourea in rats. *Acta Neuropath. (Berl.)* **29** : 45-55, 1974.
 - 24) Lapham LW : Subdivision of glioblastoma multiforme on a cytologic and cytochemical basis. *J Neuropath Exp Neurol* **18** : 244-262, 1959.
 - 25) Lehrer GM : The quantitative histochemistry of human glial tumors. *Proc. IV International Congress of Neuropathology (H. Jacob) Vol. I*, p. 66, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1962.
 - 26) Lolova I, Ivanova A, et al : Histochemical investigation of nonspecific acid phosphatase in cerebral tumors. *J Neurosurg* **34** : 730-740, 1971.
 - 27) Lowry OH, Rosenbrough NJ, et al : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193** : 265-275, 1951.
 - 28) Mullan S : Essentials of neurosurgery for students and practioners. Springer Publishing Company, Inc. N.Y. 1961.
 - 29) Müller W and Nasu H : Fermenthistochemische Untersuchungen an Neurinomen. *Frankfurt Z. Path.* **70** : 417-422, 1960.
 - 30) 永井政勝, 寺岡 暉, 他 : Dibutyryl adenosine-3', 5' -cyclic monophosphate による悪性グリオーマ細胞の形態学的変化, *脳と神経* **25** : 295-306, 1973.
 - 31) 長澤貞継, 柴田家門, 他 : グリオーマ細胞とグリア細胞の生化学的分析. *脳研究会会誌* **2** : 94-95, 1976.
 - 32) Nasu H und Müller W : Enzymhistochemische Untersuchungen an Gliomen. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* **186** : 67-86, 1964.
 - 33) Nayyar SN : A study of phosphate, deoxyribonucleic acid and phospholipid fractions in neural tumors. *Neurology* **13** : 287-291, 1963.
 - 34) 野口鉄也, 須田治彦, 他 : 発育期ラット脳の DNA 代謝 —Hydrocortisone の及ぼす影響について— *神経化学* **13** : 190-193, 1974.
 - 35) Novikoff AB, Beaufay H, et al : Electron Microscopy of Lysosome-rich Fractions from Rat Liver. *J Biophysic and Biochem Cytol* **2** : 179-184, 1956.
 - 36) Paoletti P, Visca A, et al : Fatty acid composition of cerebral tissue and of certain human endocranial tumors. Analysis with gas-liquid chromatography. *Minerva Neurochir* **4** : 113-114, 1960.
 - 37) Rubinstein LJ and Sutton CH : Histochemical observation on oxidative enzyme activity in tumors of the nervous system. *J Neuropath Exper Neurol* **23** : 196-197, 1964.
 - 38) 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.
 - 39) Schmidt G and SJ Thannhauser : A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animals tissues. *J Biol Chem* **161** : 83-89, 1945.
 - 40) 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動態について. 第19回日本神経学会総会口演記録 332. 1978, 東京.
 - 41) Shibata I, Sato K, et al : Lysosomal enzymes and dibutyryl 3', 5'-adenosine monophosphate, Basic and clinical studies on lysosomal enzyme activities in glioma tissues and glial cells. *Neurologia Medico-chirurgica* **15** : 27-33, 1975.
 - 42) 植村慶一, 佐瀬厚子, 他 : モルモット脳の細胞核の酸性蛋白群について. *神経化学* **11** : 95-98, 1972.
 - 43) Weissmann G, Troll W, et al : Studies on lysosomes. X. Effects of tumor-promoting agents upon biological and artificial membrane systems. *Biochem Pharmacol* **17** : 2421-2434, 1968.
 - 44) Wender M and Waligóra Z : Der Gehalt an Aminosäuren der Eiweisskörper in Hirngeschwülsten. In IV Internationaler Kongress für Neuropathologie. (H Jacob) Vol 1, p. 131, Thieme Verlag, Stuttgart 1962.
 - 45) Wollemann M, Rubinstein LJ, et al : The aromatic esterase, cholinesterase, acid-phosphatase and lactate dehydrogenase activity of human brain tumors. In variation in chemical composition of the nervous system as determined by development by developmental and genetic factors. (GB Ansell) p. 114, Pergamon Press Oxford 1965.
 - 46) Wollemann M : Metabolisme des médiateurs Chimiques du système nerveux. pp 110-114, Masson et Cie, Paris, Akadémiai Kiadó, Budapest 1970.