4. 肝臓癌における乳酸脱水素酵素 Isozyme について*

服 部 信**

序 論

癌組織に関する解糖系の研究以来、乳酸や乳酸脱水素酵素は、特に Warburg の主張のために、世人の注目をつねにひいてきた¹⁾。Warburg は、更に担癌体の血清中の解糖酵素の上昇にも注目した。すなわち、担癌生体では、血清中の aldolase 活性その他が上昇することを明らかにしている²⁾。近年に到り、B. Hill³⁾ は、癌患者血清中の乳酸脱水素酵素活性の上昇を報告し、これは多数の追試者の検討する所となり、若干の臨床的意義を認められて、広く世界的に癌の補助診断の一法として、臨床検査室でルーチンに測定されている。B. Hill⁴⁾ は、その後、超遠心法、塩析法、その他を用い、血清中本酵素活性は二分画に分離しうることを発表し、吾々の注目をひいたのである。酵素化学 発達 の過去に遡ってみるに、同一酵素名で呼称されるものの内に、或いは、その製法により、或いは、その製造材料の相違によって、その酵素としての性格に、多かれ少なかれ、差違のあることが分っていた。これが後に、Markert and Möller⁵⁾ による isozyme という名称の提唱となる訳であるが、Hill によるこの実証は、乳酸脱水素酵素 isozyme の発見のいとぐちとなった。B. Hill の用いた方法は、今日より考えると極めて不完全なもので、その後、isozyme 分離の手技は、目まぐるしく改善され発達した。Th. Wieland 等⁶⁾ は、高圧濾紙電気泳動法を用いて、本酵素を5つに分けることを、各種の臓器を用いて成立せしめ、数々の有意義な実験事実を確認した。その大なる功績は、isozyme における分画像の臓器特異性の確認に指を屈する。この臓器特異性の存在は、遺伝、発生、ひいては、癌の研究者が、この途に入門し始めるのにどんなに大きい刺激となったかは、論を待たぬ所である。又、発生⁷⁾ 過程における著るしい変化も、先ず彼等により発表された。癌化の際の変化も、皮膚癌で確認している⁸⁾。更に、Wieland 一派の Wachsmuth und Pfeleiderer は、癌が転移をおこすと、転移部位は、原発巣の乳酸脱

水素酵素 isozyme と類似性があると発表した。これらのどれをとっても、著者の主題たる肝臓癌乳酸脱水素酵素 isozyme と深い関係のある研究ばかりである。更に、彼等は最近の数年間に亘り、本酵素 isozyme の結晶化を行い、その結晶酵素のアミノ酸組成より、電気泳動法による易動度の理論的意味づけを行ない、isozyme が異なると、アミノ酸組成も異なり、泳動の時の易動度の差は電荷の問題が、主として関与する事実を明らかにしてきている⁹⁾。恐らく、将来、酵素蛋白の生合成の機構にも関連のある事柄であろうと思う。Wiemé¹⁰⁾ や、Blanchard¹¹⁾ 等は、寒天による泳動法を用いて、臨床生化学的に取扱える第一歩を始めた。Wróblewski¹²⁾ もまた、澱粉ゲルによる泳動法を利用して、特に臓器特異性と関係づける多数の臨床生化学的データを発表し、この中には、各種の癌に関する血清での成績がだされた。この中で、癌の肝転移に關しての発表では、肝臓組織の isozyme と、血清との間に関係があるような発表が見られている。O. Bodansky¹³⁾ は、免疫学的な方法を取り入れ、isozyme 同志の間の異同をきめる巧い方法を導入した。この他に、cyanogum^{14,15)} による泳動法、cellulose acetate 膜¹⁵⁾ による方法が考案され、一面、多量に分離するには、カラムクロマトグラフィー (DEAE-cellulose など¹⁶⁾) が考案され、現実には、夫々の isozyme が市販されるようになり、これは更に高次の研究を刺激するものと思われる。

著者は、昭和37年¹⁷⁾の日本内科学会総会で、肝臓癌患者血清と臓器に關する、乳酸脱水素酵素 isozyme 分画について言及したが、昭和38年¹⁸⁾日本消化器病学会総会で、澱粉ゲルを用いる Smithies の方法を用いて、人の肝臓癌 (原発と転移) 組織及びその周辺の正常組織の isozyme について発表し、原発性肝臓癌においては、正常肝臓に似た分画像 (Lebertypus) すなわち第一分画が極めて高い値を示すのに反し、転移性肝臓癌では、その非転移部において、Lebertypus を呈するに拘らず、転移部では、その殆どすべてにおいて、Lebertypus を示さ

* Study of LDH isozyme of hepatoma patients

** Nobu Hattori, 国立がんセンター病院内科

ないこと、然し、Wachsmuth und Pfeiderer の主張する癌の原発部位と転移部位における乳酸脱水素酵素 isozyme の段階における一致の点は、必ずしも明確には確め得なかった。更に、著者は、昭和38年の日本生化学会総会において、cyanogum を用いる電気泳動法を乳酸脱水素酵素 isozyme の段階にも、適用し、これを用いてこの問題を更に検討したが、同様な結論以上のものを発表しえなかった¹⁹⁾。しかし、この際、例外の存在も認められるに至り、すなわち、原発性肝臓癌とされたものの中において、癌の部位の isozyme 分画像にして、Lebertypus を示さないものの存在が明かとなった事、また、逆に、肝転移部位でも、非転移部位と同じく、Lebertypus を示し、原発癌の分画像とかなり異なるものも存在している事を確認した。

昭和39年日本生化学会総会²⁰⁾において、実験的肝転移(吉田肉腫細胞を用いる)を用いて、この問題を検討した。この際の著者の結論は、吉田肉腫細胞と、同細胞注入肝臓の乳酸脱水素酵素分画像の著しい一致よりして、ある種の肝転移においては、Wachsmuth のいうように極めて著しい類似性のある事実の存在を主張した。

この点については、二三の反対もあり、その要旨は、1) 著者の使用せる呑龍系大黒鼠を用いる場合、吉田肉腫細胞を使ったのでは、遺伝的な heterogeneity の問題のおこりうること、2) 著者は、Wieland の方式に準じて、臓器を処理しているのであるが、この方式では、沢木による二回凍結融解法で始めて出現する肝の第二分画の出ないこと、3) 著者の用いる方式は、脾臓内に吉田肉腫細胞を注入するやり方であるが、これでは肝内に転移はおこるだろうがその他に、注入による変化がおこり、それ位の変化は、脂肪肝を作ってもおこると主張された。著者の、今回の発表の一部は、上記の反論に対する一部の解答でもある。

更に著者は、電気泳動学的に分離されている各 isozyme は、前述の如く、Wieland, Pfeiderer, Wachsmuth により、結晶化され、アミノ酸組成に関してすらも、仔細な成績が発表されているのであるが、泳動法で同一とされた分画が、材料の相異せる場合でも同一であるか否か、Wieland のかつて調べたような酵素活性の物理化学的検査を以てしても、同一であるか否かを、Wachsmuth に準じた方法⁹⁾で精製し、更に cyanogum 泳動で分離せる酵素を使用して、熱変性、DEAE cellulose その他の吸着剤に対する吸着性、至適 pH、基質の至適濃度、尿素及び PCMB による変性を仔細に調べた所、基質濃度と至適 pH では、若干の差を認めるが如き成績を繰返し得たのであるが、これは今日これ以上の結論をいい得ない成績と思われる(手技上の誤差より来る限界の存

在の可能性)。

以上の従来の発表につけ加えて、今回発表するのは、1) その後の血清を用いる 原発性及び 転移性肝臓癌患者の乳酸脱水素酵素 isozyme の成績 2) 人体の肝臓を用いる肝臓癌の isozyme の成績 3) 吉田肉腫、AH 130 腫瘍細胞、武田肉腫細胞と、之等各種細胞を注入して得た転移部の分画像についてである。著者は、前述せる三反論の第一に対しては、現段階で反対するようなそして、簡易な実験様式を考案しえないが、AH 130、武田肉腫の二種を加えて、若干著者の側に、より有利な成績を得たので、本論の中でのべる。但、著者の入手しえたいいくつかの腫瘍細胞は、確実な、絶対不動の成績を与えるような分画、すなわち第三分画以下の分画を有していないので、比率にのみ頼らねばならぬ弱点がまだ存在している。

本 論

1) 臓器の処理方法

Wieland 一派の方式による。すなわち、Potter homogenizer で潰して、これを冷却高速遠心し上清を用いる。沢木が、昭和39年酵素化学シンポジウムで発表したように、二回凍結融解せる方式では、著者の追試する所でも、沢木のいうように大半をしめる第一分画の外に正常大黒鼠肝臓で、第二分画がすこしく出現する。しかし、著者は敢えて、これを本実験に採用しなかった。それは、一部の腹水腫瘍細胞の乳酸脱水素酵素 isozyme が何故か逆に著しく減少したためである。

2) Cyanogum 泳動法

これも、著者が何回も記述している処であるので詳述を避ける¹⁹⁾。要点のみを記すと、0°C で、veronal 緩衝液で pH 8.6、イオン強度 0.05 とし、泳動後の染色は、Wiemé に準じて¹⁰⁾、nitro blue tetrazolium 法を用いる。後デンシトメトリーにかける。これで各分画の活性は実測しうる。

3) 肝臓癌患者血清での成績

原発性たると、転移性たるとを問わずして、肝臓癌の場合に血清乳酸脱水素酵素活性が上昇するが、これの原因は、癌の際の血清酵素上昇の真の原因がなかなか明らかにされないのと同じであって、分っていない。Wróblewski and Gregory¹²⁾によると、甲状腺癌、脾臓癌の患者血清では、甲状腺や、脾臓に似た isozyme が出現しているが、充分の一致は見えていない。この原因を推定するに、一つは、癌になって、isozyme 分画像に変化を来して、正常組織の分画像と差異を生ずる。一つは、血清中に当該組織より逸脱する isozyme が存在す

る場合に、ここに血清での稀釈がおこり、その影響が血清中では見られる。一つは、臓器内の isozyme のすべてが逸脱しないで、そのある部分のみの場合の可能性もある。一つは、血清酵素の起源に逸脱以外の可能性も否定しえない。肝臓癌の場合の患者の血清での成績のうち、先づ、原発性肝臓癌の場合にのみ限定してのべる。これは何れも、手術時の組織診又は剖検で、診断の確認された例のみを用いているが、11例で、その内肝硬変を伴う病例は8例である。肝硬変症を伴う内の1例のみでは、第一分画値が、70%に及び、他の分画値は低く、特に第二分画値は低く、ほとんど0に近く、第三分画値が25%を占めるものがあり、全体の活性も高度上昇を示して、明らかに、Lebertypus 型の典型的のものと認められた。その他の2例では、第一分画値は、一応33%、30%と一番高いが、著るしい高さとならず、又、第二分画値も17%と20%とかなり高いものがあったが、第三分画値が30%と25%となって、必ずしも典型的 Lebertypus といいかねるものであった。第一例の典型的な Lebertypus の例は、剖検材料について検するに、isozyme の分画も Lebertypus を示した。3例の肝硬変症を合併しない原発性肝硬変の症例では、その内の1例が、第一分画値が46%とかなり高く、まず Lebertypus とよんでよいものであり、肝の分画も Lebertypus といってよい。肝硬変の5例では、血清中本酵素活性総値も余り高くないが、Lebertypus を示したものは1例もなかった。その他の血清肝炎などでは、Lebertypus はある程度認められた。48例の肝転移の症例中で、胃癌に1例 (1/29)、直腸癌に1例 (1/10) Lebertypus の症例が認められた。この他の全症例では、第一分画値が最高値を呈することもなかった。Wróblewski and Gregory は、転移肝癌患者血清でも、第一分画値が高いと発表しているが、我々の多数の例では、この発表と全く一致しない成績を示した。主に、第三、第四分画値の高いものが多かった。次に、手術的に原発癌の除去されたもので、その isozyme との比較がなされ、分画の一番高いものと、次の分画とが共に同一であるものを、isozyme 分画像が一致しているものと仮定すると、その例は3例 (3/48) で、1例は原発が胃癌 (1/29)、2例は原発が直腸癌であった (2/10)。活性最高分画値のみが、一致するものをとると、16例 (16/48) に達するが、少なくともこの段階の一致には、偶然に一致する可能性が極めて高い。癌の肝転移の診断を単に、血清乳酸脱水素酵素 isozyme の点よりのみいおうとするならば、得る所が少ないといわねばならぬ。癌以外の白血球については、Wróblewski は、白血球の isozyme に似ていると唱えた

が、白血球では第四分画が高くなるが、著者の二例の慢性骨髓性白血球の症例では、むしろ第五分画の高い成績を得ているのと、何分にも肝への浸潤が全体の一症候にすぎぬし、二例しかやっていないので何ともいえない。

4) 肝臓癌患者の肝臓における成績

原発性肝臓癌15例の内、肝硬変を伴う症例10例についていうと、癌の部位では、1例を除き、Lebertypus を示した。1例では、第一分画は、極めて低く、僅か15%にすぎず、残りの分画では、第三分画値、第四分画値が27%、41%とむしろ脾臓にでも似ているような isozyme の成績で、臨床的に、意識障害を来し、かつ、低血糖発作を見た例であるが、血中インシュリン量は、東大中尾内科金平によると、ほとんど0で、Insuloma は否定しうることとであり、又、剖検で、原発性肝臓癌であることが確認された。残りの9例は、癌以外の肝硬変部で、やはり Lebertypus であったが、この例外の1例は、硬変の部位で、組織学的に一応癌でないと言われた部位でも、2カ所において Lebertypus でない像を示したが、興味のあることは、癌の部位ほど大きな変化でなくして、第一分画25%で、第二分画11%、第三分画22%、第四分画34%となっている。

肝硬変症を伴わぬ5症例では、その癌の部位についていうと、4例が Lebertypus を示し、1例では、第一分画値が29%、むしろ第三分画値33%となっていて、Lebertypus でないが、然し、非癌部では、全例定型的 Lebertypus を示した。

肝臓癌となったために、そこに isozyme 分画の上で、癌化に伴う変化を生ずるのか、又は、単なる個人差にすぎないものか、一見癌化に伴う変化ととって良い成績を得ている訳であるが、何分にも人体例は、一定の系のネズミを使つての研究と異なり、極端な雑系であることを常に念頭において、話をすすめるべきで、簡単に結論すべきでなからう。

癌以外では、血清肝炎2例、流行性肝炎4例、肝硬変4例、肝嚢胞1例、Riedel 氏奇型1例で、その剖検又は手術材料肝臓を用いる成績では、流行性肝炎の1例を除いて、何れも Lebertypus を示した。この際の肝炎例は、すべて、肝不全による死亡例である。臓器内の酵素含量もかなり少ない。一般の肝炎とは、同一視しえないものと考えたい。

肝転移50例の肝臓転移部での成績を総括すると、胃癌27症例の内、肝転移部に Lebertypus を呈したものは、2例にも及んだが、この2例とも他院で手術を終っていた、原発腫瘍部位との isozyme 類似性を検討しえなかった。手術又は剖検で、原発部位との比較の行ないえた

12例では、内3例が、前に記せる標準での原発部と転移部での isozyme 像の類似を認めた。肺癌では、4例中、Lebertypus を示せるものなく、原発 isozyme との類似は、2例中1例に存在。直腸癌10例では、Lebertypus は見られず、原発との類似は3例中2例に、子宮癌2例では、Lebertypus はなく、2例共に、原発との類似あり、乳癌1例では、Lebertypus はなく、網膜に原発したメラノームの1例では、Lebertypus は見られず、原発との類似は認められなかった。この例は、しかし、原発部位が僅かしか入手しえず、かつ又、メラノームでない他の部分も含有されていた。淋巴肉腫の1例では、Lebertypus なし、慢性骨髓性白血病の2例では、1例も Lebertypus なく、白血病白血球との間に、かなりの類似を認めた。以上50症例の内、浸潤によるものを除いて、転移結節を示したものは、非転移部は、何れも Lebertypus を示した。然し、強調したいことは、その第一分画の占める%の著しい巾の存在であって、ほとんど89%に近いものから33%と、実におどろくべきものがあって、これは胆癌生体による影響というよりむしろ個体差によるものであらうと推定している。

5) 実験的肝癌の作製

普通にいう実験肝癌における乳酸脱水素酵素 isozyme については、昭和38年、39年日本生化学会総会において、小野、大橋により発表されてきている²¹⁾。私は、東京医歯大病理森による、より簡便な方法を活用し、各種の実験肝癌を作った。これには、呑龍系大黒鼠を用いた。すでに本法の具体的な点は昭和39年日本生化学会総会でのべたが、要領は、脾臓内に、腫瘍細胞を、ツベルクリン用注射器と同注射針を用いて、洩れない様に、腹壁上で、サランラップで、包みつつ、0.1ml (この内に5千〜3万個の細胞を含む) を注入し、注入後、脾臓を摘出し、術後1〜2週間飼育を継続する。これで立派に転移性肝癌癌を入手しうる。この方法の長所は、簡易であって、実技の習得に容易であること、術中術後の死亡のないこと、腹水を作らないように注意すれば出来ることである。欠点は肝臓以外、特に肺にも転移をつくる点である。

6) 実験的肝臓癌における肝臓での成績

著者は、今回、AH 130、吉田肉腫、武田肉腫の三腫瘍細胞を用いた。極めて残念なことは沢木らの反論に対し、徹底的に攻撃を加えるには、若干の長所はあるが、完全でない点がある。それは、この三腫瘍共に、第一、第二分画以外の分画の活性が、極めて低いことである。第三分画以下の存在する腹水細胞があれば、その使用により、恐らく実に容易に実証されることである。

AH 130 腹水細胞 (佐々木研) を注入すると、肝には、粟粒大の転移巣をつくる。転移部として、isozyme を調べるのにこれを用いる。吉田肉腫細胞 (佐々木研) を注入すると、一般に肝臓は、外観的に何も変化はないが、病理組織学的に、ほとんど肝臓の大半は、吉田肉腫細胞でおき変る。とくに結節をつくらず、白血病の肝臓内浸潤のようなものである。武田肉腫細胞 (北大病理) を注入すると、これは、かなり前二者と異なり、大きな白色のくらげを思わせるような色感の転移巣をつくる。かかる転移巣以外の所は、吉田肉腫細胞注入時を除いて、ときに腫瘍細胞のない場合があって、この折は、正常肝と同じ isozyme 分画像を示す。とにかく、この方法での肝転移の作製をやって実感したことは、注入細胞の元来の性格に支配されて、転移が規定されてくることである。転移をつくりにくい、メチールコラントレンによる皮下腫瘍などは、この方法では、先ず転移が出来てこない。

AH 130 腹水細胞は、第一分画に98%、第三分画以下も存在するが、比は極めて少ない。これを脾臓に注入して得た肝臓内の白色粟粒大結節部を潰して得た isozyme は第一分画99%、第二分画1%で、吉田肉腫細胞での成績は、第一分画72%、第二分画28%、これを注入して得た浸潤性腫瘍を有する肝臓では、第一分画71%、第二分画29%で、武田肉腫では、腫瘍細胞では、第一分画96%、第二分画4%、これを注入せる肝転移部の分画像は、第一分画は、95%、第二分画は5%で、それぞれ実に大きな一致を得た。

著者はこの成績をどう解釈するか。三種の腫瘍細胞を用いても、生化学会総会で発表したと同じく著しい類似があることは、恐らく、もはや、凍結融解法で出てくる第二分画の存在が、吉田肉腫細胞注入による第二分画の出現と関係ありとすることは、その出現してくる比率の点で説明しにくいことであると思う。また、ある程度の反応があるとする点については、注入肝の小さい転移部のみに、こうした変化を有する事を考えるとき、これもまた考えにくいことと断定したい。ただし、第三分画以下を著るしく含有し、第一分画の少ない腹水腫瘍があれば、より決定的に説明しうる所と思う。

考 察 と 結 語

以上の臨床例と実験例での成績を総括するに、始め Wróblewski and Gregory の主張したようなうまい応用の実際性と異り、特に血清乳酸脱水素酵素 isozyme の測定 of 肝臓癌での段階の臨床診断学的有用性は、著者は極めて微々たるものであらうと思う。また、原発と転移

の鑑別にも、使いうるものとは思えない。臓器を使っている、病理診断学的の問題、ざっくりばらんにいうと、原発か否かということ、転移なり原発部位の推定、それも、原発か否かまでについては、かなり有用な成績を与えるが、それでも、原発でも、Lebertypusを示さぬ例外のあること、転移でも時に何故か Lebertypus となることのあることで、恐らくそれはそれなりに、何らかの摂理の存在する所ではあろうが、grob klinisch に利用するには、若干ちゅうちょされる所である。また、転移の場合の原発巣に対する推定は、余り有用なデーターを提供しないようである。Wachsmuth und Pfeleiderer の主張の正当性に、かなり限界があると信ずる所以である。

然らば、何故に、著者の用いた実験肝癌では、Wachsmuth und Pfeleiderer の主張をそのまま裏づける成績を得たのであろうか。私は、腹水腫瘍の利用に一因があると思う。考えて見るに、形態学的にも、機能的にも、かなり、統一された単一の存在であって、勿論、分析用化学物質とは異なるであろうが、かなり純粋な細胞であろう。これに伴って、その isozyme の姿も、かなり夾雑物がなく、この注入で容易に生じてくる転移とは、その間に著しい一致の存在するのは当然のことであろう。これに反し、solid の腫瘍が肝内に転移するに当り、必ずしも一致せぬ成績と一見思われる場合の生じてくるのも止むを得ない。しかし、その底に流れる真実は、腹水腫瘍でも、また、臨床の固形腫瘍でも、差がないと考えている。Starkweather 等は、癌化すると第三分画が多くなる²³⁾というが、われわれの原発性肝臓癌での例で、必ずしもそうでないし、肝転移組織でも、こうした事実を全面的に認めるような成績でなかったが、癌組織も、千差万別であり、これのみで、その説を否定しえない。しかし、これだけ多くの例で、例外の方が多いことも、重要な事実である。Kaplan は²³⁾、癌化すると、一定方向への変化を主張しているが、私の成績は、これともまた、全面的には一致しなかった。

文 献

- 1) O. Warburg : Über den stoffwechsel der Tumoren. (Monograph)
- 2) O. Warburg und W. Christian : Bioch. Z. **314**, 399, 1943.
- 3) B. R. Hill and C. Levy : Cancer Research **14**, 513, 1955.
- 4) F. W. Sayre and B. R. Hill : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **96**, 695, 1957.
- 5) C. L. Markert and F. Möller : Proc. Natl. Acad. Sci. **45**, 753, 1959.
- 6) Th. Wieland, G. Pfeleiderer und F. Orstander : Bioch. Z. **331**, 103, 1959.
- 7) G. Pfeleiderer und E. D. Wachsmuth : ibid. **334**, 185, 1961.
- 8) G. Weber und G. Pfeleiderer : Ann. New York Acad. Sci. **94** (3), 933, 1961.
- 9) E. D. Wachsmuth, G. Pfeleiderer und Th. Wieland : Bioch. Z. **340**, 80, 1964.
- 10) R. J. Wiemé : Clin. Chim. Acta **4**, 317, 1959 and ibid. **6**, 749, 1962.
- 11) M. C. Blanchard ibid. **6**, 272, 1961.
- 12) F. Wróblewski and K. F. Gregory : Ann. New York Acad. Sci. **94** (3), 912, 1961.
- 13) J. S. Nisselbaum, M. Schlamowitz and O. Bodzsky : ibid. **94** (3), 970, 1961.
- 14) P. J. Fritz and K. B. Jacobson : Science. **140**, 64, 1963.
- 15) 沢木 : 第16回酵素化学シンポジウム, 1964年 (東京)
- 16) B. W. Moore and R. H. Lee : J. Biol. Chem. **235**, 1359, 1960.
- 17) 服部信 : 松尾裕, 日本内科会誌, **51**, 536, 1962.
- 18) 服部信 : 田中富子, 分析化学, **8**, 781, 1963.
- 19) 服部信 : 日本臨床, **22**, 44, 1964.
- 20) 服部信, 第37回日本生化学会総会, 1964年 (名古屋)
- 21) 大橋望彦 : 蛋白質, 核酸, 酵素, **9**, 83, 1964.
- 22) W. H. Starkweather and H. K. Schok : Bioch. Biophys. Acta. **62**, 440, 1962.
- 23) N. O. Kaplan and Th. L. Good friend : Adv. in Enzyme Regulation. Vol. 2, P. 203, 1964.