# 骨腫瘍における細胞酵素学的研究：特にLDH及びA1-P isozymeについて


| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者:<br>公開日: 2017-10-04<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者:<br>メールアドレス:<br>所属: |
| --- | --- |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8622 |

金沢大学十全医学会雑誌　第85巻　第4号　335―345　(1976)


# 骨腫瘍における細胞酵素学的研究

## 特にLDH及びAl―P isozymeについて

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：高瀬武平教授）

赤　羽　一　秀

### 緒　　言

1923年 Warbung[31]が癌組織の代謝過程の研究で嫌気性並びに好気性解糖機能が亢進しているという事実を報告して以来，癌組織の解糖系に関する研究が盛んになり，その後数多くの解糖系酵素が悪性腫瘍患者，殊に癌患者血清で増加する事が認められて来た。1957年 Hill & Levi [7]が癌患者血清中の乳酸脱水素酵素（Lactic dehydrogenase, LDH と略す。）活性値の上昇を報告して以来，わが国でも，大平，荻原，山口，小林，渡部[19]，高瀬[30]など多数の追試報告がなされ，現在では，悪性腫瘍の臨床診断の一助となっている。

更に Hill [6]らにより進められて来たLDH酵素分画の研究は1959年 Markert & Möller [12]によって LDH は5つの分画から構成されるという isozyme の概念に発展し，多くの研究者により各臓器における LDH isozyme の分布が報告されている。更に臨床的応用として癌患者の血清及び臓器についても検索されているが，悪性腫瘍特有の patternの存在が明確に解明されておらず，その診断的価値については未だ尚検索を要する段階といえよう。

また1924年 Robinson[21]が化骨部位におけるアルカリ性フォスファターゼ（以下 Al-P と略す。）の高活性を報告して以来，1929年 Kay [10]は骨疾患の診断に血清 Al-P 活性の上昇を利用し，1930年 Roberts [22]は肝胆道疾患の指標にもこの活性を取り上げた。その後 Al-P活性の臨床的応用は急速な進歩を遂げ，1968年 Fishmann[3]が癌組織に由来し，胎盤 Al-P と同じ性質を有する Regan isozyme を報告して以来，最近ではその活性の分布により，それぞれの臓器由来および出現疾患の想定がある程度可能なまでになった。しかるに骨腫瘍組織のLDH isozyme 或いは Al-P isozyme についての報告については殆んどなく，就中 LDH isozyme については1969年西村[16]の数例の骨腫瘍組織と，骨腫瘍由来の培養細胞を用いた報告をみるに過ぎない。

一方1950年 Schneider & Hogeboom[27]が肝細胞を核，ミトコンドリア，マイクロゾームおよび細胞上清の各分画に分離出来る事を発表して以来，細胞下構築レベルでの免疫学的および生化学的な解析は目ざましい発展を遂げた。1962年 Zilber [38]，同じく1962年平井[8]らはこの細胞分画法を応用して軟部腫瘍組織の核分画に特異抗原の存在を認め，1967年教室の加藤[9]は Sr 89 発癌骨肉腫での特異抗原の存在を報告，更に1970年同じく渡辺[33]はOST 細胞の各細胞分画について螢光抗体法により特異抗原の存在を検したが，これらは何れも免疫化学的な研究で，骨腫瘍の細胞分画レベルでの酵素学的研究については未だその報告に接していない。

ここに著者はヒト骨腫瘍組織およびヒト骨腫瘍由来培養細胞を用い，その細胞下構築レベルでの LDH isozyme および Al-P isozyme patternを検索し,耶かの知見を得たので報告する。

### 研究材料並びに研究方法

I　材　　料

1）骨腫瘍患者の外科的切断，或いは切除により得られた腫瘍組織を用いた。採取後直ちに生理的食塩水中にて細切しながら充分洗滌し，壊死組織を除去後，直ちに凍結保存後実験に供した。なお実験に供した骨腫瘍は表1の如く，骨肉腫5例(図1)，骨巨細胞腫3例(図2)，骨線維肉腫2例(図3)，骨細網肉腫1例(図4)である。

2）培養細胞

1963年10月28日金沢大学整形外科教室において15才女

---

Studies on the Lactic Dehydrogenase (LDH) and ALkaline phosphatase (Al-p.) activity of human bone tumor tissues and cultured cells **Kazuhide Akahane,** Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine (Director : Prof. Buhei Takase), Kanazawa University.

子高校生左大腿骨より剔出，分離培養され，1964年6月株化細胞となった骨肉腫由来細胞（以下OST細胞と略記する。)[29]，北海道大学整形外科教室より分与されたヒト良性骨巨細胞腫由来の$G_1$細胞，ヒト正常羊膜由来のFL細胞を用いた。これらの細胞を実験に供した。即ち培養4～5日目のものを（酵素活性の消失を防ぐためtrypsin, EDTA液での処理を行なわず）Hanksの塩類緩衝液で細胞浮遊液を作り，1,000r.p.m 5分間遠沈し細胞成分を採り，その0.5～1.0mlを使用した。

2　細胞分画

Schneider & Hogeboom法[27]に準じ腫瘍細胞切片，培養細胞にそれぞれ10倍量の冷0.25M庶糖液を加え，氷冷しつつ，テフロンホモジナイザーにて約20分間ホモジナイズした。この際ホモジネートについてはゲンチアナビオレットを添加検鏡し充分ホモジナイズされていることを確認した。

表1

| | 年令 | 性 | 発生部位 |
|---|---|---|---|
| 骨肉腫　1 | 12才 | 女 | 左脛骨 |
| 〃　2 | 11才 | 男 | 右大腿骨 |
| 〃　3 | 17才 | 男 | 左大腿骨 |
| 〃　4 | 11才 | 男 | 左大腿骨 |
| 〃　5 | 53才 | 男 | 右大腿骨 |
| 骨巨細胞腫　1 | 28才 | 男 | 右大腿骨 |
| 〃　2 | 21才 | 男 | 右大腿骨 |
| 〃　3 | 27才 | 男 | 右鎖骨 |
| 線維肉腫　1 | 20才 | 女 | 右大腿骨 |
| 〃　2 | 14才 | 女 | 左腓骨 |
| 細網肉腫 | 69才 | 女 | 左大腿骨 |

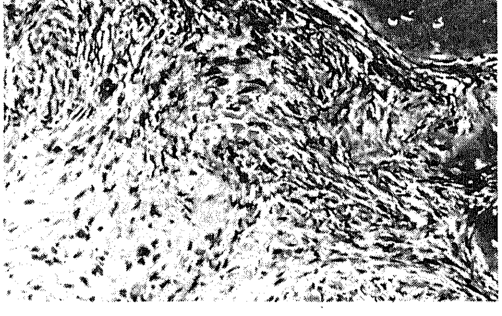


図1　骨肉腫　H＋E×180

このホモジネートを表2の如く600g 10分間遠心して核分画を得，その上清を5,000g 20分間遠心してミトコンドリア分画を落とし，更にその上清を105,000g 90分間遠心してマイクロゾーム分画を落とし，その上清の表層のcream layerを取り除き上⅔を細胞上清，即ちcell sapとして使用した。

3　測定方法

LDH及びAl-P isozymeは和光純薬製の寒天ゲルプレートを使用し，電気泳動法で分離した。電気泳動は下記の条件のもとに0～4℃で行なった。

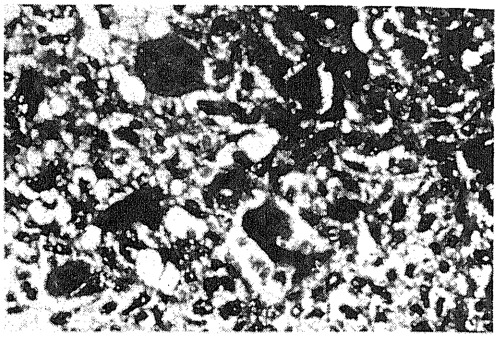


図2　骨巨細胞腫　H＋E×180

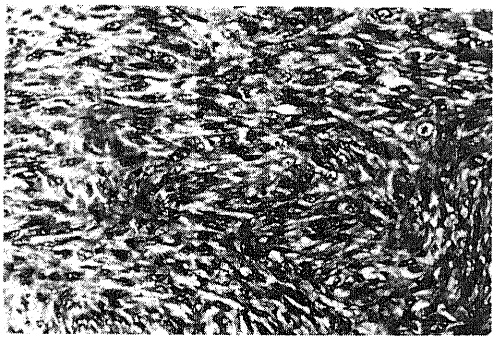


図3　骨線維肉腫　H＋E×180

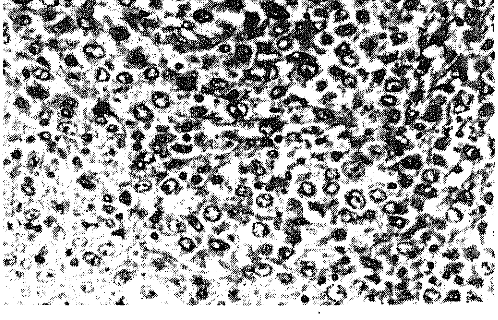


図4　骨細網肉腫　H＋E×360

表2

SEPARATION OF CELL
(Schneider-Hogeboom)

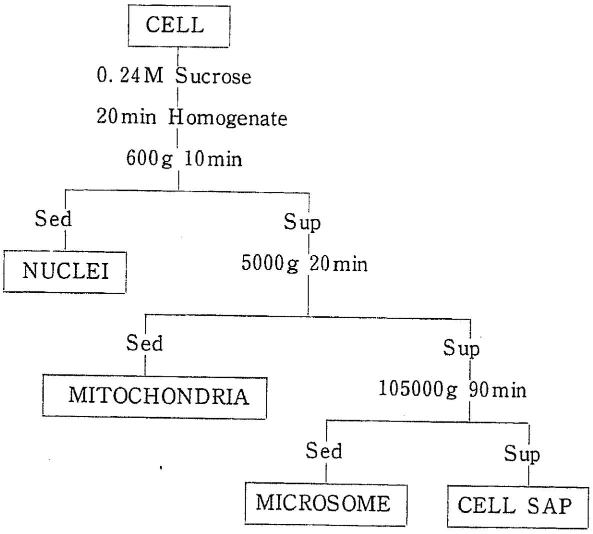



表3　ミトコンドリア分画の LDH アイソザイム

| LDH% | LDH1 | LDH2 | LDH3 | LDH4 | LDH5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 骨肉腫　1 | 9.0 | 10.4 | 52.2 | 20.9 | 7.5 |
| 〃　2 | 8.7 | 9.0 | 53.1 | 20.8 | 8.4 |
| 〃　3 | 8.0 | 9.5 | 51.8 | 21.7 | 9.0 |
| 〃　4 | 9.9 | 10.1 | 50.9 | 19.9 | 9.2 |
| 〃　5 | 7.8 | 9.9 | 52.7 | 21.0 | 8.6 |
| 平均値 | 8.7 | 9.8 | 52.1 | 20.8 | 8.6 |

1）LDH 分画の条件

a）緩衝液：バルビタール緩衝液，PH8.5 μ 0.04

b）寒天ゲルプレート（5×6×0.1cm）0.8%寒天

c）負荷：20mA，20V，180分

染色は下記の反応液にて37℃60分間染色した。

a）0.77M 乳酸ナトリウム液 PH7.4 1ml

b）nitroblue tetrazolium 0.5mg/ml 6ml

c）nicotinamide adenine dinucleotide5mg

d）phenazine methosulfate 1.25mg

染色後脱色固定液（エタノール：水：氷酢酸＝14：5：1）で室温にて60分間脱色固定し，水洗60分後570mμの波長を用いて濃度百分率を求めた。また分画は陽極側より易動の早いものより第1～5分画とした。

2）Al-P isozyme

緩衝液：トリス緩衝液（PH8.6 μ＝0.025）

寒天ゲルプレート（LDH に同じ）

負荷：15mA，250V，240分

染色は基質錠（p－トルイジニウム5－ブロモー3－インドールリン酸32mg含有）を基質用緩衝液（2M－AMP緩衝液，PH10.2）に溶解し，37℃で60分間行なった。反応終了後5%酢酸に1時間浸漬し酵素反応を止め水洗した。

## 実験成績

LDH，Al-P isozyme は共に骨腫瘍組織および培養細胞の核分画，cell sap には全く活性を認めず，ミトコンドリアとマイクロゾームにのみ認められた。且つその isozyme pattern はミトコンドリア，マイクロゾーム共に略々同一であったので，本論文では一括してミトコンドリアに関する成績について述べる。

1　LDH-isozyme について

1）骨肉腫組織

骨肉腫の LDH-isozyme pattern は表3に示す如く，5例共に最大活性値を第3分画に認めその% LDH は50.9～53.1%と非常な高値を示した。また第4分画にも19.9～21.7%の活性値を認めた。（図5）

2）骨巨細胞腫

骨巨細胞腫の LDH-isozyme pattern は表4に示す如く，3例共に陰極側 LDH に活性値の増加を認めた。その最大活性値は第4または第5分画にあり，その%L-

表4 ミトコンドリア分画の LDH アイソザイム

| LDH% | LDH1 | LDH2 | LDH1 | LDH4 | LDH5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 骨巨細胞腫1 | 0 | 13.3 | 25.1 | 29.7 | 31.9 |
| 〃 2 | 0 | 13.8 | 24.9 | 29.8 | 31.5 |
| 〃 3 | 0 | 8.1 | 23.8 | 35.1 | 33.0 |
| 平 均 値 | 0 | 11.7 | 24.6 | 31.5 | 32.2 |

DH は29.7～35.1%を占めた。(図6)

3）骨線維肉腫

2例の骨線維肉腫では第4分画および第3分画にLDH活性の増加を認め，その最大活性値は第4分画にあり，その%LDH は39.3～42.3%を占めた。(表5)(図7)

4）骨細網肉腫

1例の骨細網肉腫では主として第4分更および第5分画にLDH 活性値の増加を認め，第4分画に最大活性値

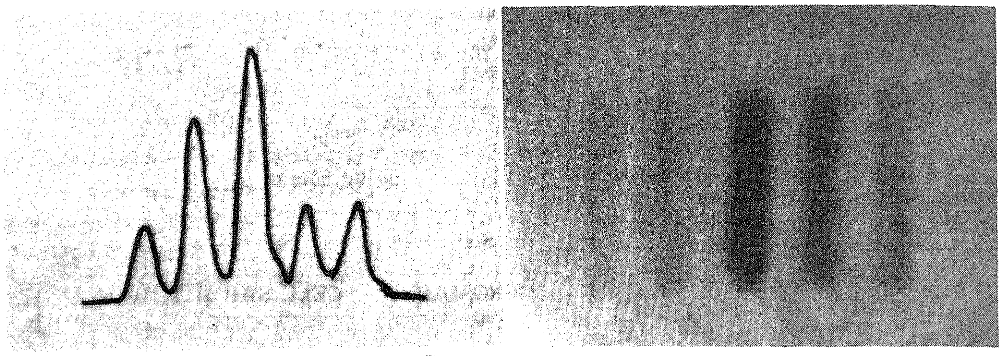



図5 骨肉腫

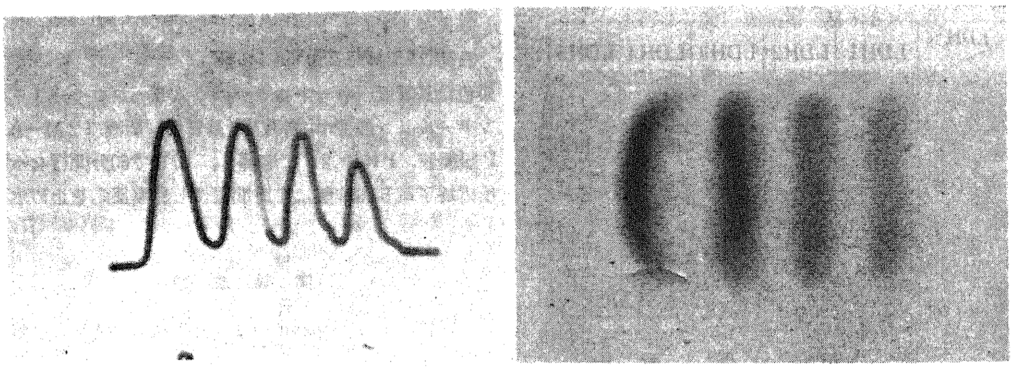



図6 骨巨細胞腫

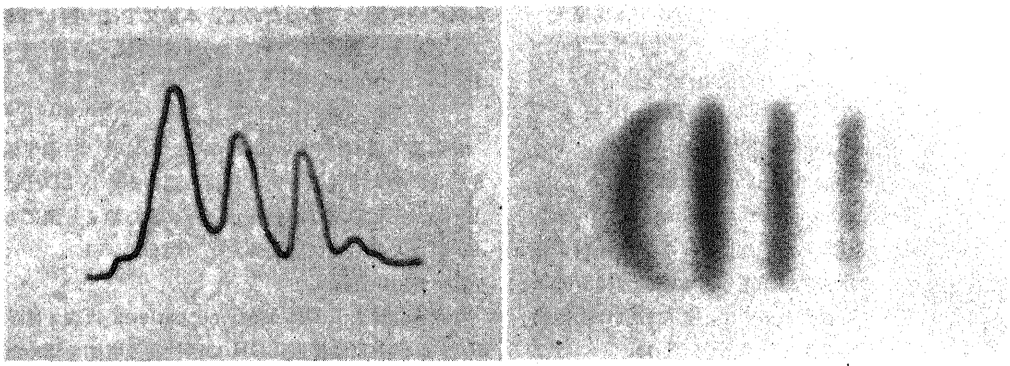



図7 骨線維肉腫

表5　ミトコンドリア分画の LDH アイソザイム

| LDH% | LDH1 | LDH2 | LDH3 | LDH4 | LDH5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 線維肉腫 1 | 4.4 | 19.4 | 32.9 | 42.3 | 1.0 |
| 〃 2 | 5.3 | 20.3 | 33.8 | 39.3 | 1.3 |
| 平 均 均 | 4.8 | 19.8 | 33.4 | 40.8 | 1.2 |

表6　ミトコンドリア分画の LDH アイソザイム

| LDH% | LDH1 | LDH2 | LDH3 | LDH4 | LDH5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 細網肉腫 | 0 | 4.5 | 13.4 | 45.7 | 36.4 |

表7　ミトコンドリア分画の LDH アイソザイム

| LDH% | LDH1 | LDH2 | LDH3 | LDH4 | LDH5 |
|---|---|---|---|---|---|
| OST 細胞 | 0 | 17.5 | 60.0 | 22.5 | 0 |
| $G^1$ 〃 | 0 | 0 | 37.5 | 47.5 | 15.0 |
| FL 〃 | 0 | 0 | 21.7 | 38.1 | 40.2 |

を示した。(表6)(図8)

5）培養細胞（OST 細胞, $G_1$細胞, FL 細胞）骨肉腫由来株化細胞（OST 細胞）は，その最大活性値は第3分画に存在し，約60%を占めた。これに反し，良性骨巨細胞腫由来株化細胞（$G_1$細胞）は陰極側に活性値の増加を認め第4分画に最大活性値を示した。これらの OST 細胞, $G_1$細胞における LDH isozyme pattern は骨肉腫および骨巨細胞腫の原発腫瘍組織と類似していた。(表7)(図9，10)

また，ヒト正常羊膜由来株化細胞（FL 細胞）では最大活性値が第5分画にあり，40.2%を占めていた。(表7)(図11)

なお，マイクロゾームの LDH isozyme 活性値については表8に示す通りである。

2　Al-P isozyme について

ヒト正常羊膜由来の FL 細胞を除いて他の $G_1$ 細胞, OST 細胞，更には骨肉腫，骨巨細胞腫，骨線維肉腫および骨細網肉腫の全てに Al-P 活性を第3分画に認めたが，他の分画には存在しなかった。(図12)

また，FL 細胞では前記のものと異なり，第4分画に活性の存在を認めた。

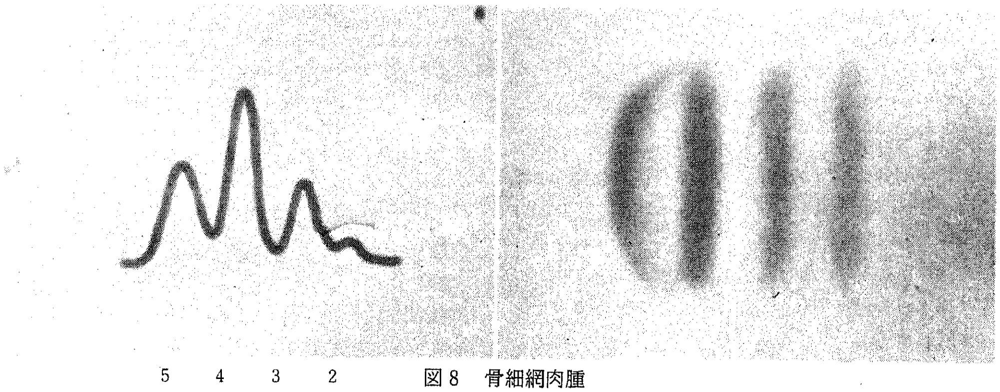



図8　骨細網肉腫

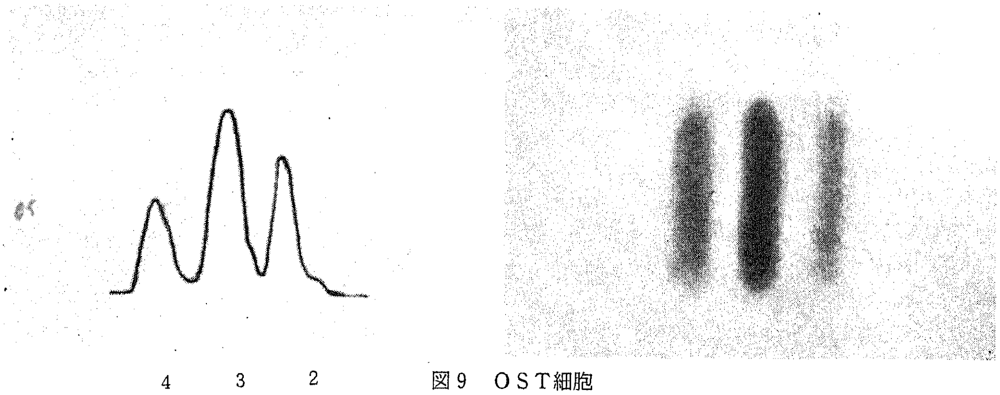



図9　OST細胞

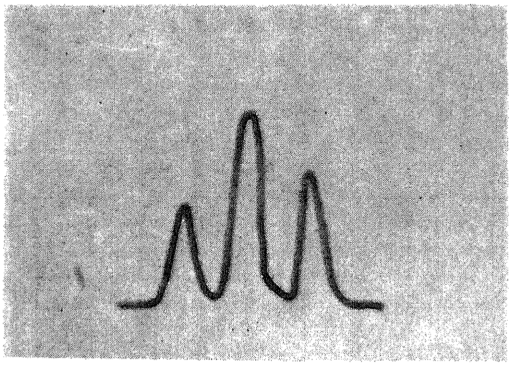
表8 マイクロゾーム分画の LDH アイソザイム

| LDH% | LDH1 | LDH2 | LDH3 | LDH4 | LDH5 |
|---|---|---|---|---|---|
| 骨肉腫1 | 8.9 | 11.0 | 52.4 | 19.8 | 7.9 |
| 〃 2 | 7.5 | 8.6 | 52.0 | 21.5 | 10.4 |
| 〃 3 | 8.3 | 9.0 | 50.5 | 22.1 | 10.2 |
| 〃 4 | 9.7 | 10.3 | 51.5 | 18.5 | 10.0 |
| 〃 5 | 6.9 | 10.1 | 51.1 | 23.4 | 8.5 |
| 骨巨細胞腫1 | 0 | 14.0 | 24.9 | 31.0 | 30.1 |
| 〃 2 | 0 | 13.6 | 25.1 | 29.5 | 31.8 |
| 〃 3 | 0 | 9.8 | 22.0 | 34.9 | 33.3 |
| 線維肉腫1 | 4.9 | 18.5 | 31.6 | 44.0 | 1.0 |
| 〃 2 | 5.6 | 20.2 | 34.0 | 39.1 | 1.1 |
| 細網肉腫 | 0 | 4.0 | 12.9 | 43.3 | 39.8 |

## 考 察

LDH がウシの心臓から結晶として取り出され，1952年 Neilands[15] らが電気泳動的に2分される LDH活性がある事を報じて以来，その異質性が認識される様になった。ついで1957年 Vesell[31] 等はヒト血清をデン粉ブロックで泳動したとき蛋白分画の alb. と $\alpha_1$-glob. との間，$\alpha_2$-glob. および $\beta$-glob. に相当する3カ所にLDHが分離されるのを観察し，更に Sayre と Hill[6] は同年同様な結果を得たと報告している。また同じく1957年 Wieland[34] らはラッテの殆んど全臓器細胞中にL-DH 活性があり，これを濾紙あるいはデン粉電気泳動にかけると通常5つの分画に分けられる事を明らかにし，その後1959年(Wroblewski[36])には各々の分画は臓器が異なっても同一の易動度をもつ事，また5つの分画の分布百分率は臓器によって特有である事を明らかにしている。また同年 Markert[12] らはウシの心筋から得た結晶性 LDH をデン粉ゲル泳動した時5つの蛋白帯に分画されたと述べている。

1960年 Wroblewski[36] らによっても人血清はデン粉ゲル泳動並びに寒天ゲル泳動のいずれの方法によっても



5 4 3

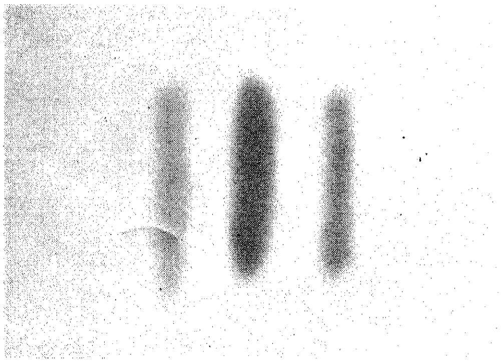
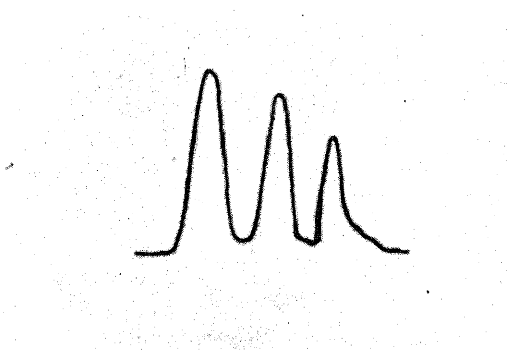


図10 $G_1$ 細胞



5 4 3

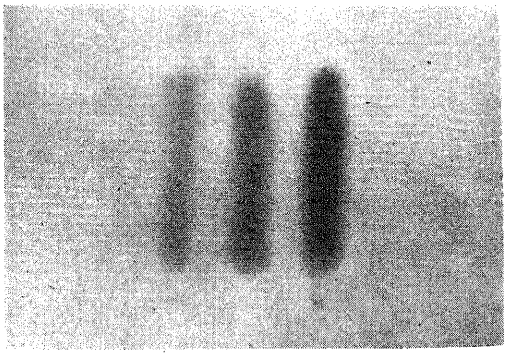
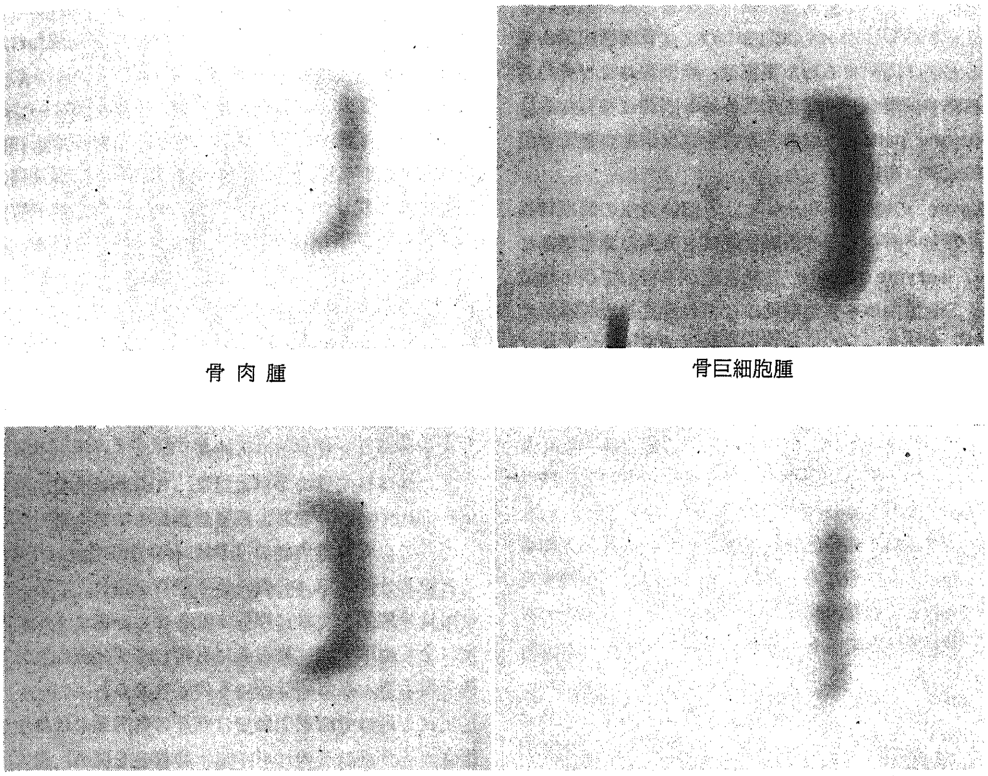


図11 F L 細胞



骨肉腫　骨巨細胞腫

OST 細胞　$G_1$ 細胞

図12

5分画に分けられる事が明らかになった。その後多くの研究者によって，基礎的並びに臨床的報告がなされ，普通電気泳動で陽極へ易動度の早いものから第1～5分画に分けられた。且つ各臓器における LDH isozyme の分布がそれぞれの方法の条件の相違や，泳動までの材料の処理による違いなど異なった条件にも拘わらず赤血球，腎などは明らかに早い易動度をもつ第1分画，第2分画が多く，一方肝や骨格筋は易動度の遅い第4～5分画が大部分を占めているとされて来た。

その後，これらの基礎に基づき人悪性腫瘍組織の LDH isozyme pattern の研究は数多くなされて来たが，1961年 Pfleiderer, Wachsmuth [20] らはヒトの各臓器の年令別の LDH isozyme を調べ，妊娠初期の胎児では各臓器とも LDH 活性は第3分画に最も多いとし，また各腫瘍組織を調べ，各臓器で異なる LDH pattern が癌化に伴ない第4分画および第5分画へと移動してくるとし，1962年 Starkweather [24] 等は悪性腫瘍の LDH isozym は臓器特異性を失い特異的に86.2%の高値で第3分画の上昇が認められたと述べている。1966年栗原も同様の結果を得たと報告している。以上の様に悪性腫瘍の LDH isozyme は第3分画説と陰極側分画説とに2分されている。この様な相違を来たす原因として実験条件が異なるという問題から，更に材料を構成する細胞の不均一性という現段階においてはヒト腫瘍組織を扱う上では避けられない問題があり，これがヒト骨腫瘍となれば尚更困難な事であろう。

従って著者はこれらの問題の一端でも克服する意味で骨腫瘍組織および培養細胞の細胞構築レベルでの LDH isozyme および Al-P isozyme の検索を試み，更に悪性骨腫瘍と良性骨腫瘍との間に異なった LDH isozyme pattern が存在するのか，また全ての悪性骨腫瘍組織は共通した pattern を有するのかという点を考慮して LDH isozyme pattern を検索したのであったが，著者の研究成績で骨肉腫の5例とも第3分画にほぼ50%近くの最大活性値を示したという事実は他の骨腫瘍と異なり，Starkweather [24] および栗原らの説に一致し，また1970年西村[16]が骨肉腫の組織レベルで検索した LDH isozyme の活性値分布に類似する。また，ヒト骨肉

腫由来のOST細胞も第3分画にLDHの最大活性値を認め，そのLDH isozyme patternは骨肉腫組織からのものとほぼ同一であった事実は，症例数および骨肉腫由来細胞が少なかった事より直ちに骨肉腫に特有なLDH isozyme patternであるとは断定出来ないまでも極めて興味深い事実であった。

isozymeの特異性の一つとして個体発生の時期特異性があるといわれている。即ち個体は分化した各臓器に特有のisozyme patternを胎生期から有しているのではなく，胎生期から成熟期にかけての分化過程で次第にpatternを変え，ついに各臓器特有のpatternを示すという事である。前述の如く1961年Pfleiderer and Wachsmuth[20]は各臓器とも胎生3カ月までは第3分画にLDHの主活性があり，その後次第にそのpatternが変化すると述べ，また1964年美濃[13]はembryonic formは第3分画にあるらしいと報告している。

さて悪性腫瘍では分化機能が低下し，いわば胎児組織の様な未分化な状態にあると考えるならば，悪性腫瘍のisozymeもその発生臓器の未分化な状態として現われてくる事が想像出来るものと思われる。

1966年Ono[17]はラット腹水肝癌のLDH isozyme patternでは胎児型から成熟型へと変化するものが多いと報告し，また1970年西村[16]はヒト胎児骨組織のLDH isozyme patternの研究で，胎生2～3カ月の骨組織では第3分画に主活性があり，これが胎生4～5カ月となると第3分画の主活性は陰極側へと変化すると述べ，骨肉腫では胎生2～3カ月のより未分化な胎児骨組織のpatternに類似していたと報告している。著者はヒト胎児骨組織のLDH isozymeについては実験していないため言及する事は出来ないが，美濃[13]，Wachsmuth[20]らの報告などと考え合せ，未だ骨腫瘍の発生起源について不明な事が多い現在，骨肉腫のみが第3分画に最大活性値を示した事実は今後更に検討されるべき課題であろう。

骨巨細胞腫は3例共に第3，4および5分画にLDH活性を示し，その最大活性値は第4または第5分画にあり，西村の良性骨巨細胞腫の所見に類似する。しかし西村は第Ⅲ度骨巨細胞腫の一例は骨肉腫に近いpatternを示し，悪性骨肉腫に移行することを示唆する報告と共に興味ある所見であると述べているが，著者の研究では第Ⅰ～Ⅱ度の骨巨細胞腫3例のみの成績であり，骨肉腫に類似する様なLDH isozyme patternはみられなかった。

また骨巨細胞腫由来$G_1$細胞では第4分画にその最大活性値を示し，第3～5分画にのみLDH活性が存在した事実は，西村の$G_1$細胞における実験成績に一致する。また西村は良性骨巨細胞腫を組織培養すると初代においては，既にLDH isozyme patternに変化が現われ，陰極側LDH isozymeが著明に増加すると述べ，これは構成細胞の変化および細胞が生体から試験管という環境の変化への順応に基づくものと結論しているが，1943年Earle[1]，1943年Gay[4]等が正常体細胞を長期間体外培養すると脱分化及至悪性化するという報告以来数多くの報告がある事からも当然肯定出来る点であるが，著者の$G_1$細胞でのLDH isozyme patternには西村のいう細胞でみられた様な第3分画に主活性をみたという事実はなかった。しかし今後一層の研究によりLDH isozyme patternの変化は良性骨巨細胞腫のin vivoにおける悪性化と悪性化とin vitroにおける悪性化の間に何らかの関連性が存在することを示唆するかも知れない。

また骨線維肉腫の2例は第3，4分画にLDH isozyme patternが存在し，第4分画にその最大活性値があった。この骨線維肉腫のLDH isozyme patternをみると第3分画と第4分画という差こそあれ，そのpatternは骨肉腫のそれに類似するものといえよう。この事実は全く組織学的に異なるにも拘わらず，その臨床的予後を考えると甚だ興味深いものといえる。

更に1例の骨細網肉腫では前記の各腫瘍とは異なり，第4，5分画にそのpatternの存在を認め，最大活性値は約45.7%と第4分画に示した。またFL細胞では第3，4，5分画にほとんどが認められ，最大活性は第5分画に存在した。1964年Goldmann, Kaplan and Hall[5]はmalignant human neoplasmaとbenign tumorを比較してLDHについて述べ，その活性は殆んどの症例でmuscle type LDHにおける絶体的増加と関連していると報告し，これらの変化はtumorのhistological gradeとは関係ないとしている。また近年わが国では1974年大平，荻原ら[19]は癌疾患のLDH isozymeの研究で悪性腫瘍組織はLDHの第3，4，5分画に活性が高く，嫌気代謝の様相を示したが良性腫瘍では殆んど差がないと報告している様に多くの研究者によりそれぞれ意見が異なり，そのLDH isozyme patternから悪性腫瘍を分類するのは未だ多くの問題が残されている。著者の研究成績でも骨肉腫は前述の第3分画説に一致し，骨線維肉腫はこれに類似するが，一方骨巨細胞腫および骨細網肉腫は前者と異なっていたが，はたして悪性腫瘍にはtumor patternともいうべき共通したpatternがあるのかという点に関して，1963年Potter等の正常臓器に近いpatternを示すというminimal devation hepatoma (MDH)に関する報告があり，一方1947年Greensteinは癌では正常母細胞が何んであれ，化学的にはある一定の方向に向けられた変化を示し，一

般に共通の化学的 pattern が存在するとし，これは現在 Greenstein の第1法則と呼ばれている。従って前述の著者の各種骨腫瘍の LDH isozyme の結果も考慮に入れて，悪性腫瘍でもより未分化のもの程 Greenstein の第1法則の様に臓器特異性を失い，それぞれ共通した pattern に近づき，一方分化度の高いものでは MDHの如く正常臓器に近い pattern を示すという事も考えられ甚だ興味深い。

更に著者の実験ではミトコンドリア分画とマイクロゾーム分画に LDH の活性を認めたが核および cell sap には認められなかった。この事実はマイクロゾーム分画を生化学的研究の対象とする場合，分画が均一であるか，また他の分画へと連続するものなのか，更に分別遠心という技術に限界があり，各構造単位に完全に分離することが困難である点より，単に LDH がミトコンドリアとマイクロゾームにあると断定は出来ないが，核および cell sap には存在しなかった。

1924年 Robinson [21] また1929年 Kay [10] が化骨部位における Al-P の高活性を報告して以来，血清 Al-P 活性値が bone activity の高い疾患において上昇するということが知られて来たが，その後1930年 Roberts [22] によりこの酵素は胆道疾患でも上昇する事が報告され，また肝，腎，小腸，胎盤にも証明された。従って，血清の Al-P の増加を直ちに骨由来のものと断定するにはかなりの問題があるが，Al-P の細胞内局在に関して，1947年 Mirsky [14] はリンパ球の分離染色体の分析から染色体の成分として Al-P の存在を報告し，また1952年 Brown はカエルの卵核細胞を集め核液中の酵素について調べ，Al-P がある様であると述べ，1952年 Misky [14] は核中の酵素を調べた結果 Al-P は存在しないと報告し，1953年 Schneider [25] はゴルジ体に Al-P 活性の上昇をみとめ，1954年 Schneider [26] はラッテの副睾丸の分画についてゴルジ体，マイクロゾームに Al-P 活性を高値に認め，同年 Staus [28] もネズミ腎細胞分画にてマイクロゾームに Al-P 活性が高いとし，1956年 Emery [2] は肝細胞核に2種類のフォスファターゼがあり一方は Mgにて活性化されないのが特徴的であるとし，1967年教室の加藤 [9] は $Sr^{89}$ 発癌骨肉腫のミトコンドリア，マイクロゾームに抗原抗体法にて Al-P 活性を示す糖リポ蛋白体を報じている。1968年 Fisherman [3] が癌組織由来の胎盤 Al-P と同じ性質を有する Regan isozyme を報告し，1970年吉田等 [37] は癌性胸膜炎の患者より腫瘍組織由来と推定される Nagaoisozyme を報告して以来 Al-P に関する研究は急速の進歩を遂げ第3分画の Al-P は骨疾患，たとえば Paget 病，骨軟化症，骨肉腫等に認められるとされている。

著者の実験で骨肉腫，骨巨細胞腫，骨線維肉腫，骨細網肉腫，OST および$G_1$細胞のミトコンドリアおよびマイクロゾームの第3分画にそれぞれ Al-P 活性を認めた事実はこれのみで直ちに断定する事は困難であるが一応骨原性由来のものと思推せしめる。

## 結　　論

人骨腫瘍組織および培養細胞の酵素活性を検索し次の結果を得た。

1．LDH および Al-P の活性はミトコンドリアとマイクロゾームに認められた。

2．骨肉腫 LDH isozyme は第3分画に主活性を認めた。

3．骨巨細胞腫 LDH isozyme は第4または第5分画に最大活性を認めた。

4．骨線維肉腫 LDH isozyme は第4分画に最大活性を認め，分画の差はあるものの pattern は骨肉腫のそれと類似していた。

5．骨細網肉腫 LDH isozyme は第4，5分画に強い活性を認め，第4分画に最大活性があった。

6．株化細胞 OST,$G_1$,FL 細胞の LDH isozyme はそれぞれ異なる pattern を示し鑑別可能であった。

7．各骨腫瘍および骨腫瘍由来の OST,$G_1$細胞の Al-P 活性は第3分画に認められ，これらは或る程度骨原性由来のものと推定された。

稿を終えるにあたり，終始御懇篤な御指導，御校閲の労を賜わりました恩師高瀬武平教授に深甚の謝意を表します。また多大なる御教示をいただきました富山県立中央病院整形外科部長山崎安朗博士並びに富山県立中央病院検査部部長波多野茂博士に深甚なる謝意を表します。更に多大な御協力をいただきました富山県立中央病院整形外科医長羽柴秀雄博士並びに富山県立中央病院整形外科医員の諸学兄，並びに富山県立中央病院検査科鈴木郁子氏に深く感謝の意を表します。

## 参 考 文 献

1) **Earle, W. R.,** : J. Nat. Cancer Inst., **4,** 213 (1943).

2) **Emery, A. J., Dounce, A, L.,** : J. Biophy. Biochem. Cytol., **1,** 105 (1956).

3) **Fishman, W. H., Inglis, N. R. Stolbach, L. L. &Krant, M. J.,** : Cancer Res., **28,** 150 (1968).

4) **Gey, G. O.,** : Acta Unio. Internat. Cancrum., **6,** 706(1948).

5) **Goldman, R. D., Kaplan, N. O., & Hall, T. C.,** : Cancer Res., **24,** 389 (1964).

6) **Hill, B. R.,Jordan, R. T.,** : Cancer Res., **17,** 144 (1957).

7) **Hill, B. R., Levi, C., :** Cancer Res., **14,** 513 (1954).
8) **平井秀松, 多賀弘子, 井上和幸, 藤岡小太郎, 井坂英彦 :** 癌の臨床, 8, 588 (1962).
9) **加藤日出治 :** 中部整災誌., **10** 376 (1967).
10) **Kay. H. D. :** Brit. J. Exper. patho., **10,** 253 (1929).
11) **Kay. H. D. :** Brit. J. Exper. patho., **11,** 90 (1930).
12) **Market, C. L., Möller, F. :** Proc. Nat. Acad. Sci., **45,** 753 (1959).
13) **美濃直也:** 第37回日本生化学会総会 (1964).
14) **Mirsky, A. E., Steva, H., Allfreg, V :** J. gen. physiol., **35,** 529 (1952).
15) **Neiland, J. B., :** J. Biol. Chem., **199,** 373 (1952).
16) **西村竝人 :** 日整会誌, **44,** 455 (1970).
17) **Ono, T., Blair, D. G. R., Potter, V. R. & Morris, H. P., :** Cancer Res., **23,** 240 (1963).
18) **Ono, T., :** Gann Mon Monograph. Japanese Cancer Association Cancer Institute, Tokyo, Japan 1, 189 (1966).
19) **大平一郎, 荻島正雄, 松岡継明, 丸山寛迪他 :** 生物物理化学., 18, 209 (1974).
20) **Pfleiderer, G., Wachsmuth :** Biochem. Zschr., **343,** 185 (1961)
21) **Robinson, R, Soames, K. M., :** Biochem. J., 18, 740 (1924).
22) **Roberts, W. M. :** Brit. J. Exper. path., **11,** 90 (1930).
23) **Robert s W. M., :** Brit. Med. J., **1,** 734 (1933).
24) **Starkweather, W. H., Schoch, H. K., :** Biochem. Biophys. Acta., **62,** 440 (1962).
25) **Schneider, W. C., Dalton, A. J., Kuff, E.L. & Felir, M. D., :** Nature., **172,** 161 (1953).
26) **Schneider, W. C. , Kuff, E. L. :** An. J. Anat., **94,** 209 (1954).
27) **Schneider, W. C., Hogeboom, G. H., :** J. Biol. Chem., **183,** 123 (1950).
28) **Straus, W. :** J. B. C., **207,** 744 (1954).
29) **高瀬武平, 山崎安朗, :** 中部整災誌, **7,** 577 (1964).
30) **高瀬武平,** :臨床外科, **9,** 35 (1954).
31) **Vessel, E. S., :** proc. Soc. Exp. Biol. Med., **94,** 96 (1957).
32) **Warbung, O., :** Biochem. Zschr., **142,** 317 (1923).
33) **渡辺甫 :** 日整会誌, **46,** 1063 (1972).
34) **Wieland, T.,, Pfleiderer, G. & Ortuvderl, F. F., :** Biochem. Z., **329,** 112 (1957).
35) **Wieland, T., :** Biochem.Z., **331,** 103 (1959).
36) **Wroblewski, F., :** Enzymes in Clinical Chemistry P., Butter worth., 385 (1962).
37) **吉田光孝, 中山年正, 北村元仕,** :生物物理化学, **15,** 25 (1971).
38) **Zilber, L.A., :** Ann. N. R. Acad. Sci., **101,** 264 (1962).


## Abstract

LDH and Al-p isozyme of human bone tumor tissues and cultured bone tumor cells were investigated on their cell fractions level.

The following results were obtained.

1) On cell fractions level, LDH and Al-p isozyme were recognized in Mitochondria and Michrosome, however they were absent in Nucleus and cellsap.

2) In human osteogenic sarcoma tissues and OST cells (derived from human osteogenic sarcoma) LDH isozyme 3 was increased markedly.

3) The LDH isozyme pattern of human bone giant cell tumor tissues and $G_1$ cells (derived from human bone giant cell tumor) were distributed between LDH isozyme 4 and 5.

4) The LDH isozyme pattern of human bone tumor tissues and cell lines differed from each other.

5) Except FL cells (derived from human amnion membrane) Al-p activity showed in Al-p isozyme 3 in all other cells.