

Lysosome 酵素の髄液内変動について

東邦大学第2外科学教室（指導：栗津三郎教授）

高 須 信 美

〔原稿受付：昭和52年11月1日〕

Studies on Lysosomal Enzyme in the Cerebrospinal Fluid

NOBUYOSHI TAKASU

Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University

(Director : prof. Dr. SABURO AWAZU)

The activity of the lysosomal enzymes in the cerebrospinal fluid can be hardly determined by colorimetry if they are not treated anyhow, and some treatment to condensate is required. The lysosomal enzymes are characteristically activated by freezing and thawing ; as utilizing the property, the cerebrospinal fluid was concentrated by vacuum freeze drying method and thus it could be subjected to colorimetric determination. The lysosomal enzymes gave very low values of the activity even after the above treatment, and in this experiment β -glucuronidase was selected and observed in head injury and brain tumor.

The experimental results were discussed as to (1) fluctuation in the injured brain, (2) fluctuation on the onset of various brain tumors, (3) the fluctuation on the value of the activity before and after surgical treatment or various combined therapies for the brain tumor, and (4) the fluctuation of the value of the activity accompanying the change of the pathogenic state in a case, as well as to compare with the values in internal carotid artery and internal juglar vein.

1. β -glucuronidase in the cerebrospinal fluid can be colorimetrically determined when the fluid is concentrated by vacuum freeze drying method.
2. β -glucuronidase in the cerebrospinal fluid of patients of head injury show the following fluctuation:
 - a) Cerebral concussion cases: the value is high in the acute stage after injured, but then abruptly decreases to return to the normal level.
 - b) Severe cases (Type III and IV of Araki): the value is high in the acute stage after injured, and remains at the level for 1 to 2 months.
3. The values of β -glucuronidase in internal carotid artery and internal juglar vein in

Key words: Lysosomal enzyme, Cerebrospinal fluid, Injured brain, Non operative therapy of the brain tumor.

Present address: Second Department of Surgery, School of Medicine, Toho University, Ota-ku, Tokyo, 143, Japan.

patients of head injury were not different.

4. The activity of β -glucuronidase in the cerebrospinal fluid of patients of brain tumor has a correlation with the activity in the tumor tissue.

5. The activity of β -glucuronidase in the cerebrospinal fluid of patients of brain tumor is high and has a correlation with malignancy of the tumor. It has, however, no correlation with the location of the tumor and the appearance of atypical cells in the cerebrospinal fluid.

6. The effect of operation + combined therapy on patients of brain tumor:

a) The activity of the enzyme is obviously inhibited by 20-50% by DBC-AMP therapy and ^{60}Co irradiation.

b) 20-30% inhibiting effect is obtained by Bleomycin therapy.

c) Various combined therapies obviously produce some inhibiting effects, but any of them can not decrease the value to a normal level.

The activity of β -glucuronidase in the cerebrospinal fluid reflects the intracranial pathological state, and its determination is significant in clinic, and can be utilized for diagnosis and evaluation of the prognosis.

I. 緒 言

中枢神経系組織と常に接している髄液は脳細胞のきわめて複雑な代謝を直接的または間接的に反映していると考えられ、古くから中枢神経系に関連する基礎および臨床の各分野で研究がすすめられ、臨床への応用、特に診断法への応用が試みられて来た。

細胞内小器官の1つとして、lysosomeが存在することは古くより報告があったが、lysosomeが注目されるようになったのはlysosome内に数10種のほろ酸性水解酵素が存在することが判明し、これらの酵素が細胞障害の際に活性化されて細胞の修復に働くと考えられるようになってからである。さらに、近年、細胞分裂の盛んな時期に一致してlysosome酵素の活性が高まっていることも報告されるようになった。その上、腫瘍細胞の異常な細胞増殖時に、腫瘍組織のlysosome酵素が高値を示すことも明らかとなって来た。

著者は種々の頭蓋内病態に伴う脳組織内lysosome酵素の変動に注目し、この酵素が髄液中に検出し得るものかどうか、検出された場合、本酵素が頭蓋内の病態を反映しているかどうか、この点を明らかにしようと考えた。ここでは β -glucuronidaseを対象とし、頭部外傷および脳腫瘍の2疾患をとりあげ検討を行った。

II. 実験材料および方法

1) 実験材料

controlとして頭蓋内病変を有しないヒトの腰椎麻酔時に得られた3例の髄液を用いた。頭部外傷例は脳細胞損傷の軽微なもの、および著明であろうと予測される2群に大別した。すなわち臨床的に広く用いられている荒木の分類に従いI、II型の軽症群と、III、IV型の重症群に分け、腰椎穿刺で採取した87例の髄液を用いた。この際、重症群にみられる血性およびキサントクロミーを呈した髄液は血液中のlysosome酵素の影響を考慮し除外した。

脳腫瘍例は52例で術前腰椎穿刺で得られた髄液、または、術中脳室穿刺で得られた髄液を用いた。

2) 髄液の濃縮処理

髄液は1検体3mlで腰椎穿刺などの検査の際に採取する一部を用い、採取後出来るだけ速やかに正確に3mlを測定し、小三角フラスコに分注し、パラフィルムで密封後フリーザーで凍結保存する。この凍結保存した20~30検体を一度に真空凍結乾燥機を用いて濃縮する。この処理には約12時間要し、乾燥処理した検体は測定するまでフリーザー内に密封のまま保存する。

3) β -glucuronidase 測定方法

Fishman¹²⁾ および加藤の変法¹⁷⁾ で測定した。極東

B-G テスト試薬を用い、基質として phenolphthalein-nitrophenyl- β -glucuronide を使用した。凍結乾燥処理した髄液は 0.2M 酸性緩衝液（酢酸-酢酸ナトリウム溶液）0.8ml (P.H. 4.5) で再抽出し、基質溶液を 0.1ml 加え、小三角フラスコ内で 37°C 恒温水槽中 4 時間反応させる。その後、0.4M のアルカリ性緩衝液（グリシン溶液）2ml (PH. 10.45) をを加え発色させ、10 分間室温に放置後蒸留水 3ml を加え、3000r.p.m. 15 分間遠沈後その上清を光電比色計で 400m μ フィルターで吸光度を測定した。酢酸緩衝液、アルカリ溶液に蒸留水を加えたものをブランクとした。標準液は phenolphthalein-nitrophenol を使用し、測定値は遊離の phenolphthalein-nitrophenol の $\mu\text{g/ml} \cdot \text{CSF/hr}$ で表現した。血清は 0.1 ml 使用し、室温にもどし酢酸緩衝液 0.35 ml、基質溶液 0.05 ml を加え、37°C の恒温水槽中で 4 時間加温したのち、アルカリ試薬 1.0 ml を加え、10 分間放置後蒸留水 3.0 ml 加え、髄液と同様に比色定量した。

Ⅲ. 結 果

実験成績は 1) 損傷脳に関する変化, 2) 各種脳腫瘍発生時の変化, および 3) 脳腫瘍に対する外科的療法あるいは各種補助療法前後の活性値変動, および 4) 1 症例の病態変化に伴う活性値変動の 4 項に分けて検討すると共に, 内頸動静脈血中の値をも比較検討した。

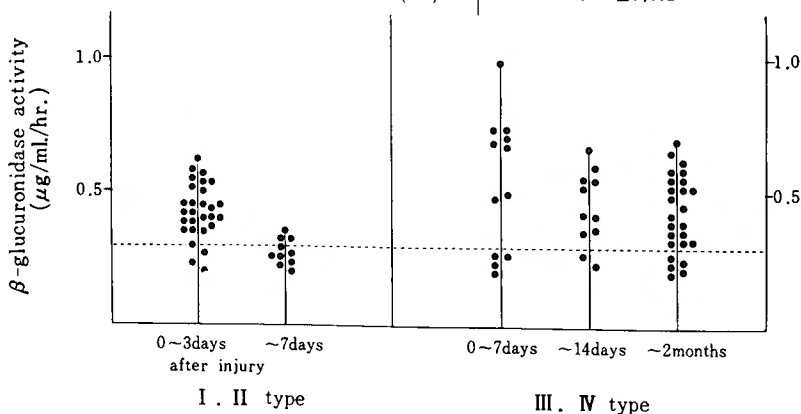
まず control として用いた頭蓋内病変のない3症例の髄液の β -glucuronidase を前記の方法で測定し、 $0.314 \pm 0.002 \mu\text{g/ml} \cdot \text{CSF/hr}$ の平均値を得た。

1) 頭部外傷

軽症群と重症群 2 群の髄液および血清の β -glucuronidase を経時的に測定した。まず軽症群の髄液を (i) 受傷後～3 病日 (28 例), (ii) 4～7 病日 (10 例) に分け測定した。受傷直後より 3 病日までの平均値は $0.42 \mu\text{g/ml} \cdot \text{CSF/hr}$ と control に比し, 35% の活性値増加を示し, 4～7 病日では $0.29 \mu\text{g/ml} \cdot \text{CSF/hr}$ と正

Fig. 1 β -Glucuronidase Activities in CSF on Head Injury

Conditions		Activity ($\mu\text{g/ml./hr.}$)
I. II type	0~ 3days (28)	0.25~0.61 *
		0.42 **
	~ 7days (10)	0.21~0.36 0.29
III. IV type	0~ 7days (12)	0.24~0.98 0.52
	~ 14days (11)	0.25~0.68 0.47
	~ 2months (25)	0.25~0.71 0.44
	Controls (3)	0.314 $\pm$ 0.002 ***



* minimum-maximum value
** mean value
*** mean $\pm$ S.D.

常値まで低下した (Fig. 1). 重症群は術前および3病日以内に採取した症例は少なかったので, (i) 受傷直後~7病日 (12例), (ii) 8~14病日 (11例), (iii) 15病日~2ヶ月 (25例) に分け測定した. 7病日までの値は $0.52\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と control に比し, 65%の活性増加を示し, 8~14病日では $0.47\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/$

hr となお control に比し, 50%の増加を示し, 2ヶ月までは $0.44\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と徐々に下降の傾向はあるがなお control に比し, 40%の活性値増加が認められた (Fig. 1). さらに重症群4例を2ヶ月以内に軽快治癒した群 (A および B 例) と遷延性昏睡群 (C および D 例) に分けて経時的变化を追求した. 軽快治癒

Fig. 2 β -Glucuronidase activity in CSF and Serum on severe head injury

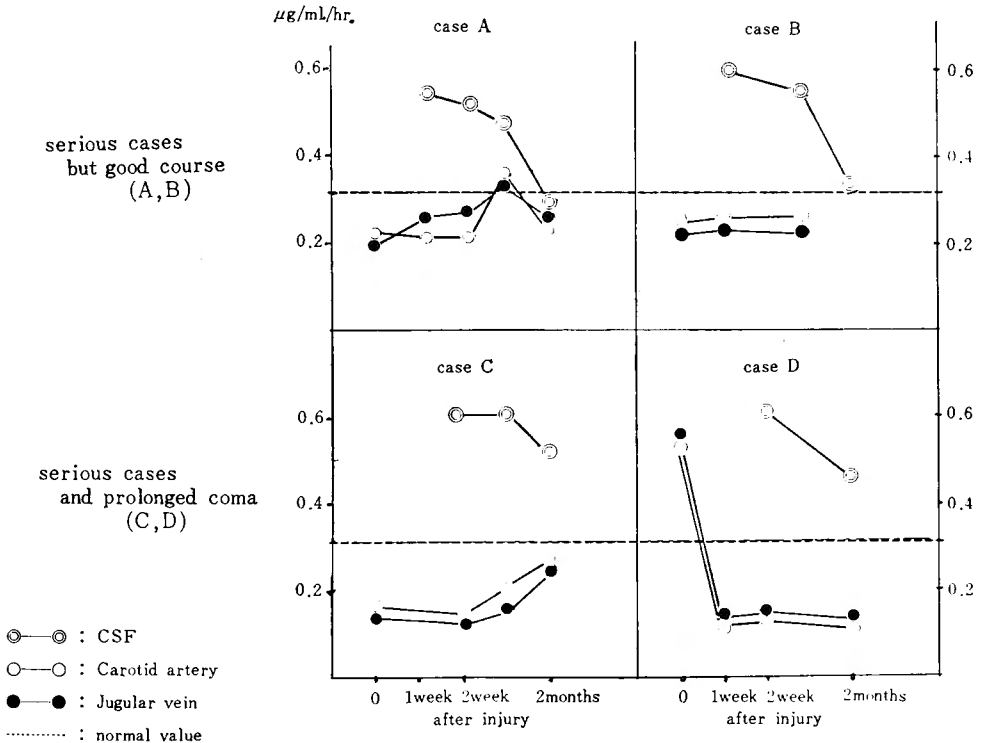


Table 1. β -Glucuronidase activities in serum on head injury

Conditions		Activity ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{hr.}$)	
		Vein	Artery
I. II type	0-7 days (5)	16.3-30.0 19.5*	11.9-38.3 20.3*
	-14 days (5)	12.3-18.5 17.3*	15.1-21.0 18.3*
III IV type	0-7 days (28)	12.3-44.1 27.1*	12.5-43.0 27.3*
	-3 weeks (16)	13.7-31.3 22.2*	14.1-29.7 21.1*
	-2 months (17)	11.7-35.3 22.6*	12.1-40.8 21.7*

* mean value

Table 2. β -Glucuronidase activities in CSF on brain tumor

Tumor		Activity ($\mu\text{g}/\text{ml}/\text{hr.}$)	
astrocytoma grade I-II	13*	0.09-0.77**	(0.38)***
astrocytoma grade III-IV	12	0.39-1.24	(0.56)
pontine glioma	3	0.38, 0.67, 0.84	
hemangioblastoma	4	0.44-0.78	(0.59)
pinealoma	3	0.28, 0.35, 0.47	
ependymoma	3	0.33, 0.47, 0.70	
pituitary adenoma	2	0.52, 1.30	
meningioma	7	0.11-0.60	(0.34)
acoustic neurinoma	2	0.47, 0.50	
metastatic			
carcinoma of rectum	2	0.24, 0.28	
carcinoma of stomach	2	0.30, 0.60	
carcinoma of lung	1	0.76	
controls	3	0.314 $\pm$ 0.002****	

* case number

** minimum-maximum value

*** mean value

**** mean value $\pm$ S. D.

群では急性期に control に比し、約80%の活性増加を示したが、臨床症状の改善と平行して低下し、2ヶ月後には正常値を示した。一方、遷延性昏睡群では急性期に control に比し、約2倍の活性値増加を示し、2ヶ月経過してもその活性値は高く正常域には復帰しなかった (Fig. 2)。

次に内頸動脈血中の β -glucuronidase の活性値をみると、軽症群では受傷後1週以内の活性値が高いが2週迄に低下している。しかし、内頸動脈血間には差は認められなかった (Table I)。また、高血圧性脳出血5例についてその内頸動脈血および股動脈血、肘静脈血中の β -glucuronidase を測定比較してみたが、四者間には有意の差は認めなかった。

2) 脳腫瘍

次に各種脳腫瘍患者54例について、髄液中の β -glucuronidase 測定結果を Table 2 に示す。脳腫瘍患者の全例に酵素活性上昇を認め、astrocytoma では grade I, II の活性値は $0.38\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と22%の増加を示し、grade III, IV では $0.56\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と82%の増加を示し、腫瘍の悪性度と相関が認められた。ependymoma の3例は0.33, 0.47, $0.70\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ であった。pontine glioma 3例は0.38, 0.67, $0.84\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と2例が高値を、1例が軽度の増加を示した。hemangioblastoma 4例の平

均値は $0.59\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と88%の増加を示し、metastatic tumor では肺癌転移の1症例に高値をみた。pituitary adenoma の $1.30\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と高活性を示した症例は2年前亜全摘手術を受け再発したものである。一方、良性脳腫瘍例では meningioma が平均 $0.34\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と control に比しわずかに高い値であったが、acoustic neurinoma では0.47, $0.50\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と中等度上昇が認められた。

3) 脳腫瘍例における各種補助療法前後の髄液中の β -glucuronidase 測定結果

脳腫瘍術後の各種補助療法を行った症例の髄液中の β -glucuronidase を測定した。

(i) Dibutyryl 3',5'-Adenosine Monophosphate (DBC-AMP) 投与例

いずれも試験開頭、または部分摘出を行った9例の glioma の術後、DBC-AMP を $2\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ を持続動注または経静脈的に10日間を1クールとして投与した。結果は Table 3 に示すごとく投与前後をみると投与前 $0.50\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ 以上であったものは平均46%の減少率を示し、投与前それ以下であったものは平均8%の減少をみるにすぎなかった。

(ii) Bleomycin 投与例

亜全摘出した astrocytoma grade II 1例、試験開頭に終わった pontine glioma 1例、全摘および亜全摘出

Table 3. Effect of DBC-AMP on lysosomal enzyme in CSF

Conditions	β -glucuronidase activity ($\mu\text{g}/\text{ml}.\text{hr}.$)	
	DBC-AMP before admin.	DBC-AMP after admin.
astrocytoma grade II (1)	0.87	0.42
	1.24	0.67
	0.82	0.49
	0.47	0.43
astrocytoma grade III, IV (8)	0.47	0.42
	0.47	0.41
	0.43	0.22
	0.42	0.41
	0.39	0.54

Table 4. Effect of Bleomycin on lysosomal enzyme in CSF

Conditions	β -glucuronidase activity ($\mu\text{g}/\text{ml}.\text{hr}.$)	
	before administration	after administration
astrocytoma grade II (1)	0.53	0.41
pontine glioma (1)	0.36	0.44
meningioma (2)	0.70	0.53
	0.58	0.36

Table 5. Effect of ^{60}Co irradiation on lysosomal enzyme in CSF

Conditions	β -glucuronidase activity ($\mu\text{g}/\text{ml}.\text{hr}.$)	
	before radiation	after radiation
glioblastoma multiforme (1)	0.67	0.53 (4000 rad) 0.35 (6000 rad)
ependymoma (1)	0.47	0.48 (4000 rad)
pinealoma (1)	0.35	0.38 (5400 rad)
pituitary adenoma (1)	1.31	0.41 (4000 rad)

Table 6. Effect of BAR-therapy on lysosomal enzyme in CSF

Conditions	β -glucuronidase activity ($\mu\text{g}/\text{ml}.\text{hr}.$)	
	before BAR therapy	after BAR therapy
astrocytoma grade II (2)	0.45	0.43
	0.59	0.36
astrocytoma grade III (2)	0.43	0.43
	0.49	0.46

Table 7. Effect of DBC-AMP and ^{60}Co irradiation therapy on lysosomal enzyme in CSF

Conditions	β -glucuronidase activity ($\mu\text{g}/\text{ml}.\text{hr}.$)		
	DBC-AMP before admin.	DBC-AMP after admin.	irradiation after ^{60}Co
astrocytoma grade III, IV (4)	1.24	0.67	0.53
	0.82	0.49	0.45
	0.47	0.41	0.40
	0.42	0.41	0.42

した convexity, parasagittal meningioma の2例に Bleomycin を 0.3 mg/kg, 隔日経静脈的に20回投与した. 投与後も活性値が増加した pontine glioma の1例を除けば約28%の減少率を示した (Table 4).

(iii) ^{60}Co 単純照射例

部分摘出した glioblastoma multiforme 1例, 第4脳室 ependymoma (亜全摘) 1例, pinealoma (亜全摘) 1例, pituitary adenoma (亜全摘) 1例にそれぞれ 4000~6000rad 照射した. pituitary adenoma の症例では 4000rad 照射後21%の減少を示し, 6000rad 照射後には48%の活性値減少を示した. 照射前0.47, 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ であった ependymoma, pinealoma の症例では活性値変動はみられなかった (Table 5).

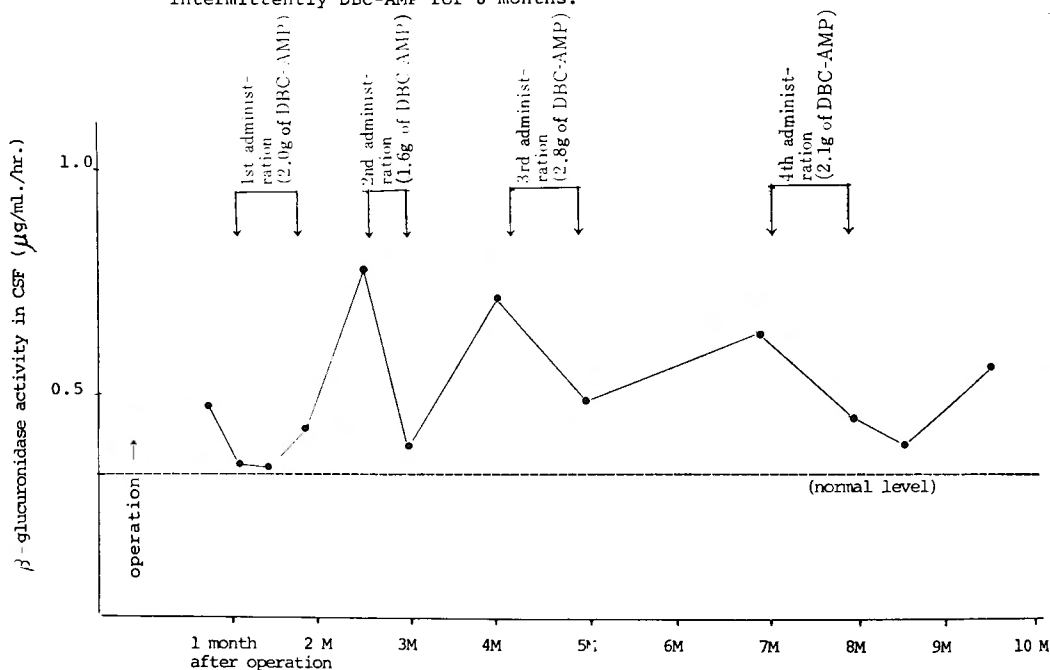
(iv) BAR 療法例

astrocytoma grade II, III の4例(いずれも部分摘出)に行い, BudR (ラジバット) 500mg/day を持続動注した. 出来るだけ長期間続けるが, カニューレージョンチューブの自然抜去や閉塞などの症例があったため動注期間は平均して2週間であった. 動注開始3日後より ^{60}Co 照射開始し, それぞれ total 6000rad 照射した. 照射前活性値が 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ 以下の症例は BAR 療法後も殆んど変動を認めなかった. しかし, astrocytoma grade II の1例では BAR 療法前 0.59 $\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ が療法後 0.36 $\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ と40%活性値が低下した (Table 6).

(v) DBC-AMP と ^{60}Co 照射の併用療法例

試験開頭, または部分摘出を行った後, DBC-AMP を投与し, 更に ^{60}Co 照射した astrocytoma grade III, IV 4例について検討した. DBC-AMP 投与前 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ 以上の2例は投与後45%の活性値低下をみ, 更に ^{60}Co 照射後に12%に減少した. しかし, DBC-AMP 投与前に 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{CSF}/\text{hr}$ 以下であった2例においてはあまり変動は認められなかった (Table 7).

Fig. 3. A case of glioblastoma multiforme, 47 years old man was administrated intermittently DBC-AMP for 8 months.



4) 症 例

次に glioblastoma multiforme 術後に DBC-AMP を総計 4 クール投与し、髄液中 β -glucuronidase 活性に興味ある変動を示した症例 (Fig. 3) を挙げる。症例は 47 才男性で両側前頭葉 glioblastoma multiforme で部分摘出し、両側前頭骨を除去し外減圧を行った。1 ヶ月後に第 1 回 DBC-AMP を両側内頸動脈カニューレーションを行ない、2mg/kg/day 20 回注入した。第 2 回以後は経静脈的に DBC-AMP 2mg/kg/day 投与した。第 1 回投与終了後 3 週より 16 回の全身投与を行い、その後 30 日間の間隔をおいて第 3 回目には 28 回、更に 2 ヶ月後に第 4 回目 21 回の投与を行った。投与前後に髄液中 β -glucuronidase を測定した。第 1 回より第 4 回まで投与前後の活性値の変動を比較すると、第 1 回 0.47 $\mu\text{g/ml} \cdot \text{CSF/hr.}$ → 0.42, 第 2 回 0.78 → 0.36, 第 3 回 0.71 → 0.48, 第 4 回 0.63 → 0.43 と投与後には著明に活性値低下をみたが 3 週 ~ 2 ヶ月後には再び上昇し、再投与により下降するという DBC-AMP により酵素活性が明らかに抑制される事実が判明したが、いずれも正常値までには至らなかった。手術時骨片を除去しておいたので、腫瘍の一部は頭皮上より触知可能

であり、脳スキャン、血管撮影などで経過を追ってみると DBC-AMP 投与後では明らかな腫瘍の減少および自覚症状の軽減が認められ著効を示した。更に、髄液中の細胞診を毎回行ったが異型細胞の出現と活性値変動には相関は認められなかった。

Ⅳ. 考 察

髄液中の lysosome 酵素の活性はきわめて弱く通常の方法では殆んど測定不可能である。Allen³⁾や Tóth⁴⁾らは microcuvett を使って未処理のままの髄液を microbiochemical に測定した。しかし、この方法には測定技術上の問題と、得られた値の確実性が問題となる。著者はこの点を解決するために真空凍結乾燥法を用いて lysosome 酵素の測定を行った。現在までのところ髄液を濃縮させ測定した報告はない。濃縮法には透析濃縮法¹¹⁾³⁸⁾、限外圧過法¹⁰⁾¹¹⁾¹⁹⁾、凍結乾燥法⁹⁾などの方法があるが、前 2 者は大量の試料が必要であり、臨床には適さない。真空凍結乾燥法による濃縮の利点は、1) 髄液を希望の濃縮倍率にすることが可能である。2) lysosome 酵素はこの操作中、凍結処理することにより活性化を計ることが出来る特徴がある。

lysosome 以外の酵素の場合には凍結乾燥すると酵素活性を失活させるので不適当な場合が多く、今迄は、蛋白含有量の定量などに利用されていたのみであった。しかし、本酵素は濃縮と同時に完全に活性化することが出来るので、はじめて簡便に比色定量することが可能となったのである。なお、測定方法の詳細は既に報告した⁴⁰⁾。測定方法で Allen らは³⁾は基質液に phenolphthalein- β -monoglucuronide を使用したが、著者らは phenolphthalein nitrophenyl- β -glucuronide を使用し、反応時間の短縮および安定化を計った。

1955年 de Duve⁸⁾により提唱された lysosome の生化学的ならびに形態学的な性質が徐々に明らかになり、細胞の修復、融解および細胞分裂における lysosome の役割が重要視されてきた。即ち、本酵素は別名“repairing enzyme”と呼ばれる如く、障害を受けた細胞の修復に働き、また、強度な障害のために修復不可能な細胞に対しては自己消化の作用を有することが知られている²⁷⁾⁴²⁾。Allison⁵⁾は細胞分裂時に lysosome が関与していることを形態学的、化学的に報告し、野口ら²⁵⁾は脳組織の發育過程における研究、特に小脳組織で神経細胞やグリア細胞の細胞分裂に伴って lysosome 酵素、特に acid-DNase が変動することを報告している。さらに Fishman¹³⁾、Monis²⁰⁾により悪性腫瘍組織中の β -glucuronidase が活性化されていることが報告されて、脳腫瘍組織中においてもある種の腫瘍は高い活性を示すことが報告されている¹⁾⁴⁾⁶⁾¹⁸⁾²³⁾³⁴⁾。また、佐藤³⁰⁾により損傷脳の修復に関する lysosome 酵素についての詳細な報告があり、ラッテ脳切截による損傷脳組織中の lysosome を経時的に測定し、術直後より酵素活性値は上昇し、第5病日が peak となり、その後徐々に下降し、1~2ヶ月後には正常に復すると報告している。脳組織が損傷を受けると、出血、浮腫など脳特有の一連の急性変化を生じ、次いで glia 細胞の反応性分裂増殖を起こし、障害部位の修復がなされ、ほぼ1ヶ月後には gliosis といわれる形態が形成されることは古くから知られている。中野²⁴⁾、柴田³⁵⁾らは実験的に外傷脳を作製し、脳組織が修復されてくる過程の細胞レベルでの変化を生化学的および形態学的に詳細に報告した。外傷脳組織に起る急性障害期のこのような変化は、生体の homeostasis mechanism より考えても、細胞レベルで lysosome 酵素が活性化されて、細胞の修復に働いていることは充分推察出来ることである。この外傷脳組織内 lysosome 酵素に関する研究結果は、すでに報告した³²⁾

³⁶⁾⁴⁰⁾。障害を受けた直後より lysosome 酵素は著明に活性化され、グリア細胞の分裂増殖の最盛期と重なる5日目頃に活性 peak をむかえ、以後下降して gliosis 形成期に入る頃には、再び正常値にもどる経過をとる。そこでこうした外傷時に引き起される一連の頭蓋内病態変動が髄液中にはどの様に反映されているかが問題となる。臨床的に直接的な頭蓋内変化を知り得る材料である髄液を対照とし、頭部外傷と脳腫瘍の2疾患における髄液中の lysosome 酵素変動および脳組織との相関性をも検討した。

1) 頭部外傷時の髄液中 β -glucuronidase activity について

著者は頭部外傷を軽症群と重症群に分けて検討した。軽症群では入院期間が短いため、経時的に髄液を採取し得た例は少ない。一方、重症例ではその急性期に髄液を採取することは容易ではなく且つ危険も伴なう。この点充分注意し慎重に採取した。血性のものや xanthochromic なものも除外した。全ての試料に蛋白量、細胞数の測定を行ったがそれらと β -glucuronidase 活性値に相関は認められなかった³¹⁾。軽症群では、受傷後より3病日までの期間に活性値が正常より約35%増加を示し、1週間後では正常に復していた。これは軽症例でも多少なりとも浮腫、出血などに基づく細胞障害が起っていると考えられる。重症群では1週までの急性期には約65%の増加を示し、このうち、軽快治療群では2ヶ月後には正常に復した。これは佐藤³⁰⁾が報告した損傷脳の組織中における lysosome 酵素の変動と類似し、髄液は充分頭蓋内病態を反映しているものと考えられる。lysosome 酵素は障害の程度に応じて activate されて、修復に働くと考えられるので受傷後少くとも2~3日目までは活性値の上昇がみられると考えられる。しかも、repairing enzyme としての機能は、その目的をはたすと、再び resting stage にもどり、正常に復するため、軽症例では受傷後7日目にはほぼ正常値へ復帰がみられたと考えられる。これに対し重症例では7日目でも軽症例よりも活性値は高く、頭蓋内変化は流動的であり、未だ repairing enzyme が活発に働いていることが十分にうかがえる。臨床的にも軽快して日常生活にもどれた2ヶ月目頃には、活性化された lysosome 酵素も正常化へと動いたことは、脳組織との相関性を充分裏づける1つのデータとも考えられる。しかし、重症例のうち、臨床上に遷延性昏睡群と分類した症例についてみると、受傷後より髄液中の lysosome 酵素は高値が持続し、数ヶ月を

ても正常値の2～3倍の活性を示し、臨床的にも「いわゆる植物状態」にあるものが多い。このことが、頭蓋内組織の障害程度のみによるものなのか、あるいは repairing mechanism の遷延だけではない別の要因による活性化なのかは未だ不明である。しかし、臨床的に遷延性昏睡例では髄液中の本酵素が正常化しないことは、予後判定のデータとしてきわめて重要な所見と考えられる。

一方、内頸動静脈血中の lysosome 酵素の値を内頸動静脈および股動脈、肘静脈との間に有意な差は認められなかったことは、少くとも内頸静脈が頭蓋内酵素変動を直接的に反映しているものではないと考えられた。さらに、脳障害の程度との関連および経時的变化をみたが、血清 β -glucuronidase は直接頭蓋内病態との相関を示さなかった。このことは脳以外の全身的要素にその起源を求めるべきであろう。

2) 脳腫瘍の髄液中 β -glucuronidase activity について

脳腫瘍54例の髄液中の β -glucuronidase 活性値 (Table 2) を表現するために上段に最高値～最低値だけを記し、下段に平均値を示した。これは未だ症例数が少ないことと、活性値にも幅が認められたためであるが正常に比し一様に高活性を示した。特に astrocytoma grade III, IV, pontine glioma, hemangioblastoma に顕著であった。glioma では悪性度が進むにつれて活性値上昇が認められ、meningioma の様な benign tumor ではその上昇はごく軽微であった。

脳腫瘍組織中の lysosome 酵素活性は Allen⁴⁾ Allison⁵⁾⁶⁾, Kent¹⁸⁾, 長沢²³⁾ らの報告があるが、髄液で測定したのは Anlyan と Starr⁷⁾, Tóth⁴¹⁾ や Allen³⁾ らのみである。著者は髄液を凍結させることにより本酵素を全活性させ測定し、脳腫瘍例で一様に高活性を示した。これは上記諸家の報告と一致する。さらに特徴的なことは、組織中の測定データと相関し、悪性度の高いものほど高活性を示したことである。Adames²⁾の再生肝を用いた実験で再生時の lysosome 酵素の変動を経時的に追求し、その bound activity は DNA 合成前期より上昇し、後期より減少し、分裂時に一致して最も減少し、この時 free activity の bound activity に対する比が増加していたと云っている。また、柴田³³⁾も脳腫瘍組織中において同様の事実を報告している。これは細胞分裂時の本酵素の活性化を示したものであり、それも遊離された状態で活動していることを示している。すなわち、lysosome 酵素が細胞分

裂と深い関係にあることを示唆している。

Anlyan と Starr⁷⁾ は glioblastoma multiforme の髄液で lysosome 酵素が著明な活性増加を示したと報告し、さらに、その活性化の由来を necrosis におち入り易い腫瘍細胞自身に求め、この細胞が死滅崩壊した時に酵素が髄液中に遊離し高活性を示すと説明している。一方、Allen³⁾は腫瘍の種類にはあまり関係なく、腫瘍が髄腔に接しているものほど活性値が高いと報告している。著者の症例では術中脳室より採取した脳室に露出していた ependymoma の症例の活性値は比較的軽度であり、腫瘍の占拠部位との相関性は必ずしも認められなく、Allen³⁾の報告とは異っていた。さらに、髄液の細胞診を行ない、異型細胞出現の有無との相関を求めたが、特別の関連はみられなかった。これらに関してはさらに症例を重ね充分検討されねばならない問題と考える。

3) 脳腫瘍症例の各種補助療法前後の髄液中 β -glucuronidase activity の変動について

次に外科的療法の限界にある脳腫瘍の治療に各種補助療法が研究されている。1957年 Sutherland²⁹⁾³⁹⁾によって発見された cyclic AMP は1968年ごろより悪性腫瘍への応用が試みられ¹⁴⁾¹⁵⁾、中でも最近 DBC-AMP が悪性グリオーマ細胞の分裂、増殖に対して抑制効果を示し、未分化細胞をより分化した細胞へと変化させる効果を有すると報告されている¹⁶⁾²¹⁾²⁶⁾。著者らは glioma 症例における DBC-AMP 投与前後の組織像の変化及び組織中の lysosome 酵素を測定し、すでに報告³⁴⁾³⁷⁾したが、tumor tissue が DBC-AMP 投与により分化細胞へと組織像が変化し、tumor cell の核数の減少、細胞質の膨化、microcyst の形成が認められ、組織中の lysosome 酵素活性は DBC-AMP 投与により著明な低下を認めた。著者はこのシリーズで9例の glioma に DBC-AMP を投与し、髄液中において平均30%の β -glucuronidase 活性低下を示し、明らかに臨床にも症状の改善が認められた。特に Fig. 3 の症例では著効を示し、1年経過した現在でも有意な社会生活を送っており、経時的に採取した髄液中の β -glucuronidase 活性値の低下がみられた。この様な事実から本酵素の活性値の測定は少くとも頭蓋内病変の治療効果判定に有用であると考えられる。また、プレオマイシン投与でも髄液中の β -glucuronidase の活性値は平均20%低下し、その有効性が示された。コバルト照射では平均42%の本酵素の活性値低下を示したことは補助療法として優れていると云える。化学療法と

放射線療法の併用について佐野²⁹⁾、永井²²⁾らは BAR 療法が比較的良性的 glioma に対しては極めて良好な成績をおさめたが、高度に悪性のものではその効果が低いことから2週間の DBC-AMP の投与で可能な範囲で悪性 glioma を良性化して BAR にてたたくという方法をとっている。著者らもこの方法を悪性度の強い glioma 4 例に行い、腫瘍の縮小および延命に有効であった。しかしこれらの各種補助療法前に髄液中 β -glucuronidase 活性値が $0.49\mu\text{g/ml} \cdot \text{CSF/hr}$ 以下と軽度上昇を示す群では、各種補助療法後にも活性値変動は殆んどみられなかった。

以上の様に lysosome の1つである β -glucuronidase と脳疾患との相関を調べたが、手術後の補助療法により、臨床症状の改善と共に、髄液中の β -glucuronidase 活性値が著明に影響を受けて正常化へと近づく傾向を示した事は髄液中の β -glucuronidase 測定が治療効果判定に充分有効であることを示すものであろう。しかし、今回最長10ヶ月の経時的観察の中では殆んど全症例に酵素活性は完全には正常値まで復帰するにはいたらず、正常の約2倍値を維持し、それ以後は他の補助療法を併用してもあまり変化を認めなかった。この事は脳腫瘍の性質上、完全な全摘出が可能な例が少ないためかまたは他の原因によるものなのか不明である。しかしここで問題となるのは、髄液中の enzyme activity が total activity としてみなければ測定出来ない点であり、腫瘍組織では free activity が total activity の80%以上を示していたが、髄液中では free activity がどの様に動いているかが現在の方法では不明である点である。

いずれにせよ、細胞分裂に際して活性化される lysosome 酵素、特に β -glucuronidase が glioma では著明な高値を持続するのに対し、gliosis 組織では glia の増殖にも拘わらず、増殖期を過ぎて完成期に至ると活性値は正常化すると云う同一酵素での相異なる現象はどの様に考えるべきなのであろうか。1つには腫瘍細胞分裂と正常細胞分裂における lysosome 酵素の関与する機序と活性化が起こる細胞レベルでの誘因に違いが存在するとも考えられる。また、腫瘍細胞と正常細胞では lysosome 酵素の存在様式が本来異なっている可能性もあり、未だ不明な点が多く残されている。これらの解明が脳腫瘍の非観血的治療への大きな突破口になることを期待している。

V 結 論

1. 通常の方法ではなかなか困難であった β -glucuronidase は髄液真空凍結乾燥法による濃縮処理を行うと比色定量が可能である。

2. 頭部外傷患者の髄液中の β -glucuronidase 活性は

a). 軽症群(荒木の分類 I, II型)では受傷後急性期は高値を示すが、急激に下降し、正常値にもどる。

b). 重症群(III, IV型)では受傷後急性期は高値を示し、1~2ヶ月間持続する。

3. 頭部外傷患者の内頸動静脈中の β -glucuronidase 活性は動脈血と静脈血間に差は認められない。

4. 脳腫瘍患者髄液中の β -glucuronidase 活性値と腫瘍組織の活性値との間に正の相関を認めた。

5. 脳腫瘍患者の髄液中の β -glucuronidase 活性は高値を示し、腫瘍の悪性度と相関が認められた。しかし、腫瘍の占拠部位および髄液中の異型細胞出現の有無との相関は認めなかった。

6. 脳腫瘍患者の手術+補助療法による効果

a). DBC-AMP 療法, ^{60}Co 照射にて明らかに酵素活性は40~50%の抑制効果を示す。

b). プレオマイシン療法では20~30%の抑制効果を示す。

c). 各種の補助療法により、明らかに抑制効果を認めるが、いずれも正常値になるまで引き下げる効果は認められない。

以上髄液中の β -glucuronidase 活性は頭蓋内の病態を反映しているものと考えられ、その測定は臨床的に意義が深く、診断、予後判定に充分応用され得るものである。

本論文の要旨は、第33回日本脳神経外科学会総会(1974年仙台)、第34回日本脳神経外科学会総会(1975年名古屋)、第35回日本脳神経外科学会総会(1976年前橋)で発表した。

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、吉井信夫助教授並びに第2生理学教室平野修助教授に深甚なる謝意を表わすと共に、本研究について終始御協力、御鞭撻を頂いた柴田家門博士に深謝し、併せて種々御協力下さった第2外科、脳神経外科学教室各位に厚く感謝いたします。

文 献

1) 阿部弘, Allen N, 他: Nitrosamine 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) Adames RL : Periodic activation of lysosomal enzymes during regeneration of the liver. *Biochem J* **87** : 532-536, 1963.
- 3) Allen N and Reagan E : β -glucuronidase activities in cerebrospinal fluid. *Archives of Neurology* **11** : 144-154, 1964.
- 4) Allen N : Beta-glucuronidase activities in tumors of nervous system. *Neurology (Minneapolis)* **11** : 578-596, 1961.
- 5) Allison AC : Lysosomes and diseases. *Scientific American* **217** : 62-72, 1967.
- 6) Allison AC and Mallucci L : Lysosomes in dividing cells, with special reference to lymphocytes. *Lancet* **2** : 1371-1373, 1964.
- 7) Anlyan AJ and Starr A : β -glucuronidase activity of spinal and ventricular fluids in humans. *Cancer* **5** : 578-580, 1952.
- 8) de Duve C, Pressman BC et al : Tissue fractionation studies, intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J* **60** : 604-617, 1955.
- 9) Eaton JC and Gardner MD : Separation of cerebrospinal fluid proteins by paper electrophoresis. *Biochem J* **52** : XXV-XXVI, 1953.
- 10) Esser H and Heinzler F : Eine Methode zur Gewinnung der Proteine aus Liquor cerebrospinalis und anderen schwach eieisshaltigen Lösungen durch Filtration mit Überdruck für die Elektrophorese in Filterpapier. *Klin Wochenschr* **30** : 159-161, 1953.
- 11) Ewerheck H : Die Elektrophoretische Darstellung Normalen Menschlichen Liquors. *Klin Wochenschr* **28** : 692-693, 1950.
- 12) Fishman WH, Springer B et al : Application of an improved glucuronidase assay method to the study of human blood β -glucuronidase. *J Biol Chem* **173** : 449-456, 1948.
- 13) Fishman WH and Anlyan AJ : Comparison of β -glucuronidase activity of normal, tumor, and lymph node tissues of surgical patients. *Science* **106** : 66-67, 1947.
- 14) Gericke D and Chandra P : Inhibition of tumor growth by nucleoside cyclic 3',5'-monophosphates, Hoppe-Seyler's Z. *Physiol Chem* **350** : 1469-1471, 1969.
- 15) Heidrick ML and Ryan WL : Cyclic nucleotide on cell growth in vitro. *Cancer Res* **30** : 376-378, 1970.
- 16) 神野哲夫、中沢恒幸、他 : cyclic AMP と悪性神経膠腫第1報. Dibutyl adenosine 3',5'-monophosphate の悪性神経膠腫に及ぼす影響. *臨床神経学* **12** : 584-595, 1972.
- 17) Kato K, Yoshida K et al : Synthesis of p-nitrophenyl β -D-glucopyranosiduronir acid and its utilization as a substrate for the assay of β -glucuronidase activity. *Chem Pharmac Bull* **8** : 239-242, 1960.
- 18) Kent G, Minick OT et al : the movement of Iron-Laden Lysosomes in rat liver cells during mitosis. *Am J Pathol* **46** : 803-827, 1965.
- 19) Mies HJ : Einengung von Liquor cerebrospinalis als Vorbereitung zur Papierelektrophorese. Ein einfaches und schonendes Verfahren. *Klin Wochenschr* **30** : 159-161, 1953.
- 20) Monis B, Banks BM et al : β -d-glucuronidase activity in malignant neoplasms of man. *Cancer* **13** : 386-393, 1960.
- 21) 永井政勝, 佐野圭司, 他 : Dibutyl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate による悪性グリオーマの形態学的変化. *脳と神経* **25** : 295-306, 1972.
- 22) 永井政勝 : 脳腫瘍治療「あすへの外科展望②」金原出版, 314-326, 1972.
- 23) 長沢貞継, 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. *脳研究学会誌* **2** : 94-95, 1976.
- 24) 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.
- 25) 野口鉄也 : ラット大脳の酸性 DNA 分解酵素の性質. *日本神経化学会誌* **12** : 64-67, 1973.
- 26) 野村和弘, 佐野圭司, 他 : グリオーマ細胞に及ぼす cyclic AMP の影響—生長解析の観点から. *脳神経外科* **1** : 43-50, 1973.
- 27) Novikoff AB : "Lysosome in Nerve Cells", in Hyden, H (ed.), The Neuron. New York Elsevier Publishing Co 319-377, 1967.
- 28) Rall TW, Sutherland EW et al : The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem* **224** : 463-475, 1957.
- 29) 佐野圭司, 星野孝夫, 他 : 悪性脳腫瘍に対する BAR 療法の遠隔成績. *日本癌治療学会誌* **6** : 224-230, 1971.
- 30) 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.
- 31) 佐藤克之, 柴田家門, 他 : 髄液内 lysosome 酵素変動による各種脳腫瘍治療の効果判定. 第34回日本脳神経外科学会口演記録 212, 1975. 名古屋.
- 32) 清水義勝, 柴田家門, 他 : 外傷脳の修復機能における lysosome 酵素, 特に組織化学及び生化学的検討. *脳研究学会誌* **3** : 102-103, 1977.
- 33) 柴田家門, 佐藤克之, 他 : 脳組織における lysosome 酵素の病態時変動に関する研究. 東邦医学会雑誌投稿中
- 34) Shibata I, Takasu N et al : Lysosomal enzymes and Dibutyl 3',5'-Adenosine Monophosphate basic and clinical studies on lysosomal enzyme

- activities in glioma tissue and glial cells. *Neurologia medico-chirurgica* 15 (part I) ; 27-33, 1975.
- 35) 柴田家門：損傷脳に発生する反応性グリオージス組織の生化学的研究. *脳と神経* **25** : 329-336, 1973.
- 36) 柴田家門, 佐藤克之, 他：外傷脳の修復過程に伴う lysosomal enzyme の変化に関する研究. 第34回日本脳神経外科学会口演記録 76, 1973, 福岡.
- 37) 柴田家門, 長沢貞継, 他：悪性神経膠腫に対する非手術的療法の基礎的, 臨床的検討. 第35回日本脳神経外科学会口演記録 198, 1976, 前橋.
- 38) Schneider G and Wallenius G : Electrophoretic studies on cerebrospinal fluid proteins. *Scand J Clin & Lab Invest* **3** 145-150, 1951.
- 39) Sutherland EW and Rall TW . Fractionation and characterization of cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232** : 1077-1091, 1958.
- 40) 高須信美, 柴田家門, 他：髄液内酵素の測定法とその臨床的検討—特に lysosome 酵素についての検討と内頸動静脈血との比較. 第33回日本脳神経外科学会口演記録, 109, 1974, 仙台.
- 41) Tóth S, Ujvarosi I et al : Lysosomal enzymes in neurological and psychiatric conditions. *Acta Medica Academiae Scientiarum Hungaricae. Tomus* **30** 153-158, 1973.
- 42) Weissman G: Lysosomes. *The New England J Medicine* **273** : 1084-1090, 1965.