

Brown-Pearce 系癌腫家兎の酵素學的研究

松 本 研 究 室

醫 學 士 森 義 一

白鼠の肉腫及び癌腫の酵素作用が、腫瘍組織の Alterung（老成化或は壊死の増加）と共に、各々一定の消長をなすことは、既に Waldschmidt-Leitz 等により指摘せられてゐる。腫瘍の發生は生態にとつて必しも單なる局所的疾患であり得ない。殊に悪性腫瘍の場合には、腫瘍の發育、増殖は全生態に對し非常な影響を與へる。腫瘍生態の各臓器、組織内に於て或種の酵素作用（例へば Arginase, Phosphatase, Kathepsin, Esterase 等）が腫瘍の發育に伴はれて消長することに就ても、既に Fujiwara,²⁾ Waldschmidt-Leitz,¹⁾ Sure,³⁾ Edlbacher,⁴⁾ Purr⁵⁾ 等の諸學者により、興味ある業績が發表せられ種々論議せられてゐる。

余は今回、片側辜丸に移植して得たる Brown-Pearce 系癌腫家兎を用ひ、辜丸原發並に肝、腎、淋巴腺轉移腫瘍に於て、Amylase, Esterase, Kathepsin, Dipeptidase, Oxydase 及 Peroxydase の諸種酵素作用が、腫瘍組織の老成化に伴ひ如何に消長するかを検索し、併せて腫瘍の發育及増殖に因する一般狀態の惡化に並行して、肝、腎、筋、辜丸及血清等の之等各種酵素作用が如何なる消長をなすやを觀察した。

實 驗 部

酵 素 材 料 の 調 製

1. Amylase, Esterase, Kathepsin 及 Dipeptidase の實驗に使用したる酵素液の調製は、腫瘍發育の適當なる時期に於て、頸動脈切斷により家兎を脱血致死せしめたる後直に各組織を採取し、之を細挫し、10 倍容量の 0.15 % 醋酸含有 87 % Glycerin 液を以て抽出した。
2. Oxydase 及 Peroxydase の實驗に用ひたる酵素液は、細挫組織をその 20 倍容量の蒸溜水を以て混和したる組織細胞浮游液である。
3. 血清は家兎生存中は耳翼動脈より、屠殺時は頸動脈より採血し調製す。
4. 尙對照實驗用として正常家兎の各組織の同様抽出液及血清を調製した。

實 驗 方 法

1. Amylase: Wohlgmuth 24 時間法 — 井上氏變法⁶⁾を更に適宜改變す。澱粉を基質とす。

pH 7.0 に於ける $D_{\frac{38^\circ}{24h}}$ (組織 1 gm. 或は血清 1 cc. が 24 時間 38°C に於て消化し

うべき 1% 澱粉液量 (cc.)) を以て酵素量を示す.

2. Esterase: Rona u. Michaelis⁷⁾ に従ひ Stalagmometer を用ふ. 飽和 Tributyrin 液 25 cc. を基質とす. 稀釋酵素液 0.5 cc. (各酵素材料は各自酵素作用の強弱に従つて, 肝 (1:20), 腎 (1:15), 辜丸 (1:10), 腫瘍 (1:5), 血清 (1:20) の如き割合に酵素原液を蒸溜水にて稀釋した. 但し筋のみ原液の儘を用ふ.) pH 7.6, 38°C に於て前, 後 30 分間の滴數差より各反應速度恆數 $\left(K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}\right)$ を算出, 兩者の平均値を以て Esterase 量を表す.
3. Kathepsin (Kaseinsubstrat): Kleinmann u. Werr⁸⁾ の法を適宜改變す. 稀釋酵素液の使用量 2 cc. (各酵素原液を (1:10) の割合に蒸溜水を以て稀釋した). 基質 0.25% Kasein 液 (6 cc.). pH 3.3, 38°C, 6 時間 (筋のみ 24 時間) に於ける被分解蛋白量 (%) を Nephelometer (Dubosq) を以て測定し, Kathepsin 量とす.
4. Kathepsin (Eigeneiweisssubstrat): Kleinmann u. Werr⁸⁾ の法を適宜改變す. 酵素液使用量 0.5 cc. (辜丸及腫瘍は酵素原液の儘を, 肝及腎は (1:3) の割合に蒸溜水を以て稀釋したるものを用ふ). 酵素原液の自己蛋白を基質とす. pH 5.0, 38°C, 4 時間に於ける被分解蛋白量 (%) を Nephelometer (Dubosq) を以て測定し, Kathepsin 量とす.
5. Dipeptidase: Lindenstroem - Lang⁹⁾ 法を適宜改變す. 酵素液使用量 1 cc. 基質 0.2 M Glycylglycin 溶液 (2 cc.). PH 7.6, 38°C に於て 24 時間後の消化液内酸値を 0.05 n-KOH Alkohol 溶液を以て滴定し, 試験開始直後及基質を含まざる酵素液のみの消化滴定値を對照値として引き去りたる酸値増加値を 0.05 n-KOH 量 (cc.) にて表し Dipeptidase 量とす.
6. Oxydase: Staemmler u. Sander¹⁰⁾ 及 進氏¹¹⁾ 法を更に改變す. 酵素液使用量 2 cc. pH 7.6, 25°C, 15 分に於て M/150 α -Naphthol (2 cc.) 及 M/150 Paraphenylenediamin (2 cc.) に作用して發生したる Indophenolblau を Xylol にて抽出し, その濃度を Fuchsin 標準液 (5mgm./l.) と比色定量し, mgm. 數を以て Oxydase 量を表す. (但し沸騰重湯煎上に 5 分間處理したる酵素液による測定値を對照値として差引くものとす)
7. Peroxydase: 酵素液使用量 0.5 cc. PH 5.0, 20°C, 30 分間に, 0.3% 過酸化水素 (1 cc.) の存在に於て, 飽和 Benzidin 液 (5 cc.) 0.2% Guajakol 液 (5 cc.) の混液に作用し

て發生したる、帶黃淡紅色の着色物質を Aether にて抽出し、その濃度を Safranin 標準液 (20 mgm./l.) と比色定量し、mgm. 數を以て Peroxydase 量を表す。(但し、沸騰重湯煎上に 5 分間處理したる酵素液による測定値を對照値として差引くものとす)。

腫瘍の酵素作用を検するに當り、病理組織學の見地より Alterung (老成化) を考慮して、腫瘍組織を肉眼的に大體次の如く實質部、半壞死部、壞死部の 3 部位に分割した。

1) 實質部： 帶淡紅白色を呈し、半透明、緻密で、組織學的に主に進行期或は極期の腫瘍細腫よりなる實質性部分である。

2) 半壞死部： 灰白色を呈し、光澤なく、粗糙で、組織學的に多少腫瘍細胞の退行性變化と共に結締組織の増生を認むる部位である。

3) 壞死部： 帶黃或は黃褐色を呈し、甚だ脆く、腫瘍細胞は全く壞死化せる部分である。

腫瘍の發生による癌腫症性變化の進行に關聯して、諸種臓器及組織の酵素量の消長を闡明するために、總ての癌腫家兎をその罹患狀態の程度により初期群、中期群及末期群の 3 群に分けて觀察した。

1) 初期群： 移植後日數少く、體重の減少輕度で、移植部辜丸原發腫瘍のみ發育し、殆んど他臓器に轉移を認めぬものを一括す。

2) 中期群： 稍々移植後日數を経過し、體重も稍々著明に減少し、榮養少しく衰へ、辜丸原發腫瘍以外に、肝、腎、淋巴腺に多少の轉移を認むるものを一括す。

3) 末期群： 更に稍々日數を経過し、體重は最高度に減じ、衰弱甚だしく、肝、腎、肺、淋巴腺等に著明なる轉移竈を作るものを一括す。

尙本實驗に使用したる癌腫家兎の數は、Amylase, Esterase, Kathepsin (Kaseinsubstrat) 及 Kathepsin (Eigeneiweiss substrat) の實驗に於て、初期群 8 頭、中期群 8 頭、末期群 9 頭、計 25 頭、Dipeptidase の實驗に於て初期、中期、末期各 8 頭宛、計 24 頭、Oxydase 及 Peroxydase に於ては初期、中期、末期各 6 頭計 16 頭である。

實 驗 結 果

實驗成績は第 1 表及第 2 表を以て總括的に表示し、更にその結果を要約する。

第 1 表 腫瘍の酵素作用と腫瘍の老成化との關係

- | | |
|--|---|
| 1. Amylase 値: $D \frac{38^\circ}{24h}$ | 2. Esterase 値: 反應速度恒數 |
| 3. Kathepsin (Kaseinsubst.) 値: 被分解蛋白量(%) | 4. Kathepsin (Eigeneiweissubst.) 値: 被分解蛋白量(%) |
| 5. Dipeptidase 値: 酸値增加 0.05 n-KOH cc. | |
| 6. Oxydase 値: 對應せる Fuchsin 濃度 (mgm/l.) | 7. Peroxydase 値: 對應せる Safranin 濃度 (mgm/l.) |

		實 質 部			半 壞 死 部			壞 死 部		
		最高値～ 最低値	平均值	例 數	最高値～ 最低値	平均值	例 數	最高値～ 最低値	平均值	例 數
Amylase	辜丸原發	160～100	130.0	6	250～160	210.0	18	630～250	378.0	10
	肝 轉 移	63	63.0	1	160～100	145.0	4	250	250.0	1
	腎 轉 移				250～160	227.5	4	630～400	553.3	3
	淋巴腺轉移	100～63	85.2	5	250～160	193.3	6	630～400	457.5	4
Esterase	辜丸原發	0.00666～ 0.00347	0.00516	6	0.00603～ 0.00226	0.00374	18	0.00248～ 0.00110	0.00180	10
	肝 轉 移	0.00342	0.00342	1	0.00404～ 0.00226	0.00331	4	0.00177	0.00177	1
	腎 轉 移				0.00432～ 0.00248	0.00351	4	0.00226～ 0.00177	0.00203	3
	淋巴腺轉移	0.00534～ 0.00205	0.00405	5	0.00461～ 0.00188	0.00293	6	0.00248～ 0.00111	0.00180	4
Kathepsin (Kasein- substrat.)	辜丸原發	36.7～28.0	32.1	6	32.5～18.7	26.5	18	18.2～6.7	14.2	10
	肝 轉 移	28.9	28.9	1	26.5～21.3	23.7	4	18.6	18.6	1
	腎 轉 移				31.1～22.5	26.6	4	20.0～15.0	17.1	3
	淋巴腺轉移	32.5～25.1	29.5	5	30.8～21.4	24.1	6	18.1～8.5	12.7	4
Kathepsin (Eigeneiwe- issubst.)	辜丸原發	25.5～18.5	22.7	6	18.5～10.5	14.0	18	11.2～4.6	7.7	10
	肝 轉 移	19.5	19.5	1	20.4～14.8	17.2	4	10.0	10.0	1
	腎 轉 移				19.6～11.8	16.1	4	11.5～9.1	10.4	3
	淋巴腺轉移	27.5～17.5	22.5	5	21.6～14.2	16.9	6	10.2～7.5	8.7	4
Dipeptidase	辜丸原發	0.56～0.32	0.43	5	0.36～0.15	0.27	18	0.13～0.03	0.08	11
	肝 轉 移				0.31～0.19	0.24	5	0.11～0.08	0.10	2
	腎 轉 移				0.51～0.31	0.42	7	0.16～0.07	0.11	4
	淋巴腺轉移	0.42～0.24	0.32	5	0.31～0.18	0.24	7	0.14～0.05	0.08	3
Oxydase	辜丸原發	1.25～0.61	0.90	7	2.45～1.37	1.91	14	1.73～0.67	1.06	8
	肝 轉 移				2.33～1.64	2.04	3	1.02～0.98	1.00	2
	腎 轉 移				2.27～1.34	1.92	5	1.62～0.75	1.19	4
	淋巴腺轉移	1.06～0.42	0.68	4	2.13～1.02	1.76	6	1.12～0.85	1.01	3
Peroxydase	辜丸原發	4.20～2.08	2.89	7	2.85～0.66	1.35	14	3.85～0.67	1.69	8
	肝 轉 移				2.67～1.19	1.86	3	1.45～0.82	1.14	2
	腎 轉 移				2.54～1.05	1.81	4	1.23～1.02	1.10	3
	淋巴腺轉移	5.34～2.27	3.82	4	1.80～1.03	1.35	6	6.27～0.87	3.45	3

第 2 表 癌腫家兎の肝, 腎, 筋, 辜丸及血清の酵素作用と癌腫症性變化との關係

1. Amylase 値: $D \frac{38^\circ}{24h}$ 2. Esterase 値: 反應速度恒數
 3. Kathepsin (Kaseinsubst.) 値: 被分解蛋白量 (%) 4. Kathepsin (Eigeneiweiss-subst.) 値: 被分解蛋白量 (%)
 5. Dipetidase 値: 酸値増加 0.05 n-KOH cc.
 6. Oxydase 値: 對應せる Fuchsin 濃度 (mgm/l.) 7. Peroxydase 値: 對應せる Safranin 濃度 (mgm/l.)

		初 期 群			中 期 群			末 期 群			正 常 群 (對照)		
		最高値~ 最低値	平均値	例數	最高値~ 最低値	平均値	例數	最高値~ 最低値	平均値	例數	最高値~ 最低値	平均値	例數
肝	Amylase	160~100	141.2	8	400~100	238.7	8	400~100	210.0	9	160~100	130.0	6
	Esterase	0.00915~ 0.00317	0.00557	8	0.00935~ 0.00534	0.00754	8	0.00666~ 0.00177	0.00387	9	0.01036~ 0.00342	0.00647	6
	Kathepsin (Kaseinsubst.)	38.8~ 12.7	26.9	8	42.1~ 23.4	32.1	8	42.3~ 22.0	34.5	9	36.7~ 28.7	32.1	6
	Kathepsin (Eigeneiweissubst.)	23.0~ 12.7	19.4	8	27.1~ 18.6	21.7	8	25.4~ 17.6	22.0	9	31.3~ 26.0	28.0	6
	Dipeptidase	1.65~ 1.29	1.49	8	1.61~ 1.22	1.39	8	1.27~ 0.73	1.03	8	1.91~ 1.45	1.69	6
	Oxydase	3.10~ 1.55	2.20	6	4.24~ 2.06	3.22	6	4.73~ 2.27	3.24	6	2.66~ 1.88	2.16	5
	Peroxydase	0~0	0	6	1.7~0	0.39	6	166~0	0.47	6	0~0	0	5
腎	Amylase	630~250	438.7	8	6300~ 250	391.2	8	630~160	295.5	9	630~400	438.3	6
	Esterase	0.00534~ 0.00248	0.00409	8	0.00534~ 0.00226	0.00360	8	0.00666~ 0.00177	0.00406	9	0.00728~ 0.00347	0.00519	6
	Kathepsin (Kaseinsubstrat.)	40.0~ 25.0	34.8	8	43.0~ 26.0	34.5	8	42.5~ 20.0	31.5	9	43.7~ 30.0	36.9	6
	Kathepsin (Eigeneiweissubst.)	28.7~ 19.6	23.7	8	25.9~ 17.2	22.3	8	24.1~ 16.7	20.4	9	29.4~ 21.6	25.6	6
	Dipeptidase	2.53~ 1.95	2.32	8	2.18~ 1.85	2.04	8	2.06~ 1.11	1.76	8	2.58~ 1.94	2.36	6
	Oxydase	18.24~ 12.27	15.01	6	14.20~ 11.76	12.50	6	11.98~ 6.63	9.14	6	19.73~ 14.77	16.64	5
	Peroxydase	0.66~0	0.11	6	0~0	0	6	0.33~0	0.09	6	0~0	0	5
筋	Amylase	1000~ 400	665.0	8	630~400	543.7	8	400~250	316.6	9	1000~ 630	815.0	6
	Esterase	0.00070~ 0	0.00048	8	0.00070~ 0	0.00045	8	0.00093~ 0	0.00042	9	0.00070~ 0	0.00043	6
	Kathepsin (Kaseinsubst.)	18.2~5.1	11.5	8	16.7~6.5	11.4	8	16.7~5.8	11.4	9	12.7~5.0	9.3	6
	Dipeptidase	0.07~ 0.03	0.05	8	0.09~ 0.02	0.06	8	0.04~ 0.02	0.04	8	0.11~ 0.03	0.06	6
	Oxydase	0.33~ 0.13	0.25	6	0.31~ 0.22	0.26	6	0.32~ 0.13	0.26	6	0.32~ 0.16	0.26	5
	Peroxydase	1.30~ 0.66	0.90	6	1.30~ 0.66	0.99	6	1.83~ 0.53	1.13	6	0.53~ 0.33	0.45	5
辜丸	Amylase	250~160	182.5	8	250~160	216.2	8	250~100	163.3	9	250~160	190.0	6
	Esterase	0.00534~ 0.00089	0.00245	8	0.00780~ 0.00130	0.00350	8	0.00561~ 0.00226	0.00424	9	0.00606~ 0.00205	0.00336	6
	Kathepsin (Kaseinsubst.)	16.9~ 8.7	13.1	8	20.0~ 12.6	17.2	8	24.1~ 8.4	16.6	9	20.0~ 11.2	16.4	6
	Kathepsin (Eigeneiweissubst.)	13.2~ 6.1	9.9	8	16.2~ 8.2	10.9	8	16.2~ 5.4	11.1	9	20.2~ 13.4	17.1	6
	Dipeptidase	0.57~ 0.36	0.48	8	0.51~ 0.19	0.33	7	0.39~ 0.26	0.23	6	0.72~ 0.35	0.55	6
	Oxydase	0.91~ 0.32	0.60	6	0.83~ 0.41	0.61	6	0.66~ 0.15	0.34	6	1.02~ 0.35	0.58	5
	Peroxydase	1.00~ 0.53	0.78	6	3.50~ 0.73	1.39	6	1.67~ 0.82	1.24	6	1.05~ 0.62	0.87	5

血	Amylase	移植前	1600~ 1000	1075.0	8	1600~ 1000	1075.0	8	1600~ 1000	1133.3	9			
		屠殺時	1000~ 630	861.2	8	1000~ 630	815.0	8	1000~ 400	784.4	9	1600~ 1000	1100.0	6
清	Esterase	移植前	0.01106- 0.00666	0.00867	8	0.01145- 0.00534	0.00895	8	0.01155- 0.00697	0.00876	9			
		屠殺時	0.01106- 0.00205	0.00559	8	0.00849- 0.00130	0.00424	8	0.00737- 0.00158	0.00445	9	0.01041- 0.00666	0.00872	6

1. 腫瘍の酵素作用 (第 1 表)

Brown-Pearce 系癌腫の Amylase は實質部に弱く、半壊死部に稍々増強し、壊死部に於て最強である。即腫瘍組織の老成化に並行して増強す。反之 Esterase, Kathepsin (Kasein substrat), Kathepsin (Eigeneiweisssubstrat) 及 Dipeptidase は實質部に最強、半壊死部に稍々減じ、壊死部に於て最弱である。即老成化に並行して減弱する。Oxydase は稍趣を異にし、實質部最も弱く、半壊死部に著明に増強し、壊死部に於て再度減弱す。Peroxydase は實質部に強く、半壊死部に於て低下し、壊死部に於て更に低下する傾向を認む。但し、半壊死部、壊死部、殊に後者に於て陳舊出血により血色素屬の沈着甚しき場合は酵素量の増加を來す。

以上酵素作用の腫瘍老成化に伴ふ消長の傾向は、原發(辜丸) 及轉移腫瘍(肝、腎、淋巴腺) の何れに於ても同様であるが、實質、半壊死、壊死の部位別により、原發及轉移各腫瘍材料の酵素作用を比較するに相互に幾分量的の差異が認められる。

2. 癌腫家兎の肝の酵素作用 (第 2 表)

Amylase 及 Oxydase は正常家兎肝の夫等に比して、初期は大差なく、中期及末期は明に増強してゐる。即癌腫症性變化の比較的進行したる時期に於て増強を示す。Esterase 及 Dipeptidase は末期に於て甚しい減弱を示す。即癌腫症性變化の最も重篤なる時期に低下す。Kathepsin (Kasinsubstrat) は初、中、末期何れも正常値と大差なく、Kathepsin (Eigeneiweisssubstrat) は各期一般に幾分正常値より低下を示すも、3 期の間に著差を認めず。即兩者共癌腫症性變化の進行により受くる影響は餘り著明でない。Peroxydase は正常家兎肝の夫と同様に甚しく微弱で殆んど證明し難く、僅に鬱血肝の數例に於て陽性成績を得たるに過ぎぬ。

3. 癌腫家兎の腎の酵素作用 (第 2 表)

Amylase, Dipeptidase 及 Oxydase は正常家兎腎の夫に比して何れも初期は之と大差なく、中期稍々減じ、末期愈々低下す。即癌腫症性變化の進行に並行して減弱を示す。Esterase, Kathepsin (Kaseinsubstrat) 及 Kathepsin (Eigeneiweisssubstrat) は初期、中期、末期共に正常値に比して少しく低下を示すも、之等 3 期の間に大差を認めない。即癌腫發生により多少低下する如く見ゆるも、癌腫症性變化の進行に並行的なる、著明なる消長は認め難い。Peroxydase

は正常家兎腎の夫と同様に甚しく微弱で、殆んど證明し難く、僅に鬱血腎の數例に於て陽性成績を得たるに過ぎぬ。

4. 癌腫家兎の筋の酵素作用 (第 2 表)

Amylase は正常家兎筋の夫に比して、初期既に幾分低下し、中期を経て更に末期へと漸次減弱する。即癌腫症性變化の進行に並行して著明なる減弱を示す。Peroxydase は初、中、末期共に明に上昇を認むるも、之等 3 期間に、大差なく、癌腫症性變化の進行に密接なる消長を認め難い。Esterase, Kathepsin (Kaseinsubstrat) 及 Dipeptidase は共に微弱で、その消長も鮮明を缺く。

5. 癌腫家兎の睾丸の酵素作用 (第 2 表)

Dipeptidase は正常家兎睾丸の夫に比して、初期僅に減じ、中期を経て末期へと漸次甚しき低下を來す。即癌腫症性變化の進行に並行して著明なる減弱を示す。Oxydase は初期、中期は正常値と大差なく、癌腫症性變化の最も重篤なる末期に至り著しき下降を示す。反之 Peroxydase は中期及末期に於て上昇を示す。Kathepsin (Kaseinsubstrat) は初、中、末期に正常値と大差なく、Kathepsin (Eigeneiweiss substrat) は全期を通じて正常値に對し僅に低下を示すも、3 期の間に大差なく、癌腫症性變化の進行により受くる影響は明瞭でない。

6. 癌腫家兎の血清の酵素作用 (第 2 表)

屠殺時 Amylase は移植前の夫に比して 25 例中 14 例 (初期 8 例中 4 例, 中期 8 例中 4 例, 末期 9 例中 6 例) に於て低下を示す。而して平均値より見れば, Amylase は癌腫の發育及癌腫症性變化の進行に並行して低下を示す。Esterase は移植前に比して 25 例中 21 例 (初期 8 例中 6 例, 中期 8 例中 7 例, 末期 9 例中 8 例) に於て低下を示す。平均値より見れば Esterase は腫瘍發育に急激なる低下を來すも、中期以後の癌腫症性變化の進行に並行的なる移動は明瞭でない。

撰筆するに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲とを賜はりし恩師松本教授、並に本實驗に就て多大の御援助を辱くしたる京都帝國大學理學部生物化學教室小松教授、條田講師に對し深甚の謝意を表す。

(昭和 13 年 12 月 京大樂友會館化研第 10 回秋季講演會發表會)

文 獻

- 1) Waldschmidt-Leitz u. Mitarbeiter, Hoppe-Seyl. Z., **219**, 115, 1933.
- 2) Fujiwara, Hoppe-Seyl. Z., **185**, 1, 1929.
- 3) Sure etc, Biochemic. J., **29**, 1508, 1935.

- 4) Edlbacher u. Neber, Hoppe-Seyl. Z., **233**, 265, 1935.
- 5) Purr, Biochem. J., **28**, 1907, 1934.
- 6) 井上, 東京醫學會誌, **34**, 344, 大正 9.
- 7) Rona u. Michaleis, Biochem. Z., **31**, 345, 1911.
- 8) Kleinmann u. Werr, Biochem. Z., **241**, 108, 1931.
- 9) Lindenstroem-Lang, Hoppe-Seyl. Z., **182**, 151.
- 10) Staemmler u. Sander, Virchow. arch. f. Path., **256**, 595, 1925.
- 11) 進, 福岡醫學會雜誌, **23**, 289, 昭 5.