

結節型 Tawa肉腫 Collagenase部分精製 및 性狀에 關한 研究

大阪齒科大學 生化學敎室

鄭泰英* · 李德根 · 金有鳳

藤田厚 · 村瀬進 · 柳鐵也

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGENASE IN SOLID TAWA SARCOMA

Tai Young Chung*, Dirk Keun Lee, Yoo Bong Kim,
Atsui Fujita, Susumu Murase, and Tetsuya Sakaki

Dept. of Biochemistry Osaka Dental University.

.....> Abstract <.....

A report was made of a collagenolytic enzyme present in solid Tawa sarcoma, its localization in the tumor mass, and its activities in respond to a growth of the tumor. The subcutaneous Tawa sarcoma mass was obtained on the 5th, 8th and 11th days after transplantation of ascites Tawa sarcoma cells. Collagenolytic enzyme was extracted from culture media, salted out and subject to a disc electrophoresis to be purified. A piece of tumor mass and the purified collagenolytic enzyme was each incubated on reconstituted collagen gel which was made of neutral salt soluble collagen and acid soluble collagen extracted from the rat skin and tail tendon.

The results obtained were as follows:

- 1) The collagen used had a high purity and a considerable immunity against an attack by common proteolytic enzymes. It had an advantage as a substrate for detecting and measuring the collagenolytic activity under physiologic conditions.
- 2) It was demonstrated that solid Tawa sarcoma contained the enzyme which proved to be collagenolytic.
- 3) The collagenolytic activity was found higher in the outer layer than in

* 서울大學校 齒科大學 生化學敎室

Dept. of Biochemistry College of Dentistry S. N. U.

the inner layer of solid Tawa sarcoma.

4) The highest activity was observed in the outer layer on the 11th day, and the lowest in the inner layer on the 5th day after tumor cell transplantation.

5) It was confirmed that the collagenolytic activity coincided with the degree of lysis of reconstituted collagen gel.

6) The extracted collagenolytic enzyme was purified by a disc electrophoresis of the 30~60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation fraction.

7) It was verified by a disc electrophoresis that the action of the collagenolytic enzyme, extracted from solid Tawa sarcoma, was identical with that of the animal collagenase which disintegrates the collagen molecule to 3:1 under neutral pH and low temperature.

緒 論

Collagen은 動物界에 存在하는 蛋白質로서 脊椎動物에는 蛋白質의 約 1/3을 차지하며 酸性무코多糖이나 糖蛋白등과 함께 結締組織의 細胞間物質을 構成하고 있다.

最近 放射性物質을 利用한 實驗에서 胎兒나 胚의 어떤 時期, 즉 個體의 發生分化나 成長過程에서 collagen 代謝가 活潑히 이루어지며 이의 半減期도 겨우 數日이라는 것¹⁾이 밝혀졌다. 그후 collagen의 生合成이나 分解에 대하여 많이 追求되어 個體의 成長후에도 特殊條件例를 들면 創傷治癒期²⁾, 妊娠時子宮³⁾ 등에 collagen 生合成이 活潑하게 되며 兩棲類의 變態期⁴⁾, 分娩後子宮⁵⁾ 등은 collagen 分解가 顯著하게 일어나는 것은 널리 알려진 事實이다.

Collagen은 生體內에서 collagen分子가 規則적으로 合成하여 纖維狀態로 存在하고 있다. 纖維를 形成하고 있는 collagen은 그의 大部分이 不溶性이고 一部分이 中性鹽溶液이나 含有碳酸溶液에 collagen이 分散하는 것에 의해 可溶化되며 즉 可溶性collagen이 된다. 그러나 collagen은 可溶性, 不溶性에 關係없이 未變性일 뿐 trypsin, chymotrypsin, papain 및 pepsin 등 一般의 蛋白質分解酵素에는 分解되지 않는다. 그러므로 生體內에는 未變性的 狀態로서 collagen은 分解되지 않는다고 思料되며 動物組織에서 誘來되는 collagen 分解酵素가 組織 homogenate나 抽出物에서 檢出되지 않는다는 것으로 이 酵素의 存在自體도 疑問視되고 있다. 그러나 이의 解決을 爲해 Gross (1962)⁶⁾가 組織培養으로 collagen을 特異적으로 分解하는 collagenase의 存在를 最初로 證明하였다. 이 酵素는 계속해서 Gross et al.

(1965)⁶⁾과 Nagai (1966)⁷⁾에 의해 올챙이尾의 組織培養 medium에서 抽出精製하여 20°C 低溫에서 collagen을 特異적으로 分解하여 collagen全分子길이의 3/4과 1/4을 分解한다는 것도 밝혀졌다.

그후 皮膚^{9, 10)}, 骨^{11, 17)} 子宮^{18, 19)} 류마치스滑液關節液^{20, 21)} 齒齦^{25, 32)}, 創傷部位^{2, 3)} 白血球³³⁻³⁵⁾ 등에서 collagenase 活性의 存在를 報告하였다.

Collagenase는 生體內 組織成分의 調節을 받으면서 collagen代謝에 關與하고 있다고 思料된다. 그러나 이의 活性는 無細胞 level에서는 전혀 證明되지 않으며 대부분이 組織培養法에 의해 觀察되고 있다. 그렇기 때문에 collagenase는 酵素生産細胞가 어떤 것인지도 모르지만 어떤 刺戟을 받어서 生産되는 것이 아닌지 抽測되기도 하며³⁶⁾, puromycin添加培養에서 collagenase 前驅物質이 細胞內存在한다고 推定한 報告도 있다^{37, 38)}.

增殖中에 있는 結締組織은 Woessner (1965)³⁹⁾에 報告와 같이 collagen合成은 組織 remodeling機轉으로서 分解를 同伴하며 兩調節機構에는 動的平衡關係가 成立하고 있다. 그래서 한번 刺戟이 가해지면 創傷이나 感染에서 볼수 있는 바와 같이 組織의 破壞와 이의 回復을 爲해 collagen合成系와 分解系의 平衡이 한편으로 偏在하게 된다. 이런 現象은 結締組織을 含有하는 腫瘍組織에서도 生體內 生理的 制御에서 이탈하여 增殖을 이르기 때문에 더욱 複雜한 樣相을 나타내는 것이라 思料된다. 腫瘍의 浸潤增殖에 미치는 結締組織動態에 對하여는 Vasiliev 등 우수한 業績이 있다⁴⁰⁻⁴²⁾.

Collagen과 腫瘍組織에 關하여는 腫瘍組織의 周邊部에서는 collagen纖維가 低重合의 gel樣物質로 變化된다고 알려져 왔다.

Gersh et al. (1949)⁵²⁾는 이의 重合度의 低下를 腫瘍組織內에 存在하는 collagenase樣酵素에 의한다 하였고

Grabowska (1959)⁵³⁾는 이의 collagenase樣酵素가 腫瘍의 浸潤增殖에 關與할 可能性이 있다하였다.

著者들은 collagen分解酵素가 腫瘍의 發育增殖에 어떤 役割을 하는 가를 追求하기 爲해 結節型 Tawa肉腫에서 이 酵素의 活性을 檢索하였다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗動物

約 5週된 雌性 DonRyu rat 60匹을 使用하여 CE-2 型固型飼料(日本 clear, 東京)과 水道水를 供給하여 飼育하였다.

2. 實驗腫瘍

30匹의 rat背部皮下에 1個體 1部位當 約 10⁷個의 純培養狀態의 腹水型 Tawa肉腫細胞를 無菌的으로 2個所에 移植하여 얻은 結節型 Tawa肉腫을 使用하였다. 結節型腫瘍은 移植後 3~5日에 腫物로서 觸知되며 그의 表面은 光澤을 띄운 紅色을 나타내며 組織學的으로도 2層의 거의 均質的인 組織像을 나타내고 있다. 移植後 7~9日이 되면 腫物은 엄지손가락 크기정도로 增殖한다. 移植後 10~12日頃에는 腫瘍은 상당히 增大하지만 그의 中心部는 乳白色을 나타내는 壞死巢가 限局性으로 認知되며 13~16日頃에는 宿主는 腫瘍으로 죽게되는 經路를 밟게된다.

이러한 增殖型을 基準으로하여 本實驗은 腫瘍細胞移植後 5日, 8日 및 11日의 3 實驗群으로 大別하여 各各 10匹씩 腫瘍을 摘出하였다. 摘出腫瘍은 重量을 測定한 후 壞死巢가 있는 것을 除去하고 이어서 penicilin 100 u/ml와 streptomycin 100 μ g/ml를 添加한 Tyroid液에 數回씻었다.

各 實驗群중 各各 5個의 腫瘍은 collagenase測定에 使用하였고 나머지 15個의 腫瘍은 collagenase抽出에 使用하였다. 酵素活性은 腫瘍組織의 外側部에서 內側部로 向해 切斷하여 外層과 內層의 2層을 分離하여 測定하였다.

3. 基質 collagen의 抽出精製

體重 150g내외의 rat 30匹의 皮膚 및 尾髓에서 Kang et al. (1966)⁵⁵⁾法에 의해 中性鹽可溶性collagen을 抽出하였고 中性鹽可溶性collagen 抽出後 나머지 鹽不溶性試料에서 酸可溶性 collagen을 Glimcher et al. (1964)⁵⁶⁾의 方法에 의해 抽出하였다.

4. 精製 collagen의 純度檢定

Rat皮膚 및 尾髓에서 抽出精製한 中性鹽 및 酸可溶性

collagen의 純度를 檢定기 爲하여 hydroxyproline, tyrosin, hexose 및 hexosamine을 定量하였다.

(a) hydroxyproline定量: 精製 collagen 20mg을 6N HCl 2ml에 넣고 115°C 16時間 封管中에서 加水分解한후 2.5N NaOH로 中和後 H₂O를 加해 全量1000ml가 되게 하여 이의 2ml를 使用하여 Woessner(1961)⁵⁷⁾法으로測定하였다.

(b) Tyrosine定量: 精製collagen 20mg에 0.1N NaOH 8ml를 加해 100°C 10分間 封管中 加熱한 후 H₂O로 全量 40ml되게 하여 이의 4.1ml를 使用하여 鶴藤(1964)⁵⁸⁾法으로 定量하였다.

(c) Hexose: 佐藤 (1962)⁵⁹⁾法에 의해 定量하였다.

(d) Hexosamine定量: 精製 collagen 20mg에 4N HCl 2ml를 加해 110°C 16時間 封管中에서 加水分解하여 加水分解液을 rotary evaporator에서 減壓下에 HCl을 除去後 2ml의 0.35M citrate buffer에 溶解하여 Hitachi liquid chromatography (034型)에서 hexosamine을 分別定量하였다.

5. Collagen溶液의 調製

collagen 800mg을 0.4M phosphate buffer (ph7.4) 200ml에 加해 4°C에서 48時間 攪拌하여 溶解하였다. 이 溶解物을 遠沈하여 上清液을 0.4M NaCl에 透析後 透析內液을 다시 遠沈 (10,000 \times g 1時間)하여 不溶物을 除去하여 얻은 上清을 Millipore filter(0.45 μ m, USA)에 除菌하여 滅菌 fask에 40ml씩 分注하여 4°C에 保管하였다.

6. Collagenase活性檢索

Collagenase活性은 Gross et al. (1962)⁵⁾과 Fullmer et al. (1966)²⁵⁾ 法에 準한 培養法으로 檢索하였다.

(a) Collagenase活性檢出法: Collagen溶液 1ml와 Eagle MEM2X(大阪大微研, 大阪) 1ml와의 混合溶液을 直徑 35ml의 culture dish (Falcon, U. S. A)에 넣고 37°C 3時間 加溫하여 乳白色 gel狀의 collagen纖維를 再生시켰다. 培養 medium에는 penicillin 100u/ml와 streptomycin 100 μ g/ml를 添加하였다. 이 collagen gel 위에 組織片 (2 \times 3 \times 1mm)을 놓고 5% CO₂를 供給하는 37°C incubator에서 4日間培養하였다. 培養이 끝날때 gel溶解部의 面積을 trace하여 酵素活性의 持標로 삼았다.

(b) Collagenase活性測定法: 培養後 culture dish 中の collagen은 遠沈 (13000 \times g 20分間)하여 上清과 沈澱으로 分割하고 上清은 다시 二分하여 各各 減壓乾燥하여 割分 Ia와 Ib로 하였고 沈澱은 割分 II라 하였다. 割分 Ib와 割分 II는 各各 6N HCl 1ml를 加해 115°C

16時間 封管 加水分解하여 加水分解液을 KOH로 pH 8.0로 調整한後 H₂O를 加해 劃分 Ib는 全量 40m/로, 劃分 II는 80m/로 하였다.

劃分 Ia는 10m/의 H₂O로 溶解하였다. 各劃分은 遠沈(2,000×g 20分間)하여 不溶物을 除去한후 그의 4m/를 使用하여 Kivirikko (1967)⁶⁰法에 의해 hydroxyproline을 測定하였다.

7. Collagenase抽出精製法

(a) Collagenase抽出法: 結節腫瘍組織을 1mm³으로 細切하여 Nagai et al. (1966)⁷⁷法을 改良하여 Eagle MEM에 7日間 培養한後 培養 medium을 每日 交換하여 이를 모았으며 位相差顯微鏡으로 感染을 確認하여 한꺼번에 凍結保存하였다. 回收 medium은 遠沈(17,500×g)30 分間하여 上清을 分離하였다. 여기에 ammonium sulphate를 加해 30%飽和溶液을 만들어 0°C에서 2時間 放置後 이의 遠沈上清을 60%飽和되게 하여 생긴 沈澱을 salting out前 medium量의 0.5%에 해당하는 0.05M tris buffer (pH 7.6, 0.4M NaCl 含有)에 溶解시켜 同溶液에 대하여 24時間 4°C에 透析하였다. 透析內液을 遠沈하여 不溶物을 除去하여 이의 上清을 抽出酵素液으로 하였다.

(b) Collagenase精製法: Salting out에 의해 部分 分劃한 抽出酵素液을 精製할目的으로 Orstein(1964)⁶¹과 Davis (1964)⁶²法에 의해 polyacrylamide를 支持體로 하고 riboflavin을 觸媒로 하는 光重合을 利用한 disk電氣泳動法을 행하였다.

Tris-glycin buffer (pH 8.3)으로 1mA/tube, 3時間 泳動하여 分離用 gel은 새로로 二分하여 한편은 1% amido black의 acetate溶液에 2分間 染色하고 즉시 acetate液에 脫染色하였다. 다른 gel은 먼저 染色하여 얻은 各 band에 따라 가로로 切斷하여 濃縮分離된 酵素試料를 各各 0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.6, 0.4M NaCl 含有)에 溶出시켰다.

全實驗은 冷凍室에서 行하였다.

實驗 結果

1. collagen抽出量

rat皮膚 및 尾臑에서 얻은 collagen溶液은 대단히 높은 粘度를 가졌기 때문에 chromatography나 電氣泳動으로 精製하는 것은 매우 困難하다. 그럼으로 collagen 可溶性을 應用한 沈澱生成을 反復하여 純度를 높였다. 精製 collagen의 抽出量 (mg) 혹은 組織濕重量 (g)當 抽出量比 (%)는 전부 Table 1에서 보는 바와 같다. 抽出量比는 抽出溶媒가 같은 경우 皮膚보다 尾臑이 높

Table 1. Soluble collagen extracted from the rat skin and tail tendon

	Tissue wet weight* (g)	Extracting solvent	Soluble collagen	
			(mg)	(%)**
Tail tendon	54	1.0M NaCl	91	0.17
		3% CH ₃ COOH	467	0.87
Skin	410	1.0M NaCl	533	0.13
		3% CH ₃ COOH	1,748	0.43
Total	464		2,839	0.61

* Thirty rats were used.

** per cent of tissue wet weight

고 抽出組織이 같은 경우는 中性鹽보다는 酸에 의한 抽出이 높았다.

2. 精製 collagen 純度定成成績

精製 collagen의 一定量을 試料로하여 hydroxyproline, tyrosine, hexose 및 hexosamine을 定量한 結果는 collagen乾燥重量 (mg)當 μg로 表示하였으며 Table 2에서 보는 바와 같다.

Hydroxyproline: collagen의 特異적으로 多量 存在하는 amino acid이기 때문에 이의 含有量은 collagen의 指標가 된다. 精製 collagen의 hydroxyproline은 모든 試料에서 100mg以上 檢出되었다. hydroxyproline은 collagen抽出溶媒가 같은 경우 尾臑보다 皮膚에 많고 抽出組織이 같은 경우 中性鹽보다 酸溶媒에서 많이 含有하고 있다.

Tyrosine: 非 collagen蛋白質의 指標로서 tyrosine은 抽出組織이나 溶媒에 關係없이 어떠한 試料에서도 극히 微量(3~3.5μg)밖에 含有하지 않았다.

Hexose와 Hexosamine: amino acid以外的 成分으로 抽出組織이나 溶媒에 關係없이 어떠한 試料에서도 hexose가 17μg정도, hexosamine이 trace로서 檢出되었다.

3. 結節型 Tawa肉腫의 collagenase活性

(a) Collagen gel의 溶解面績: 精製 collagen溶液을 in vitro로 中性 pH領域에서 約 37°C로 維持시키면 collagen gel纖維를 再生시킨 gel狀으로 된다⁶⁵. 이런 性質을 利用하여 精製 collagen溶液과 培養液의 混合液으로 부터 collagen gel平板을 調整한다. 그러나 脊椎動物由來의 collagenase는 血液중의 α₂-macroglobulin에 不活性化되는 性質이 있기 때문에⁶⁵ 本實驗에서는 無血清完全合成培養液을 使用하였다. collagen gel

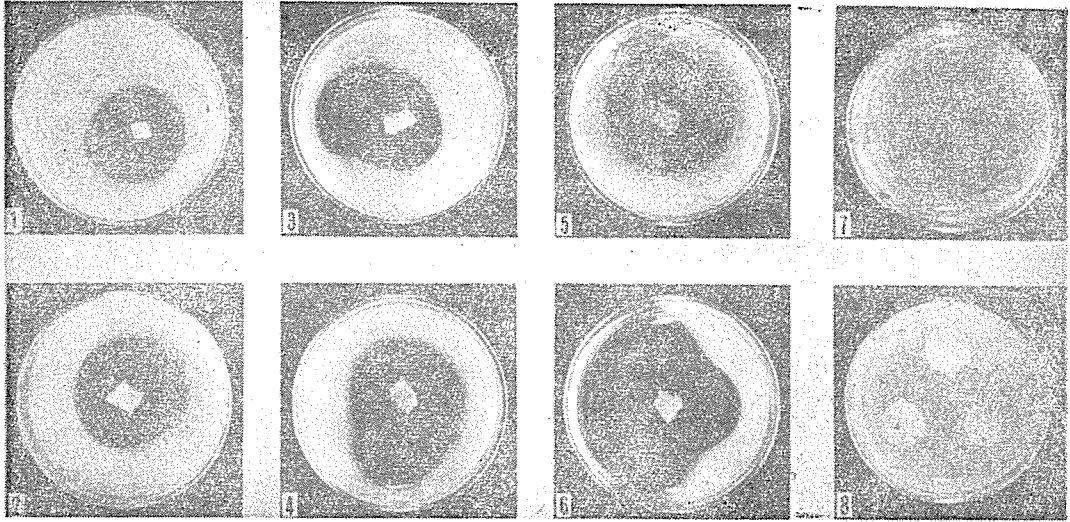


Photo. 1 Five days after tumor transplantation Inner layer in solid
 Photo. 2 Five days after tumor transplantation Outer layer in solid
 Photo. 3 Eight days after tumor transplantation Inner layer in solid
 Photo. 4 Eight days after tumor transplantation Outer layer in solid
 Photo. 5 Eleven days after tumor transplantation Inner layer in solid
 Photo. 6 Eleven days after tumor transplantation Outer layer in solid
 Photo. 7 Control (Non tissue)
 Photo. 8 Common proteolytic enzymes

Table 2. Analysis of soluble collagen extracted from the rat skin and tail tendon

	Extracting solvent	Hydroxyproline* (μg)	Tyrosine* (μg)	Hexose* (as glucose) (μg)	Hexosamine
Tail tendon	1.0M NaCl	102.34	3.04	17.42	trace
	3% CH ₃ COOH	119.75	3.21	16.98	trace
Skin	1.0M NaCl	111.38	3.49	17.29	trace
	3% CH ₃ COOH	123.55	3.48	17.48	trace

* μg per mg of soluble collagen dry weight

위에 腫瘍組織片을 培養하던 빠른것은 培養 2日째부터 組織片周圍의 gel이 溶解되기 시작하고 3日째에는 各實驗群 전부 collagen gel의 溶解能의 存在를 認定하였다. 各實驗群의 培養 4日의 collagen gel溶解狀態는 Photo. 1~6에서 보는 바와 같다. 對照群 Photo. 7에서 보는 바와같이 collagen gel은 溶解되지 않았다. 以上の 結果로 結節型 Tawa肉腫에서 collagenase의 存在가 確認되었기 때문에 collagen gel의 溶解도를 gel 全表面積當의 gel溶解面積의 百分率로 나타냈으며 Table 3에서 보는 바와 같다. collagen gel의 溶解도는 腫瘍細胞移植後 어떤 時期에도 일어나는데 腫瘍組織의

內層보다 外層이 높고 더욱 外層과 內層의 溶解度差는 時日이 經過함으로 커지며 移植後 11日에 外層에서 最大溶解도를 나타낸다.

(b) Collagen gel의 各劃分の Hydroxyproline量: Collagen gel劃分 Ia(上清), 劃分 Ib(上清水解物) 및 劃分 II(沈澱水解物)에 나타난 hydroxyproline量은 culture dish當 μg 으로 表示하여 Table 4에서 보는 바와 같다. 여기서 劃分 Ia는 遊離型, 劃分 Ib는 遊離型과 peptide型, 劃分 II는 蛋白結合型의 hydroxyproline을 나타내고 있다. 더욱 全 hydroxyproline量은 劃分 Ib와 劃分 II를 合한 것이다.

Table 3. Visible lysis of collagen gel in cultures of solid Tawa sarcoma

		Area of visible lysis (%)*
Non tissue		0
Enzyme		0
5 days	inner	41.4
	outer	51.8
8 days	inner	45.8
	outer	58.7
11 days	inner	44.2
	outer	67.7

* Cultures were incubated for 4 days at 37°C. per cent of dish area

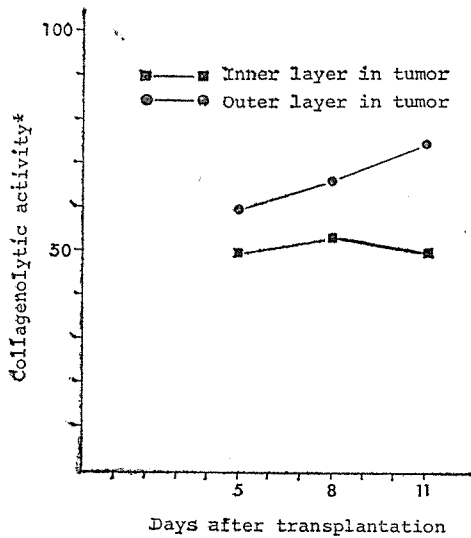


Fig. 1. Changes of collagenolytic activity in solid Tawa sarcoma

* hydroxyproline in hydrolyzed supernatant per cent of total

全 hydroxyproline量은 最高 300.98 μ g, 最低 298.64 μ g을 나타내고 있는데 이成績은 實驗에 使用한 collagen gel溶液이 sol狀態로서 均一性을 지니고 있다고 볼 수 있다. 劃分 II에서 얻어진 hydroxyproline은 未反應의 collagen gel에 포함되어 있는 結合型 hydroxyproline으로서 이는 各實驗群에서 對照群에 비해 현저히 減少되었다. 劃分 Ib의 hydroxyproline은 對照群의

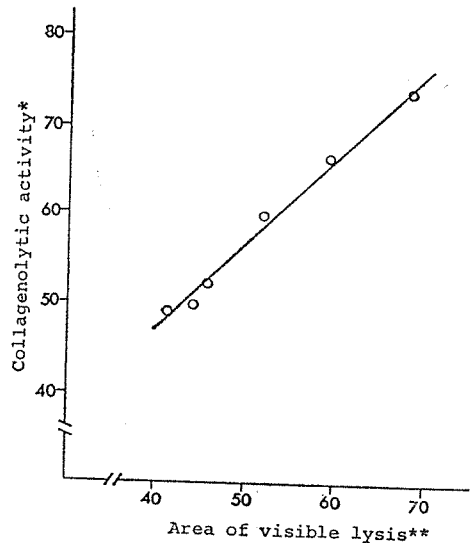


Fig. 2. Relationship between collagenolytic activity and area of visible lysis in culture of solid Tawa sarcoma

* hydroxyproline in hydrolyzed supernatant per cent of total

** percent of dish area

21.25 μ g에 비해 實驗群에서 148.04~223.20 μ g으로 顯著하게 增加되었다. 이런 增加는 再生 collagen纖維가 培養組織片에 存在하는 collagenase에 의해 分解된 때문이다.

◎ Collagen gel의 一般蛋白分解酵素에 對한 感受性

未變性的 collagen gel은 一般的인 蛋白分解酵素에 對해 肉眼的으로는 gel의 溶解를 認定할 수 없었지만 (Photo. 8) Table 4에서 보는 바와같이 劃分 Ib에서는 31.08 μ g의 hydroxyproline이 檢出되었다. 對照群의 劃分 Ib에서도 21.25 μ g이 檢出되었으며 이는 collagen gel形成時에 再生纖維形成에 關與치 않았던 hydroxyproline이 그 狀態로 定量된 結果라 推測된다. 따라서 이와같이 對照群에 나타난 基質의 狀態와 hydroxyproline을 考慮해 보다면 本實驗에 使用한 collagen gel은 papain, trypsin 및 chymotrypsin 등의 一般的蛋白分解酵素에 抵抗性을 가지며 collagenase에 特異的인 基質로 충분히 精製되어 있다고 생각된다.

4. 結節型 Tawa肉腫의 Collagenase活性的 腫瘍內局在性

結節型 Tawa肉腫의 collagenase活性은 分解生成物에 含有되는 hydroxyproline量을 全 hydroxyproline量에 對한 百分率로 表示하였다. 즉 腫瘍細胞移植後 各

Table 4. Hydroxyproline content of collagen gel fraction

	Fraction IA* ($\mu\text{g}/\text{dish}$)	Fraction IB** ($\mu\text{g}/\text{dish}$)	Fraction II*** ($\mu\text{g}/\text{dish}$)	Total**** ($\mu\text{g}/\text{dish}$)
Non tissue	trace	21.25	278.70	299.95
Enzyme	trace	31.08	268.47	299.55
5 days inner	21.27	148.04	151.58	299.62
outer	27.55	178.88	121.26	299.84
8 days inner	27.91	157.86	140.78	298.64
outer	25.75	196.94	102.52	299.46
11 days inner	28.37	151.58	149.40	300.98
outer	30.33	223.20	76.58	299.78

* hydroxyproline in supernatant
 ** hydroxyproline in hydrolyzed supernatant
 *** hydroxyproline in hydrolyzed residue
 **** the sum of fraction IB and II

Table 5. Collagenolytic activity in solid Tawa sarcoma

	Collagenolytic activity*
5 days inner	49.4
outer	59.6
8 days inner	53.0
outer	65.8
11 days inner	50.4
outer	74.5

* hydroxyproline in hydrolyzed supernatant per cent of total hydroxyproline

時期에 結節腫瘍의 內層 또는 外層의 collagenase活性은 다음式으로 計算하여 Table 5와 Fig 1에서 보는 바와 같다(劃分 Ib/劃分 Ib+劃分 II)의 hydroxyproline 量 $\times 100$ =collagenase 活性).

더욱 Fig 2에 보는 바와 같이 collagenase活性値는 gel溶解度와 잘 一致되는 相關關係를 나타내고 있다.

5. Collagenase의 精製와 그의 性狀

(a) 結節型 Tawa肉腫 collagenase의 精製: 細切腫瘍組織片을 collagen을 含有치 않는 培養 medium중에서 大量으로 培養하여 時間이 經過함에 따라 回收한 medium에서 ammonium sulfate 30~60%飽和劃分을

얻었다. 이 劃分은 disk電氣泳動으로 짧은 2 band와 가는 1 band로 分離되었다. 各 band의 濃縮精製된 酵素蛋白은 각각 0.05M Tris-HCl buffer으로 抽出시킨 후 基質 collagen에 作用시켜 그의 酵素的性狀을 disk電氣泳動으로 檢討했으며 그 結果 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

(b) 抽出精製酵素의 反應性: Collagen分子로 3本の α -polypeptide鎖로 構成된 helix構造를 이루고 있어 變性시키면 單離된 α 鎖와 polypeptide鎖에 架橋가 形成된 β -鎖, 또는 γ -鎖가 얻어진다.

腫瘍組織에서 抽出精製한 collagenase의 性狀을 檢討한 結果는 Fig 3에서 보는 바와같이 ammonium sulfate 30~60%飽和劃分の 分子量이 크고 두꺼운 band로서 이 部分에 酵素活性이 높다. 즉 酵素를 含有치 않는 對照에서는 β -鎖와 α -鎖는 明瞭히 分離되어 있으나 그 이외의 band는 檢出되지 않았다. 그러나 分子量이 크고 두꺼운 band를 酵素試料로 한 경우 β -鎖의 下端에 이 分子길이의 3/4에 切斷된 β A鎖가, α -鎖의 下端에 α A鎖가 認定되었다. 그러나 β -鎖와 α -鎖사이에는 β A鎖以外의 band가 出現치 않으니 이 酵素試料에는 collagen의 架橋를 切斷할 能力이 없다고 推測된다. Disk電氣泳動으로 分離된 다른 2개의 band를 酵素試料로 한 경우에는 反應分解生成物로서 band가 明確히 分離되지 않았다. 따라서 이 酵素試料에는 아마 培養에 關與한 一般蛋白分解酵素가 混入하고 있는 것으로 推測된다.

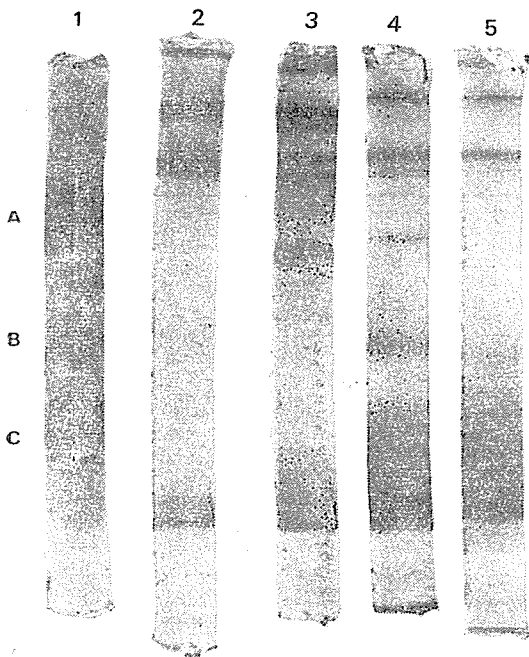


Fig. 3. Polyacrylamide disc electrophoretic patterns of collagen reaction products of enzyme extracted from solid Tawa sarcoma

- 1 Enzyme fractionated with 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation
- 2 Control collagen
- 3 Products of collagen digestion by enzyme eluted from A band
- 4 Products of collagen digestion by enzyme eluted from B band
- 5 Products of collagen digestion by enzyme eluted from C band

考 察

惡性腫瘍은 浸潤性이며 腫瘍에 隣接한 正常組織을 廣範圍하게 破壞하면서 發育增殖한다. 腫瘍에 隣接한 組織은 대부분 結締組織으로 이의 破壞様相은 collagen 纖維의 變性を 電子顯微鏡으로 觀察한바 있다^{67, 68}. 그러나 腫瘍細胞와 그의 間質로서의 結締組織과의 關聯性에 대하여는 結締組織이 腫瘍의 增殖에 促進的 혹은 支持的으로 作用하고 있는지, 逆으로 防禦的으로 作用하고 있는지는 現在까지도 究明되어 있지 않고 腫瘍研究에 많은 課題를 남겨놓고 있다. 특히 腫瘍細胞가 生産하는 어느 酵素가 周圍組織을 破壞하는 것이 아닌가 하는 것도 注目을 끌고 있어 이 酵素의 存在와 그 遊離機構에 대하여 Kiriluk et al. (1950)⁶⁹에 의해 행하여졌다. 그

러나 hyaluronidase를 指標로 한 이들의 所見은 現在에도 아직 明確한 結論을 얻지 못하고 있다.

그후 Burstone (1956)⁷⁰은 腫瘍의 增大는 宿主로부터 營養供給의 問題를 除外하고 腫瘍細胞에 周圍正常組織 특히 纖維性結締組織이 크게 抵抗함으로써 腫瘍細胞가 正常組織을 分解하는 物質을 生産하여 그 物質이 周圍組織을 破壞하는 것이 아닌가란 假定아래 實驗을 하여 結締組織이 腫瘍細胞에 의해 酵素的으로 分解된다는 假說을 提起하였다. 그러나 Vasiliev (1958)⁴⁹는 이 假說을 確認 못하고 腫瘍의 浸潤增殖을 促進하는 物質을 結締組織自體에서 찾으려 했다. 즉 實驗腫瘍에 있어서 腫瘍細胞가 移動하는 徑路에 따라 뮤코多糖의 重合이 일어나 이에 따라 纖維性蛋白構造網이 形成됨으로써 結締組織의 變化는 腫瘍의 浸潤增殖에 關與하는 것이 아닌가 推測하였다. 이와 關聯하여 Leighton et al. (1956)⁷¹ (1959)⁷² 등은 幼若纖維芽細胞가 腫瘍細胞의 移動, 增殖에 關與하고 있는 것을 培養細胞를 使用한 實驗에서 報告하고 있다.

特定한 酵素가 腫瘍의 增殖, 특히 周圍組織에 浸潤과 關聯하여 生化學的으로 究明한 報告가 Sylvén et al. (1959, 1960, 1965)⁷³⁻⁷⁵에 의해 이루어졌다. 즉 腫瘍細胞周圍의 組織間質液에는 腫瘍細胞의 細胞質由來의 可溶性酵素 특히 cathepsin이나 peptidase의 酵素活性이 上昇하여 이들 酵素가 腫瘍細胞에 接觸하고 있는 正常細胞에 어떤 影響을 미치는 것으로 推定하였다. Benz et al. (1959)⁷⁶와 Goldberg et al. (1969)⁷⁷는 腫瘍의 cathepsin活性은 正常組織에 比하여 顯著的한 增加를 보이지 않고 Sylvén이 間質液으로 測定한 酵素活性은 周圍組織의 破壞에 의해 생긴 細胞質由來의 蛋白質과 酵素의 遊離에 起因하고 있다고 反論하고 있다. 그러나 aminopeptidase活性이 浸潤性이 강한 腫瘍組織에 隣接한 間質組織에만 上昇하고 있는 것을 Glenner et al. (1959)에 의해 報告되었으며 Braun-Falco et al. (1959)⁷⁹도 組織化學的으로 立證하였다.

그런데 collagen은 結締組織의 대부분을 차지하는 體蛋白으로 一般的인 蛋白分解酵素에 感受性을 갖고 있지 않아 著者는 collagenase 특히 動物 collagenase에 注目하여 이 酵素의 存在와 活性이 腫瘍增殖과 어떤 關連性을 가지는 가를 檢討하였다. 腫瘍細胞의 浸潤增殖過程에는 腫瘍細胞가 꼭 collagen에 接觸하는 機會를 가지며 細胞增殖의 影響을 받는 腫瘍間質은 形態的으로나 機能的으로 變化를 받는 것으로 推定된다. 腫瘍周邊部の 組織이 腫瘍細胞에 接觸하면 腫瘍性破壞를 받아 腫瘍間質로 變化하여 血流路의 形成이 進行되며 腫瘍塊의 營養路가 確保된다.

宮田 등 (1954)⁸⁰은 吉田肉腫의 皮下移植實驗으로 生

體의 腫瘍細胞에 대한 反應으로서 局所의 結締組織이 肉芽結締組織으로 改造되어 이것이 腫瘍支持體로서 機能를 갖게 된다고 報告하였다.

또한 Vasliev (1958)⁴⁶⁾도 幼若肉芽組織이 가지는 腫瘍組織에서 役割에 대해 같은 見解를 밝혔다. 이와 같이 腫瘍組織의 間質을 形成하는 結締組織은 腫瘍의 發育과 密接한 關係가 있기 때문에 結締組織代謝에 重要な 役割을 한다고 생각되는 collagenase의 存在와 이의 活性은 腫瘍增殖研究에 극히 重要的 課題를 提供하고 있다.

腫瘍組織에 있어서 collagenase의 存在는 Riley et al. (1967)⁸¹⁾, Robertson et al. (1969)⁸²⁾ Taylor (1970)⁸³⁾, 및 Dresden(1972)⁸⁴⁾ 등에 의해 確認되어 있다. Rieley (1967)는 浸潤增殖을 계속하는 腫瘍일수록 collagenase活性이 높고 이 活性은 腫瘍組織自體에서 由來한다고 하였고 Pinto et al. (1970)⁸⁵⁾은 腫瘍組織에 있어서의 collagenase의 生産은 2-aminoanthracene誘發腫瘍에서도 볼 수 있었지만 그 活性은 collagen合成能의 低下에 의해 左右되는 것이라 指摘하였다.

Gel狀의 collagen은 生體組織과 親化性을 가지기 때문에 그 gel上에서 細胞培養을 行하면 細胞의 成長은 아주 良好하다고 하였다⁸⁶⁾. 더욱이 collagen gel은 보통 蛋白分解酵素에 溶解되지 않기 때문에 組織의 collagenase를 檢出하는 特異的基質로서 最適이다. 本實驗에서 結節型 Tawa肉腫의 組織片을 collagen gel上에 培養한 경우 全實驗群에서 collagen gel溶解能을 認定할 수 있었다(Photo. 1~6). 특히 結節腫瘍의 內層보다도 外層에서 collagen分解能이 높았고 腫瘍浸潤層에서 collagen分解活性이 높았음을 觀察했다.

惡性腫瘍細胞는 하나의 腫瘍塊로서 增殖하여 正常組織을 壓迫하여 그 가운데를 侵入하여 組織을 破壞하는 것이 特徵이다. 浸潤을 계속하는 腫瘍은 그 進路를 妨害하는 既存 collagen을 分解하여 結締組織을 破壞한다. 腫瘍細胞는 宿主生體의 調節機構와는 떨어진 調節機構 아래 自律的으로 增殖하는 性質을 갖고 있기 때문에 腫瘍細胞가 腫瘍細胞周圍의 正常細胞나 組織을 破壞하며 宿主의 調節機構로부터 이탈하여 腫瘍細胞의 自律的增殖이 進行되어 腫瘍의 浸潤이 加東化되어 宿主의 放害없이 增殖이 繼續하게 된다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 腫瘍內層의 collagenase 活性은 時間에 따른 變化가 적은데 腫瘍外層은 時間에 따라 增加하는 傾向이 있다. collagen成分을 含有하는 結締組織을 많이 包含한 腫瘍內層이 外層보다 低活性을 나타내는 것은 이 部位에 있어서 活潑한 collagen合成을 暗示하고 있다. 반대로 腫瘍外層에서 時間에 따른

活性上昇은 이 部位에 既存의 正常組織 및 腫瘍化組織의 collagen合成이 腫瘍細胞增殖에 수반하여 일어나고 있기 때문에 合成過程 보다도 分解過程으로 動的平衡이 移動한 結果라고 思料된다.

이 collagen合成과 分解에 關與하는 生體內部에 있어 調節機構의 存在는 무엇에 의해 支配되는 지는 전혀 不明하다.

Grabowska(1959)⁵⁹⁾는 實驗腫瘍에 있어서 collagen量은 腫瘍의 增大에 따라 減少하는 것을 報告하였다. 즉 腫瘍의 成長初期에는 collagen은 急激한 減少傾向을 나타내며 腫瘍이 約 5g에 達한 경우 이의 減少傾向은 停止하고 그 後는 거의 一定量을 維持한다고 하였다. 이와같이 collagen量이 腫瘍의 成長初期에 減少하는 原因으로 collagen代謝의 動的平衡이 負의 方向으로 기울어 지든지 혹은 collagen外의 物質의 增加에 의해 collagen相對量이 減少하는 것에 起因하는 二種의 可能性을 생각할 수 있다. 이에 關連하여 collagen合成에 關與하는 protocollagen·proline·hydroxylase가 癌의 經過에 따라 一定時期에 高活性을 나타내는 것도 立證되어 있다⁸⁷⁻⁸⁹⁾. 惡性腫瘍의 成長은 無制限이기 때문에 이와같은 腫瘍의 增殖과 結締組織의 增生, 特別 collagen의 增加에 있어서 相互關係는 매우 複雜하다.

또한 Banfield (1952)⁹⁰⁾는 腫瘍組織에서는 보통 collagen纖維보다 低重合이라 생각되는 細纖維가 形成되는 것을 組織學的으로 觀察하였고 Tarin (1969)⁶⁸⁾은 腫瘍의 成長에 따라 collagen纖維는 가늘게 되어 차차 消失해 간다고 報告하였다.

本實驗과 마찬가지로 腫瘍組織片을 培養하는 方法으로 Riley et al. (1967)⁸¹⁾는 26例의 人上皮系腫瘍의 50%에서 collagenase存在를 報告하였고, Robertson et al. (1969)⁸²⁾는 rat肝의 實驗上皮腫에서 正常肝보다 높은 collagenase活性을 報告하였다. 또한 最近 Harris et al. (1972)⁹¹⁾, Yamanishi (1972, 1973)^{92), 93)} 및 Hashimoto (1973)⁹⁴⁾ 등도 上皮系腫瘍에서 높은 collagenase活性을 認定하여 그 化學的性狀에 대해 檢索하고 있다. 그러나 電氣泳動으로 分子移動은 本實驗의 結果도 마찬가지로 (Fig. 3.) 올챙이 由來의 collagenase와 同一性狀을 나타내며 다른 動物 collagenase와도 差異가 없다고 思料된다.

그러나 collagenase는 過去에는 上皮細胞에 의해서만 生産된다고 推測되었기 때문에 非上皮系腫瘍에 대하여는 별 關心이 없었다. 非上皮細胞由來의 collagenase 活性^{21), 30)}이 檢出된 것은 아주 最近이며 Taylor (1970)⁸³⁾와 Dresden (1972)⁸⁴⁾도 이를 證明하는 所見을 報告하였다. Tawa肉腫을 使用한 著者의 實驗成績도 이 見解에 支持를 주고 있다. 그러나 collagenase가 腫瘍細

胞에서 生産되는지 혹은 間質細胞에서 生産되는 지는 아직도 不明하며 collagenase가 가지는 活性發現의 意義도 推測의 領域을 벗어나지 못하고 있다.

지금까지 實驗結果에 대해 考察을 했으나 腫瘍組織에서 檢出된 collagenase는 腫瘍에 隣接한 結締組織의 腫瘍性破壞, 즉 腫瘍細胞의 浸潤增殖에 促進의 作用할 可能이 있다고 思料된다. 이 結果는 腫瘍의 浸潤增殖機轉解明에 어떤 指針이 될 것으로 思料된다.

結 論

Tawa肉腫細胞를 rat背部皮下에 移植하여 腫瘍移植 5, 8, 11日의 3期로 나누워 얻은 結節型腫瘍을 rat皮膚 및 尾臑에서 抽出한 中性鹽 및 酸可溶性 collagen gel 上에 培養하여 腫瘍組織에 含有되는 collagenase活性를 檢索하였다. 또한 腫瘍組織의 培養 medium에서 抽出한 collagenase를 disk電氣泳動에서 精製하여 前記 基質에 作用시켜서 얻어진 分解生成物과 그 分解過程을 disk電氣泳動으로 檢討한 結果는 다음과 같다.

1. Rat皮膚 및 尾臑에서 抽出한 中性鹽 혹은 酸可溶性 collagen은 純도가 높고 一般의 蛋白質分解酵素에 抵抗性을 가지며 collagenase에 特異的으로 作用하는 基質로서 適合하다.

2. 結節型 Tawa肉腫은 基質collagen gel溶解能을 가지고 collagenase의 存在가 確認되었다.

3. 結節型 Tawa肉腫에 있어서 collagenase는 腫瘍組織外層에서 높은 活性를 나타내며 가장 活性이 높은 것은 腫瘍細胞移植後 11日의 外層이며 가장 적은 것은 5日의 外層이다.

4. 腫瘍細胞移植後 各時期의 collagenase活性의 變動은 內層에서 減少하였으나 外層에서 時間이 지남에 따라 增加하는 傾向이 있다.

5. collagenase活性値와 collagen gel溶解度는 잘 一致한 相關關係를 나타내었다.

6. 抽出 collagenase는 培養 medium의 ammonium sulfate 30~60%飽和點分을 disk電氣泳動하여 濃縮分離하였다.

7. 結節型 Tawa肉腫에서 보이는 collagenase의 作用은 動物組織에 證明되는 中性領域, 低溫으로 collagen分子를 3:1로 分解하는 collagenase와 同一하다는 것을 disk電氣泳動에 의해 確認하였다.

References

1) Neuberger, A., Perrone, J.C. and Slack, H. G.B.: The Relative Metabolic Inertia of

Tendon Collagen in the Rat: *Biochem. J.*, 49: 199, 1951.
 2) Grillo, H.C. and Gross, J.: Collagenolytic Activity during Mammalian Wound Repair: *Develop. Biol.*, 15: 300, 1967.
 3) Donoff, R.B., McLennan, J.E. and Grillo, H. C.: Preparation and Properties of Collagenases from Epithelium and Mesenchyme of Healing Mammalian Wounds: *Biochim. Biophys. Acta*, 227: 639, 1971.
 4) Harkness, R.D. and Moralee, B.E.: The Time-Course and Route of Loss of Collagen from the Rat's Uterus during Post-Partum Involution: *J. Physiol.*, 132: 502, 1956.
 5) Gross, J. and Lapiere, C.M.: Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay: *Proc. nat. Acad. Sci.*, 48: 1014, 1962.
 6) Gross, J. and Nagai, Y.: Specific Degradation of the Collagen Molecule by Tadpole Collagenolytic Enzyme: *ibid.*, 54: 1197, 1965.
 7) Nagai, Y., Lapiere, C.M. and Gross, J.: Tadpole Collagenase. Preparation and Purification: *Biochem.*, 5: 3123, 1966.
 8) Sakai, T. and Gross, J.: Some Properties of the Products of Reaction of Tadpole Collagenase with Collagen: *ibid.*, 6: 518, 1967.
 9) Eisen, A.Z., Jeffrey, J.J. and Gross, J.: Human Skin Collagenase. Isolation and Mechanism of Attack on the Collagen Molecule: *Biochim. Biophys. Acta*, 151: 637, 1968.
 10) Eisen, A.Z., Bauer, E.A. and Jeffrey, J.J.: Human Skin Collagenase. The Role of Serum Alpha-Globulins in the Control of Activity in vivo and in vitro: *Proc. nat. Acad. Sci.*, 68: 248, 1971.
 11) Woods, J.F. and Nichols, JR. G.: Collagenolytic Activity in Mammalian Bone: *Science*, 142: 386, 1963.
 12) Stern, B.D., Mechanic, G.L., Glimcher, M.J. et al.: The Resorption of Bone Collagen in Tissue Culture: *Biochem. biophys. Res. Comm.*, 13: 137, 1963.
 13) Kaufman, E.J., Glimcher, M.J., Mechanic, G.L. et al.: Collagenolytic Activity during Active Bone Resorption in Tissue Culture: *Biochem. J.*, 49: 199, 1951.

- Proc. Soc. exp. Biol. Med., 120 : 632, 1965.
- 14) Shimizu, M., Glimcher, M.J., Travis, D. et al. : Mouse Bone Collagenase: Isolation, Partial Purification, and Mechanism of Action: *ibid.*, 130 : 1175, 1969.
 - 15) Fullmer, H.M. and Lazarus, G.S. : Collagenase in Bone of Man: *J. Histochem. Cytochem.*, 17 : 793, 1969.
 - 16) Sakamoto, S., Goldhaber, P. and Glimcher, M.J. : The Further Purification and Characterization of Mouse Bone Collagenase: *Calc. Tiss. Res.*, 10 : 142, 1972.
 - 17) Strates, B.S. and Urist, M.R. : Collagenase and Proteinase Induction in Implants of Bone Matrix: *Biochem. biophys. Res. Comm.*, 49 : 752, 1972.
 - 18) Jeffrey, J.J. and Gross, J. : Collagenase from Rat Uterus. Isolation and Partial Characterization: *Biochem.*, 9 : 268, 1970.
 - 19) Woessner, JR. J.F. and Ryan, J.N. : Collagenase Activity in Homogenates of the Involuting Rat Uterus: *Biochim. Biophys. Acta*, 309 : 397 1973.
 - 20) Harris, JR. E.D. and Krane, S.M. : An Endopeptidase from Rheumatoid Synovial Tissue Culture: *ibid.*, 258 : 566, 1972.
 - 21) Nagai, Y. and Hori, H. : Vertebrate Collagenase: Direct Extraction from Animal Skin and Human Synovial Membrane: *J. Biochem.*, 72 : 1147, 1972.
 - 22) Harris, JR. E.D., Dibona, D.R. and Krane, S.M. : Collagenases in Human Synovial Fluid: *J. Clin. Invest.*, 48 : 2104, 1969.
 - 23) Abe, S. and Nagai, Y. : Evidence for the Presence of a Complex of Collagenase with α_2 -Macroglobulin in Human Rheumatoid Synovial Fluid: A Possible Regulatory Mechanism of Collagenase Activity in vivo: *J. Biochem.*, 73 : 897, 1973.
 - 24) Abe, S., Shinmei, M. and Nagai, Y. : Synovial Collagenase and Joint Disease: The Significance of Latent Collagenase with Special Reference to Rheumatoid Arthritis: *ibid.*, 73 : 1007, 1973.
 - 25) Fullmer, H.M. and Gibson, W. : Collagenolytic Activity in Gingivae of Man: *Nature*, 209 : 728, 1966.
 - 26) Gibson, W. and Fullmer, H. : Collagenolytic Activity of Gingival Tissues in vitro: *J. dent. Res.*, 45 : 1225, 1966.
 - 27) Beutner, E.H., Trifshauer, C. and Hazen, S.P. : Collagenase Activity of Gingival Tissue from Patients with Periodontal Disease. : *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 121 : 1082, 1966.
 - 28) Fullmer, H.M. : Histochemical Studies of the Periodontium: *J. dent. Res. (Supple. No.3)*, 45 : 469, 1966.
 - 29) Bennick, A. and Hunt, A.M. : Collagenolytic Activity in Oral Tissues: *Arch. oral Biol.*, 12 : 1, 1967.
 - 30) Fullmer, H.M., Gibson, W.A., Lazarus, G.S. et al. : The Origin of Collagenase in Periodontal Tissues of Man: *J. dent. Res. (Supple. No.3)*, 48 : 646, 1969.
 - 31) Taylor, A.C. : Collagenolysis in Cultured Tissue: I. Digestion of Mesenteric Fibers by Enzymes from Explanted Gingival Tissue: *J. dent. Res.*, 50 : 1294, 1971.
 - 32) Fullmer, H.M., Taylor, R.E. and Guthrie, R.W. : Human Gingival Collagenase: Purification, Molecular Weight, and Inhibitor Studies: *J. dent. Res. (Supple. No.2)*, 51, 349, 1972.
 - 33) Lazarus, G.S., Brown, R.S., Daniels, J.R. et al. : Human Granulocyte Collagenase: *Science*, 159 : 1483, 1968.
 - 34) Robertson, P.B., Ryel, R.B., Taylor, R.E. et al. : Collagenase: Localization in Polymorphonuclear Leukocyte Granules in the Rabbit: *ibid.*, 177 : 64, 1972.
 - 35) Ohlsson, K. and Olsson, I. : The Neutral Proteases of Human Granulocytes: Isolation and Partial Characterization of Two Granulocyte Collagenases: *Europ. J. Biochem.*, 36 : 473, 1973.
 - 36) Gross, J. : The Animal Collagenase: Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix Vol.3 (Ed. by Balazs, E.A.), 1623, Academic Press, New York and London, 1970.
 - 37) Harper, E., Bloch, K.J. and Gross, J. : The Zymogen of Tadpole Collagenase: *Biochem.*, 10 : 3035, 1971.

- 38) Vaes, G.: The Release of Collagenase as an Inactive Proenzyme by Bone Explants in Culture: *Biochem. J.*, 126: 275, 1972.
- 39) Woessner, JR. J.F.: Acid Hydrolases of Connective Tissue: International Review of Connective Tissue Research. Vol.3 (Ed. by Hall, D.A.), 201, Academic Press, New York and London, 1965.
- 40) Vasiliev, J.M.: The Role of Connective Tissue Proliferation in Invasive Growth of Normal and Malignant Tissues: A Review: *Brit. J. Cancer*, 12: 524, 1958.
- 41) Vasiliev, J.M.: Early Changes in the Subcutaneous Connective Tissue of Rats after Implantation of Pellets Containing Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons: *J. nat. Cancer Inst.* 23: 441, 1959.
- 42) Vasiliev, J.M. and Guelstein, V.I.: Sensitivity of Normal and Neoplastic Cells to the Damaging Action of Carcinogenic Substances: A Review: *ibid.*, 31: 1123, 1963.
- 43) 榑 鐵也, 鶴身 紀雄, 河村 宏ほか; 腫瘍組織の酸性ムコ多糖類 第1報 結節型多和肉腫の酸性ムコ多糖類: *齒基礎誌*, 12: 14, 1970.
- 44) 鶴身 紀雄; 腫瘍の増殖におよぼす酸性ムコ多糖類の影響について; *齒科醫學*, 33: 593, 1970.
- 45) Sakaki, T., Tsurumi, N., Maeda, J. et al.: Studies on the Influences of Acid Mucopolysaccharides on the Growth of Tawa Sarcoma: *J. Osaka dent. Univ.*, 4: 113, 1970.
- 46) 本多 忠敬; 腫瘍組織の酸性ムコ多糖類 第2報 Silicone-induced tumor の酸性ムコ多糖類: *齒科醫學* 34: 413, 1971.
- 47) Sakaki, T., Tsurumi, N., Maeda, J. et al.: Acid Mucopolysaccharides in Silicone-induced Tumors of Rats: *Gann*, 63: 167, 1972.
- 48) 堤之柳太郎; コンドロイチン硫酸の多和肉腫増殖促進作用について: *齒科醫學*, 35: 67, 1972.
- 49) 青野 公; 腫瘍組織の酸性ムコ多糖類 第3報 多和肉腫細胞および腹水の酸性ムコ多糖類: *同誌*, 35: 259, 1972.
- 50) Sakaki, T., Tsurumi, N., Tsutsumino, R. et al.: Promoting Activity of Chondroitin Sulfate A on the Growth of Tawa Sarcoma: *J. Osaka dent. Univ.*, 6: 1, 1972.
- 51) 阿部 克生; 腫瘍細胞の肝轉移にともなう肝酸性ムコ多糖の變動について; 投稿中
- 52) Gersh, I. and Catchpole, H.R.: The Organization of Ground Substance and Basement Membrane and its Significance in Tissue Injury, Disease and Growth: *Amer. J. Anat.*, 85: 457, 1949.
- 53) Grabowska, M.: Collagen Content of Normal Connective Tissue of Tissue Surrounding a Tumour and of Growing Rat Sarcoma: *Nature*, 183: 1186, 1959.
- 54) Tawa, T., Sakaki, T., Yokota, Y. et al.: A New Spontaneous Transplantable Tumor in Donryu Rat: *Gann*, 56: 75, 1965.
- 55) Kang, A.H., Nagai, Y., Piez, K.A. et al.: Studies on the Structure of Collagen Utilizing a Collagenolytic Enzyme from Tadpole: *Biochem* 5: 509, 1966.
- 56) Glimcher, M.J., Francois, C.J., Richards, L. et al.: The Presence of Organic Phosphorus in Collagens and Gelatins: *Biochim. Biophys. Acta*, 93: 585, 1964.
- 57) Woessner, JR. J.F.,: The Determination of Hydroxyproline in Tissue and Protein Samples Containing Small Proportions of This Imino Acid: *Arch. Biochem. Biophys.*, 93: 440, 1961
- 58) 鶴藤 丞; フェノール試薬法によるコラーゲンおよびゼラチン中のチロシンの定量法: *生化学*, 36: 277, 1964.
- 59) 佐藤 敏子; フェノール硫酸による血清ムコタンパク (seromuroid 分畫) 中の総ヘキソース微量定量法: *同誌*, 34: 635, 1962.
- 60) Kivirikko, K.I., Laitinen, O. and Prockop, D.J.: Modifications of a Specific Assay for Hydroxyproline in Urine: *Anal. Biochem.*, 19: 249, 1967.
- 61) Ornstein, L.: Disc Electrophoresis-I. Background and Theory: *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121: 321, 1964.
- 62) Davis, B.J.: Disc Electrophoresis-II. Method and Application to Human Serum Proteins: *ibid.*, 121: 404, 1964.
- 63) Nakai, Y., Gross, J. and Piez, K.A.: Disc Electrophoresis of Collagen Components: *ibid.*, 121: 494, 1964.

- 64) Butler, W. T. and Cunningham, L. W.: Evidence for the Linkage of a Disaccharide to Hydroxylysine in Tropocollagen: *J. biol. Chem.*, 241 : 3882, 1966.
- 65) Gross, J. and Kirk, D.: The Heat Precipitation of Collagen from Neutral Salt Solutions: Some Rate-Regulating Factors: *ibid.*, 233 : 355 1958.
- 66) Abe, S. and Nagai, Y.: Interaction between Tadpole Collagenase and Human α_2 -Macroglobulin: *Biochim. Biophys. Acta*, 278 : 125, 1972
- 67) Schwarz, W. und Güldner, F.H.: Elektrone nmikroskopische Untersuchungen des Kollagenabbaus in Uterus der Ratte nach der Schwangerschaft: *Z. Zellforsch.*, 83 : 416, 1967.
- 68) Tarin, D.: Fine Structure of Murine Mammary Tumours: The Relationship between Epithelium and Connective Tissue in Neoplasms Induced by Various Agents: *Brit. J. Cancer*, 23 : 417, 1969.
- 69) Kiriluk, L.B., Kremen, A.J. and Glick, D.: Mucolytic Enzyme Systems: (XII) Hyaluronidase in Human and Animal Tumors, and Further Studies on the Serum Hyaluronidase Inhibitor in Human Cancer: *J. nat. Cancer Inst.*, 10 : 993, 1950.
- 70) Burstone, M.S.: Histochemical Demonstration of Proteolytic Activity in Human Neoplasms: *ibid.*, 16 : 1149, 1956.
- 71) Leighton, J., Kline, I., Belkin, M. et al.: Studies on Human Cancer Using Sponge-Matrix Tissue Culture: III. The Invasive Properties of a Carcinoma (Strain He La) as Influenced by Temperature Variations, by Conditioned Media, and in Contact with Rapidly Growing Chick Embryonic Tissue: *ibid.*, 16 : 1353, 1956.
- 72) Leighton, J., Kalla, R.L., Kline, I. et al.: Pathogenesis of Tumor Invasion: I. Interaction between Normal Tissues and "Transformed" Cells in Tissue Culture: *Cancer Res.*, 19 : 23, 1959.
- 73) Sylven, B., Ottoson, R. and Revesz, L.: The Content of Dipeptidases and Acid Proteinases in the Ascitic Fluid of Mice with Ascites Tumours: *Brit. J. Cancer*, 13 : 551, 1959.
- 74) Sylven, B. and Bois, I.: Protein Content and Enzymatic Assays of Interstitial Fluid from Some Normal Tissues and Transplanted Mouse Tumors: *Cancer Res.*, 20 : 831, 1960.
- 75) Sylven, B. and Bois-Svensson, I.: On the Chemical Pathology of Interstitial Fluid: I. Proteolytic Activities in Transplanted Mouse Tumors: *ibid.*, 25 : 458, 1965.
- 76) Benz, G. und Lehmann, F.E.: Das Verhalten gewebseigener Proteasen aus normalen und malignen Geweben der Ratte: *Helv. Physiol. Acta*, 17 : 380, 1959.
- 77) Goldberg, D.M., McAllister, R.A. and Roy, A.D.: Proteolytic Enzymes in Adenocarcinomata of the Human Colon: *Brit. J. Cancer*, 23 : 735, 1969.
- 78) 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, 1959.
- 79) Braun-Falco, O. and Salfeld, K.: Leucin Aminopeptidase Activity in Mast Cells: *Nature*, 183 : 51, 1959.
- 80) 宮田 樂, 住田 行夫, 岡島 昭夫; 腫瘍間質としての結合織に關する病理形態學的研究・吉田肉腫の皮下移植による觀察: *日病會誌*, 43 : 344, 1954.
- 81) Riley, JR. W.B. and Peacock, JR. E.E.: Identification, Distribution, and Significance of a Collagenolytic Enzyme in Human Tissues: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 124 : 207, 1967.
- 82) Robertson, D.M. and Williams, D.C.: In vitro Evidence of Neutral Collagenase Activity in an Invasive Mammalian Tumour: *Nature*, 221 : 259, 1969.
- 83) Taylor, A.C., Levy, B.M. and Simpson, J. W.: Collagenolytic Activity of Sarcoma Tissues in Culture: *ibid.*, 228 : 366, 1970.
- 84) Dresden, M.H., Heilman, S.A. and Schmidt, J.D.: Collagenolytic Enzymes in Human Neoplasms: *Cancer Res.*, 32 : 993, 1972.
- 85) Pinto, J.S., Dobson, R.L. and Bentley, J.P.: Dermal Collagen Changes during 2-Aminoanthracene Carcinogenesis in the Rat: *ibid.*, 30 : 1168, 1970.

- 86) Ehrmann, R.L. and Gey, G.O.: The Growth of Cells on a Transparent Gel of Reconstituted Rat-Tail Collagen: J. nat. Cancer Inst., 16 : 1375, 1956.
- 87) Halme, J., Uitto, J., Kahanpää, K. et al.: Protocollagen Proline Hydroxylase Activity in Experimental Pulmonary Fibrosis of Rats: J. Labo. clin. Med., 75 : 535, 1970.
- 88) Roberts, N.E. and Udenfriend, S.: Appearance of Collagen Proline Hydroxylase in Sera of Mice with Implanted Sarcomas: J. nat. Cancer Inst., 45 : 277, 1970.
- 89) Keiser, H.R., Vogel, C.L. and Sadikali, F.: Potocollagen Proline Hydroxylase in Sera of Ugandans with Hepatocellular Carcinoma: ibid. 49 : 1251, 1972.
- 90) Banfield, W.G.: Occurrence of Tapered Collagen Fibrils from Human Sources with Observations on Mesenchymal Neoplasms: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 81 : 658, 1952.
- 91) Harris, JR. E.D., Faulkner, II C. S. and Wood, JR. S.: Collagenase in Carcinoma Cells: Biochem. biophys. Res. Comm., 48 : 1247, 1972.
- 92) Yamanishi, Y., Dabbous, M.K. and Hashimoto, K.: Effect of Collagenolytic Activity in Basal Cell Epithelioma of the Skin on Reconstituted Collagen and Physical Properties and Kinetics of the Crude Enzyme: Cancer Res., 32 : 2551, 1972.
- 93) Yamanishi, Y., Maeyens, E., Dabbous, M.K. et al.: Collagenolytic Activity in Malignant Melanoma: Physicochemical Studies: ibid., 33 : 2507, 1973.
- 94) Hashimoto: K., Yamanishi, Y., Maeyens, E. et al.: Collagenolytic Activities of Squamous Cell Carcinoma of the Skin: ibid., 33 : 2790, 1973.



보 성 치 과 기 공 소

대 표 박 윤 삼

서울특별시 동대문구 창신동 465



Tel. (53) 3 4 1 1