

酵素抗体法による胃癌組織内 collagenase の検索

岡山大学医学部第一外科学教室（指導：折田薫三教授）

筒井保太

（昭和59年2月2日受稿）

Key words : 胃癌, collagenase,
酵素抗体法

胃癌が発育進展するとき、あるいは潰瘍が進行、治癒するときには病巣及び病巣周囲の間質結合織はそれに伴い崩壊する一方、増生もしてくる。この間質の変化は、結合織崩壊に働く因子と増生に働く因子の均衡によっている。結合織崩壊の因子の中で最も重要なものの一つとして、生理的条件下で collagen 分子を特異的に分解する collagenase があげられる。浸潤しつつある癌の先進部では、癌細胞より分泌された collagenase を主とする蛋白分解酵素が間質を破壊し、その間隙を癌細胞が拡がって行くと考えるのが妥当であろう。すでに胃癌浸潤と collagenase の関連について、胃癌組織各部の collagenase 活性を計測し、癌先進部で最も活性が高く、胃癌の進展に collagenase が関与しているとの報告がある^{1,2)}。しかし、その collagenase が胃癌細胞から分泌されているのかという最も興味ある疑問に答えることはできていない。

著者は collagenase 抗体を作製し、免疫組織学的方法（酵素抗体法）を用いて、胃癌組織内における collagenase の局在を検索した。その結果 collagenase は間質側に多く存在するが、癌細胞内にも存在することを確認した。また胃癌を組織型別、深達度別、浸潤様式別等に分類し、各組織での collagenase の局在を検索し、これらの結果や他の報告をも含めて、胃癌の進展に collagenase がどのように関与しているのか考察した。更には対照組織として正常ヒト皮膚、胃潰瘍、大腸癌を検討し、各組織における collagenase の局在と免疫学的組織特異性の有無も検討した。

実験材量および方法

1. 抗 collagenase 抗体の作製

1) 正常ヒト皮膚の組織培養

collagenase は Eisen ら³⁾の方法に従いヒト皮膚を組織培養して抽出した。すなわち乳房切断時に入手した正常ヒト皮膚をただちに無菌操作下に皮下組織を削除し、5 mm²の皮膚120片を作製したのち、Limbro の7.5ml 用組織培養プレートに皮膚1片と培養液3 ml を入れ培養した。培養液は Dulbecco's modified Eagle's medium にペニシリン100 iu/ml、ストレプトマイシン100 μg/ml を加えて使用した。培養は5% CO₂にて行い、培養液を24時間ごとに回収して新しい培養液に交換し、この操作を7日間くりかえした。

2) collagenase の精製

collagenase の精製は Bauer ら⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち、回収した培養液はまず50,000 g にて30分超遠沈し、上澄み分画を大量の蒸留水で24時間透析したのち凍結乾燥した。このようにして得た乾燥末を0.005M CaCl₂含有0.05M Tris-HCl (pH 7.5) に溶解し、50% 硫酸と反応させ、10,000g、15分の遠沈を3回くりかえした。沈殿物を0.005M CaCl₂含有0.05 M Tris-HCl (pH 7.5) 10ml に溶解し、大量の同緩衝液にて72時間透析を行った。次に Amicon 社製 Diaflomembrane UM10 を使用し、1 ml まで圧濃縮を行った。これを Sephadex G150 を使用してゲル濾過し、各分画の蛋白濃度と collagenase 活性を測定した(図2)。これらの操作はすべて4°Cにて行った。

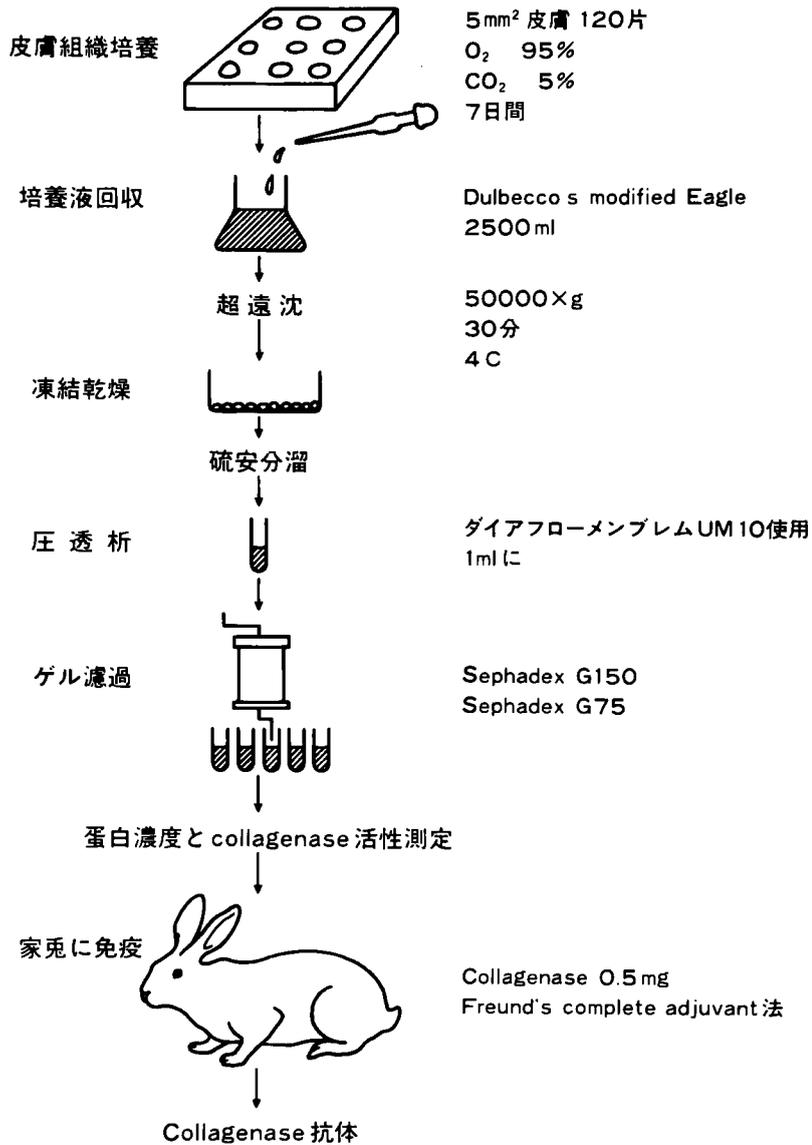


図1 Collagenase 抗体の作製法

3) collagenase 活性の測定

まず ¹⁴C をラベルした再生 collagen 線維を作製した³⁾。これを基質としてゲル濾過液と 37°C 3 日間培養し、上澄み分画中に遊離した ¹⁴C を液体シンチレーションカウンターにて測定したものを collagenase 活性とした。

4) collagenase の免疫

collagenase 活性の高い Fraction 19, 20, 21

(図2) を集め再度 Sephadex G75 にてゲル濾過し、最も蛋白量の多い Fraction 11 (図3) を collagenase 抗原として免疫に使用した。免疫は 3 kg の雄ウサギに 0.5 mg の上記精製ヒト皮膚 collagenase を Freund's complete adjuvant 法にて 1 週間隔で 2 回施行し、その 2 週後に booster を注射し、さらに 1 週後に採血して抗体を得た。

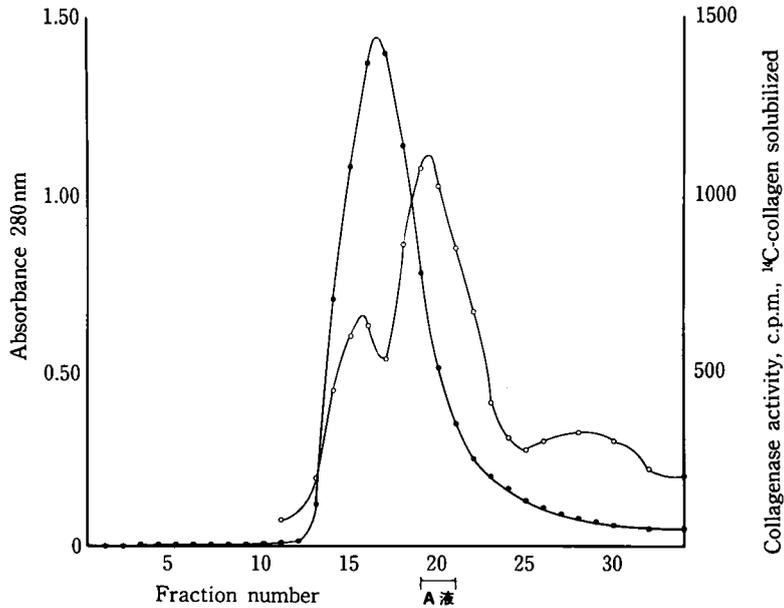


図2 Sephadex G150によるヒト皮膚 collagenase のゲル濾過。カラム1.2cm×100cm, 流速10.5 ml/h, 1管3.5 ml. ●—● 280 nm における吸光度, ○—○ collagenase 活性。

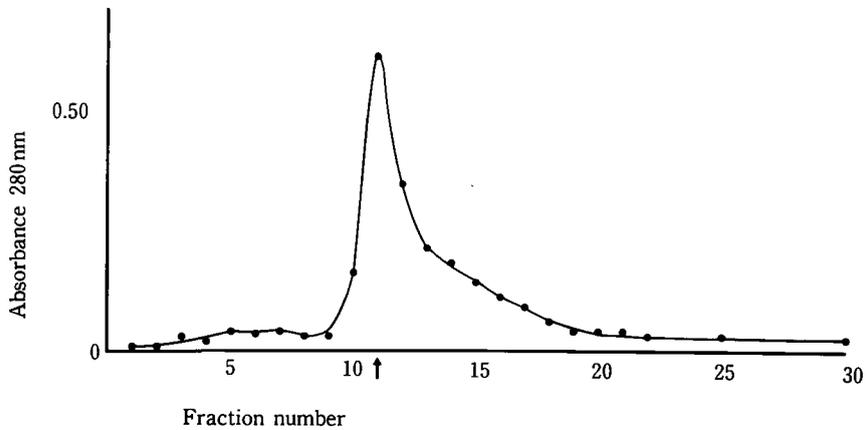


図3 Sephadex G75によるA液の再濾過。カラム0.9cm×60cm, 流速6 ml/h, 1管1.5ml.

5) collagenase 抗原と collagenase 抗体の検出
精製した抗原が collagenase であることを証明するため、抗原と再生 collagen 線維を24時間培養し、上澄み液を永井の方法⁵⁾に従ってディスク電気泳動にかけた。その結果 collagen 分子が collagenase によって分解された時特異的

に現われる α^A , β^A バンドを認めた (図4)。

作製した抗体は Ouchterlony 法にて collagenase 抗原と10倍希釈まで1本の沈降線を示した (図5)。このようにディスク電気泳動と Ouchterlony 法にて抗原と抗体の純度を確認した。

2. 酵素抗体法による組織 collagenase の染色

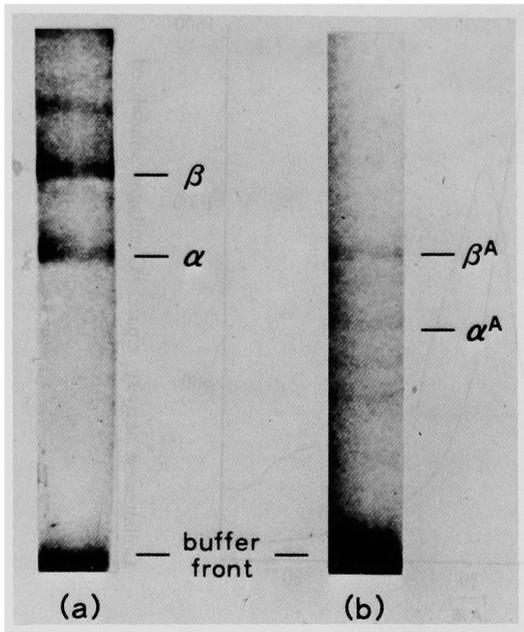


図4 ディスク電気泳動

- (a) control: 再生 collagen 線維
 (b) reaction mixture: 再生 collagen 線維と collagenase 液との培養後の上澄み液, collagenase による分解産物 α^A , β^A バンドを認める。

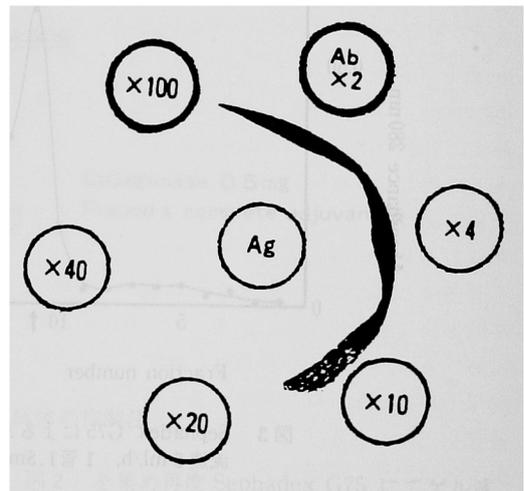
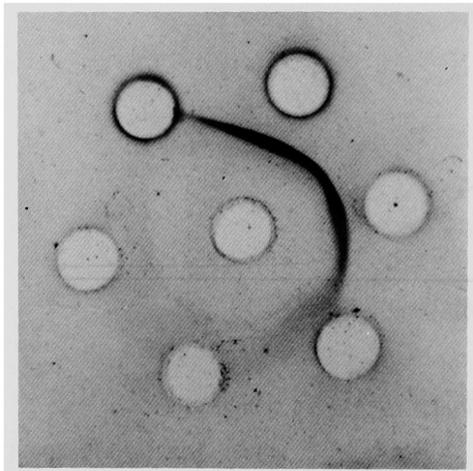


図5 Ouchterlony 法, Ag, 精製ヒト皮膚 collagenase. Ab $\times 2$, 抗ヒト皮膚 collagenase 血清の2倍希釈液, $\times 4$, 抗ヒト皮膚 collagenase 血清の4倍希釈液。

症例には岡山大学第1外科と岡山済生会病院にて切除された胃癌52例, 大腸癌2例, 胃潰瘍2例, 正常皮膚1例を用いた。組織の固定は10%ホルマリンにて行い, 切片はパラフィン包埋

ブロックを使用した。一次血清である collagenase 抗体は全血清を用いた。二次血清は富士臓器製の HRP 標識抗ウサギ 1 g G ヤギ血清を使用し, 酵素抗体法間接法にて染色した。内因性 peroxidase は Isobe⁶⁾の方法に従い, 5 mM 過ヨウ素酸と 3 mM 水酸化ホウ素ナトリウム水溶液にて消去した。核染色はヘマトキシリン, 発色は 3-3' DAB-H₂O₂ にて行った。酵素抗体法では求める抗原は褐色に染色されるが, 染色されているものが collagenase であると判定するために, 一次血清を種々変えて染色し対照とした。すなわち①免疫前に採取しておいた正常ウサギ血清, ② collagenase 抗原で吸収した抗 collagenase 血清, ③ PBS のそれぞれを一次血清に用いて染色したものを陰性対照とし, collagenase 陽性か陰性かの判定を行った。

実験成績

1. 胃癌組織内における collagenase

1) 癌中心部での胃癌細胞内 collagenase
 前述の一次血清を変えて染色した陰性対照と比較することにより, 癌中心部での胃癌細胞内 collagenase の染色度を陽性と陰性とに分けた。

表1 組織型別による胃癌細胞内 collagenase 陽性率

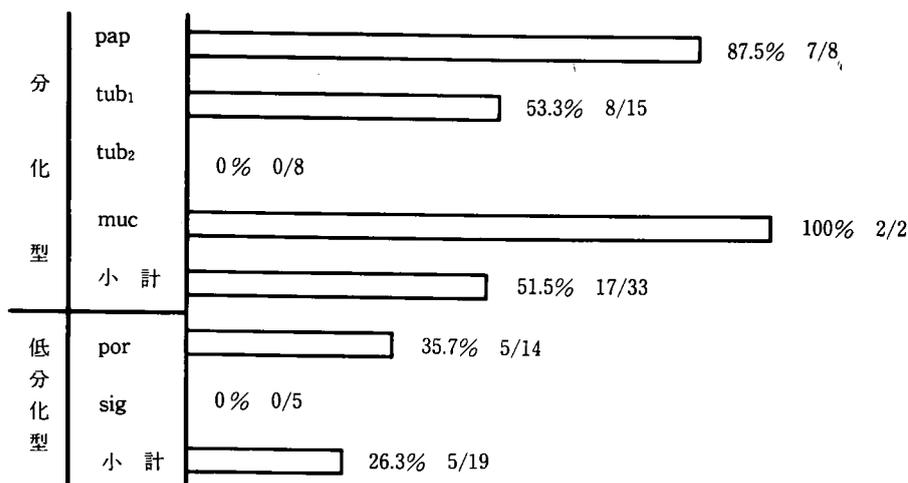
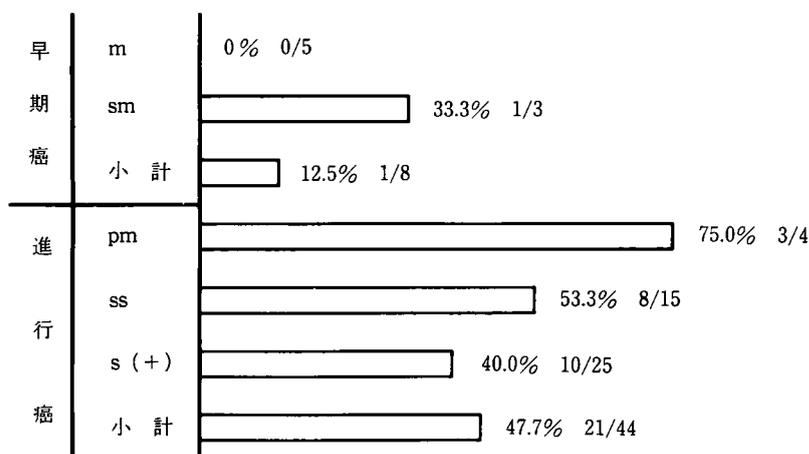


表2 深達度別による胃癌細胞内 collagenase 陽性率



そして癌細胞の2/3以上が染っていれば陽性例とし、それ以下ならば陰性例としたが、ごく少数例を除いて、陽性例はほぼ全ての癌細胞が陽性を呈していた。対象例胃癌52症例を組織型、深達度、肉眼分類、浸潤様式、間質量別に分類し、それぞれでの癌細胞内 collagenase 陽性率を検討した。

a) 組織型と癌細胞内 collagenase : 癌中心部における predominant な組織型をその症例の組織型とした。そして predominant な組織型を呈している癌細胞が染色されており、上記判定基準を満していれば陽性とした。組織分類は胃癌取扱い規約⁷⁾に基いた。papillary adeno-

carcinoma (pap), well differentiated tubular adenocarcinoma (tub₁), moderately differentiated tubular adenocarcinoma (tub₂), mucinous adenocarcinoma (muc) を分化型胃癌、poorly differentiated adenocarcinoma (por), signetringcell carcinoma (sig) を低分化型胃癌と分類すれば、分化型胃癌は33例中17例(51.5%)が陽性であり、低分化型胃癌は19例中5例(26.3%)が陽性であった。このように癌細胞内 collagenase 陽性例は分化型胃癌の方に多い傾向があった(表1)。

b) 壁内深達度と癌細胞内 collagenase : 深達度別に m 癌, sm 癌, pm 癌, ss 癌, それに癌

表3 肉眼分類による胃癌細胞内 collagenase 陽性率

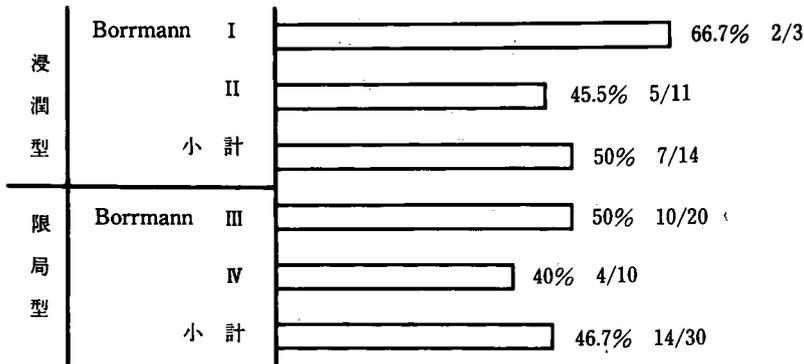


表4 浸潤様式別による胃癌細胞内 collagenase 陽性率

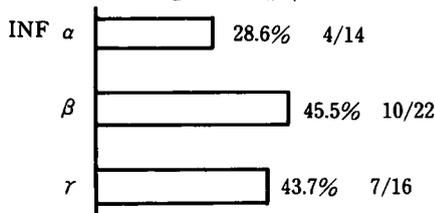
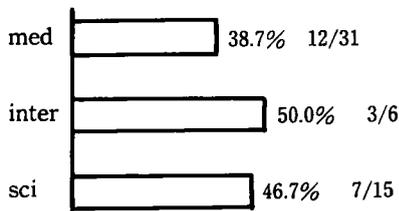


表5 間質量別による胃癌細胞内 collagenase 陽性率



が漿膜表層面に達している s(+)
癌とに分類し、それぞれの癌細胞内 collagenase 陽性率を検討した(表2)。sm までの早期癌は 8 例中 1 例のみが陽性であり、陽性率は 12.5% と低かったのに対し、進行癌は 44 例中 21 例が陽性であり、陽性率は 47.7% と高かった。また早期癌のうち特に m 癌は 5 例全てが陰性であった。症例数が十分とはいえないが、癌が進行するに従い陽性例が増加し、pm 例で最も高い陽性率を示した。pm, ss 例より s(+)
例の方が陽性率が低い理由として、pm 例では 4/4 例、ss 例では 13/15 例が分化型胃癌であるのに対し、s(+)
例では 13/25 例しか分化型胃癌がなく、この組織型の差によるものかと考えられた。

c) 肉眼分類と癌細胞内 collagenase : 進行癌を Borrmann 分類に従って I 型から IV 型に分

類し、さらに I 型と II 型を限局型、III 型と IV 型を浸潤型に分けると、限局型では 14 例中 7 例(50%) が癌細胞内 collagenase 陽性であり、浸潤型は 30 例中 14 例(46.7%) が陽性であった。このように進行癌を限局型と浸潤型で比較した場合、陽性率に差は認められなかった(表3)。

d) 浸潤増殖様式と癌細胞内 collagenase : 胃癌の浸潤増殖様式 (INF) を α , β , γ の三種に分類した。すなわち癌巣が膨張性に発育する INF α , 浸潤性に増殖する INF γ , その中間の INF β に分け、癌細胞内 collagenase 陽性率を検討した(表4)。INF α 症例では 14 例中 4 例(28.6%) が陽性であった。しかしこの INF α 症例には、陽性率が極めて少い早期癌が 7 例含まれており、進行癌の INF α 症例だけを検討すると 7 例中 3 例(42.9%) が陽性であり、全例が進行癌であった INF γ 症例の 43.7% とほぼ同率となった。

e) 間質量と癌細胞内 collagenase : 胃癌の細胞間質量を間質量の少ない medullary, 間質量の多い scirrhus, その中間の intermediate に分類し、それぞれの癌細胞内 collagenase 陽性率を検討した(表5)。medullary type では 31 例中 12 例(38.7%) が陽性、scirrhus type

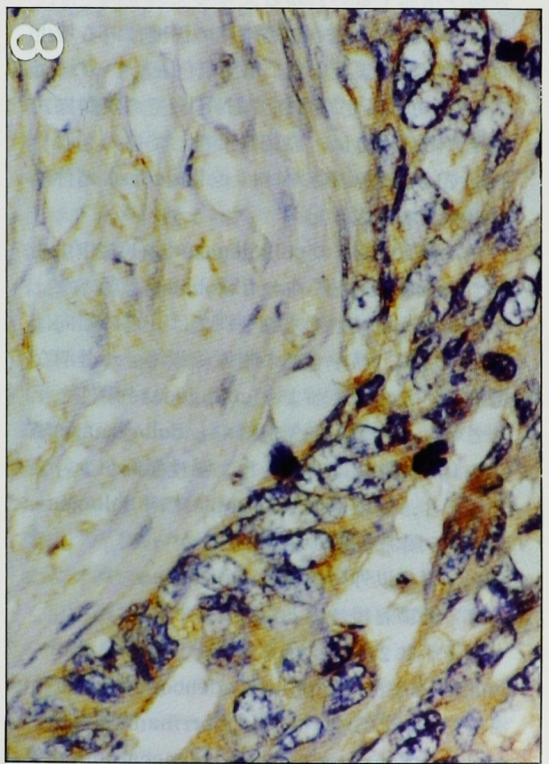
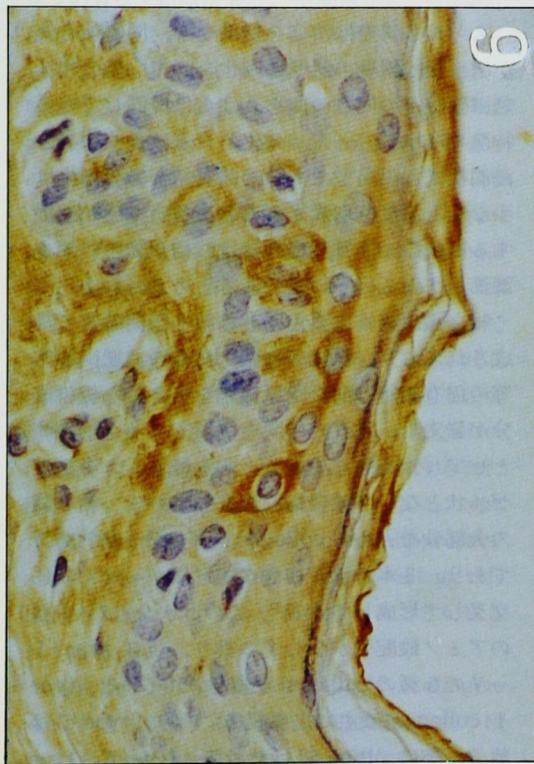
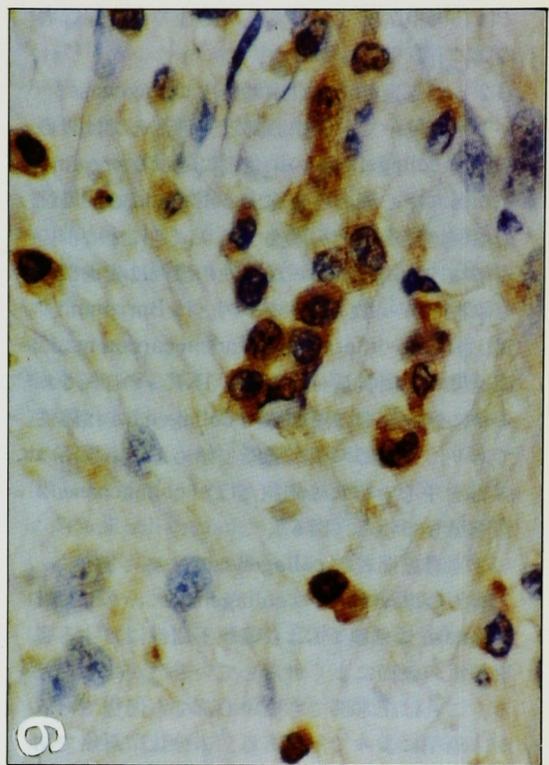
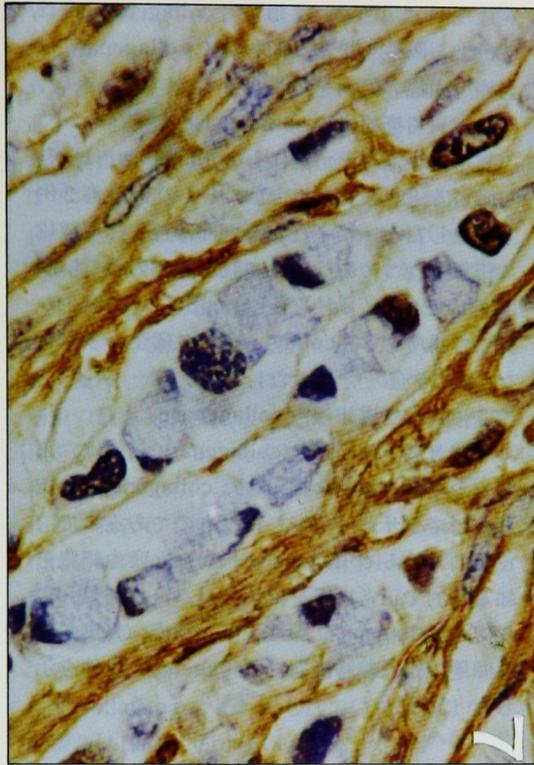
カラー写真の説明

図6 低分化腺癌の先進部。癌細胞内 collagenase 陽性

図7 印環細胞癌。癌細胞内 collagenase 陰性

図8 乳頭腺癌。INF α 。癌細胞内 collagenase 陽性。癌細胞に接する膠原線維では collagenase 陰性。

図9 正常皮膚。表皮内に collagenase 陽性細胞を認める。真皮乳頭層にも collagenase を認める。



では15例中7例(46.7%)が陽性であり、二者の間に有意差はなかった。

2) 癌先進部での胃癌細胞内 collagenase

1例を除いて、癌中心部と先進部とは胃癌細胞内 collagenase の染色度に差はなかった。すなわち中心部の癌細胞内 collagenase が陽性の症例は先進部でも陽性であり、逆に中心部の癌細胞内 collagenase が陰性の症例は先進部でも陰性であった。例外の1例とは Borrmann IV, poorly differentiated adenocarcinoma, 深達度 se, 間質質 scirrhous, INF γ の症例であるが、癌中心部の癌細胞内 collagenase は陰性であり、先進部の壁が肥厚し始めている場所の ss 部を中心とした癌細胞だけが collagenase 陽性を呈していた(図6)。

3) 胃癌間質の collagenase

a) 膠原線維表面の collagenase: 一般に collagenase は粘膜下および漿膜下組織における膠原線維の表面によく付着しているのが認められる。これは正常部でも癌中心部でも同様であるが、癌型によって差がある。未分化型胃癌で結合織が増加するいわゆるスキルス⁸⁾の症例では、まばらに浸潤している癌細胞の周囲にある増生した膠原線維表面は特に濃く染色されていた(図7)。一方、分化型胃癌で INF α 型の浸潤様式を呈する症例では、癌細胞に接して癌巣を取り囲んでいる膠原線維だけは collagenase の付着がなかった(図8)。

b) fibroblast の collagenase: 胃癌52例中6例で collagenase 陽性の fibroblast を認めた。この6例は組織型等の癌型別では一定の傾向はなかったが、癌中心部の膠原線維増生が著明な場所で fibroblast がよく collagenase 陽性を呈していた。しかし癌先進部でも collagenase 陽性の fibroblast は認められ、陽性症例が少いこともあり、癌の進展と fibroblast 内 collagenase との関係を知る事はできなかった。

2. 胃癌以外の組織 collagenase

1) 大腸癌組織内 collagenase

大腸癌は2例に染色を行った。1例は Borrmann I 型様, papillary adenocarcinoma, 深達度 pm であり、1例は Borrmann II 型様, well differentiated tubular adenocarcinoma,

深達度 se であった。癌細胞内 collagenase は2例とも陽性を呈し、間質側の collagenase は胃癌と同様の傾向を示した。

2) 胃潰瘍組織内 collagenase

胃潰瘍の進行と治癒にも collagenase は関与していると思われた。今回 UI 4 の胃潰瘍2例を染色したが、いずれも潰瘍部は再生膠原線維で修復されつつあり、この膠原線維表面でも collagenase は強く陽性を呈し、collagen の産生が盛んな場所では、collagenase の産生も多く行なわれていると思われた。

3) 正常皮膚組織内 collagenase

今回著者が作製した collagenase 抗体は、正常ヒト皮膚組織より抽出した collagenase を抗原としてウサギに免疫し得たものであるため、皮膚における collagenase の局在と産生細胞を知る目的で正常皮膚を染色した。その結果、表皮内で collagenase 陽性細胞を認め、真皮では乳頭層の膠原線維表面で collagenase 陽性を示した(図9)。

考 察

スキルス胃癌は潰瘍を形成せず、間質結合織が増生し、胃壁の肥厚と硬化を起し、低分化な癌細胞がその間質の間をまばらに浸潤している特徴を有する。一方、分化型胃癌は多くの場合浸潤様式も限局型であり、間質結合織の増生は少なく、潰瘍を形成することが多い。癌が進展する際のこの間質反応の差は、結合織の代謝を調節している因子の差であると考えられる。

結合織は線維成分と固有細胞と空間基質で構成されており、線維芽細胞、組織球、肥満細胞等の固有細胞の間を膠原線維を主とした線維成分が錯走し、それらの間をコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸を主成分とする酸性ムコ多糖がゲル状となって結合織を形成している。結合織の大部分を占める collagen 分子は分子量約30万であり、3本のポリペプチド鎖がらせん状に交叉して形成している⁸⁾。このポリペプチド鎖のアミノ酸配列が少しずつ異なり、現在 type I ~ V の5種の collagen が確認されている。type I collagen は主に皮膚組織にあり、type II は軟骨、肺に、type III は軟骨等、type IV, type

Vは基底膜に存在する⁹⁾。潰瘍等の組織修復の際の collagen 産生細胞は主として fibroblast であるとされており¹⁰⁾、その collagen 合成能を促進する物質としてヒスタミン¹¹⁾、エストロゲン¹²⁾、血液凝固因子¹³⁾などが知られている。杉山ら¹⁴⁾はリンフォカインの中に fibroblast の collagen 合成能を特異的に促進する因子があり、慢性炎症における collagen 合成には細胞性免疫の関与が十分考えられると述べている。また飯島ら¹⁵⁾はマウスの腹壁に癌腫を移植し、癌腫の腹膜浸潤を観察したが、OK-432を腹腔へ投与すると、癌腫の最深部へ膠原線維が増生し、癌の腹膜播種を防止していることを観察した。そしてこの膠原線維の反応には細胞性免疫の関与が考えられると報告している。一方スキルス胃癌の線維化は癌細胞自身が collagen を産生した結果であると竹内¹⁶⁾は述べている。

生理的条件下で collagen 分子を特異的に分解するのは、clostridium histolyticum 由来の細菌性 collagenase しか知られていなかったが、動物では1962年 Gross-Lapierre¹⁷⁾がオタマジャクシの背皮を組織培養し、培養液中に collagenase が抽出されていることを初めて証明した。以来この collagenase は動物性 collagenase と呼ばれるようになった。本論文における collagenase とは、全てこの動物性 collagenase をさしている。

ヒト皮膚 fibroblast より抽出した collagenase の分子量は約50,000である¹⁸⁾。collagenase は生理的温度、pHのもとで collagen 分子に作用し、collagen 分子のN末端より3/4の部位でらせん構造を保ったまま切断する。二分された collagen 分子は、ここで初めて非特異的蛋白分解酵素によって加水分解を受ける。collagenase は type I, II, IIIの collagen を分解するが、type IV, Vの collagen には作用しない。type IV collagen は murine tumor metalloproteinase¹⁹⁾、type V collagen は tumor cell metalloproteinase²⁰⁾ によって分解されることが知られている。

組織での collagenase の証明には、collagenase 活性を測定する方法と、免疫組織学的手段にて局在を知る方法とがある。現在までにヒト

の皮膚³⁾、リウマチ患者の関節囊²¹⁾、歯齦²²⁾、白血球²³⁾、macrophage²⁴⁾、fibroblast^{25,26)}、胃癌^{1,2,27)}、大腸²⁸⁾、malignant melanoma²⁹⁾ 等で collagenase の存在が報告されている。collagenase は EDTA, cystein, 血清によって活性が抑制されることが知られているが、Stricklin ら¹⁸⁾の報告によると、培養 fibroblast から抽出した collagenase は非活性型であり、trypsin を加えることにより、皮膚組織培養より得られた collagenase と同じ活性型となる。また培養 fibroblast から得られた非活性型 collagenase と、皮膚組織培養から得られた活性型 collagenase は免疫学的に同一の性格を持つと述べている。Bauer ら⁴⁾はヒト皮膚 collagenase、リウマチの関節囊 collagenase、歯齦 collagenase は互いに免疫学的性格は同一であるが、ヒト皮膚 collagenase とオタマジャクシの尾 collagenase、家兎の子宮 collagenase は互いに免疫学的種特異性があると述べている。

疾患と collagenase に関する報告はいくつかある。Okazaki ら³⁰⁾はラットに実験的肝線維症ないし肝硬変を作製し、collagenase 活性を測定した。その結果、線維化の初期は活性が高く、線維化が進行し肝硬変になった時点では活性が低く、線維化が最も盛んな時に collagenase 活性も高くなったと報告している。本谷²⁷⁾は胃潰瘍の collagenase 活性を測定し、胃潰瘍周辺粘膜は正常胃粘膜と比較するとはるかに collagenase 活性が高かったと述べている。Bauer ら³¹⁾は基底細胞癌の collagenase を蛍光抗体法で染色した。それによると、collagenase は腫瘍を取り囲んでいる間質成分にのみ存在し、上皮成分には見られなかった。腫瘍周囲には正常皮膚組織の2倍量 collagenase があり、基底細胞癌組織中の collagenase と正常ヒト皮膚 collagenase は免疫学的性格は同一であると述べている。著者の作製した抗ヒト皮膚 collagenase 抗体によって胃癌、大腸癌が染色されていることから、各臓器の collagenase は免疫学的性格は同一であると考えられる。大腸疾患における collagenase 活性に関しては Sturzaker ら²⁸⁾の報告があるが、それによると大腸癌は対照群や潰瘍性大腸炎よりも collagenase 活性は低かった

と述べている。著者の成績では大腸癌細胞内 collagenase は 2 例とも陽性であったが、おそらく癌細胞内では collagenase は非活性型なのであろう。胃癌と collagenase 活性との関係は本谷²⁷⁾、伊藤¹⁾、三村²⁾の報告があり、いずれも癌組織は正常粘膜と比較して collagenase 活性が高かったと報告している。

本研究の目的は胃癌組織内での collagenase の局在を観察し、胃癌の進展に collagenase がいかに関与しているのかを知ろうとする試みであり、癌細胞が collagenase を産生し、その collagenase が間質を破壊しながら癌が進展していくのか、そしてまた癌進展に伴う間質結合織の増生と collagenase との関係はどのようになっているのかという二つの問題を検討した。今回作製した collagenase 抗体を用いて染色した結果、胃癌 52 例のうち 22 例 (42.3%) は癌細胞内に collagenase を認めたが、m 癌は全例癌細胞内 collagenase 陰性、sm 癌で 1 例のみ陽性であり、pm 例以上で陽性例が増加してきた。このように進行しつつある中期癌に陽性例が多いことより、癌細胞内 collagenase が癌の進展に関与していることが考えられるであろう。また低分化型腺癌、scirrhous type の症例で、癌中心部の癌細胞内 collagenase は陰性であるが、癌先進部の壁の肥厚が始まっている部分の癌細胞だけが collagenase 陽性を呈している症例があった。このことも癌細胞内 collagenase が癌の進展と壁の肥厚に関与していることを示唆している。

間質側の collagenase を間質結合織の増生著明な INF γ 低分化型胃癌と、間質結合織が少ない INF α 分化型胃癌の先進部と比較検討して得た非常に興味ある結果が図 7 と図 8 である。すなわち INF γ 型 scirrhous type の低分化型胃癌は、増生した膠原線維表面で collagenase 陽性を示した。これは癌の浸潤に伴い、間質反応として結合織が増生したため生体の feed back 機構が働き、過剰の結合織を崩壊させるための collagenase が増加したものと考えられる。逆に INF α 分化型胃癌は、あたかも癌の進展を阻止する様に膠原線維が癌細胞を取り巻いているが、その膠原線維表面は collagenase 陰性を示

しており、これは癌が進展する際、生体の防御機転として collagenase の産生を抑え、その結果結合織の崩壊を減少させることによって癌の進展を膠原線維で阻止しているものと考えられる。このような癌型による間質反応の差は Wahl³²⁾、杉山¹⁴⁾、飯島¹⁵⁾らの報告しているように macrophage, lymphokine, fibroblast を介して膠原線維及び collagenase の増減が生じた結果であり、細胞性免疫の機構も関与しているものと考えられる。

以上著者の成績及び他の報告より、癌や潰瘍における結合織崩壊の際には、当然 collagenase 活性は増加しているが、結合織増生の際にも collagenase の産生は増加しているものと考えられた。そして胃癌の発育と進展にも collagenase が関与していると考えられた。

結 論

正常皮膚を組織培養し抽出した collagenase を用いて collagenase 抗体を作製したのち、酵素抗体法にて胃癌 52 例、大腸癌 2 例、胃潰瘍 2 例、正常皮膚 1 例を染色し、次の結果を得た。

1. 胃癌細胞内 collagenase は、分化型胃癌症例に陽性例が多かった。

2. 胃癌細胞内 collagenase は、早期癌症例では陰性例が多く、進行癌になると陽性例が増加した。

3. INF γ 、低分化型胃癌の増生した膠原線維表面には collagenase の付着が多かった。

4. INF α 、分化型胃癌に接する膠原線維表面は collagenase 陰性例が多かった。

5. 間質では、膠原線維表面の他に fibroblast 内にも collagenase を認めた。

6. 大腸癌は、2 例とも癌細胞内 collagenase は陽性であり、間質での局在は胃癌と同様の傾向を示した。

7. 胃潰瘍では、潰瘍部の再生膠原線維表面で collagenase 陽性であった。

8. 正常皮膚では、表皮内に collagenase 陽性細胞があった。

以上より、collagenase は膠原線維が存在するところで産生され、癌や潰瘍の進展と修復に関与していると思われた。

- lytic activity of synovium in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **279**, 914—919, 1968.
22. Fullmer, H.M. and Gibson, W.: Collagenolytic activity in gingivae of man. *Nature* **209**, 728—729, 1966.
 23. Lazarus, G.S., Daniels, J.R., Brown, R.S., Bladen, H.A. and Fullmer, H.M.: Degradation of collagen by a human granulocyte collagenolytic system. *J. Clin. Invest.* **47**, 2622—2629, 1968.
 24. Senior, R.M., Bielefeld, D.R., Jeffrey, J.J. and Goldman, M.L.: Collagenolytic activity in alveolar macrophages. *Clin. Res.* **20**, 88, 1972.
 25. Reddick, M.E., Bauer, E.A. and Eissen, A.Z.: Immunocytochemical localization of collagenase in human skin and fibroblasts in monolayer culture. *J. Invest. Dermatol.* **62**, 361—366, 1974.
 26. Bauer, E.A., Stricklin, G.P., Jeffrey, J.J. and Eisen, A.Z.: Collagenase production by human skin fibroblast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **64**, 232—240, 1975.
 27. 本谷益良：ヒトの正常胃，胃潰瘍，胃癌におけるコラゲナーゼ活性，*医学と生物学*，**80**，273—275，1970.
 28. Sturzaker, H.G. and Hawley, P.R.: Collagenase activity and malignant disease. *Br. J. Surg.* **61**, 921, 1974.
 29. Tane, N., Hashimoto, K., Kanzaki, T. and Ohyama, H.: Collagenolytic activities of cultured human malignant melanoma cells. *J. Biochem.* **84**, 1171—1176, 1978.
 30. Okazaki, I. and Maruyama, K.: Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature* **252**, 49—50, 1974.
 31. Bauer, E.A., Gordon, J.M., Reddick, M.E. and Eisen, A.Z.: Quantitation and immunocytochemical localization of human skin collagenase in basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.* **69**, 363—367, 1977.
 32. Wahl, L.M., Wahl, S.M., Mergenhagen, S.E. and Martin, G.R.: Collagenase production by lymphokineactivated macrophages. *Science* **187**, 261—263, 1975.

The determination of the distribution of collagenase in gastric cancer tissue by the peroxidase-labeled antibody method

Yasuta TSUTSUI

First Department of Surgery, Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

(Director; Prof. K. Orita)

Collagenase plays an important role in the invasion of gastric cancer. However, it is not known if gastric cancer cells produce collagenase. In this study, anti-collagenase antibodies were generated by inoculation of collagenase, which was isolated and purified from normal human cultured skin tissue. The distribution of collagenase in gastric cancer tissue from 52 gastric cancer patients was analysed by the peroxidase-labeled antibody method.

Collagenase existed on the surface of collagen fibers and in cell plasma of fibroblasts. Moreover, cancer cells themselves produced collagenase, as the cell plasma of cancer cells stained.

The relation of the histological type and depth of invasion to positive staining of cancer cells was then analysed. Cancer cells of the differentiated type stained frequently, while positive staining was low in cases of early gastric cancer. The percentage of positive staining increased according to the advance of gastric cancer. The infiltrative growth pattern also changed the distribution of parenchymal collagenase.