

# 癌の増殖に関する研究

## 第 1 編

### Ehrlich 腫瘍の増殖に及ぼす間質成分の影響

岡山大学医学部：平木内科（主任：平木潔教授）

副 手 西 崎 良 知

〔昭和49年4月25日受稿〕

#### 第1章 緒 言

悪性腫瘍は実質と間質より構成されているが実質細胞が増殖していくために間質成分が何らかの影響を及ぼしているであろうことは以前より考えられていた。1925年 Fisher<sup>1)</sup> は Rous 肉腫の発育に線維芽細胞の存在が促進的に働くことを組織培養法により立証しており、又腫瘍細胞を長期継代培養する目的で腫瘍細胞と線維芽細胞の併置培養が行われている。<sup>2)</sup> 又竹内<sup>3)</sup> はアクリフラビンの硫酸エステルに対する特異的結合反応を利用して組織化学的に酸性ムコ多糖類の分布を検討し Brown-Pearce 家免疫において、特に腫瘍増殖の旺盛な部分に酸性ムコ多糖類が多いことより、これが腫瘍増殖に促進的に働いているのであろうと推論している。さらに亀井ら<sup>4)</sup> は免疫と結合織の変化より癌増殖をとらえた研究を行っているが、その中で免疫力を考慮しない場合には結合織の幼若なものは腫瘍増殖促進の傾向を認めると報告している。我々の教室においては以前より、この事実に注目し癌の増殖において、その腫瘍内間質成分は腫瘍増殖に促進的に働くとの立場から線維芽細胞の抑制剤であるクロロキンを投与し、動物実験及び臨床例について腫瘍の縮小傾向があることを報告している。<sup>5) 7) 9) 10) 11)</sup> 以上のことより腫瘍内間質成分が癌の増殖に促進的に働いている可能性が考えられるが、逆に間質の有力な成分である酸性ムコ多糖類の多い状態に腫瘍細胞を置き、その腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響をみたらどのようなであろうか。これについて竹内<sup>12) 13)</sup> は第24回日本癌学会以来マウスの背部皮下にコンドロイチン硫酸を投与し、その部に腫瘍細胞を移植し、その増殖を観察しているが、それによるとコンドロイチン硫酸の局所投与後の腫瘍増殖は対照に比較して明らかに促

進されると報告している。本稿においては間質成分の有力な物質であるコンドロイチン硫酸を始め、種々の物質を in vivo で直接癌増殖の場に投与し、その結果として2～3の知見を得たので報告する。

#### 第2章 実験材料及び実験方法

実験材料：実験に使用したマウスは Strong A 系マウス(♂)で平均25gのものを担癌生体として使用、又移植した癌細胞は教室で継代されている Ehrlich 腹水癌を使用した。

実験方法：上述したマウスを実験直前に各群に無作為に10匹ずつ分け、その背部皮下に Ehrlich 腫瘍を移植した。その移植直前に種々の間質成分を移植すべき皮下に投与して、対照と比較しながら、その後の腫瘍発育の程度を観察、計測し、移植後10～12日にマウスを屠殺し腫瘍重量を測定した。又一部は腫瘍重量を経時的に観察する目的で5日目、10日目、12日目にマウスを屠殺し、腫瘍重量を比較した。さらに重量を測定した腫瘍は直ちに固定し組織学的に検討した。

実験1：先ず間質成分として重要な成分と考えられるコンドロイチン硫酸を投与した場合いかなる影響があるか又コンドロイチン硫酸が促進的に働くとするれば如何なる濃度が最もその促進効果があるかを知るために次の如き実験を行った。即ち、腫瘍移植直前に各群10匹ずつマウスを区別し、4群とし、第1群対照、第2群2%コンドロイチン硫酸腹腔内投与群、第3群2%コンドロイチン硫酸背部皮下投与群、第4群4%コンドロイチン硫酸背部皮下投与群とした。第1群には腫瘍移植直前にその移植部の背部皮下にリンゲル液1mlを、第2群には移植直前にその腹腔内に1mlの2%コンドロイチン硫酸1mlを、第3群には移植直前にその移植部背部皮下に2%コ

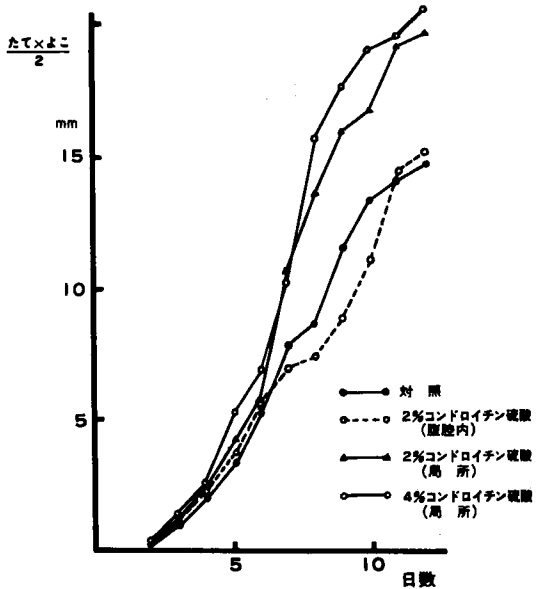
ンドロイチン硫酸 1 ml を、第 4 群はその移植直前に 4 % コンドロイチン硫酸 1 ml を移植部の背部皮下に投与した。移植した腫瘍は前述した如く Ehrlich 腹水腫瘍であり、腫瘍細胞数は  $81500/\text{mm}^3$  のものを各々 0.1 ml 使用した。そして腫瘍移植後経時的に腫瘍の大きさを測定し、12 日後担瘤マウスを屠殺し、腫瘍重量の変化を観察した。又担瘤マウスより取出した腫瘍はこれを 2 分して 1 つは 10 % フォルマリン固定し、他の 1 つはカルノア液にて固定した後パラフィン切片を作り組織学的に検討を行った。なおここで使用したコンドロイチン硫酸は分子量約 50000 のコンドロイチン硫酸 C (化研) である。

実験 2 : 次にコンドロイチン硫酸以外の主に生体物質の癌増殖に及ぼす影響を観察するために下記の実験を行った。移植前の処置及び癌移植方法は実験 1 と同様であるが本実験では、マウスを各 5 群に分け、第 1 群は前回同様リンゲル液で前処置をしたもの、第 2 群は 4 % ポリビニールピロリドン (PVP) で前処置をしたもの、第 3 群は 4 % コンドロイチン硫酸で前処置をしたもの、第 4 群は教室で培養中のマウス組織より分離され株化された間葉系の培養細胞である L 株細胞の抽出液で前処置をしたもの、第 5 群は胎児抽出液で前処置をしたものとし、実験 1 と同様の方法で腫瘍の経時的計測と腫瘍重量の比較を行った。なおここでいう 4 % ポリビニールピロリドンは分子量約 60000 のものを使用し、L 株細胞の抽出液は教室で継代培養されている L 株細胞を遠心沈澱により集め、リンゲル液で 3 回洗滌し、リンゲル液を加え細胞数を算定した後凍結融解にて細胞を破壊した後遠心沈澱をしてその上清を使用した。凍結融解前の L 株細胞数は  $5140/\text{mm}^3$  であった。胎児抽出液は Strong A 系マウスの妊娠子宮より無菌的に胎児をとり出し、それをホモジナイザーでホモジナイズした後リンゲル液で 2 倍に稀釈後、L 株細胞と同様凍結融解で細胞を破壊し、その後遠心沈澱をし、その上清を使用した。

第 3 章 実験成績

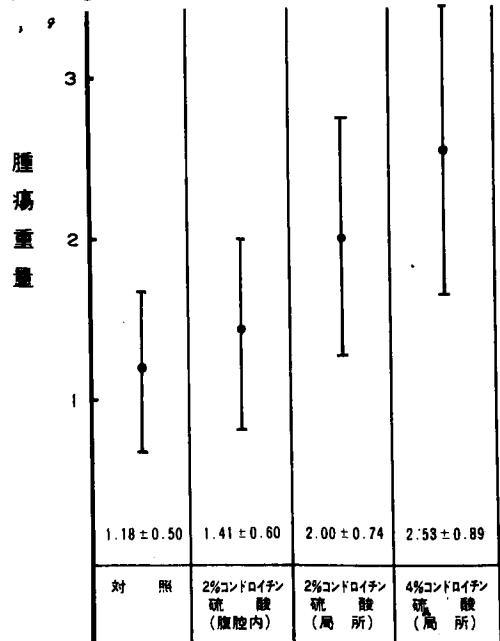
実験 1 においては先ず、第 1 図に示す如く腫瘍の経時的計測結果においては腫瘍移植後 6 日目までは 4 者の間に著明な差異は認められないが 7 日目頃より、第 1 群の対照に比較して第 3 群 2 % コンドロイチン硫酸局所投与群及び第 4 群 4 % コンドロイチン硫酸局所投与群は著明にその腫瘍の大きさを増し、その差は移植後 10 日ないし 12 日目に最大に達する。

図-1 Ehrlich腫瘍に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響 (Strong A系マウス)



その後はその頃より著明に起る壊死のためかその差はむしろ次第に減ずる。又第 2 群 2 % コンドロイチン硫酸腹腔内投与群では経時的測定では移植後 7 日目から 10 日目にかけてやや対照群の方が大きい傾向

図-2 Ehrlich腫瘍に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響 (Strong A系マウス)



第1表

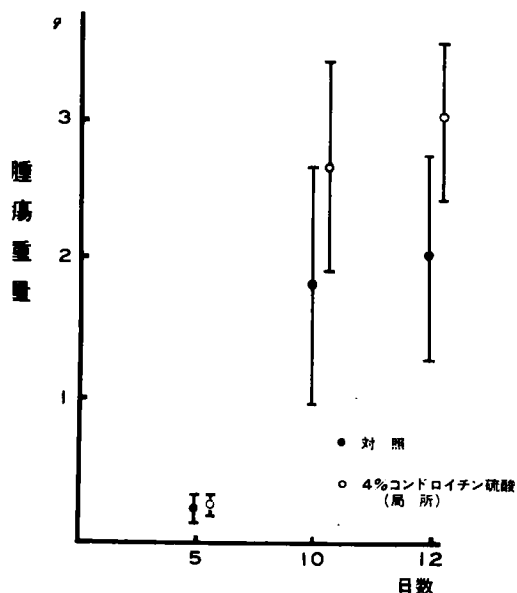
	対 照	2%コンドロイチン硫酸 (腹腔内)	2%コンドロイチン硫酸 (局所)	4%コンドロイチン硫酸 (局所)
腫瘍重量	1.18±0.50	1.41±0.60	2.00±0.74	2.53±0.89
有意差		P>0.05	P<0.01	P<0.01

が見られるが10日目以後は殆んど対照と大きさに  
 おいて変らなくなるようである。12日目屠殺時にお  
 ける腫瘍重量は、第2図、第1表に示す如くで、対  
 照に比して2%コンドロイチン硫酸局所投与群、4%  
 コンドロイチン硫酸投与群では明らかな腫瘍重量の  
 増大が認められた。これに反し2%コンドロイチン  
 硫酸腹腔内投与群は対照との間に腫瘍重量の差は認  
 められなかった。次に経時的に屠殺して観察した対  
 照とコンドロイチン硫酸局所投与群との成績は、第  
 3図に示す如くで、移植後5日目にはその差が殆ん

と群では対照に比して癌細胞巣の数が多く、腫瘍増  
 殖が多源的に行われたのではないかと推論が出来る。  
 又コンドロイチン硫酸局所投与群は対照に比して  
 細胞間の間隔がやや粗である様に思われた。間質  
 染色を行って面者の比較を試みたが、その結果で  
 はコンドロイチン硫酸投与群にやや腫瘍間質が腫瘍  
 内に多いかに思われたが、腫瘍内に壊死もかなり認  
 められ、その影響を否定出来ないため結論は出な  
 かった。腫瘍周囲の包囲間質では両者に差を認め得  
 なかった。

図-3

Ehrlich腫瘍に及ぼすコンドロイチン硫酸の影響  
 (Strong系ハウス)



ど認められないが、10日目、12日目では明らかに局  
 所投与群にその腫瘍重量の増加が認められている。  
 腫瘍重量測定のために取り出した腫瘍を観察すると  
 対照に比してコンドロイチン硫酸投与群は背部皮下  
 に広く拡ってはいるが、腫瘍の高さは両者にあまり  
 違いはなく、腫瘍は皮下を浸潤性に拡っていること  
 に気付く。組織学的にはコンドロイチン硫酸局所投

実験2においては前述したコンドロイチン硫酸の  
 他に比較的分子量の似ているポリビニールピロリ  
 ドン及び比較的間質成分の多量に含まれていると考  
 えられるL株細胞及び胎児抽出液を使用し、コンド  
 ロイチン硫酸投与と同様な効果があるかどうかにつ  
 いて実験を行った。その結果コンドロイチン硫酸以  
 外のL株細胞抽出液及び胎児抽出液を投与したもの  
 についてもコンドロイチン硫酸投与群同様、対照に  
 比して腫瘍の増大が認められた。即ち、経時的に行  
 った腫瘍計測においては前実験同様移植後6日目頃  
 より対照に比して、L株細胞抽出液投与群及び胎児  
 抽出液投与群コンドロイチン硫酸投与群は著明に増  
 大を示した。4%ポリビニールピロリドン投与群で  
 はこれに反して移植後7日目までは対照と比べて腫  
 瘍の増大は認められなかったが、8日目より10日  
 目までの間は対照に比してやや大きいように思われ  
 た。(第4図)又今回の実験では腫瘍の増大が著し  
 かったため前回と異なり移植後10日目に屠殺して  
 その腫瘍重量を比較した。それによると対照の1.2  
 ±0.7gに対し、4%PVP投与群では1.8±0.5g、  
 L株細胞抽出液投与群では2.8±0.5g、胎児抽出  
 液投与群では3.5±0.3gであり、特に後2者では  
 腫瘍の増大が著明であった。(第5図第2表)なお  
 4%PVP投与群は本実験では腫瘍の増大は対照に  
 対して有意差がある結果を得たが、後に行った再  
 現性の実験では有意差を認め得なかった。実験2  
 において取り出した腫瘍についても実験1におけ  
 ると同様これを組織学的に検索したがコンドロイ  
 チン硫酸投与群とほぼ同様で特に明確な差異は  
 認め得なかった。

図-4

Ehrlich腫瘍に対するコンドロイチン硫酸、L株抽出液、PVP胎児抽出液の影響 (Strong A系マウス)

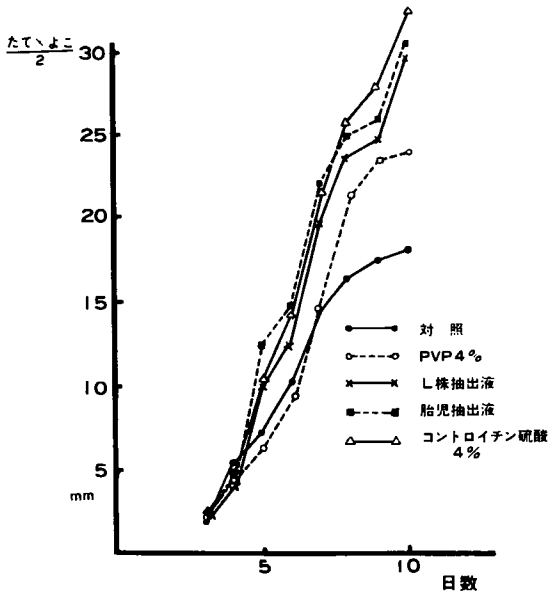
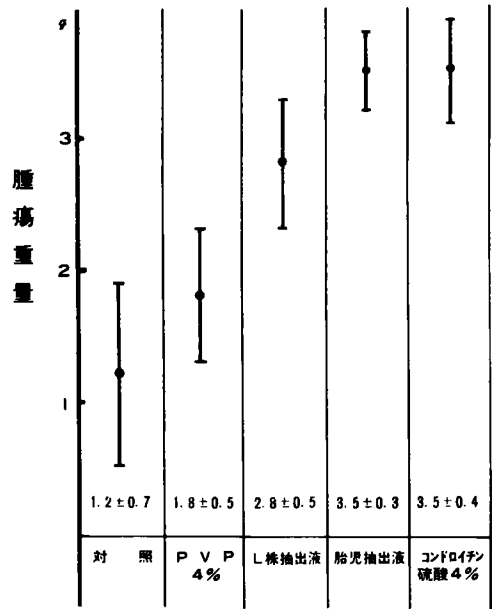


図-5

Ehrlich腫瘍に対するコンドロイチン硫酸、L株抽出液、PVP胎児抽出液の影響 (Strong A系マウス)



第2表

	対 照	4 % PVP	L株抽出液	胎児抽出液	4 %コンドロイチン硫酸 (局所)
腫瘍重量 (g)	1.21 ± 0.72	1.82 ± 0.51	2.83 ± 0.49	3.50 ± 0.30	3.51 ± 0.39
有意差		P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01	P < 0.01

第4章 総括並びに考按

我々は数年来、腫瘍間質、特に腫瘍内間質成分が腫瘍の増殖に促進的に働いているのではないかの考えから種々検討を加えているが、本稿においては、コンドロイチン硫酸投与の際、腫瘍増殖が促進されることを濃度との関係において観察するとともに、他の成分についても検討した。胎児抽出液及びL株細胞抽出液については純粋な物質ではないが、比較の間質成分が多く含まれていると考えられるため、これを使用した、それらはいずれも腫瘍増殖に促進的に働くとの結果を得た。

腫瘍の間質が腫瘍の増殖に対して何らかの影響を与えているであろうことは古くより想像されているが、竹内ら<sup>11)</sup>は前述の如く、第20回日本癌学会総会において Brown-Pearce 家免疫を組織学的に検討し、癌組織の中で細胞分裂が多い腫瘍増殖の旺盛な部分に酸性ムコ多糖類の量が多いことを報告してい

る。又滝沢ら<sup>14)</sup>は、第24回日本癌学会総会において主として人癌の剖検例を中心に67例の癌組織を検討し、その組織化学的検討を行っているが、その中で特に腫瘍基質に対する検索ではアルシアンブルー染色を使用し、酸性ムコ多糖類の変化を追求している。これによれば胃腺腫、肝腺腫、乳腺症などの良性腫瘍にはその基質には殆んど酸性ムコ多糖類が認められなかったのに反し、悪性腫瘍ではその基質に明らかに多量の酸性ムコ多糖類を認め得るといふ。又それを組織分類によって見ると、肺癌及び胃癌組織分類委員会の分類に従えば、その浸潤度と密接な関連があり、浸潤度β (INF β) のものに特に酸性ムコ多糖類の増加が著しいという。

さらに竹内<sup>12)</sup>は第24回日本癌学会総会以来酸性ムコ多糖類が腫瘍増殖に促進的に働くとの立場より種々の報告をしているが、この報告によるとコンドロイチン硫酸及びヒアウロン酸を局所に投与するとその濃度により、又その投与量によりその腫瘍増殖

に差が生じ、又コンドロイチン硫酸以外のデキストラン硫酸、コラーゲンなどでは腫瘍の増殖は促進されず、又コンドロイチン硫酸及びヒアウロン酸投与群では担癌生体の生存日数も短縮するという。我々の今回の実験でも竹内氏の報告とほぼ同様の結果を得たが、更にL株細胞、胎児抽出液などについてもコンドロイチン硫酸投与の場合と同様の結果を得たことは、生体内に存在する物質のままでも十分に腫瘍増殖に効する促進作用があると考えられ興味深い。元来悪性腫瘍は、その特長として生体を死にいたらしめるまで無限に増殖しつづけることより、とかく癌実質細胞の増殖能力にその研究対象がおかれがちであるが癌組織も本来生体の中で増殖を続けているものであるかぎり生体の種々の影響を受けていることは容易に想像される。即ち癌の増殖を左右する条件として、癌-宿主間の種々の関係を常に考慮に入れる必要がある。例えば内分泌系の腫瘍においては著明にホルモンの影響を受けているし、癌増殖に関してその宿主の免疫力により多大の影響があることも今日明らかになっている。しかしそのような全身的影響とともに、癌増殖の場における局所的な問題も全身的な問題に劣らず重要である。前述した論文の他に、滝沢ら<sup>15) 16) 17)</sup>は第26回日本癌学会総会において、多数の人悪性腫瘍について応沷なる組織学的検討を行い、腸及び尿路系腫瘍においては、良性腫瘍は、その間質細胞に変性が認められないのに反して、悪性腫瘍では増殖の癌実質に接する間質細胞に脂肪変形を含む間質細胞の崩壊消失等が生ずると報告しており、これは悪性の非上皮性の腫瘍でも腫瘍の実質細胞に接する間質組織においては同様の変化が見られるという。このことはいわゆる自然発生人癌においても、間質細胞及び間質成分が何らかの関与をしていることを考えさせられる所見として大変興味深い。

特に近年癌化学療法法の進歩に伴って担癌生体と癌組織との関係を検討することは益々重要かつ緊急の問題とされているが、やはりこの場合においても、化学療法剤とその局所の組織の状態の関係が問題となるであろう。即ち、その組織の状態、特にその間質系組織及び間質成分の変化などについて今後さらに詳しい検討が必要となろう。又さらに化学療法を行った場合、その化学療法剤によって起る癌実質細胞の変化、あるいはそれに伴う間質細胞及び間質成分の変化、又癌化学療法における多剤併用、特に抗癌剤とその他それを助ける薬剤との組合せの場合、

その局所の変化は重要な問題として今後検討されるべきであろう。

## 第5章 結 語

Ehrlich 癌を用いてその移植直前にコンドロイチン硫酸、P. V. P, L 株細胞、胎児抽出液の投与を行い癌の増殖に及ぼす影響を検討し以下の結果を得た。

1 コンドロイチン硫酸を腫瘍移植前に局所に投与すると Ehrlich 腹水癌においては、腫瘍増殖に促進的に働き、対照との腫瘍の大きさの差は10日前後で最大になった。又腫瘍の大きさはコンドロイチン硫酸の濃度が高い程大なる傾向が示された。又同時に行った同量のコンドロイチン硫酸腹腔内投与では対照との間に有意差が認められなかった。対照とコンドロイチン硫酸局所投与群との間の有意差検定は  $P < 0.01$  であった。

2. L 株細胞及び胎児抽出液などの比較の間質成分の多いと考えられるものを前記コンドロイチン硫酸と同様の方法で局所に投与したところ、大略コンドロイチン投与と同様の成績が得られた。L 株細胞抽出液、胎児抽出液と対照との間の有意差も  $P < 0.01$  であった。4%ポリビニールピロリドン投与でも対照との間に差が認められたが、再現性に乏しいように思われた。

3. 前述の組織を組織学的に検討したが、コンドロイチン硫酸投与群は対照に比して腫瘍増殖が多源的に行われたことを思わせる如く、癌細胞巣が多く認められた。又対照に比して各細胞間の間隔がやや粗であるように思われた。両者の間質染色を行ってその差を検討したが、コンドロイチン硫酸投与群の方がやや腫瘍内間質が多いかに思われたが、組織中に壊死が所々に認められたため、明確な結論を得られなかった。又癌組織周囲の間質成分には組織学的に差異を認めなかった。L 株細胞抽出液及び胎児抽出液についても組織学的に検討したがコンドロイチン硫酸投与の場合と同様であり、特異的な組織変化を認め得なかった。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師平木教授に深甚の謝意を表するとともに木村講師の御教示と御校閲を深謝いたします。

- 1) Fisher, A: Cytoplasmic growth principles of tumor cells, Arch. exper. Zellforsch, 1 : 369, 1925.
- 2) Lettre', H. & Schleich, A: Untersuchungen am Yoshida- Tumor, Naturwiss, 41 : 505, 1954.
- 3) 桜井鉄夫, 佐藤博, 今村博, 森脇絢子: 腫瘍細胞の体外培養の研究(1)吉田肉腫細胞の試験管内継代培養について, 癌, 47 : 644, 1956.
- 4) 竹内純: 腫瘍発育と結合織基質の態度について, 日本癌学会記事 (第20回総会) 2, 1962.
- 5) 亀井秀雄, 竹内吉弥, 関和雄, 星川信: 腫瘍増生に及ぼす結合織の影響 特に免疫力に関連して, 日本癌学会記事 (第24回総会) 217, 1966.
- 6) 平木潔, 木村郁郎: 線維芽細胞の癌細胞の増殖に及ぼす影響, 抗酸菌研究雑誌, , 19 : 136, 1967.
- 7) 平木潔, 木村郁郎: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 (第1報)・実験癌におけるクロロキンの効果を中心に, 総合臨床, 11 : 1807, 1962.
- 8) 平木潔, 木村郁郎, 太田善介, 浅野健夫, 影山浩, 小谷秀成, 松浦良三, 土田潤一郎, 瀬崎達雄, 平岡敏延, 姫井孟, 守谷欣明, 山名正俊: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 クロロキン剤の基礎と臨床 (第1報) 岡山医学会雑誌, 75 : 297, 1962.
- 9) 平木潔, 木村郁郎, 小谷秀成, 守谷欣明, 森俊雄, 永広哲, 林信広, 山名正俊, 井上修, 大熨泰亮, 白井孝一, 西崎良知: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 (第2報) 各種癌患者におけるクロロキンの効果について, 総合臨床, 15 : 340, 1965.
- 10) 小谷秀成: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の研究, 岡山医学会雑誌, 77 : 941, 1964.
- 11) 平木潔, 木村郁郎, 河西浩一, 小谷秀成, 守谷欣明, 永広哲, 森俊雄, 林信広, 山名正俊, 井上修, 大熨泰亮, 白井孝一, 西崎良知: 線維芽細胞抑制剤による悪性腫瘍の治療に関する研究 (第3報) 悪性リンパ性腫瘍に対するクロロキンの効果 総合臨床, 15 : 1170, 1956.
- 12) 竹内純: エールリッヒ腫瘍増殖に対する酸性粘液多糖類の促進作用, 日本癌学会記事 221, 1965.
- 13) Takeuehi Z: Growth-promoting Effect of Acid Mueopoly-saccharides on Eurlich Ascites Tumor, Cancer Research. 26 : 797, 1966.
- 14) 林豊, 長尾孝一, 日浦利明, 滝沢延次郎, 中野喜久男, 酒井幹雄: 腫瘍基質の組織化学的研究 (第2報) 日本癌学会記事 (第24回) 205, 1965.
- 15) 小池良夫, 滝沢延次郎: 腸の良性及び悪性腫瘍における基質に関する研究, 日本癌学会記事 (第26回) 164, 1967.
- 16) 梶田隆, 滝沢延次郎: 良性および悪性非上皮性腫瘍の基質に関する研究 (とくに Mesenchymodystrophie および Mesenchymolyse-Takizawa) 日本癌学会記事 (第26回) 165, 1967.
- 17) 中村宣生, 滝沢延次郎: 腎臓尿路平統の良性および悪性腫瘍における基質に関する研究, 日本癌学会記事 (第26回) 165, 1967.

**Studies on the Growth of Cancer****Part I****The effects of chondroitin sulfate and other  
substances on the growth of Ehrlich ascites tumor.****By****Yoshitomo NISHIZAKI**

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

In 1925 Fisher found that the growth of Rous sarcoma was accelerated by adding fibroblasts into the culture medium of the sarcoma. Takeuchi found that the rapidly growing tissue of Brown-Pearce cancer contained much mucopolysaccharide and he suggested that mucopolysaccharide had accelerated the tumor growth.

On the basis of these findings, the author has attempted a few experiments as follows:  
Experiment 1.

Chondroitin sulfate was injected into Strong A mice either subcutaneously or intraperitoneally. After this pretreatment, Ehrlich ascites tumor cells were transplanted to the back of mice. The tumor growth was observed until they were killed on the 12th day after the transplantation.

No significant difference in the tumor weight was found between the control group and the group which had been pretreated by the intraperitoneal injection. A significant difference in the tumor weight, however, was found between the control group and the group given the subcutaneous pretreatment ( $P < 0.01$ ).

Experiment 2.

By using the same method, some other substances (extracts of L-strain cells and of mouse fetus, and P. V. P.) were studied. No intraperitoneal injection was tried this time.

A significant difference in the tumor growth was found between the control group and the group which had been pretreated with the extracts of L-strain cells and mouse fetus, but not between the controls and the group pretreated with P. V. P..