腫瘍組織のエステラーゼ・アイソザイム分析

1. 脂肪肉腫を中心として

九大整形外科

貝 原 信 紘・江 口 正 雄

柴 田 堅一郎・篠 原 典 夫

別 府 保 男

Electrophoretic Separation of Esterase Isozymes in Tumor Tissues

1. Isozyme Pattern of Liposarcoma.

By

N. Kaibara, M. Eguchi, K. Shibata,
N. Shinohara and Y. Beppu

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka.

Esterase isozymes were studied in the extracts of bone and soft parts tumors. The isozymes were extracted with 0.25 M sucrose solution and separated on polyacrylamide gel according to Tomino et al. Esterase activity was detected in the polyacrylamide gels by the method using α -naphthyl acetate and hexazotized pararosaniline.

In the tissue varieties examined, a composite total of 12 discrete esterase bands were discerned.

The extracts of three specimens of lipomas revealed the same isozyme pattern as normal adipose tissue. In the extracts of three liposarcomas, the isozyme pattern showed greater heterogeneity.

はじめに

アイソザイムの概念は現在遺伝学上の問題解明への1手段として広く応用されているが、腫瘍との関係においても主として癌化の過程におけるアイソザイムパターンの変化、あるいは悪性腫瘍に共通するアイソザイムパターンが存在するか否か等の問題において広く研究されている。しかし整形外科領域における骨軟部腫瘍とアイソザイムの問題に関しては乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ、酸フォスファターゼに関する研究が散見されるのみである。酸フォスファターゼアイソザイムについてはわれわれがすでに詳しく報告しているが、必ずしも悪性腫瘍に共通するアイソザイムパターンは存在せず、骨巨細胞腫、fibrous

dysplasia、骨肉腫、骨転移癌、線維肉腫についてはそれぞれ特有なアイソザイムパターンが存在することが明かであった。これらの結果から腫瘍の形態学的診断に加えて新たに有力な補助診断法としての酵素学的診断の可能性が示唆される。今回われわれは nonspecific esterase を取り上げて腫瘍組織中の本酵素の質的検討を行なっているので脂肪肉腫を中心として報告する。

材料および方法

手術あるいは剖検時に採取した腫瘍組織を用いた。採取した腫瘍組織は生理的食塩水で軽く洗って付着せる血液成分を除き、明かな腫瘍塊のみを -20°C にて凍結保存し、適宜実験に供した。

凍結保存せる腫瘍組織約 200 mg に 0.25 M sucrose を加え、ガラスホモジナイザーを用いて氷冷下にて 10% のホモジネートを作製し、冷凍遠心 10,000×g, 15 分間の上清を試料とした。

アイソザイムの分離は Clarke, Tomino らの報告によるアクリルアミドゲル電気泳動法を若干 modify して行なった。ゲル濃度は 7.5% とし, gelling buffer は Tomino らの方法に従って調製した。分離用ゲルの上に直接 10~30 μl の試料をのせ、上下の電極槽には Tris-glycine-HCl 緩衝液 pH 8.1 を各 500 ml 使用した。4°C の冷室中にて 300 V の定電圧で 90 分間泳動した。泳動終了後ゲルをガラス管より取り出し、 α -naphthyl acetate を基質とした hexazotized pararosaniline との混液により室温にて 30~60 分間活性染色を施した。back-ground staining をできるだけ少なくする目的で塩酸パラロザニリンは 1/6 量に減量して用いた。各活性帯の分画比は densitometer Kemic を用いて測定した。

結 果

種々の試料について得られた各活性帯を合成して模式的に示すと図 1 のようになる。各活性帯は易動度の異なるもの、易動度の異なるもの、その中間のものと 3 群に大別可能であり、それぞれ fast (F), slow (S), intermediate (I) と便宜的に表現した。活性帯 S は更に 10 の分画に細分され、それぞれ S₁ から S₁₀ と仮称して表現した。他方活性帯 F は少なくとも 3 個の分画に分れるようであるが、S にみられるごとくシャープに分離されなかったため今回はこれら 3 個の分画を合せて F 分画と呼ぶことにした。

図 1 エステラーゼアイソザイムのシェーマ

正常脂肪組織および脂肪腫のエステラーゼザイモグラムを図 2 に示した。まず正常脂肪組織においては S₅ に強いエステラーゼ活性があり、これより易動度が増すにつれて活性は漸次減弱していく。S₂, F 分画には非常に弱い活性が認められるが、S₃, S₄ 分画には活性を検出することができなかった。

次に脂肪腫のザイモグラムをみてみると正常脂肪組織と同様に S₅ 分画に主活性があり、S₆, 7, 8, 9, 10 と漸次活性が減弱していく。S₂, F 分画は活性が非常に弱い。このアイソザイムパターンは正常脂肪組織のものとまったく同じである。脂肪腫についてはこのほか 2 例について検索したが、アイソザイムパターンは類似のものであった。

次に脂肪肉腫 3 例について得られた結果を図 3 に示した。症例 1 は F 分画に主活性があり、S₂ 分画に中等度の活性が認められた。S₃, S₄, S₅ 分画画には非常に弱い活性が検出されたが、その他の分画には活性を検出することができなかった。病理組織学的には myxoid type の脂肪肉腫であった。

症例 2 は S₂ 分画に主活性があり、F 分画は 2 分画に分離されているが活性は中等度である。次いで S₅ 分画に中等度の活性が検出された。その他の分画には活性を検出できないか検出されても極めて弱い活性で

図 2 正常脂肪組織と脂肪腫のザイモグラムとデンシトメトリー

図 3 脂肪肉腫 3 例のザイモグラムと組織像

あった。病理組織学的には myxoid type の脂肪肉腫であった。以上 2 例はともに myxoid type の脂肪肉腫であり、ザイモグラムにて S_2 分画と F 分画の活性比が逆転しているが、比較的強い活性はこの 2 分画に限られている。次いで S_8 分画に少し弱い活性がみられるが、その他の分画は活性が検出されないか、検出されても極めて弱いという点で共通のパターンであった。

症例 3 は F 分画に非常に強い活性があり、次いで S_2 分画、さらに S_5 , S_6 , S_7 , S_8 分画に同程度の弱い活性が検出され、 S_3 , S_4 分画は極めて弱い活性であった。病理組織学的には fibrosing type の脂肪肉腫であった。このアイソザイムパターンは後述する骨巨細胞腫と線維肉腫のアイソザイムパターンに近似したもの

であり、症例 1, 2 にみられた myxoid type の脂肪肉腫のアイソザイムパターンとは明かに異質のものである。

骨巨細胞腫と線維肉腫の各 1 例について得られた結果を以上述べてきた脂肪組織由来の腫瘍で得られた結果と対比させる目的でまとめて図 4 に示した。骨巨細胞腫においては F 分画に主活性があり、次いで S_2 分画に比較的強い活性がある。 S_3 から S_8 分画はほぼ同程度の活性を有し、前述の fibrosing type の脂肪肉腫に近似したパターンである。

線維肉腫のザイモグラムも一見して骨巨細胞腫や fibrosing type の脂肪肉腫によく似たパターンを示

図 4 線維肉腫と骨巨細胞腫のザイモグラム

しているが、 S_2 分画が比較的強く、また活性は弱い
が I 分画が検出されている点でこれらとはまったく異
るパターンといえることができる。

考 察

エステラーゼが単一の酵素蛋白でなく、アイソザイ
ムが存在することは周知の事実である。アイソザイ
ムの分析には電気泳動法を用いることが多いが、使用さ
れる支持体、緩衝液その他の泳動条件により、得られ
たザイモグラムに違いが生じることも当然である。今
回われわれがアクリルアミドゲルを支持体とした電気
泳動法によるエステラーゼアイソザイムの分析を試み
ることに決めたのは、(1) 試料が極く微量でよい、
(2) 操作が手軽である、(3) 再現性がよい、(4)
分離能が優れている、などの理由による。

種々の条件によるアクリルアミドゲル電気泳動法に
ついて検討を加えた結果、Clarke 法を若干 modify
した Tomino らの方法が最も分離能がよいのでこの
方法をさらに少し modify して利用することにした。
本法の再現性は極めて良好であった。

次には使用する基質の問題が生じてくるが、今回は
 α -naphthyl acetate, β -naphthyl acetate, na-
phthol AS acetate および naphthol AS-D chlo-
roacetate を用いて検討した。その結果 α -naphthyl
acetate を用いた場合に最も安定した活性染色が得ら
れたので今回の報告はすべて α -naphthyl acetate
を基質としたものである。

本法によるとエステラーゼは少くとも 12 個の分画
に分離可能であり、 $S_1 \sim S_{10}$, I, F 分画と仮称して表
現した。

正常脂肪組織と脂肪腫では S_5 分画に主活性があり、
これより易動度が大なる分画では漸次活性は減弱して
いく。 S_2 と F 分画の活性は非常に弱く、ともに同一
のパターンであった。脂肪肉腫 3 例については正常脂
肪組織や脂肪腫でみられたアイソザイムパターンとは
全く異なるパターンが認められた。さらに同じ脂肪肉腫
の中でもタイプが異ればアイソザイムパターンも違い
が生じることも明かとなった。

脂肪肉腫を含めて整形外科領域における骨軟部腫瘍
のエステラーゼアイソザイムに関する報告は残念ながら
見当たらない。実験腫瘍についてみれば Kreusser は
ハムスターの正常および腫瘍組織のエステラーゼアイ
ソザイムを検索して正常組織には臓器特異性を有する

アイソザイムパターンを認めているが、悪性腫瘍のアイ
ソザイムパターンはわずかの例外を除いて母組織と
は全く異なる一定の tumor pattern に近づくとも報告し
ている。

Yoshimura はマウスを用いて皮膚および唾液腺の
癌化の過程におけるアイソザイムパターンの変化を調
べ、脱分化による一定の tumor pattern への移行を
認めている。これらは共に Greenstein の法則を支持
する結果である。他方 Young らはヒトの悪性腫瘍が
必ずしも一定のエステラーゼアイソザイムパターンを
示さないと報告しており、果して Greenstein の法則
が成立するののか否かについても未だ結論の出せない状
態である。

われわれが酸フォスファターゼアイソザイムについ
て調べた結果でも必ずしも悪性腫瘍に共通する tumor
pattern は認められず、数種の腫瘍群についてはそれ
ぞれ特有なアイソザイムパターンが認められた。

このことは翻って考えてみるとアイソザイムパター
ンの検索から腫瘍診断の可能性が生れることを示唆す
るものである。今後さらに症例を積み重ねて腫瘍の酵
素学的診断の可能性を更に追求していく予定である。

結 語

エステラーゼアイソザイムの分析法について述べ、
腫瘍組織中のエステラーゼアイソザイムを検索するこ
との意義について考察を加えた。

文 献

- 1) Clarke, J. T. Ann. N. Y. Acad. Sci., 121: 428, 1964.
- 2) 江口正雄ほか、骨代謝, 6: 135, 1973.
- 3) 貝原信敏、福岡医誌, 66: 397, 1975.
- 4) Kreusser, E. H. Cancer Res., 26: 2181, 1966.
- 5) Tomino, S., & Paigen, K. In the Lactose Operon (Beckwith, J. R., & Zipser, D., eds.), p. 233, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1970.
- 6) Yoshimura, Y. Gann, 62: 187, 1971.
- 7) Young, C. W., & Bittar, E. S. Cancer Res., 33: 2692, 1973.

質 問 北里大学 真 角

① 正常脂肪と肉腫組織との間のパターンの違いは
興味深い。ただ分画の再現性、恒常性はよろしいでし

ようか。

② Chemical Biopsy の意味で、実際に臨床に応用されていますか？、臨床的意義についてはいかがでしょう。

質 問

鳥取整形 前山 巖

各腫瘍によるアイソザイムパターンの意義づけについて、何か知見をおもちでしょうか。

良 性 軟 骨 芽 細 胞 腫 の 5 例

鳥取大学医学部 整形外科教室

山 本 吉 蔵・古 瀬 清 夫

平 川 訓 己・稲 田 治

豊 島 良 太・前 山 巖

Five Cases of Benign Chondroblastoma

By

K. Yamamoto, K. Furuse, K. Hirakawa,
O. Inata, R. Teshima and I. Maeyama.

Department of Orthopaedic Surgery, Tottori
University School of Medicine

Five cases of benign chondroblastoma were presented in this report. Three cases had tibial involvement, talus and pubis was also affected in each one case. Four males and one female. The age range was 12 to 28 years.

Histologically, tumors were consist of oval chondroblasts and giant cells with cartilage matrix, stained slightly with Alcian blue.

The ultrastructures of chondroblast and cartilage matrix were studied utilizing TEM and SEM. The well developed and sometimes dilated endoplasmic reticulum and filaments in the cytoplasm were characteristic and also, protein-mucopolysaccharide was detected by PAM staining. By energy dispersive analysis of X-ray, apatite clusters with 0.5 to 0.8 μ in diameter in tumor matrix showed a little different patterns of Ca, P and S from the epiphyseal cartilage matrix.

Benign chondroblastoma は、最初 giant cell tumor の1異型と考えられ、calcifying giant cell tumor, epiphyseal chondromatous giant cell tumor また cartilage containing giant cell tumor などと呼ばれていた。1942年 Jaffe & Lichtenstein が組織学的検索をもとに benign chondroblastoma と命名し、以後、広く使用されるようになった。

昭和39～49年までの11年間のわが国骨腫瘍全国登録によると、64例が登録されているにすぎず、比較的まれな疾患である。

最近、われわれの教室で5例の本症を経験したので、その臨床像、組織学的検索結果について報告し、全国登録症例と比較検討を加える。

症 例

症例は、距骨1例、脛骨3例および恥骨1例の計5例（表1）で、年齢は12才から26才までの比較的若い人に限られ、男4例、女1例であった。

1) エックス線像

一般に境界の明瞭な骨透明巣として認められ、円形ないし楕円形で、辺縁部は薄い骨硬化像を呈する。症