信州医誌，20(2)： 165～ 184，1972

原　著

乳腺疾患における酵素ならびに間質多糖類の組織化学的研究

小　池　綏　男
信州大学医学部第二外科教室（主任：降旗力男教授）

HISTOCHEMICAL STUDIES ON ENZYMES AND STROMAL POLYSACCHARIDES IN THE LESIONS OF BREAST DISEASES

Yasuo KOIKE
Department of Surgery, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director : Prof. Rikio FURIHATA)

Key words：乳腺疾患 (breast disease)，組織化学 (histochemistry)，phosphorylase, lactate dehydrogenase, cytochrome oxidase, leucine aminopeptidase，間質多糖類 (stromal polysaccharide)

緒　言

生体の組織中に存在する酵素を種々の呈色反応によって組織標本の上に現出させ，酵素の局在を明らかにしようとする試みは古くから行なわれてきたが，近年に至り酵素組織化学に関する基礎的な研究が一段と進歩し，この領域の研究はしだいに活発となった。一方，乳腺疾患は日常もっともしばしば認められる外科的疾患の一つであるが，その酵素組織化学的研究としては高野[1]，延藤[2]らの報告のほかにはほとんど見当らない。

著者は最近急速に進歩した酵素組織化学的研究方法を用いて，乳腺疾患における糖質代謝系酵素，蛋白代謝系酵素および間質多糖類について検討を行ない，各種乳腺疾患の病態について考察を加えた。

I　研究対象および研究方法

A　研究対象

1967年から1970年までの4年間に信州大学医学部第二外科において手術を施行した乳腺疾患例の病巣64個を研究対象とした。症例は全例女性で，そのうちわけは表1のごとく乳腺症30個，乳腺線維腺腫17個，乳癌17個である。また，乳腺線維腺腫，あるいは乳癌患者の腫瘤から離れた部位より採取した正常乳腺組織12個を対照とした。

表1　研　究　対　象

対　照（正常乳腺）	12
乳　腺　症	30
乳腺線維腺腫	17
乳　癌	17
合　計	76

B　研究方法

1. 酵素組織化学

手術により切除した乳腺組織を約 0.5×0.5×0.5cm の小組織片とし，これをドライアイスーアセトンで冷却したイソペンタン中に投入して急速に凍結させ，凍結後 −20°C の cryostat の中で，約 15μ の凍結切片を作成し，スライドグラスにはりつけ，5°C の空気中で乾燥させ，以下に記す溶液中に浸漬して各酵素の検索を行なった。

a）Phosphorylase（武内法）[3]

基質液としては，

Glucose-1-Phosphate	50 mg
Adenosin-5-phosphate	10 mg
Acetate buffer (pH 5.7)	10 mℓ
Ethanol	5 mℓ
Glycogen	2 mg
Distilled water	10mℓ

の混合液を用い，これを37° C に温め，この溶液中に組織片を1時間浸漬したのち，とり出して20倍に稀釈した Gram 液中に入れ反応させた。

b) Lactate dehydrogenase (Nachlas 法)[4]

基質液としては，

Sodium lactate (0.5M)	0.6 mℓ
DPN (5mg/mℓ)	0.3 mℓ
Nitro BT (5mg/mℓ)	0.3 mℓ
Phosphate buffer (0.2M, pH 7.4)	1.0 mℓ
Distilled water	0.8 mℓ

の混合液を用い，この溶液中に組織片を入れ，室温で30分間反応させた。

c) Cytochrome oxidase (Burston 法)[5]

基質液としては，

Para-aminodiphenylamine	15 mg
8-amino-1,2,3,4-tetrahydroquinoline	one drop
Tris buffer (0.2M, pH 7.4)	15 mℓ
Ethanol	0.5 mℓ
Distilled water	35 mℓ

の混合液を用い，この溶液中に組織片を入れ，室温で3時間反応させた。

d) Leucine aminopeptidase (Nachlas 法)[6]

基質液としては，

L-leucyl-β-naphthylamide hydrochloride (8mg/mℓ)	1 mℓ
Acetate buffer (0.1M, pH 6.5)	10 mℓ
Sodium chloride (0.85%)	8 mℓ
Potassium cyanide (2×10^{-2}M)	1 mℓ
Diazo blue B	10 mg

の混合液を用い，この溶液を37° C に温め，組織片を1時間浸漬したのち，とり出し，さらに 0.1M $CuSO_4$ 溶液に2分間つけて反応させた。

以上の方法によって反応させた酵素活性の程度を陰性 (−)，弱陽性 (+)，中等度陽性 (卄)，強陽性 (卅) の4段階に分けて検討を行なった。

2. 間質多糖類の組織化学

酵素組織化学に使用した組織の残りの組織片を純アルコール中で一昼夜固定し，パラフィン包埋後，厚さ約4μに薄切して，alcian blue-PAS 重染色 (Vialli-Lison 法)[7] により間質多糖類の検索を行ない，また，Hematoxylin-Eosin 染色により形態学的観察を行なった。

Ⅱ 研究成績

A 酵素組織化学

1. Phosphorylase

本酵素の活性は間質には全く陰性であるが，上皮細胞には種々の程度に陽性を示す。

対照（正常乳腺）においては，表2，表6に示すごとく，9例中2例の中等度陽性例を除いたほかはすべて図1のごとく弱陽性である。なお腺房と腺管とを比較すると，腺管にややつよい活性が認められた。

表 2　対照（正常乳腺）における酵素活性

症例	年令	Phosphorylase	Lactate Dehydrogenase	Cytochrome Oxidase	Leucine Aminopeptidase
1 安藤	26	+	+	+	卅
2 小松（制）	37	+	+	+	卅
3 丸山（由）	37	卄	+	卄	卅
4 松林	40	+	+	+	卅
5 林	43	卄	+	+	卄
6 高井	44	+	+	+	卅
7 田中	46	+	+	+	卅
8 金沢	48	+	+	+	卅
9 荻原	58	+	+	+	卄

（卅：強陽性　卄：中等度陽性　+：弱陽性　−：陰性）

表 3　　乳腺症における酵素活性

症例	年令	Phosphorylase	Lactate Dehydrogenase	Cytochrome Oxidase	Leucine Aminopeptidase
1 上条	24	++	++	++	++
2 衣川	24	+	+	+	++
3 高野	24	++	++	+	++
4 西村	25	++	+	+	+++
5 吉田（さ）	27	+	+	+	++
6 降幡	28	++	++	+	+
7 福島	30	++	++	+	++
8 長沢	32	++	+	++	+++
9 松沢	33	+	+	+	++
10 宮坂（智）	33	++	+	++	+++
11 小松（志）	34	+	++	++	++
12 宮坂（守）	34	++	++	++	+++
13 川久保	37	+	++	+	+++
14 丸山（二）	38	++	+	++	+++
15 丸山（陽）	38	+	++	+	+++
16 宮原	38	+	+	+	+++
17 亀山	39	++	+	+	+++
18 小坂	44	++	+	+++	++
19 五味	44	++	++	+	+++
20 西尾	44	++	+	+	++
21 二木	44	−	++	++	+
22 堀越	44	+++	+	++	++
23 依田	44	++	+	++	+++
24 曽根原	45	+++	+++	+	+++
25 曽根原	45	++	+	+	+++
26 小林（美）	46	+	+	+	++
27 上杉	47	++	++	+	++
28 伊藤	52	++	+	+	+
29 宮下	53	+	+	+	++
30 小林（ま）	61	+	+	+	+

乳腺症30例においては，表3，表6に示すごとく弱陽性10例および中等度陽性（図2）17例である。そのほかには陰性1例，強陽性2例が認められた。乳腺症では形態学的に種々の像が認められるが，著者の症例ではほとんどが腺症であって，このほかには閉塞性乳管増生症および乳頭腫症が小数例にみられた。Phosphorylase 活性は一般に乳頭腫症および腺症の増殖が著しい部分につよい傾向が認められる。

乳腺線維腺腫17例では，表4，表6に示すごとく，phosphorylase 活性はややつよく認められ，13例が図3，4のごとく中等度陽性であって，これが大多数を占め，そのほかには陰性1例，弱陽性1例ならびに強陽性2例が認められた。乳腺線維腺腫の組織型を管内型と管周囲型とに分けて検討すると，表4，表7に示すごとく，phosphorylase に関しては管内型と管周囲型との間にとくに明らかな差異は認められなかった。

乳癌17例においては，表5，表6に示すごとく陰性3例，弱陽性5例，中等度陽性（図5）5例，強陽性4例で，陰性から強陽性までほぼ同数に認められた。乳癌の組織型を乳頭腺管癌，硬性癌，面疱癌の3群に分けて検討すると，表5，表8に示すごとく，乳頭腺管癌では陰性例はなく，弱陽性2例，中等度陽性3例，強陽性1例であって，硬性癌では陰性2例，弱陽性1例，中等度陽性1例，強陽性2例であった。また面疱

表 4　乳腺線維腺腫における酵素活性

	症例	年令	Phosphorylase	Lactate Dehydrogenase	Cytochrome Oxidase	Leucine Aminopeptidase
管内型	1 粟津原	22	++	++	++	+++
	2 安藤	26	++	++	+++	+++
	3 吉田(加)	31	++	+	+	+
	4 青木	36	+	++	++	++
	5 丸山(由)	37	++	+	++	+
	6 松林	40	+++	+	+	−
	7 大月	41	++	++	+	+++
	8 新村	42	++	++	++	+++
管周囲型	9 清水(美)	13	++	+	+	+++
	10 清水(た)	19	++	+	+	+
	11 木野下	27	++	++	++	++
	12 小松(い)	29	++	+	+	+
	13 小松(い)	29	++	+	+	+
	14 立沢	31	−	++	++	++
	15 宮岡	33	+++	+	++	++
	16 沼波	38	++	++	+	−
	17 高井	44	++	++	++	−

表 5　乳癌における酵素活性

	症例	年令	Phosphorylase	Lactate Dehydrogenase	Cytochrome Oxidase	Leucine Aminopeptidase
乳頭腺管癌	1 小松(制)	37	+	+++	++	−
	2 宮原	38	++	++	++	−
	3 林	43	++	+	+	−
	4 小林(美)	46	+	++	+	+
	5 大久保	53	+++	++	+	+++
	6 神田	76	++	+	+	++
硬性癌	7 宮沢	45	+	++	+	−
	8 金沢	48	−	+++	+	−
	9 森	48	−	+++	+	+
	10 古畑	49	+++	+++	++	−
	11 丸山(す)	61	++	++	++	+++
	12 樽沼	73	+++	++	+	−
面疱癌	13 笹谷	38	++	++	++	+
	14 堀越	44	+	+++	++	−
	15 依田	44	+++	++	++	−
	16 荻原	58	−	+++	++	−
	17 山田	60	+	++	++	−

癌では陰性1例，弱陽性2例，中等度陽性1例，強陽性1例であった。すなわち乳癌の組織型と phosphorylase 活性との間には一定の関係は認められなかった。

表 6　各種乳腺疾患の Phosphorylase 活性

	対　照	乳腺症	乳腺線維腺腫	乳　癌
−	0	1	1	3
+	7	10	1	5
++	2	17	13	5
+++	0	2	2	4

表 7　乳腺線維腺腫の組織型と Phosphorylase 活性

	対　照	管内型	管周囲型
−	0	0	1
+	7	1	0
++	2	6	7
+++	0	1	1

表 8　乳癌の組織型と Phosphorylase 活性

	対　照	乳頭腺管癌	硬性癌	面疱癌
−	0	0	2	1
+	7	2	1	2
++	2	3	1	1
+++	0	1	2	1

以上の成績を要約すると，phosphorylase 活性は正常乳腺組織ではほぼ弱陽性であり，乳腺症では弱陽性ないし中等度陽性で，形態学的には乳頭腫症および腺症の増殖が著しい部分に陽性度がつよい傾向が認められる。乳腺線維腺腫においては大部分が中等度陽性であり，乳癌においては陰性から強陽性まで広い範囲にほぼ同数にみられ，その組織型と phosphorylase 活性との間には一定の関係は認められなかった。すなわち，phosphorylase 活性は各疾患の間にとくに明白な差異を示さない。

2. Lactate dehydrogenase

本酵素は一般に実質から離れた間質には微弱陽性か，あるいは陰性に認められ，また，正常乳腺組織の小葉内結合組織に微弱陽性に認められることがあり，乳腺症および乳癌の実質をとりかこむ間質にも実質の酵素活性の程度により弱陽性か，微弱陽性に認められるが，主として上皮細胞に種々の程度に陽性を示す。

対照（正常乳腺）の lactate dehydrogenase 活性は，表2，表9に示すごとく，全例とも弱陽性（図6）で，腺管と腺房との間に phosphorylase 活性の場合ほど明らかな差異は認められなかった。

乳腺症30例においては，表3，表9に示すごとく弱陽性18例，中等度陽性（図7）11例，強陽性1例であり，lactate dehydrogenase は phosphorylase の場合と同様乳頭腫症や腺症の増殖の著明な部分に活性がつよい傾向が認められた。

乳腺線維腺腫17例においては，表4，図9に示すごとく弱陽性8例，中等度陽性（図8）9例で，両者ほぼ半数ずつ認められ，組織型別にみると，表4，表10に示すごとく管内型と管周囲型との間にはとくに差を認めなかった。

乳癌17例においては，表5，表9に示すごとく，弱

表 9　各種乳腺疾患の Lactate Dehydrogenase 活性

	対　照	乳腺症	乳腺線維腺腫	乳　癌
−	0	0	0	0
+	9	18	8	2
++	0	11	9	9
+++	0	1	0	6

表10　乳腺線維腺腫の組織型と Lactate Dehydrogenase活性

	対　照	管内型	管周囲型
−	0	0	0
+	9	3	5
++	0	5	4
+++	0	0	0

表11　乳癌の組織型と Lactate Dehydrogenase 活性

	対　照	乳頭腺管癌	硬性癌	面疱癌
−	0	0	0	0
+	9	2	0	0
++	0	3	3	3
+++	0	1	3	2

陽性2例，中等度陽性9例，強陽性6例であって，lactate dehydrogenase 活性は一般に増強し，大多数が中等度ないし図9のごとく強陽性である。組織型別にみると表5，表11に示すごとく弱陽性の2例は乳頭腺管癌であるが，とくに乳癌の組織型と lactate dehydrogenase 活性との間に明らかな関係は認められなかった。

以上の成績を要約すると，lactate dehydrogenase 活性は正常乳腺ではすべて弱陽性であるが，乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌の順に増強する傾向が認められる。また乳腺症では乳頭腫症や腺症の増殖の著明な部分に活性がつよく，さらに乳腺線維腺腫においては管内型と管周囲型との間に差はなく，乳癌においても組織型による差異は認められない。

3. Cytochrome oxidase

本酵素は実質から離れた間質には陰性であるが，正常乳腺組織の小葉内結合組織に微弱陽性に認められることがあり，乳腺線維腺腫および乳癌の実質をとりかこむ間質にも時として弱陽性に認められることがあるが，主として上皮細胞に種々の程度に陽性を示す。

対照（正常乳腺）では，表2，表12に示すごとく9例中8例が弱陽性（図10）で，他の1例は中等度陽性である。なお腺房と腺管との間には明らかな差異は認められなかった。

乳腺症30例においては，表3，表12に示すごとく弱陽性20例，中等度陽性（図11）9例，強陽性1例である。

乳腺線維腺腫17例においては，表4，表12に示すごとく乳腺症より活性がやや強く，弱陽性8例，中等度陽性（図12）8例，強陽性1例である。これを組織型別にみると，表4，表13に示すごとく管内型と管周囲型との間に明らかな差異は認められない。

乳癌17例においては，表5，表12に示すごとく，乳腺線維腺腫の場合とほぼ同程度の陽性度であって，弱陽性8例，中等度陽性（図13）9例である。これを組織型別にみると，表5，表14のごとく，乳頭腺管癌，硬性癌に比して面疱癌にやや活性の程度がつよい傾向が認められた。

Cytochrome oxidase の組織化学でとくに興味深いことは図14のごとく，乳腺組織全般においては cytochrome oxidase 活性が弱陽性ないし中等度陽性でありながら，その中に時として点状に強陽性を示す部分が認められることである。この点状の強陽性反応は正常乳腺においても，また各疾患においても共に認められるが，とくに乳癌にしばしば認められ，その中で

表12 各種乳腺疾患の Cytochrome Oxidase 活性

	対照	乳腺症	乳腺線維腺腫	乳癌
−	0	0	0	0
+	8	20	8	8
++	1	9	8	9
+++	0	1	1	0

表13 乳腺線維腺腫の組織型と Cytochrome Oxidase 活性

	対照	管内型	管周囲型
−	0	0	0
+	8	3	5
++	1	4	4
+++	0	1	0

表14 乳癌の組織型と Cytochrome Oxidase 活性

	対照	乳頭腺管癌	硬性癌	面疱癌
−	0	0	0	0
+	8	4	4	0
++	1	2	2	5
+++	0	0	0	0

も硬性癌には最も多く認められる。点状に強陽性の部分を強拡大で観察すると図15のごとく cytochrome oxidase 活性は必ずしも上皮系細胞のみに局在するものではないようであるが，この現象には上皮系細胞における cytochrome oxidase の周囲への拡散が関与している如く推測される。ただし，その詳細に関しては明らかでない。

以上の成績を要約すると cytochrome oxidase 活性は正常乳腺ではほぼ弱陽性であるが，乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌では弱陽性ないし中等度陽性に認められ，各疾患の間に明らかな差異は認められない。

4. Leucine aminopeptidase

本酵素は主として上皮細胞に種々の程度に認められ，実質から離れた間質には通常は認められない。上皮細胞につよい活性が認められるさいは小葉内結合組織や実質の周囲の結合組織に認められる。

対照（正常乳腺）においては，表2，表15に示すごとく中等度陽性の2例を除き他の10例はすべて強陽性（図16）である。なお腺房と腺管との間には活性の差異は認められない。

乳腺症30例においては，表3，表15に示すごとく強陽性13例，中等度陽性（図17）13例，弱陽性4例である。なお硬化性腺症では活性の程度が弱いように思われる。

乳腺線維腺腫17例では，表4，表15に示すごとく強陽性から陰性の間に分布し，強陽性5例，中等度陽性（図18）4例，弱陽性5例，陰性3例である。線維腺腫の leucine aminopeptidase 活性を組織型別にみると，表4，表16に示すごとく管内型より管周囲型において活性がやや減弱する傾向が認められた。

乳癌17例においては，表5，表15に示すごとく陰性11例であって，これが大多数を占め，弱陽性3例（図19），中等度陽性1例，強陽性2例である。なお強陽性を示す実質をとりかこむ間質は弱陽性であり，陰性を示す実質をとりかこむ間質のうち1例にのみ弱陽性のものが認められた。乳癌の leucine aminopeptidase 活性を組織型別にみると，表5，表17に示すごとく面疱癌において活性がやや減弱しているようである。

以上の成績を要約すると，leucine aminopeptidase は正常乳腺では強陽性に現われるが，乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌の順に次第に減弱する傾向が認められる。

表15　各種乳腺疾患の Leucine Aminopeptidase 活性

	対照	乳腺症	乳腺線維腺腫	乳癌
−	0	0	3	11
+	0	4	5	3
++	2	13	4	1
+++	7	13	5	2

表16　乳腺線維腺腫の組織型と Leucine Aminopeptidase 活性

	対照	管内型	管周囲型
−	0	1	2
+	0	2	3
++	2	1	3
+++	7	4	1

表17　乳癌の組織型と Leucine Aminopeptidase 活性

	対照	乳頭腺管癌	硬性癌	面疱癌
−	0	3	4	4
+	0	1	1	1
++	2	1	0	0
+++	7	1	1	0

B　間質多糖類の組織化学

Alcian blue-PAS 重染色により間質結合組織の構成々分の一つである多糖類を組織化学的に検討した。

乳腺における間質結合組織の多糖類の性状は月経周期と関係して変化する。そこで月経周期のうち月経中間期に相当する症例を除き，月経前期，月経期，月経後期に相当する症例について検討し，さらに閉経期以後の症例についても検討した。このさい月経前期とは前回の月経終了後18日から次回月経の直前までを含め，月経後期とは月経終了後から7日までを含めた。

まず正常乳腺について述べると，月経期の3例においては小葉内結合組織には alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類がほぼ同程度に認められ，また小葉間結合組織にも alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類がほぼ同程度に認められる。月経後期の3例においては月経期と同様，小葉内結合組織および小葉間結合組織において alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類とがほぼ同程度に認められる。月経前期の3例においては前述の二つの時期と異なり，一般に小葉内結合組織には，図20のごとく alcian blue 陽性の多糖類が主体を占め，小葉間結合組織においては小葉の附近で alcian blue 陽性の多糖類が多いが，小葉から離れるに従って alcian blue の色調が弱くなり，PAS 陽性多糖類と混在するようになる。閉経期の2例においては小葉内結合組織および小葉間結合組織の性状は月経期および月経後期のそれとほぼ同様である。

以上の成績を要約すると，正常乳腺では月経周期と関係して変動するのは主として小葉内結合組織であって，月経前期に小葉内結合組織の alcian blue 陽性多糖類の増加する傾向が認められる。一方，小葉間結合組織においては alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類とが月経周期と関係なく，つねにほぼ同程度に認められる。

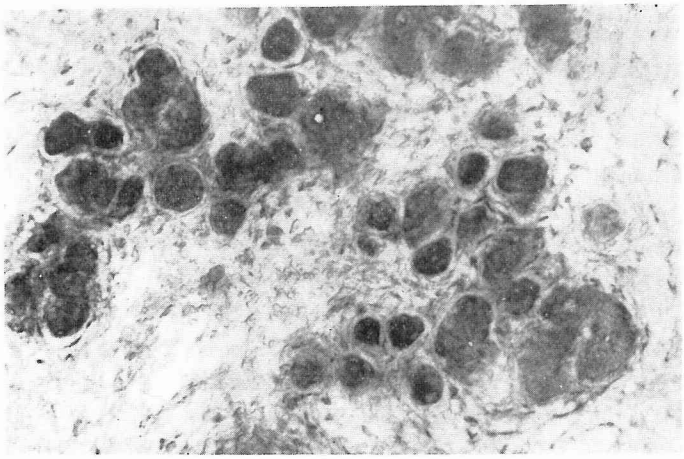


図 1　正常乳腺の phosphorylase
：100×
上皮細胞に弱陽性に出現，間質には陰性

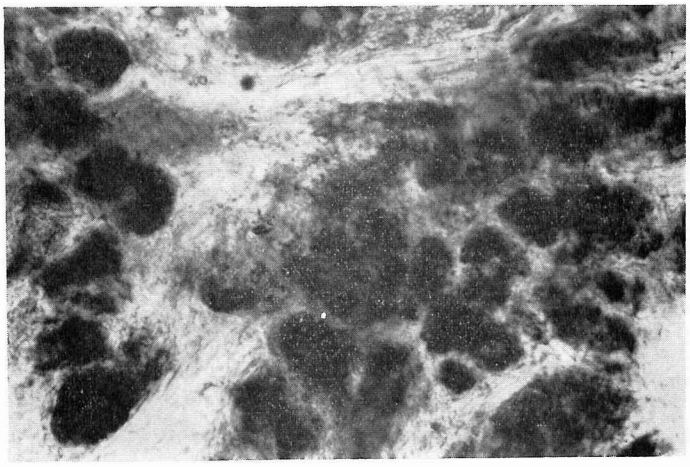


図 2　乳腺症の phosphorylase
：100×
腺細胞に中等度陽性に出現

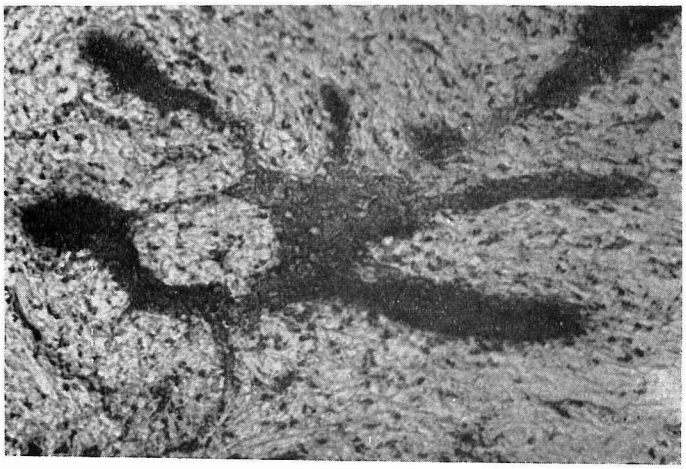


図 3　乳腺線維腺腫（管内型）の phosphorylase　：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

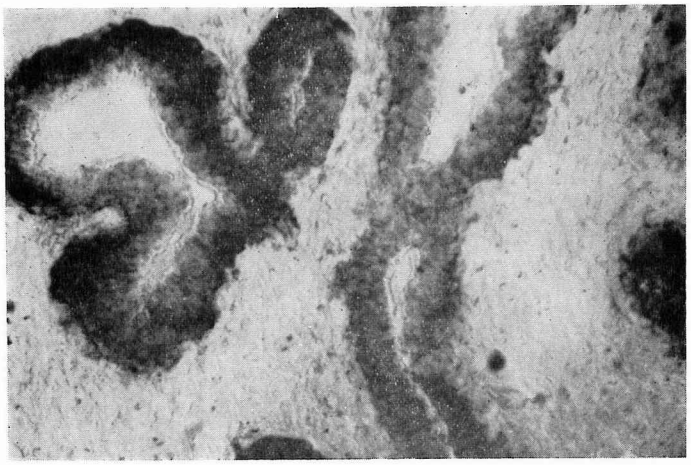


図 4　乳腺線維腺腫(管周囲型)の phosphorylase　：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

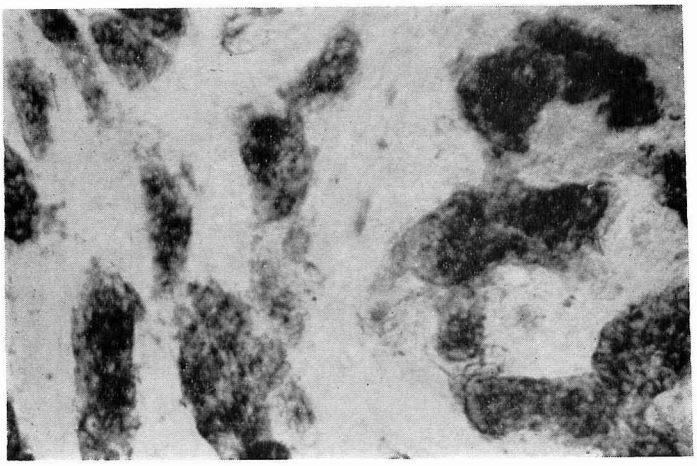


図 5　乳 癌（硬性癌）の phosphorylase　：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

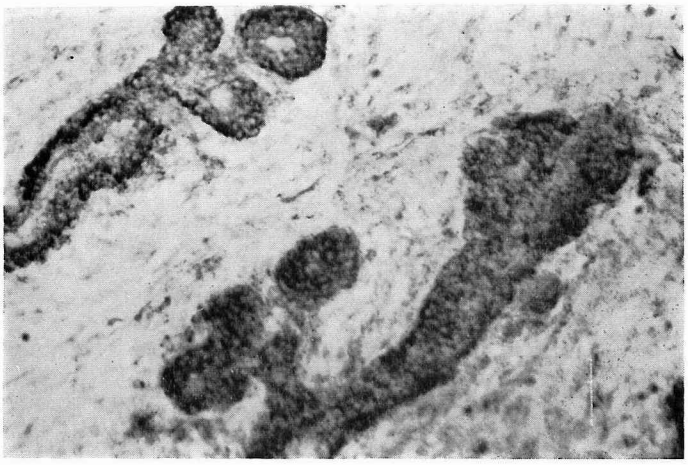


図 6　正常乳腺の lactate dehydrogenase　：100×
上皮細胞に弱陽性に出現

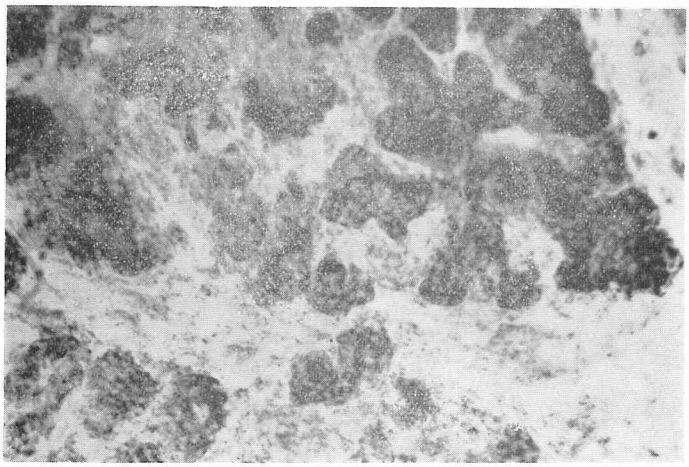


図 7　乳腺症の lactate dehydrogenase　：100×
腺細胞に中等度陽性に出現

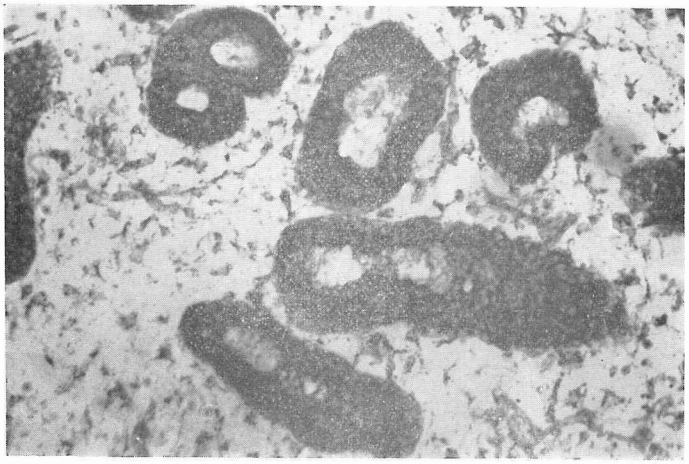


図 8　乳腺線維腺腫(管周囲型)の lactate dehydrogenase　：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

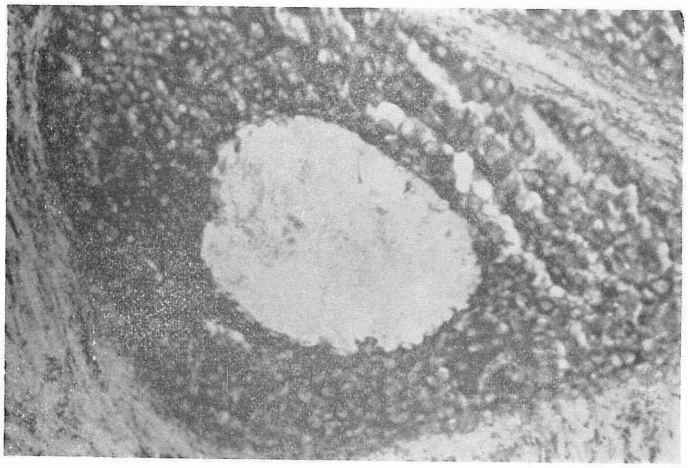


図 9　乳癌（面疱癌）の lactate dehydrogenase　：100×
腫瘍細胞に強陽性に出現

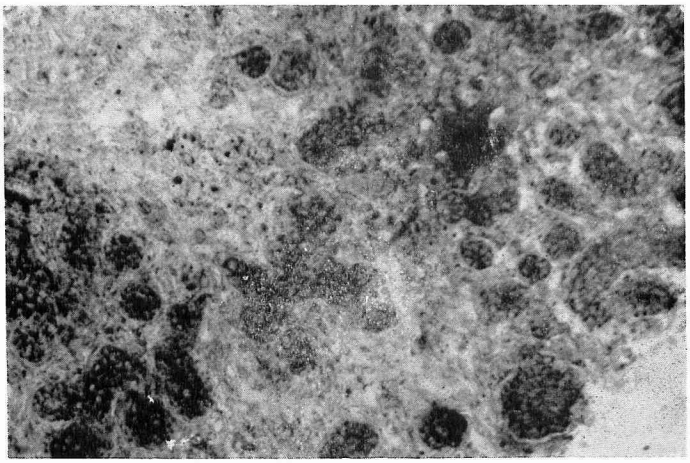


図 10　正常乳腺の cytochrome oxidase　：100×
上皮細胞に弱陽性に出現

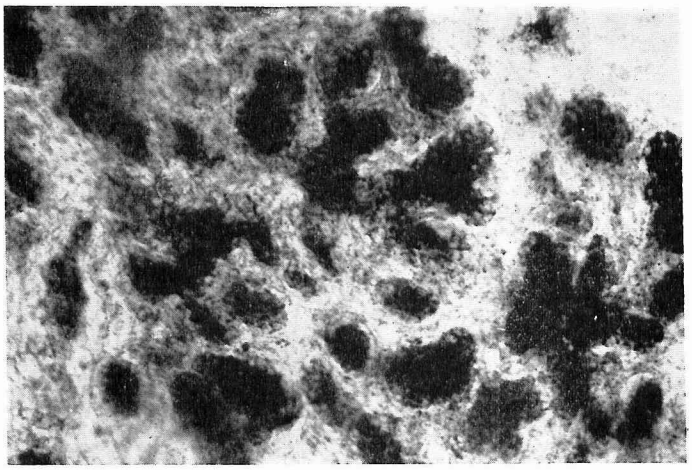


図 11　乳腺症の cytochrome oxidase　：100×
腺細胞に中等度陽性に出現

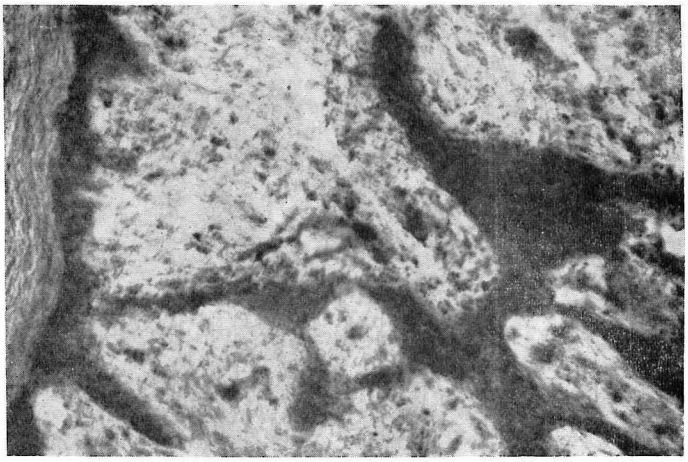


図 12　乳腺線維腺腫（管内型）の cytochrome oxidase　：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

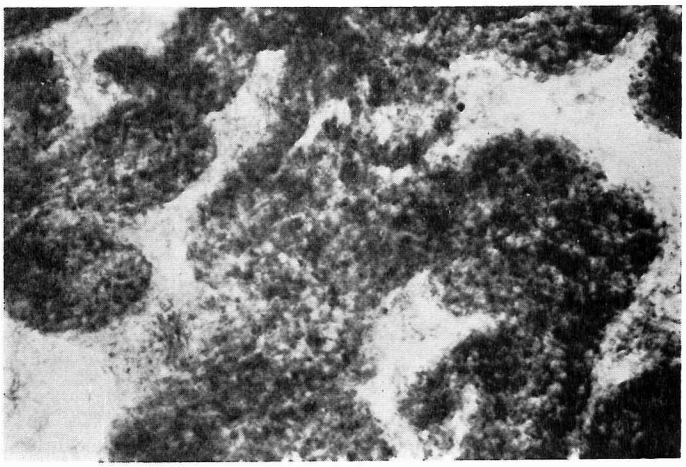


図 13　乳癌（管状腺癌）の cyto-chrome oxidase
：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

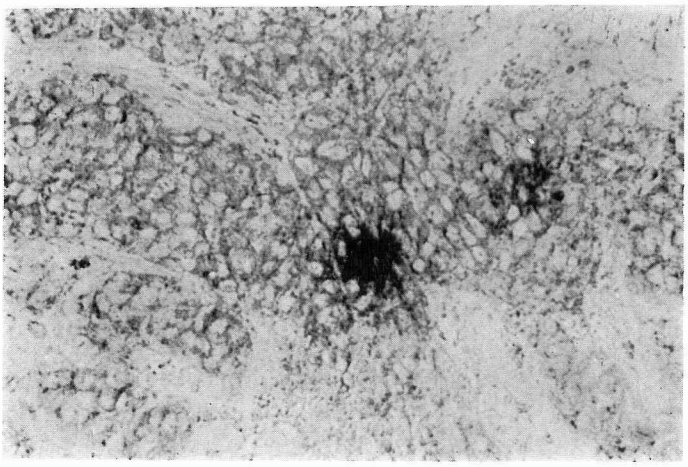


図 14　乳癌（管状腺癌）の cyto-chrome oxidase
：100×
腫瘍細胞に弱陽性に出現その中に点状に強陽性の部分が認められる



図 15　点状に強陽性を示す cyto-chrome oxidase の強拡大
：400×

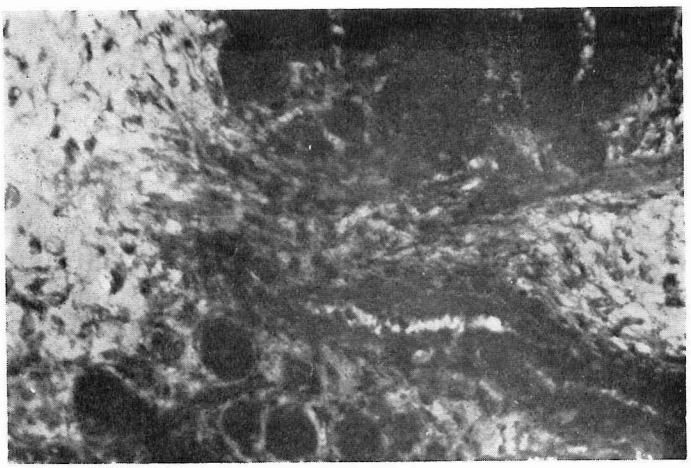


図 16　正常乳腺の leucine aminopetptidase　：100×
上皮細胞に強陽性に出現，間質に弱陽性

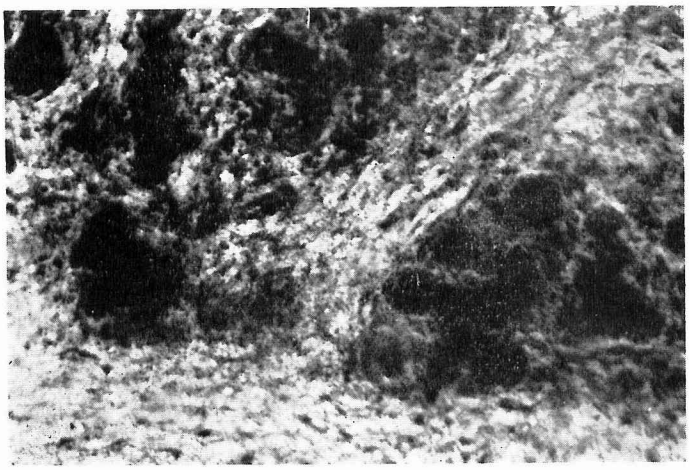


図 17　乳腺症の leucine aminopeptidase　：100×
腺細胞に中等度陽性に出現

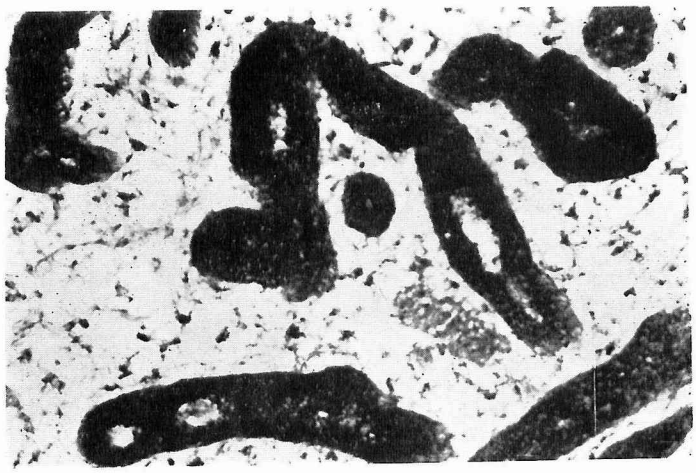


図 18　乳腺線維腺腫(管周囲型)の leucine aminopeptidase　：100×
腫瘍細胞に中等度陽性に出現

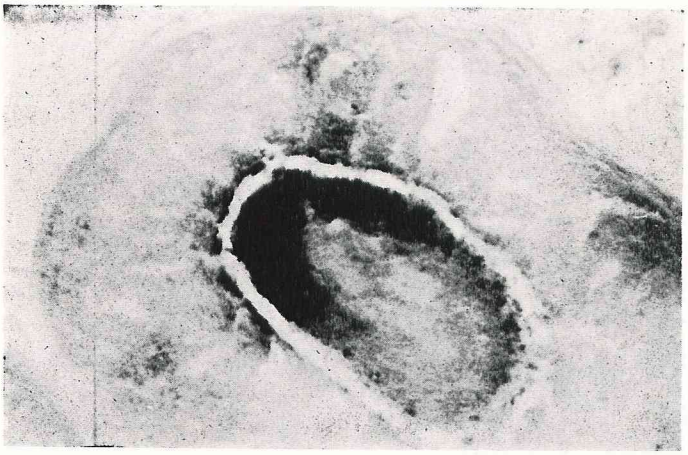


図 19　乳癌（面疱癌）の leucine aminopeptidase ：100×
腫瘍細胞に弱陽性に出現



図 20　正常乳腺月経直前期の間質多糖類　　：400×
小葉内結合織に alcian blue 陽性多糖類が主体を占めている

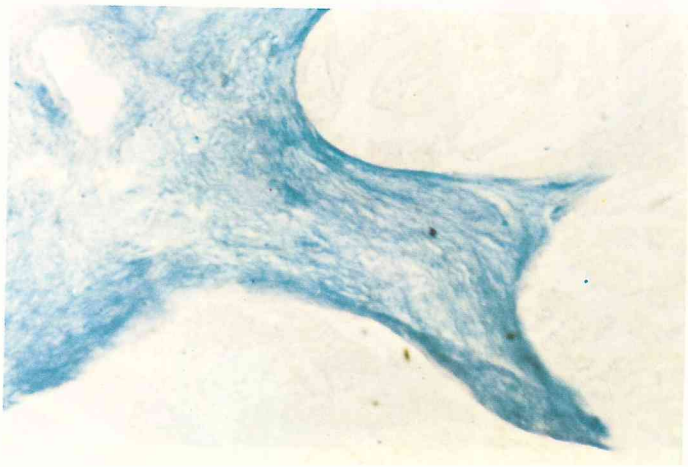


図 21　乳癌の間質多糖類 ：100×
癌巣周囲の結合織は alcian blue 強陽性を示す。この所見は癌発育の先端部にとくに顕著である

乳腺症においては月経期の3例では小葉内結合組織にはalcian blue陽性多糖類がPAS陽性多糖類より多く認められ，小葉間結合組織にはalcian blue陽性多糖類とPAS陽性多糖類とがほぼ同程度に認められる。月経後期の10例では月経期とほぼ同様に小葉内結合組織にはalcian blue陽性多糖類がPAS陽性多糖類より多く認められるが，小葉間結合組織にはalcian blue陽性多糖類とPAS陽性多糖類がほぼ同程度に認められる。月経前期の8例では一般に小葉内結合組織および小葉間結合組織にalcian blue陽性多糖類とPAS陽性多糖類がほぼ同程度に認められる。閉経期の3例では一般に小葉内結合組織および小葉間結合組織にalcian blue陽性多糖類とPAS陽性多糖類とがほぼ同程度に認められる。すなわち乳腺症における間質結合組織の性状は正常乳腺のそれと異なり，月経期および月経後期には小葉内結合組織にalcian blue陽性多糖類が増加し，月経前期にはむしろalcian blue陽性多糖類とPAS陽性多糖類とがほぼ同程度に混在することが明らかとなった。

乳腺線維腺腫においては，管内型と管周囲型との間には明らかな差異は認められず，一般に腫瘍細胞の周囲にはalcian blue陽性多糖類が多く，腫瘍細胞から離れるに従ってPAS陽性多糖類が増加する傾向が認められる。しかしながら，時としてalcian blue陽性多糖類とPAS陽性多糖類とが同程度に混在していることもある。以上述べた乳腺線維腺腫の結合組織の性状は月経周期の影響を受けることなく一定している。

乳癌においては，一般に癌巣周囲の結合組織はalcian blue強陽性を示し，癌巣から離れるに従ってalcian blueの陽性度は減少し，PAS陽性多糖類が増加する傾向が認められる。alcian blue強陽性の所見は図21のごとく癌発育の先端部にとくに著明である。以上述べた乳癌における間質結合組織の性状は月経周期と関係なく一定している。

以上の成績を要約すると，乳腺の間質結合組織のうち月経周期と関連して変化するのは，主として正常乳腺と乳腺症における小葉内結合組織であって，しかも正常乳腺では月経前期においてalcian blue陽性多糖類が増加するのに対して，乳腺症ではむしろ月経期および月経後期においてalcian blue陽性多糖類が増加する。また，乳腺線維腺腫および乳癌においては月経周期と関係なく，腫瘍組織周辺に常にalcian blue陽性多糖類が増加し，この傾向はとくに乳癌の浸潤先端部において著しい。

Ⅲ 考　察

糖質は生体のエネルギー源として重要なものであるが，それが分解される場合には幾多の中間産物を経て，ピルビン酸となり，酸素の供給が充分であれば，CO_2 と H_2O になる。これが組織呼吸である。一方，酸素の供給の乏しい場合にはピルビン酸から乳酸が作られることになる。この過程が解糖作用であって，酸素の供給が全くない条件下で行なわれる解糖作用を嫌気的解糖作用といい，酸素供給の充分な条件下で行なわれる解糖作用を好気的解糖作用という。解糖作用，とくに好気的解糖作用は癌組織に特徴的なエネルギー代謝とされている[8)9)]。

著者は乳腺症ならびに乳腺腫瘍における糖質代謝に関与する諸酵素のうちphosphorylase, lactate dehydrogenase, cytochrome oxidase, について組織化学的に検索を行なった。

現在，glycogenの合成機転としては二つの経路が証明されている。第一はglucose-1-phosphateから2段階の酵素作用，すなわちphosphorylaseとbranching enzymeの作用によりglycogenが合成されるというもの，第二はuridine diphospho-glucose (UDPG) にUDPG-glycogen transferaseが作用し，その後さらにbranching enzymeが作用してglycogenが合成されるというものである。しかしながら，生体内でのglycogenの合成はUDPG系のみによって行なわれ，その分解はphosphorylase系によって行なわれるという[10)]。

Phosphorylaseを組織化学的に証明しようとする場合には上記の第一の過程すなわち，phosphorylaseがglucose-1-phosphateに作用して α-1,4-polyglucoseを合成する過程を利用したものであって，その実際の手技は武内[3)11)]らによって完成された。その後武内一派をはじめ多数の人々により人体組織におけるphosphorylaseの存在が証明され[12)13)14)15)16)]，また各種腫瘍組織におけるphosphorylase活性の変化も証明されている[17)18)19)]。著者は武内[3)]らの方法を用いて各種乳腺疾患のphosphorylase活性を検討した。

著者の成績においては，phosphorylase活性は正常乳腺では9例中7例が弱陽性で，中等度陽性は2例のみであった。乳腺症では弱陽性から中等度陽性のものが大多数を占めるが，乳頭腫症および腺症の増殖の著

明な部分に活性度のつよい傾向がみられた。乳腺線維腺腫は中等度陽性が大部分で，管周囲型と管内型との間に特別の差異は認められなかった。この成績は武内[17]，木下[18]，森[20]らの成績とほぼ一致している。

乳癌における著者の成績では，phosphorylase 活性は陰性から強陽性までの種々の段階にほぼ同数に認められたが，この成績は武内[17]，木下[18]らの成績と多少異なる。すなわち武内[17]，木下[18]らは乳癌では同一の癌組織中に陽性の部分と陰性の部分とが共に存在している所見を認めているが，著者の症例におけるような検索癌組織の全体にわたって全く陰性であった症例は認めていない。著者は phosphorylase の検出に際して血行遮断時間，組織切片の採取部位および大きさ等に注意して検索を行なったので，技術上の誤りはないものと考えているが，乳癌の3例に phosphorylase 活性の陰性例を認めたことから，乳癌の中には小数ながら phosphorylase 活性の陰性例が存在するものと考えている。なお，これら3例においては lactate dehydrogenase および cytochrome oxidase 活性は陽性であった(表5)。また，乳癌を乳癌研究会規約[21]に従って三つの組織型，すなわち乳頭腺管癌，硬性癌，面疱癌に分けて検討したが，組織型と phosphorylase 活性との間に一定の関係は認められなかった。

Phosphorylase の検出にヨード法を用いた場合，合成された α-1,4-polyglucose のブドウ糖結合鎖の長さによって色調が異なり，連鎖が長いほど青色調がつよく，連鎖が短いほど赤色調がつよくなるとされているが[22]，著者の成績では各種乳腺疾患において色調が青色から紫紅色まで認められ，疾患による差異は明らかでなかった。以上のごとく，phosphorylase 活性は各種乳腺疾患の間にとくに明白な差異を示さなかった。

Lactate dehydrogenase は解糖過程の最終段階に関与し，乳酸とピルビン酸との間の反応を触媒する酵素であって，助酵素を必要とし，糸粒体と可溶性細胞成分との両方に存在し，生体のほとんどすべての細胞に分布する[20]。本酵素は種々の臓器において組織化学的に研究されており[23][24]，その活性は悪性腫瘍においてとくに増加することが知られている[25][26]。

著者が乳腺疾患において組織化学的に検索した成績によれば，lactate dehydrogenase 活性は主として上皮細胞に認められ，一般に実質から離れた間質には微弱陽性か，あるいは陰性に認められ，また，正常乳腺組織の小葉内結合組織に微弱陽性に認められることがあり，乳腺症および乳癌の実質をとりかこむ間質にも実質の酵素活性の程度により弱陽性あるいは微弱陽性に認められた。本酵素活性は，正常乳腺ではすべて弱陽性であるが，乳腺症ならびに乳腺線維腺腫ではともにほぼ同程度に増強している。一方，乳癌においては明らかにその活性が増加しているが，この成績は前述の Warburg[8][9]の学説を裏付けるものと考えられる。ただし，癌の組織型と活性の強さとの間には一定の関係はみられなかった。

以上の乳癌における実質の成績は，高野[1]，延藤[2]らの報告とほぼ一致している。しかし，間質について高野[1]は微弱陽性から陰性であると述べ，延藤[2]は軽度ないし中等度陽性であると報告し，著者の成績と多少異なる見解を述べている。いずれにしても，乳癌における lactate dehydrogenase 活性は乳癌の組織型とは関係ないものである。間島[27]，梶谷[28]らによれば，乳癌においては乳頭腺管癌は比較的予後が良く，硬性癌，面疱癌の予後は不良であるとされているが，lactate dehydrogenase 活性は乳癌の組織型とは関係ないことより，lactate dehydrogenase 活性の程度と癌の悪性度との間には関係がないものと考えられる。

Cytochrome oxidase は，Warburg によって Atmungsferment または Sauerstoffübertragendes Ferment と命名されたが，本酵素はまた indophenol blue を形成するので，indophenol oxidase または Nadi oxidase とも呼ばれている。本酵素は図22に示すごとく TCA サイクルにおいて遊離した水素イオン，あるいは電子を O_2 まで運搬し，H_2O にする過程に関与する酵素である[10][20]。本酵素に関しては古く

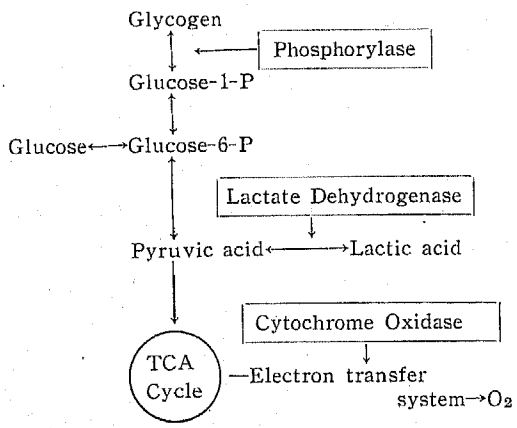


図22　糖質代謝系路と酵素

から多くの研究があり[29)30)31)]，また最近組織化学的に証明しようとする試みもなされて来た[32)33)34)]。

著者は Burstone 法[5)]を用いて乳腺疾患の cytochrome oxidase 活性を検索した。その成績によれば本酵素活性は正常乳腺ではほぼ弱陽性であるが，乳腺症，乳腺線維腺腫および乳癌では弱陽性ないし中等度陽性に認められた。

Burstone[35)]，Hannibal[36)]らによれば，一般に悪性腫瘍においては cytochrome oxidase 活性は低下するといわれているが，著者の乳癌の成績では正常乳腺組織あるいは良性乳腺疾患より低下するという所見は認められなかった。他の解糖系酵素とくに lactate dehydrogenase 活性は乳癌では，他の乳腺疾患と比較して明らかに増加しているが，cytochrome oxidase 活性は乳癌においても乳腺症，あるいは乳腺線維腺腫とほぼ同程度に認められ，その間にとくに差異を認めなかったことは乳癌における特徴的な所見の一つといえよう。

著者の cytochrome oxidase に関する成績で興味深い所見は，各種乳腺組織において，弱陽性あるいは中等度陽性を示すなかに時として点状に強陽性を示す部分が認められ，乳癌にもっともしばしば認められたことである。この部分を強拡大で観察するとその呈色反応は上皮系細胞のみでなく，その周囲へ拡散しているごとくであるが，その詳細の解明は今後の研究に待ちたい。

Leucine aminopeptidase は蛋白質や peptide の末端 peptide 結合のみに作用して，その水解を行なう酵素の一種である[37)]。Gomori[38)]が aminopeptidase の有色性物質として glycine と leucine の naphthylamine 化合物を用いて以来，次第にこの方面の組織化学的研究と比色定量が行なわれるようになった。現在のところ aminopeptidase の意義について二つの代表的な考え方がある。その一つは Burstone[39)40)41)]らの主張する蛋白分解説で，aminopeptidase は結合組織の基質に存在し，線維芽細胞には認められず，また腫瘍組織においては，腫瘍増殖に対する間質反応として形成された結合組織を融解する作用を有するものと考えられる。他の一つは Monis[42)41)]らの線維形成説で，aminopeptidase は線維芽細胞に存在するので，再生組織における線維形成と関係があるという考え方で，腫瘍組織においては腫瘍の増殖に対する間質形成に際して認められるという説である。腫瘍間質は同一部位に同時に蛋白融解現象と線維形成が行なわれる可能性があるから，これを単一に解釈することは困難であろうが，leucine aminopeptidase 活性は一般に間質結合組織に認められることが多く，たとえば教室の石田[25)]の甲状腺組織における研究によれば，leucine aminopeptidase 活性は甲状腺の疾患とは関係なく，間質結合組織の増生の著しい部分に陽性であって，濾胞上皮細胞においては大多数が陰性であるとされている。しかしながら，著者が Nachlas 法[6)]を用いて乳腺疾患における leucine aminopeptidase 活性を検討した結果では，本酵素活性は主として上皮細胞に陽性で，その上皮細胞における活性がつよい場合に，これに接する間質に陽性を示すことが観察された。したがって，乳腺組織と甲状腺組織とでは leucine aminopeptidase の局在部位に相違があると考えられる。

さて著者の成績によれば，正常乳腺では多くは強陽性であるが，乳腺症では強陽性例と中等度陽性例が相半ばし，乳腺線維腺腫では強陽性から陰性の間に分布し，乳癌では多くが陰性であった。すなわち，leucine aminopeptidase は主として上皮系細胞に存在し，正常乳腺では強陽性であるが，乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌の順に次第に減弱する傾向が認められ，とくに乳癌では大多数が陰性であった。

以上の成績は，石田[25)]の甲状腺疾患における成績と比較して明らかに異なる成績であって，leucine aminopeptidase 活性は臓器によってその局在部位が異なることを示すものであろう。

つぎに著者は Vialli-Lison 法[7)]を用いて各種乳腺疾患の間質多糖類について検討した。間質多糖類は酸性と中性の2群に分けられ，酸性多糖類はすべて高重合をしており，その構造上の単位はヘキソウロン酸の1分子と hexosamine 1分子が glycoside 結合を行なっている。一方，中性多糖類の構造上の単位は acetylglucosamine と糖で作られた2糖類である[43)]。

著者は Vialli-Lison 法[7)]により酸性多糖類を alcian blue で染色し，中性多糖類を PAS で染色した。正常乳腺では月経前期には小葉内結合組織に alcian blue 陽性の多糖類が比較的多く認められたが，その他の時期には alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類とがほぼ同程度に混在して認められた。Dieckmann[44)]によれば，月経直前期には小葉内結合組織は疎になって浮腫状を呈するが，月経中間期にはもとにもどるという。また久留[45)]，Ozzello[46)]によれば，乳腺の小葉内結合組織は性周期と共に変化するが，小葉間結合組織は不変であるという。著者の成績において

も月経周期に従って変動するのは小葉内結合組織における alcian blue 陽性多糖類，すなわち酸性多糖類であることが明らかとなった。

乳腺症においては正常乳腺と逆の関係が認められた。すなわち，月経周期と最も関係の深い小葉内結合組織についてみれば，月経前期には正常乳腺では alcian blue 陽性多糖類が多く認められたが，乳腺症では alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類とがほぼ同程度に混在して認められた。また，そのほかの時期においても，正常乳腺では alcian blue 陽性多糖類と PAS 陽性多糖類とがほぼ同程度に混在して認められるのに反して，乳腺症では alcian blue 陽性多糖類が多く認められた。月経周期による小葉内結合組織の性状が正常乳腺と乳腺症とで逆の変化を示すことは乳腺症が性ホルモンの異常と密接な関係のもとに発生することとあわせ考えまことに興味ある事実であって，乳腺症における小葉内結合組織の性状の変化が乳腺症の病変形成の上になんらかの役割を果しているものと考えられる。

乳腺線維腺腫ならびに乳癌における間質結合組織の性状は月経周期とは関係なく一定しているが，この事実はこれら結合組織が腫瘍発育に伴って形成されたものであって，性ホルモンの影響下にないことを示すものであろう。また乳癌の浸潤先端部においてとくに alcian blue 陽性多糖類が多いことは他の癌における所見とも一致するものであって，横山[47]，増田[48]らも胃癌において同様の所見を観察している。

結　論

信州大学第二外科において取り扱った各種乳腺疾患について，糖質代謝系ならびに蛋白代謝系に関与する酵素および間質多糖類の組織化学的研究を行ない，以下の結果を得た。

1. Phosphorylase 活性は上皮細胞に認められ，正常乳腺ではほぼ弱陽性，乳腺症では大部分が弱陽性ないし中等度陽性，乳腺線維腺腫では大多数が中等度陽性，乳癌では陰性から強陽性まで巾広く認められた。すなわち，phosphorylase 活性は各種乳腺疾患の間にとくに明白な差を示さない。

2. Lactate dehydrogenase 活性は主として上皮細胞に認められ，正常乳腺ではすべて弱陽性で，疾患別には乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌の順につよくなる傾向があり，乳癌においては活性が明らかに増加している。

3. Cytochrome oxidase 活性は主として上皮細胞に認められ，正常乳腺ではほぼ弱陽性で，乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌では弱陽性ないし，中等度陽性に認められ，各種乳腺疾患の間にとくに差を示さない。

4. 以上の糖質の代謝に関連した酵素を組織化学的に観察した場合，とくに明白な差を示すものは lactate dehydrogenase である。

5. Leucine aminopeptidase 活性は主として上皮細胞に認められ，正常乳腺では強陽性であるが，乳腺症，乳腺線維腺腫，乳癌の順に次第に減弱する傾向があり，とくに乳癌においては大多数が陰性である。

6. 間質多糖類のうち，月経周期と関係して変動するものは，小葉内結合組織の alcian blue 陽性多糖類であって，この多糖類は正常乳腺では月経前期に増加するのに反して，乳腺症では月経期および月経後期に増加する。

乳腺線維腺腫および乳癌では，月経周期とは関係なく腫瘍細胞周辺に常に alcian blue 陽性多糖類が増加し，とくにこの傾向は乳癌の癌浸潤先端部において著しい。すなわち，間質多糖類の態度は乳腺症と乳腺腫瘍とでは明らかに異なる。

（本論文の要旨は，昭和43年11月11日第9回日本組織細胞化学会総会において発表した。）

文　献

1) 高野晃寧：乳腺腫瘍の酵素組織化学的研究，癌の臨床，13：92－108，151－159，1967
2) 延藤栄男：乳腺腫瘍の酵素組織化学的研究，岡山医誌，77：251－266，267－286，1965
3) 武内忠男，東　国弘，木下謙治：フォスフォリラーゼ（Phosphorylase）の組織化学的証明法についての補遺，熊本医会誌，29：補冊 4，565－571，1955
4) Nachlas, M. M., Walker, D. G. and Seligman, A. M.: A histochemical method for the demonstration of diphosphopyridine nucleotide diaphorase, J. biophys. biochem. Cytol., 4: 29－36, 1958
5) Burstone, M. S.: Modifications of histochemical techniques for the demonstration of cytochrome oxidase, J. Histochem. Cytochem., 9: 59－65, 1961
6) Nachlas, M. M., Crawford, D. T. and Selig-

man, A. M.: The histochemical demonstration of leucine aminopeptidase, J. Histochem. Cytochem., 5 : 264－278, 1957

7) Vialli and Lison：高橋登，多糖類の染色法，臨床検査，7：213－216，1963より引用

8) Warburg, O. et al.：Über den Stoffwechsel der Karcinomzelle, Biochem. Z., 152 : 309－344, 1924

9) Warburg, O.：Über die Wirkung von Blausäureäthylester (äthylcarbyramine) auf die Pasteurshe Reaktion, Biochem. Z., 172 : 432－441, 1926

10) 武内忠男，清水信夫，小川和朗編集：酵素組織化学，P 187－189，168－170，朝倉書店，東京，1967

11) 武内忠男，栗秋秀雄：フォスフォリラーゼの組織化学的証明法について，東京医事新誌，71：519－522，1954

12) 武内忠男，東　国弘，綿貫専二郎，木下謙治：フォスフォリラーゼの組織化学的研究(第三報)，本酵素の臓器組織内分布について，東京医事新誌，72：191－193，1955

13) 武内忠男，綿貫専二郎：フォスフォリーゼの組織化学的研究（第四報），再び本酵素の臓器組織内分布についての追加，東京医事新誌，72：301－302，1955

14) 武内忠男，木下謙治：フォスフォリラーゼの組織化学的研究（第五報），血液塗抹標本における血球フォスフォリラーゼの証明について，東京医事新誌，72：355－356，1955

15) 武内忠男，小早川史郎，木下謙治：フォスフォリラーゼの組織化学的研究（第八報），胎児諸臓器のフォスフォリラーゼ反応について，東京医事新誌，73：279－281，1956

16) 武内忠男，木下謙治，田所　巽：フォスフォリラーゼの組織化学的研究（第十報），炎症組織におけるフォスフォリラーゼ反応について，東京医事新誌，73：709－710，1956

17) 武内忠男，木下謙治，小早川史郎：フォスフォリラーゼの組織化学的研究（第九報），腫瘍組織におけるフォスフォリラーゼ反応について，東京医事新誌，73：282－284，1956

18) 木下謙治：腫瘍組織における Amylophosphorylase 反応について，医学研究，27：1689－1731，1957

19) 武内忠男：酵素反応からみたグリコーゲン代謝の形態学的研究，日本病理会誌，55：35－57，1966

20) 森　昌彦：腫瘍酵素組織化学，P 328－329，342－353，366－368，医学書院，東京，1966

21) 乳癌研究会編：乳癌取扱い規約，金原出版，東京，1967

22) Swanson, M. A.：Studies on the structure of polysaccharides, J. biol. Chem., 172 : 825－837, 1948

23) 河島隆男，竹本　茂，吉田　宏，島谷信人，中村正人，西山　瑩，竹内鬼三郎，延藤栄男，清藤　敬，緒方卓郎：人の胃の組織化学的研究，第Ⅱ編脱水素酵素活性について，日消病会誌，62：1641－1646，1965

24) 小杉豊治：正常および関節炎滑膜における糖代謝の酵素組織化学的研究，阪大医誌，19：269－278，1967

25) 石田康雄：各種甲状腺腫における酵素並びに多糖類の組織化学的研究，信州医誌，18：24－46，1969

26) Monis, B., Nachlas, M. M. and Seligman, A. M.：Histochemical study of 3 dehydrogenase system in human tumors, Cancer, 12 : 1238－1247, 1959

27) 間島　進，吉田弘--：乳癌治療の遠隔成績，外科診療，10：170－175，1968

28) 梶谷　鐶，久野敬二郎，木下　巌，深見敦夫：乳癌の治療成績，外科治療，21：219－226，1969

29) Schneider, W. C., Claude, A. and Hogeboom, G. H.: The distribution of cytochrome c and succinoxidase activity in rat liver fractions, J. biol. Chem., 172 : 451－458, 1948

30) Slater, E. C.：The measurement of the cytochrome oxidase activity of enzyme preparations, Biochem. J., 44 : 305－318, 1949

31) Smith, F. G. and Stotz, E.：A colorimetric method for the determination of cytochrome oxidase, J. biol. Chem., 179 : 891－902, 1949

32) Burstone, M. S.：New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase), J. Histochem. Cytochem., 7 : 112－122, 1959

33) Oda, T., Okazaki, H. and Seki, S.：New me-

thods for the histochemical and cytochemical demonstration of cytochrome c oxidase and of cytochrome c-cytochrome oxidase system, Acta Med. Okayaya, 12 : 302−309, 1958

34) 要　明雄：Cytochrome Oxidase の組織化学的検出法の新変法とその検討，阪大医誌，18 : 551−571, 1966

35) Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of cytochrome oxidase with new amine reagents, J. Histochem. Cytochem., 8 : 63−70, 1960

36) Hannibal, M. J., Nachlas, M. M. and Seligman, A. M. : Histochemical localization of cytochrome oxidase in human tissues and neoplasms, Cancer, 13 : 1008−1016, 1960

37) 安斉哲郎：Leucine Aminopeptidase について，最新医学，16 : 87−91, 1961

38) Gomori, G. : Chromogenic substrates for aminopeptidase, proc. soc. Exp. Biol. Med., 87 : 559−561, 1954

39) Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of proteolytic activity in human neoplasms, J. nat. Cancer Inst., 16 : 1149−1161, 1956

40) Glenner, G. G., Burstone, M. S. and Meyer, D. B. : A study of aminopeptidase activity in the stroma of neoplastic tissue, with a comparison of histochemical techniques, J. nat. Cancer Inst., 23 : 857−873, 1959

41) 森　昌彦，岡本次郎：Aminopeptidase の組織化学，臨床病理，10（4）: 256−260, 1963

42) Monis, B., Nachlas, M. M. and Seligman, A. M.: Study of leucine aminopeptidase in neoplastic and inflammatory tissues with a new histochemical method, Cancer, 12 : 601−608, 1959

43) Lison, L. : 今泉正訳，組織化学および細胞化学，P 292−306，白水社，東京，1954

44) Dieckmann, H. : Über die Histologie der Brustdrüse bei gestörtem und ungestörtem Menstruationsablauf, Virchow's arch. Path. Anat., 256 : 321−356, 1925

45) 久留　勝：乳腺腫瘍図譜，P 131−132，中山書店，東京，1962

46) Ozzello, L. et al. : The mucopolysaccharides in the normal and diseased breast. Their distribution and significance, Am. J. Path., 34 : 993−1010, 1958

47) 横山寿雄：胃癌の粘液多糖類と悪性度に関する組織化学的研究，久留米医誌，30 : 1465−1477, 1967

48) 増田　博：人体胃癌の酸性多糖類について，久留米医誌，28 : 1451−1472, 1965

(1972. 7. 18 受稿)