

癌腫毒の毛細血管透過性物質についての実験的研究

(本論文の要旨は第67回岡山医学会総会において発表した)

岡山大学医学部津田外科教室 (主任: 津田誠次教授)

助 手 平 賀 隆

〔昭和33年10月9日受稿〕

目 次

緒 言	第1項 癌エキスを注射時における毛細血管透過性および線維素溶解現象
第1章 毛細血管透過亢進作用について	第2項 トキソホルモン注射時における毛細血管透過性および線維素溶解現象
第1節 序	第3項 癌腫毛細血管透過亢進物質注射時における毛細血管透過性および線維素溶解現象
第2節 実験材料	第4節 小括および考按
第3節 実験方法	第3章 癌腫毛細血管透過亢進物質注射時における細網および間葉系臓器組織機能の態度
第4節 実験成績	第1節 序
第1項 癌エキスの毛細血管透過作用	第2節 実験材料および実験方法
第2項 トキソホルモンによる毛細血管透過作用	第3節 実験成績および小括
第3項 癌尿エキスの毛細血管透過作用	第4節 考 按
第4項 癌腫毛細血管透過亢進物質の抽出	総 括
第5節 小括および考按	結 論
第2章 毛細血管透過作用および線維素溶解現象との関連について	主要文献
第1節 序	
第2節 実験材料および実験方法	
第1項 実験材料	
第2項 実験方法	
第3節 実験成績	

緒 言

生体に悪性腫瘍が増殖しつつあるとき、ある癌腫毒を産出し生体の新陳代謝を障害し遂に生体を悪液質に陥れることは否定出来ない事実である。この解決に向つて癌に対する多数の臨床的ならびに基礎的研究、特に生化学的方面より癌組織の物質代謝に及ぼす影響に関する研究が進歩して来た。

臨床的にみられる癌の悪液質の成因は複雑であり、栄養の不足、出血、二次的感染、さらに精神的状態までもそれに関与しているものと考えられる。これらの癌と直接関係のない原因を二次的のものとし、癌そのものに由来する毒性物質が悪液質に関係あるとすれば、当然生体の新陳代謝に重要な意義を有す

る生体の酵素系に影響を与えることは想像出来ることであり、またこのような物質が生体内にひろがるには、血液の流れや、リンパ液の流れを利用することは勿論であるが、毛細血管ならびに組織を透過してひろがる道も考えられる。この場合毛細血管および組織の透過性を容易にさせるような物質が存在すれば毒素の拡散は一層容易になり、癌腫の急激な増大や転移を説明するのに大いに好都合である。動物実験において悪性腫瘍の中に拡散因子を注射するとその破壊的育生と転移が促進されることがある¹⁾。また逆に二十日鼠で肉腫組織に拡散因子を注射しても、なんら変化を認めぬという報告¹⁾²⁾もある。それでは癌腫中に果して拡散因子が存在するものか、また存在するとすればどのように存在するかを知る

必要がある。尾崎³⁾、中邑⁴⁾等は悪性腫瘍組織は良性腫瘍に比して多量の拡散因子を含んでいると述べている。一方腫瘍細胞自身は拡散因子を作らないが混合感染を起している微生物のあるものが拡散因子を産生するのであろうという説もある⁵⁾。

組織の透過性亢進物質は菌の産生したヒアルロニダーゼに由来するであろうと考えられる説もあるが、クロトン油には組織の透過性を亢進させる物質が存在しないのかかわらずクロトン油で起した炎症組織中には組織の透過性を亢進する物質が証明されている。また機械的刺戟によつて無菌的に作製した肉芽組織の抽出液にも同様組織の透過性を高める物質が証明され、現在においては菌とは無関係に拡散因子の存在によつて組織の透過性を亢進するものとされている。しかし拡散因子の毛細血管の透過性亢進作用については Eloster⁶⁾ によればあると言い、Zweifach⁷⁾ などは透過性亢進作用は認められないと言い、いまだ厳密な証明は行われていないようである。

私は癌腫中に毛細血管透過性亢進因子の存在に疑問をもち、癌エキスを、トキソホルモンおよび癌尿エキスによる毛細血管透過亢進作用を検索し、併せて癌腫組織中より該活性因子を抽出し、その物理化学的性状を考察した。つぎに線維素溶解現象との相互関係を観察し、また癌腫組織中より抽出した毛細血管透過亢進物質（癌腫透過亢進物質）の投与時における細網系ならびに間葉系臓器組織の機能を追究し、いささか知見を得たので報告する。

第1章 毛細血管透過亢進作用について

第1節 序

生体に物理化学的な刺戟が作用すると局所の血管、リンパ管、組織細胞の複雑な反応変化が起り、ついでその有害なる物理化学的刺戟を固定し、終にはこれを破壊してしまおうとする反応が起ると考えられる。この反応の一つである毛細血管の透過亢進作用の事実については Menkin⁸⁾ が最近では Moore および Tobin⁹⁾ が実験により確証し、さらに Menkin は滲出液を兔の皮下に注射した後 Trypan-blue 溶液を耳静脈から注射すると、色素はこの注射部位に速かに透過集堆することを認めたが、健常部位ではこのような所見は認められなかつた。この事実より何らかの血管の透過性をたかめる物質のあることを想定し、氏は炎症滲出液から結晶様含窒素物質の抽出に成功し leucotoxine と名づけた。このものは耐

熱性であり、また決して血清中に移行することはないと述べている。さらに町口¹⁰⁾、畔柳¹¹⁾ も56°C 30分の加熱非動化した正常血清中には leucotoxine 様物質は存在しないと述べており、一般に正常血清は毛細血管の透過性を亢進させないとされている。また畔柳は悪性腫瘍患者の非動化した血清が毛細血管の透過性を亢進せしめる leucotoxine 様作用を有することを報告している。

私は癌腫毒性物質が生体血液内へ絶えず放出移行するには、かかる有害物質中に存在する毛細血管透過亢進物質の作用によるものではなからうかと推定し、癌エキスを、トキソホルモンおよび癌尿エキスについて毛細血管の透過性を検討し、さらに Menkin の leucotoxine の抽出法を癌エキ应用到し、癌腫透過亢進因子について若干の物理化学的性状を追求した。

第2節 実験材料

1. 実験動物

体重2kg 前後の健康白色家兎を使用した。

2. 癌エキスの作製

新鮮なる切除標本の癌組織および転移リンパ腺を採取し、壊死物質を出来る限り除去して細挫し、10倍量の生理食塩水を加えつつ Homogenizer を用いて充分磨砕して組織乳を作り1夜氷室に放置して浸出し、翌日 2×10⁴ 回転15分間の高速遠沈にて細胞を分離し、その上清を採取使用した。

3. トキソホルモンの作製（中原¹²⁾）

癌組織（壊死に陥つた部分および脂肪分はとり除く）を細碎し、4倍量の蒸留水を加え混和し、100°Cの温湯中で1～2時間加熱後1昼夜氷室に放置し、充分遠沈す。その上清を約1/10容に至るまで100°Cの温湯中で濃縮し、2倍容の局方純アルコールを混和し1昼夜氷室に放置す。白色沈澱物形成後遠沈により上清を除き、エーテルで乾燥し材料に供した。

4. 癌尿エキスの作製

癌尿は津田外科入院患者にして診断確定せる24時間尿を使用した。

1M安息香酸ソーダ溶液を尿量の1/10容に加え、ついで1M塩酸溶液をもつて攪拌しながら原尿の1/10容よりやや多い目に加えて pH 4.3 附近にし、時々攪拌しながら約1時間室温に放置する。安息香酸の結晶が析出すると該液を濾過し、濾紙上の沈澱物を温浴にて作成せる飽和安息香酸水溶液にて清浄し、硝酸銀溶液で塩化銀反応が消失するまで洗う。ついで沈澱物を乾燥した濾紙にて水分をしぼり該沈澱物

をアセトンに溶解遠沈する。該沈渣をエーテルに溶解、遠沈し沈澱物を使用した（安息香酸吸着法尿エキス作成法¹³⁾）。

5. 標示薬

標示薬としては、細菌毒や色素剤が使用されるが、このうち色素剤としては墨汁, Evansblue, Pontamine sky blue, Hemoglobin, Trypanblue 等があるが特に Trypan-blue 溶液が適当で、主として 0.5% Trypan-blue 溶液を使用した。墨汁は皮内に注射した場合一様に拡散しがたく注射局所の一部に残留する傾向があるので不適当である。

第3節 実験方法

1. 注射部位

皮内における色素集堆および拡散様式は同一家兎でも部位によつて異なるので、原則として背部両側を使用した。腹部を使用したものも若干ある。後者の場合には色素の集堆および拡散がしばしば不規則な形を呈するという欠点がある。

2. 毛細血管透過作用の実験方法

Menkin の leucotoxine 検査法⁸⁾に準じて行つた。すなわち家兎の背部あるいは腹部を短く剪毛し、良質の硫化バリウムを使用して脱毛、水洗乾燥し1～2日後炎症性反応のないことを確めた皮膚に前記被検液（癌エキス、トキソホルモン、癌尿エキス）をリンゲル氏液と対称の位置にツベルクリン用注射器を用いて正確に 0.2 cc 宛一定の圧力をもつて皮内に注射し、後直ちに 0.5% Trypan-blue 溶液 15cc を家兎耳静脈より注射し、一定時間後各々の色素集堆面積を測定し被検液のリンゲル氏液に対する比（色素集堆率）を算出し、毛細血管透過作用判定の基準とした。

色素集堆率によつて判定する理由は同一家兎の同じ背部を用いても、頭側あるいは尾側に近いかによつて同じ被検液を使用しても色素集堆面積の大小だけで判定することは危険である。脊柱を軸とした左右対称の部位では殆んど集堆面積に差異を認めないので常に集堆率を使用した。

色素集堆面積の測定法としては Madinavcitia の記載による最長軸 D 、最短軸 d を計測して、集堆面積 $S = \pi \frac{D \cdot d}{4}$ によつて求める方法をとつた。集堆面積の測定時期については、被検液注射後15分、30分、45分、60分後等にそれぞれの面積を測定し検討した結果、Duran-Reynals, Mc-clean 等の成績にほぼ等しく、最初の1時間以内が比較的速に進行することがわかつたので、注射後15～30分の集堆面積

を計算の基礎とした。

第4節 実験成績

第1項 癌エキスによる毛細血管透過作用

実験1（表1）

10倍、25倍および50倍に希釈した癌エキスおよび対照リンゲル氏液を同時に家兎背部の対称の位置に皮内注射し、その直後 0.5% Trypanblue 液 15 cc を家兎耳静脈に注射し、30分後における色素集堆状況を観察した。

表1 癌エキスの毛細血管透過作用

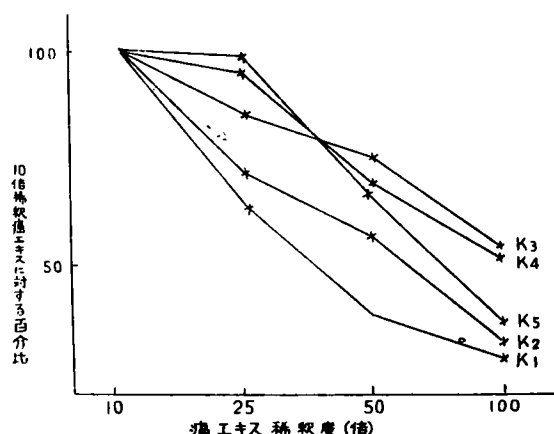
実験番号	希釈度	癌エキス集堆面積	リンゲル氏液集堆面積	集堆率	百分率
K ₁	10倍	3.43 2.1×1.9	1.33 1.3×1.3	2.57	100
	25 "	2.37 2.1×1.5	1.41 1.5×1.2	1.68	65
	50 "	1.33 1.3×1.3	1.39 1.6×1.1	0.96	37
K ₂	10倍	3.29	1.57	2.09	100
	25 "	2.61	1.63	1.61	77
	50 "	1.88	1.51	1.24	59
K ₃	10倍	2.52	1.57	1.61	100
	25 "	2.16	1.57	1.38	86
	50 "	2.25	1.86	1.21	76
K ₄	10倍	2.99	2.20	1.36	100
	25 "	2.90	2.19	1.33	98
	50 "	1.70	1.98	0.86	65
K ₅	10倍	2.83	1.57	1.81	100
	25 "	2.99	1.66	1.80	99
	50 "	1.86	1.60	1.16	64

集堆面積欄中上段一集堆面積 (cm²)、下段一長径 (cm)×短径 (cm) 百分率—10倍癌エキス集堆面積に対する各希釈液の%

表1を通覧すれば程度の差こそあれ、癌エキスの色素集堆面積は対照に対して色素の集堆が明らかに増強すると考えられる所見を得た。すなわち癌エキスの10倍希釈液においては対照リンゲル氏液の集堆面積に対して有意の差（5%以下の危険率）を認め、平均値 $1.36 \pm 0.38 \text{ cm}^2$ の面積の増大を認めた。また25倍液においても有意の差を認め、 $0.91 \pm 0.35 \text{ cm}^2$ の面積増大を認め、50倍液に於ては対照液に対して有意の差を示さない結果を得た。

色素集堆率においても10倍および25倍液では有意の差を認め、10倍液は 1.88 ± 0.60 、25倍液は 1.56 ± 0.33 の集堆率を示し、癌エキスの高濃度のもの程集堆面積および集堆率は大である(図1)。

図1 癌エキス稀釈度による集堆率比較



実験2 (表2, 3)

つぎに癌エキスの毛細血管透過作用の熱に対する影響を検討してみた。

癌エキスのそれぞれの稀釈液を 56°C の温湯中で30分間加熱非動化(表2), また 100°C 30分間加熱非動化(表3)せる稀釈液を Trypanblue 液の集堆面積による集堆率にて比較した。癌エキスの非加熱群および加熱群 ($56^{\circ}\text{C} \cdot 30'$, $100^{\circ}\text{C} \cdot 30'$) においては有意の差を認め得ない成績を得た。すなわち非動化により影響を受けない。

表2 癌エキス ($56^{\circ}\text{C} \cdot 30'$) の毛細血管透過作用

実験番号	稀釈度	癌エキス集堆面積	リングル氏液集堆面積	集堆率
K31	10倍	3.14 2.1×1.9	1.79 1.9×1.2	1.76
	25 "	2.51 2.0×1.6	1.68 1.8×1.2	1.49
K32	10倍	3.44 2.3×1.9	1.74 1.7×1.3	1.98
	25 "	1.47	1.16	1.26
K33	10倍	1.99	1.89	1.06
	25 "	3.14	1.75	1.79
K34	10倍	2.82	2.12	1.32
	25 "	1.88	1.34	1.40

集堆面積欄中上段—集堆面積, 下段—長径×短径

表3 癌エキス ($100^{\circ}\text{C} \cdot 30'$) の毛細血管透過作用

実験番号	稀釈度	癌エキス集堆面積	リングル氏液集堆面積	集堆率
K35	10倍	1.05 1.2×1.6	0.49 0.9×0.7	2.14
	25 "	2.98 2.0×1.9	2.16 2.2×1.3	1.38
	50 "	1.69 1.8×1.2	1.34 1.3×1.3	1.26
K36	10倍	2.01 1.7×1.5	1.18 1.5×1.0	1.71
	25 "	1.10 2.0×0.7	0.61 1.1×0.7	1.81
	50 "	1.32 1.3×1.3	1.10 2.0×0.7	1.20

集堆面積欄中上段—集堆面積 (cm^2) 下段—長径×短径

実験3 (表4)

既述せる如く Menkin の毛細血管透過亢進因子は決して血液中には存在しないものとされており, また 56°C 30分の加熱非動化した異種正常血清も透過性亢進作用を有しないとされている。

表4 癌エキス注射血清の毛細血管透過作用

	稀釈度	癌エキス注射血清	癌エキス非注射血清	集堆率
K18	原液	0.71 1.0×0.9	0.024 0.3×0.1	29.5
	10倍	1.13 1.3×1.1	0.094 0.4×0.3	12.0
K19	原液	0.79 1.0×1.0	0.031 0.2×0.2	25.5
	10倍	0.22 0.7×0.4	0.016 0.2×0.1	13.8
K20	原液	0.61 1.1×0.7	0.024	25.4
	10倍	0.20 0.5×0.5	0.016	12.5
K21	原液	0.85 1.2×0.9	0.031	27.4
	10倍	0.19 0.5×0.5	0.024	7.9
K22	原液	0.63 1.0×0.8	0.031	20.3
	10倍	0.44 0.8×0.7	0.031	14.2

註. 上段—集堆面積 (cm^2), 下段—長径 (cm) × 短径 (cm)

私は10倍稀釈癌エキスを健常家兎の腹腔内に 10 cc/kgw の割合に注射し, 24時間後採血し 56°C 30分加熱非動化した家兎血清の毛細血管透過作用の有無を検討した。対照としては癌エキス非注射家兎血清 ($56^{\circ}\text{C} \cdot 30'$) を用意し, 対照に対する癌エキス投与群血清の集堆率を算出し比較した。

実験成績は表4にみられる如く癌エキスを投与した血清においては対照血清に比して明らかに有意の差を有し $0.69 \pm 0.03 \text{ cm}^2$ の面積の増大を示し、また非稀釈血清の集堆率は10倍稀釈血清に対して 13.36 ± 6.1 の増大を認める結果を得た。

実験4 (表5)

Duran-Reynals¹⁴⁾ が哺乳動物睾丸の抽出物中に家兎の痘苗感染を著しく促進させる物質すなわち

Spreading Factor を発見し、その後 McClean¹⁵⁾¹⁶⁾ などにより感染および色素、毒素の浸透を促進させることが報告され、Eloster⁶⁾、Binditt¹⁷⁾、Duran-Reynals などにより拡散因子は生理的条件下に於ける毛細血管の透過性を亢進さすという報告がある。また Seifter¹⁸⁾ は鼠、家兎についての実験において毛細血管透過作用は認められないとされている。

表 5 癌エキスの組織透過性

家兎番号	対 照			癌エキスを投与		
	Trypan-blue	Trypan-blue +H'yase	拡散率	Trypan-blue	Trypan-blue +H'yase	拡散率
K13	4.5 3.5×1.8	11.0 5.0×2.8	2.44	10.8 5.5×2.5	15.8 6.3×3.2	1.46
K15	4.6 4.5×1.3	9.4 6.0×2.0	2.04	10.3 4.8×3.0	16.3 6.5×3.3	1.58
K18	5.8 3.7×2.0	10.5 5.8×2.3	1.81	17.6 5.6×4.0	38.8 7.5×5.2	2.20
K19	3.6 2.4×1.9	5.7 4.0×1.8	1.58	12.3 4.5×3.8	20.4 6.5×4.1	1.65

上段—拡散面積 (cm²) 下段—長径 (cm)×短径 (cm)

私はヒアルロニダーゼを使用して癌エキスのこれに及ぼす影響を比較検討した。すなわちヒアルロニダーゼを生理食塩水で1%溶液とし、これに1/2量の1% Trypan-blue 溶液を加えてよく混和した(以下 T. B-Hyase とす)。対照液としてはリンゲル氏液にその1/2量の1% Trypan-blue 液を混和し、予め用意せる家兎脱毛背部に各々 0.2 cc を同じ圧により皮内注射し、24時間後の色素の拡散状況を拡散率によつて比較した。

実験成績は表5にみられる如く T. B-Hyase 群は Trypan-blue 群の拡散面積に比して拡散面積の増加が認められるが、拡散率は癌エキスを投与および非投与の間には有意の差は認められない。すなわち拡散因子は明らかに拡散面積の増大すなわち組織の透過性を亢進せしむるが、癌エキスを投与によるその影響は認められないことがわかった。

第2項 トキソホルモンによる毛細血管透過作用

1948年に始めて中原、福岡が癌の特殊毒性物質を探索し、癌組織から体液に放出する一種の蛋白様毒性物質トキソホルモンを分離した。このものは細胞の酸化作用の減弱による一般的ストレスの持続と蓄積によつて癌のいわゆる悪液質を誘発するものであり、癌の悪液質の本態的原因の少くとも最も重要なものの一つであると述べている¹⁹⁾。また中川²⁰⁾ は胃癌胃液中にトキソホルモンが放出されていること

を実証している。

かかる毒性物質が癌組織から血液中に放出されるには直接血管に放出される道も考えられるがまたトキソホルモン中に毛細血管の透過性因子の存在も考えられる。この意味において私はトキソホルモンによる毛細血管透過作用を検討した。

実験成績は表6にみられる如くトキソホルモンおよび対照リンゲル氏液の集堆面積の時間的経過により分けた最初の15分間の集堆率は平均 17 ± 4.2 で最高値を示し、120分までの平均 8.34 ± 3.60 に対して有意の差を示している。30分後においては次第に集堆率は下降の兆を示し、平均に対して有意の差を認めない。すなわち以上の実験成績よりトキソホルモン中には毛細血管透過性亢進因子の存在が考えられ、その作用はトキソホルモン投与後15分間が最強であることを示している。

第3項 癌尿エキスの毛細血管透過作用について

癌患者の尿中に癌腫毒が排泄せられるであろうことは古くから予想されたところであり、近時中川およびその門下生²¹⁾によりすでに癌尿エキスについて、各種酵素性物質、催貧血性物質、脾肥大性物質、肝解毒能低下性物質、細網内皮系機能低下性物質などの諸因子の抽出に成功している。かかる癌腫毒が癌患者の尿中に証明された以上、原発腫瘍組織から生産された腫瘍毒が血液中に放出され、ついで尿中

実験番号	集積面積及び集堆率	経過時間(分)							
		15	30	45	60	75	90	105	120
H ₁	癌エクス リンゲル氏液	0.20 0.5×0.5	0.33 0.7×0.6	0.50 0.8×0.8	0.79 1.0×1.0	0.86 1.1×1.0	1.04 1.2×1.1	1.22 1.3×1.2	1.33 1.3×1.3
	集堆率	6.7	6.6	7.1	6.1	5.4	5.2	5.1	5.5
	癌エクス リンゲル氏液	0.03 0.2×0.2	0.05 0.3×0.2	0.07 0.3×0.3	0.13 0.4×0.4	0.16 0.5×0.4	0.20 0.5×0.5	0.24 0.6×0.5	0.24 0.6×0.5
	集堆率	6.7	6.6	7.1	6.1	5.4	5.2	5.1	5.5
H ₂	癌エクス リンゲル氏液	0.24	0.38	0.57	0.79	0.95	1.04	1.13	1.31
	集堆率	12.0	6.3	4.4	3.3	2.8	2.7	2.9	2.7
	癌エクス リンゲル氏液	0.02	0.06	0.13	0.24	0.33	0.38	0.38	0.49
	集堆率	12.0	6.3	4.4	3.3	2.8	2.7	2.9	2.7
H ₃	癌エクス リンゲル氏液	0.33	0.44	0.53	0.63	0.71	0.86	1.00	1.04
	集堆率	6.6	6.3	5.9	5.3	5.5	4.5	4.8	4.3
	癌エクス リンゲル氏液	0.05	0.07	0.09	0.12	0.13	0.19	0.21	0.24
	集堆率	6.6	6.3	5.9	5.3	5.5	4.5	4.8	4.3

H ₄	癌エクス	0.24	0.33	0.41	0.49	0.55	0.62	0.70	0.78
	リンゲル氏液	0.03	0.05	0.07	0.11	0.16	0.19	0.24	0.26
	集堆率	8.0	6.6	5.9	4.5	3.4	3.3	2.5	3.0
平均値		7.8±2.6	6.5±0.1	5.8±1.1	4.8±1.1	4.3±1.3	3.9±1.2	3.8±1.2	3.9±1.3
5.1±1.02									

上段一色素集堆面積 (cm²), 下段一長径 (cm)短径 (cm)

る結果を得た。一方対照リンゲル氏液に対する癌尿エキスの集堆面積は有意の差を有し、癌尿中に毛細血管透過亢進因子の存在が考えられる所見を得た。

第4項 癌腫毛細血管透過亢進物質について

既述せるごとく炎症局所における毛細血管の透過性亢進作用については古くから認められている事実で、その局所に現われる化学的物質が透過亢進作用に重要な役割を果すのであるとする説が次第に一般に認められて来ている。

私はさきに癌エキス、トキソホルモンおよび癌尿エキスにおける毛細血管透過作用について検索し、癌腫中に該亢進物質の存在すると考えられる所見を得た。つぎに V. Menkin の炎症における透過性亢進因子 leucotoxine 物質の抽出法を癌エキスの応用して癌腫毛細血管透過亢進物質を抽出した。

実験5

毛細血管透過亢進因子の抽出は Nouy は時計皿を使用して血清を蒸発せしめ、NaCl その他の無機物質から樹枝状結晶物の抽出に成功した Menkin は抽出浸出液のアセトン乾燥残渣に約20%の活性因

子を含んでいると述べている²²⁾。さらに犬の胸腔内に turpentine を注入し、その滲出液より種々の方法により毛細血管透過性亢進因子の leucotoxine を抽出したことはさきに述べた通りである。氏は滲出液より種々の方法により毛細血管透過亢進物質を抽出している²²⁾。私はつぎに述べる方法にて癌腫毛細血管透過亢進物質を抽出した。

すなわち細胞を含みぬ癌エキスを同量のピリジン飽和液で処置すると絮状沈澱物を生ずる。この混合液を数時間電気振盪器で充分混和し、つぎに遠心分離し帯黄緑色の上清を得る。この上清のピリジン分割を同量のアセトンで処理すると灰色沈澱物を生ずる。活性要素は主として上清のアセトン分割中に含まれ、遠心分離し6°Cにて数日間貯蔵すると褐色の絮状物を生ずる。この絮状物を分離採取し蒸留水にて溶解し材料に供した。

該抽出物質の毛細血管透過作用を検索するに実験成績は表8に示す如く該抽出物質の色素集堆面積は対照リンゲル氏液に対して集堆能力は強力であり、また該抽出物質は対照の集堆面積に比して有意の差

表 8 癌腫毛細血管透過性因子の透過性作用

番号	集堆面積集堆率	時間的経過(分)						
		15	30	45	60	75	90	120
P ₁	透過性因子	0.71 1.3×0.7	0.88 1.4×0.8	0.91 1.45×0.8	0.94 1.5×0.8	1.07 1.5×0.85	1.27 1.9×1.9	1.49 1.9×1.0
	リンゲル液	0.02 0.2×0.1	0.05 0.3×0.2	0.08 0.35×0.3	0.09 0.4×0.3	0.09	0.09	0.13 0.4×0.4
	集堆率	35.5	17.6	11.4	10.4	11.9	13.0	11.5
P ₂	透過性因子	1.00 1.4×0.9	1.18 1.5×1.0	1.51 1.6×1.2	1.67 1.7×1.25	1.77 1.75×1.3	1.98 1.8×1.4	2.36 2.0×1.5
	リンゲル液	0.03 0.2×0.2	0.07 0.3×0.3	0.13 0.4×0.4	0.18 0.5×0.45	0.22 0.55×0.5	0.22	0.28 0.6×0.6
	集堆率	33.3	16.8	11.6	9.3	8.0	9.0	8.4
P ₃	透過性因子	0.66 1.2×0.7	0.72 1.3×0.8	0.99 1.4×0.9	1.12 1.5×0.95	1.19 1.6×0.95	1.23 1.7×1.0	1.46 1.7×1.1
	リンゲル液	0.03 0.2×0.2	0.05 0.3×0.2	0.08 0.35×0.3	0.11 0.4×0.35	0.13 0.4×0.4	0.13	0.16 0.45×0.45
	集堆率	22.0	14.4	13.1	10.2	9.2	9.5	9.3

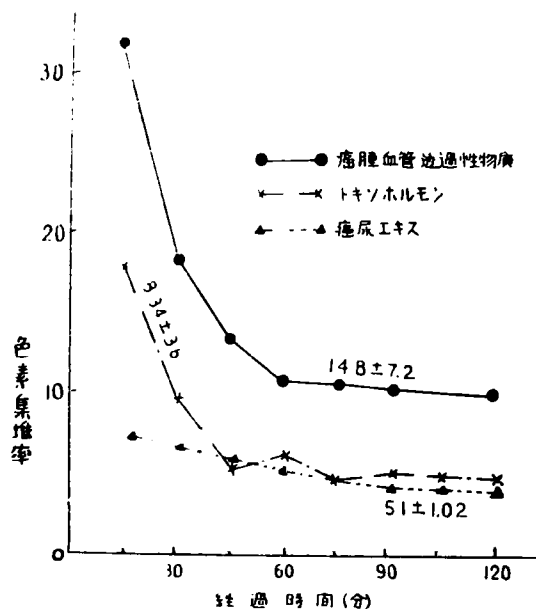
F ₄	透 過 性 因 子	0.92	1.10	1.29	1.40	1.51	1.51	1.62
	リ ン グ ル 液	0.024	0.05	0.09	0.11	0.11	0.14	0.17
	集 堆 率	38.3	22.0	14.3	12.7	13.7	10.8	9.5
平 均 値		32.2±6.2	17.7±3.2	12.6±1.4	10.6±1.0	10.7±2.7	10.5±3.0	9.67±1.3
		14.8±7.2						

上段—色素集堆面積 (cm²), 下段—長径 (cm)×短径 (cm)

を認めた。且つ該抽出物質投与後15分間の色素集堆率は平均 32.2±6.2 で全経過平均に対して有意性を示し最高である。また 120 分までは強力に色素を集堆する能力のあることを示した。

つぎにトキソホルモンおよび癌尿エキスの色素集堆率について比較するに図 2 にみられる如く、トキソホルモン集堆率平均値 8.34±3.6, 癌尿エキス平均値 5.1±1.02 であり、癌腫透過亢進物質の集堆率平均値 14.8±7.2 に対して有意の差を有する結果を得た。

図 2



つぎに該抽出活性物質の物理化学的性状を追求するためつぎの実験を行った。

1. 拡散性

アセトン分割液を Fish-skin 囊入にれ蒸留水中にて24時間透析を行った。表 9 に示すごとく毛細血管の透過活性因子は透析液および拡散液中に認められるが該因子は主として透析液中に存在することを知った。

表 9

家兎 番号	透 析 液		拡 散 液	
	室 温	56°C・30'	室 温	56°C・30'
D I	1.88 1.6×1.5	2.00 1.7×1.5	0.72 0.9×0.9	0.77 1.1×0.9
D II	1.76 1.6×1.4	1.00 1.3×1.0	0.52 0.9×0.7	0.50 0.8×0.8

上段—集堆面積 (cm²), 下段—長径 (cm)×短径 (cm)

2. 加熱による影響

該因子の熱に対する影響については既述せるとく 100°C および 56°C 30 分間の加熱においては安定であることを認めたが、さらに該因子を含んだ液を加熱蒸溜することにより該因子は非蒸溜液中に残留することを知った。

3. 組織透過性

実験 4 の方法に準じて対照リングル氏液の拡散面積に対する該因子の拡散率を15分毎に算出した。

実験成績は表10にみられるごとく、拡散率は注射直後より120分までは平均 1.19±0.39 を示している。

表10 癌腫毛細血管透過性物質の組織透過性

時間	癌腫透過性物質 の 拡 散 面 積	リングル氏液の 拡 散 面 積	拡散率
直後	1.33 1.3×1.3	1.33 1.3×1.3	1.00
15分	1.77 1.5×1.5	1.43 1.4×1.3	1.23
30 "	2.40 1.8×1.7	2.00 1.7×1.5	1.20
45 "	2.76 1.9×1.85	2.40 1.8×1.7	1.15
90 "	2.98 2.0×1.9	2.54 1.8×1.8	1.18
75 "	3.46 2.1×2.0	2.58 1.9×1.8	1.34
90 "	3.63 2.1×2.1	2.83 1.9×1.9	1.27
105 "	3.80 2.2×2.2	3.14 2.0×2.0	1.21
120 "	4.00 2.3×2.2	3.30 2.1×2.0	1.21

上段—拡散面積 (cm²), 下段—長径 (cm)×短径 (cm)

また拡散面積にて比較するに該因子は対照リングル氏液に対して有意の差を有し、平均 $0.57 \pm 0.05 \text{ cm}^2$ の拡散面積の増大を認める結果を得た。

4. 硫酸アンモンによる沈澱

活性透過性要素は硫酸アンモンと癌エキスの相互作用により沈降することを知った。

(1) 仮性グロブリン分屑

癌エキスを硫酸アンモンで $1/2$ 飽和として、約12時間放置し遠心分離し、上清をとり、これにさらに $1/2$ 飽和とし約12時間放置して遠心分離し、その沈澱を透析し、 SO_2 根を除き、遠心分離した沈澱を生理食塩水で溶し、脱毛せる家兎背部に皮内注射した。

実験成績は表11の如く仮性グロブリンは対照リングル氏液に対して集堆率 1.88 ± 0.03 を示した。

表 11

実験番号	仮成グロブリン集堆面積 (cm^2)	リングル氏液集堆面積 (cm^2)	集堆率
Kp1	2.54	1.33	1.91
	1.8×1.8	1.3×1.3	
Kp2	3.43	1.86	1.85
	2.1×1.9	1.7×1.4	

長径 (cm) $\times$ 短径 (cm)

(2) 真性グロブリン分屑

癌エキスを同様硫酸アンモンで $1/2$ 飽和とし、約12時間後遠心分離し、その沈澱に蒸留水を加えて透析し、 SO_4 根を除き、遠心分離した沈澱に生理食塩水を加えて攪拌し暫時置き、その上清を用いた。

実験成績は表12の如く真性グロブリンは対照リングル氏液に対して集堆率 1.76 ± 0.44 を示した。

表 12

実験番号	真性グロブリン集堆面積 (cm^2)	リングル氏液集堆面積 (cm^2)	集堆率
Ke1	2.67	1.21	2.20
	2.0×1.7	1.4×1.1	
Ke2	2.83	2.14	1.32
	2.0×1.8	1.7×1.6	

(3) アルブミン分屑

癌エキスを硫酸アンモンで $1/2$ 飽和とし、約12時間後遠心分離し上清を透析し SO_4 根を除き実験に用いた。

アルブミン分屑中には色素集堆能力は認められず、仮性および真性グロブリン中に色素集堆能力を有する結果を得た。また仮性および真性グロブリン分屑の集堆率においては有意の差を認め得ない結果を得た。

5. 酸およびアルカリの影響

Phenol red に対し弱アルカリまたは弱酸性を呈

し、活性因子の反応性は該作用に直接影響を与えない。

6. 蛋白およびアミノ酸試験

Biuret 反応：陰性、Millon 反応：陰性、Xantho-protein 反応：陽性、Ninhydrin 反応：陽性であった。

第5節 考按および小括

私は以上の実験成績より癌腫毒中の毛細血管透過性亢進因子を追求し、癌エキス、トキソホルモンおよび癌尿エキスについて検索し、いずれも毛細血管透過性亢進作用は有意性を示し、癌腫中に該活性因子が認められると考えられる所見を得た。

臓器組織が臓器毒を含有することは既に多くの人により証明されており、一般に臓器毒は熱に対して抵抗力弱く、加熱 60°C 前後により著しく毒性を減じ、比較的短時間 (72時間) 内に毒力を失い、無水アルコールにて破壊せられて無毒となるといわれている。

一方拡散因子については Duran-Reynolds (1928), Meyer (1934)²³⁾, chain and Duthie (1939)²⁴⁾ のヒアルロニダーゼの発見以来旺盛な發育を遂げる悪性腫瘍と本酵素との関係が注目され、長屋、藤田 (1954)²⁵⁾ の粘稠度測定法による成績によると人の癌、胎盤、胃粘膜の組織中にヒアルロニダーゼが含まれており、しかも癌組織中では最高値を示しており、尾崎 (1951)³⁾ は婦人の癌患者において高値を認めたと述べている。その拡散因子の毛細血管透過性作用については既述せるとく生理的条件下では透過性を何ら亢進させず、二次的に透過性を促進する⁶⁾ というのに対し、生理的条件下においても著明な透過性を来す⁷⁾ というものがある。

私が癌腫から抽出した毛細血管透過亢進因子は組織透過性を有し、拡散面積の増大することを認めた。該透過性因子は癌腫中に含まれる拡散因子そのものの作用によるものであろうか、Free-man, Dorfman によれば 70°C 30分間の加熱によつて拡散因子は無効となると述べている点よりみて、癌腫中より抽出した該因子は 100°C 30分の加熱に於ても有効であり拡散因子または臓器毒そのものの作用とは異なるように考えられる。

蛋白、アミノ酸試験において、Biuret 反応陰性で恐らく蛋白ではなく、Millon 反応陰性、Xantho-protein 反応陽性で Benzene 核を有することを示し、Ninhydrin 反応陽性であり、少くとも遊離の1ケの α アミノ基および1ケの Carboxyl 基を有し

ていることが考えられる。また Fishskin 囊膜を通過する性質、飽和硫酸アンモンにより沈澱することなどにより該透過性物質は蛋白分解の比較的簡単な中間産物ではなからうかと思われる。以上の物理化学的性状および 20 g/dl Sulphosalic acid で沈澱を生じないことなどによりこの因子は恐らく Polypeptide 群に属するものと考えられる。

Menkin の炎症における毛細血管透過亢進因子の所謂 leucotoxine 物質は決して血清中に移行することはないと述べており、畔柳は悪性腫瘍患者血清中に毛細血管透過亢進作用を有することを認めており、また癌患者の血中には癌組織に特異的に作用する蛋白溶解酵素があると述べられている。私の実験においても実験家兎血清は亢進作用を有することを認めた点、かかる血清中の毛細血管透過亢進因子は所謂 Menkin の leucotoxine 物質あるいは癌腫中の該因子とは多少異なるのではなからうかと考えられ、この問題に関しては他の酵素系との関連性について追求する必要があるものと思われる。

第2章 癌腫毒における毛細血管透過性と線維素溶解現象との関連について

第1節 序

毛細血管の透過作用の発現機構に対してはヒスタミン乃至アセチルコリンによるショック説などがあり今日なお多くの論争が存在する。Lewis²⁶⁾はヒスタミンに類似したH物質の作用と考えたが、その後の研究においてH物質のみでは説明が出来なくなり、H-colloid²⁸⁾あるいはslow acting substance²⁹⁾の作用を仮定しておる。Menkin はアモチールコリンは毛細血管の透過性に対して著しい影響をおよぼさないが、ヒスタミンは一定濃度以上では毛細血管の透過性を亢進せしめ得ると述べており、また 0.1~0.2 mg/dl のヒスタミン溶液 0.2 cc を皮内注射した程度では注射局所への色素の集堆を認めず、従つて毛細血管透過性亢進はヒスタミン説のみでは合理的に説明出来ないと述べている³⁰⁾。また実験において健康者ならびに毛細血管抵抗の低下していない疾患の多くのものでは血清の毛細血管透過性亢進作用も線維素溶解現象も認められず、悪性腫瘍患者などの血清は毛細血管透過亢進作用を有し、しかもそれは線維素溶解現象と深い関連性を有するものであるとされている³⁰⁾。

私はさきに癌腫毒における毛細血管透過性作用を

明らかにし、さらに線維素溶解現象との関連性について考察を加えるため次の実験を行つた。

第2節 実験材料および実験方法

第1項 実験材料

癌腫毒としては癌エキス、トキシホルモンおよび癌腫毛細血管透過亢進物質を使用し、材料は第1章と同じ方法にて作成した。

第2項 実験方法

健常家兎の耳静脈より比較的緩徐なる速度にて材料（癌エキス 2 cc/kg, トキシホルモン 25 mg/kgw, 癌腫毛細血管透過亢進物質 25 mg/kgw）を3日間連続注射し、同家兎背部にリンゲル氏液 0.2 cc を皮内注射し、同時に 0.5% Trypan-blue 生理食塩水溶液（5 cc/kg）を静注、該皮内注射局所の集堆状況を時間的に計測、さらに各測定時間毎の色素集堆増加面積に対する色素集堆面積の百分比（色素集堆増加率）にて毛細血管透過作用をあらわし、また同時刻に同一家兎から採血血清を分離し線維素溶解現象を測定し、両測定値の関連性を推計学的に検討した。

線維素溶解現象の測定方法はこれまでいろいろの方法が用いられており、その主なるものは稀釈法³¹⁾、一定量の線維素を溶解するに要する時間で測定する方法³²⁾、粘稠度による方法³³⁾その他である。しかしこれらの方法は終末点がいづらか不正確であり少量の酵素を測定するには限度がある。私は Macfarlane の変法³⁴⁾および N. R. Shulman, H. J. Tagnon³⁵⁾の変法を用い酵素量を定量的に測定した。

(1) Macfarlane の変法

静脈血に 1/9 量の 3.8% クエン酸ソーダを加え、遠沈して血漿を分離し、M/15 磷酸緩衝液で pH7.4 に調整した生理食塩水で16倍、32倍、64倍に稀釈、その 2 ml を小試験管にとり、それぞれに 3.5% 塩化カルシウム液 1~2 滴を加える。37°C 孵卵器に 24 時間静置した後線維素溶解の有無をしらべる。判定方法は 1 本溶解+, 2 本溶解++, 3 本溶解+++とする。

(2) N. R. Shulman, H. J. Tagnon の変法

この方法の要旨は放射性ヨード I¹³¹ を附加した線維素に被検液体を作用させてこの線維素を溶解させ、その結果非凝固性蛋白分割中に増加してくる放射能の量を判定するのである。

線維素原の放射能化・放射性ヨード I¹³¹ 1 mc を含んだ水 0.5 ml に 0.002M ヨードソーダ 0.6 ml および 0.02M 亜硝酸ソーダ 0.6 ml を加える。こ

の液に 0.5M 塩酸を加えて pH 4 以下にし、数分後 0.25N 苛性ソーダを加えて中和し、さらに M/15 磷酸緩衝液 (pH 7.5) で希釈して 25 ml とする。ついでこの溶液を約 1.4% 線維素原液 (持田製薬薬品) 25 ml とよく混和した後、生理食塩水に対して 2 日間透析を行う。遠沈して上清をとり冷蔵庫に貯える。

線維素溶解の測定：貯蔵の放射性線維素原溶液を 2~3 倍に希釈して、その 1.0 ml を遠沈管にとり、これに被検液 1.0 ml を加えさらにトロビン (持田製薬) 1 滴を加えてよく混和すれば数秒後に硬い線

維素塊が出来る。密栓して 37°C 孵卵器中に 24 時間保った後遠沈して上清をとり、その 0.5 ml について放射能を測定しその遊離の割合によつて線維素溶解の活性度を判定した。

放射能測定には神戸工業製 Scintillation counter を使用した。

第3節 実験成績

実験 1

健常家兎に癌エキスを注射した場合の毛細血管透過亢進作用と線維素溶解現象との関連性を調べるためにつぎの実験を行った (表13)。

表 13 癌エキスを注射時に於ける毛細血管透過作用および線維素溶解現象

家兎番号	実 験 方 法		経 過 時 間 (分)								
			注射前	直 後	30	60	90	120	150	180	240
K I	F	M. F.	—	+	++	+	+	+	+	+	+
		S. T.	0	8	14	4	9	7	10	6	5
	C. P. P.	集 堆 増加率			23	7	11	10	7	5	7
K II	F	M. F.	+	+	—	++	+	+	+	+	+
		S. T.	2	13	21	16	16	15	12	11	7
	C. P. P.	集 堆 増加率			23	11	17	18	17	15	8
K III	F	M. F.	+	+	++	++	+	+	+	+	+
		S. T.	3	11	21	18	15	13	11	7	6
	C. P. P.	集 堆 増加率			20	19	14	10	9	5	5

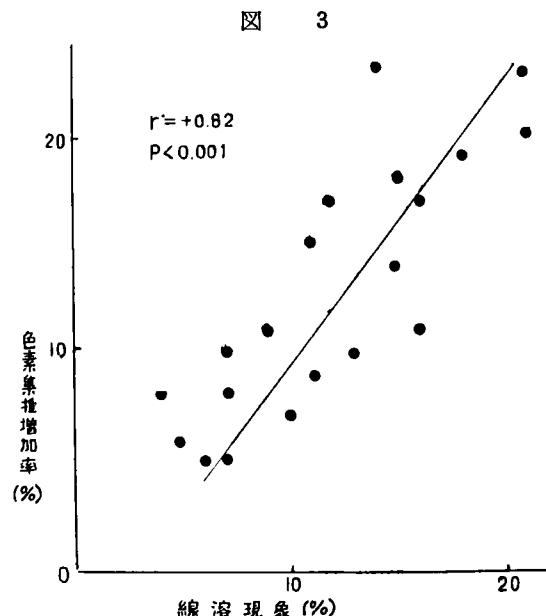
F—線維素溶解現象, M. F.—Mac-Farlane の変法, S. T.—Shulman Tanon の変法,
C. P. P.—毛細血管透過亢進作用。

実験は 4 羽の家兎を用い、家兎の耳静脈より比較的緩徐なる速度にて癌エキスを 2 cc/kgw の割合に注入し、30分、60分、90分、120分、180分および 240分後の色素集堆増加率、血清の線維素溶解現象を測定し、両測定値の相関係数を算出し相関関係を考察した。

線維素溶解現象は癌エキスを注射後約 30~60 分の血清において最高の強さを示し、その後徐々に減少してゆく傾向を示した。色素集堆増加率においても、30~60 分後最高値を示し、その後徐々に減少し前者と同様の傾向をみる。また両作用の関連性について検討するに (図 3) 相関係数 $r=0.8223$ ($P<0.001$) にして 0.1% 以下の危険率で明らかに有意の相関関係が認められた。

実験 2

トキソホルモン注射による毛細血管透過作用およ



び線維素溶解現象の関連性について実験を行った。

トキソホルモンの毛細血管透過亢進作用については前章において述べたごとくトキソホルモンは対照リンゲル氏液の色素集堆能力に比して明らかに有意の差を認めた。トキソホルモン 25 mg/kgw を家兎耳静脈より注入30, 60, 90, 120, 180, 190, 240および480分後の色素集堆増加率と同時間毎の家兎血

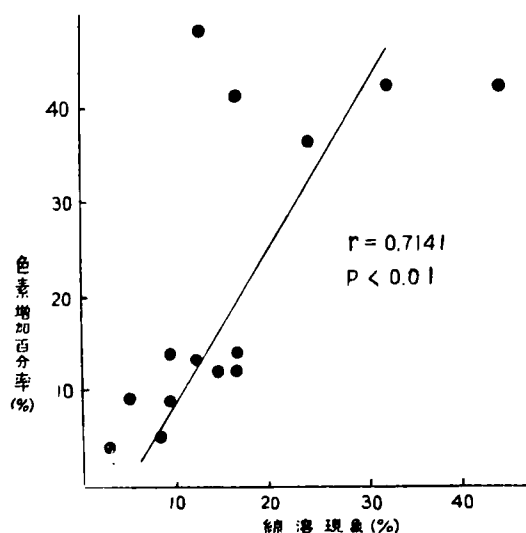
清の線維素溶解現象との相関関係は第14表および第4図にみられるごとく相関係数 $r=0.7141$ ($P<0.01$)という明らかに有意の正相関が得られた。すなわち単位測定時間におけるトキソホルモンの毛細血管透過亢進作用が強くなるほど線維素溶解現象の測定値も高く平衡は正に傾くという関係が成立する。

表 14 トキソホルモン注射時に於ける毛細血管透過作用および線維素溶解現象

家兎番号	実験方法		経過時間(分)										
			注射前	直後	30	60	90	120	150	180	210	240	480
T I	F	M. F.	—		+	+	+	++	+	—		—	—
		S. T.	0	10	20	16	14	44		7		9	9
	C. P. P.	集堆増加率				41		42		5		10	
T II	F	M. F.	—		++	+	+	++	+	+	—	—	—
		S. T.	2		23	12	16	32	14	16	12	5	4
	C. P. P.	集堆増加率			36	48	12	42	12	13	13	9	2

F—線維素溶解現象, M. F.—Mac-Farlane の変法, S. T.—Shulman Tagnon の変法,
C. P. P.—毛細血管透過亢進作用。

図 4



実験 3

癌腫組織中の毛細血管透過亢進因子についてはすでに前章において述べたところであり、また該因子の抽出物質は癌尿エキスおよびトキソホルモンの毛細血管透過亢進作用に比して推計学的に明らかに有意の差を有し最も強度であることを知った。つぎに前述の実験方法に準じて癌腫組織より抽出せる該物質の毛細血管透過作用と線維素溶解現象との関連性について検討した。表15の如く毛細血管透過作用および線維素溶解現象は最初の15分、30分において著明に現われ、その後時間的経過と共に減少する傾向がうかがわれる。実験例1において90分にて線維素溶解現象21%、色素集堆率18%を示しているがこれは家兎における線維素溶解現象の個体差による動揺と考えられる。

表 15 癌腫毛細血管透過性物質による毛細血管透過作用および線維素溶解作用

家兎番号	実験方法		経過時間(分)								
			注射前	直後	15	30	45	60	75	90	120
M I	F	M. F.	—	+	++	++	+	+	+	+	+
		S. T.	0	4	34	29	14	7	11	21	16
	C. P. P.	集堆増加率			37	24	4	3	13	18	17

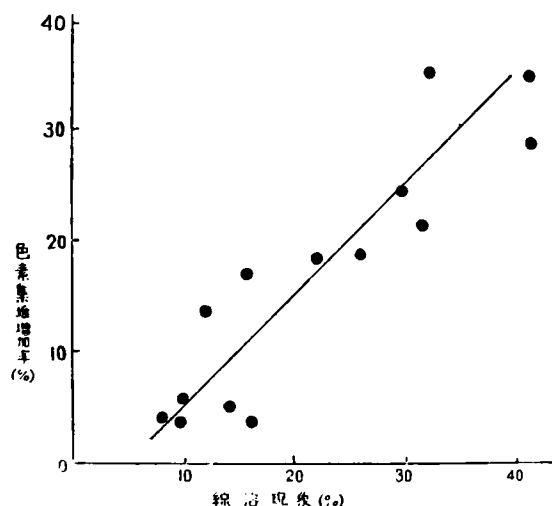
M II	F	M. F.	—	—	++	++	++	+	+	+	+
		S. T.	0	2	43	31	25	13	9	10	7
	C. P. P.	集堆 増加率			28	22	19	6	3	5	3

F—線維素溶解現象, M. F.—Mac-Farlane の変法, S. T.—Shulman Tagnon の変法,

C. P. P.—毛細血管透過亢進作用.

つぎに毛細血管透過作用と線維素溶解現象との間には相関係数 $r=0.9423$ ($P<0.0001$) という有意の相関が認められた(図5).

図 5



第4節 小括および考按

私は癌エキス、トキソホルモンおよび癌腫組織より抽出した毛細血管透過亢進物質を正常健康な家兎にその一定量を注射することによつて線維素溶解現象が陽性であり、且つ毛細血管透過性を亢進させる作用を有し、両作用は15分ないし60分間において最高度であり、また線維素溶解現象と毛細血管透過作用とは有意の相関関係を有することを明らかにした。Fibrinolysis という言葉を初めて使用したのは Green³⁶⁾ であり、Rolot (1904)³⁷⁾ は線維素溶解現象は血液中の白血球増加によつて促進されるとし、白血球により線維素の溶解が起るものと考えた。Nolf (1905)³⁸⁾ はペプトンショックや肝切除等の処置によつて線維素溶解現象が起ることを報告し、Mac-farlane³⁹⁾ はショック状態には線維素溶解現象が常に存在することを指摘し、その後 Imperati, Kaulla⁴⁰⁾, Mole, Wexler & Ellis⁴¹⁾, Smith⁴²⁾, Wilson & Munnel⁴³⁾, Tagnon⁴⁴⁾ などにより臨床的に種々の場合に線維素溶解現象が認められることを明らかにしたが当時この種の作用が如何なる機序で起るかは不明であつた。

毛細血管透過作用および線維素溶解現象との関連については畔柳³⁰⁾ は人および種々の動物の流血中に各種蛋白を溶解する線維素溶解酵素系を非活性の形で含んでおり、Fibrinolysin と Antifibrinolysin との動的平衡が存在するが、Profibrinolysin が活性状態の Fibrinolysin に変化した際、Fibrinolysis ないし血清の毛細血管透過性を亢進させる作用を有するに至ると述べている。Fibrinolysin が直接的に血管壁に作用して障害を及ぼすと考える人もあり、私の実験した癌腫毒による毛細血管透過作用が Fibrinolysin そのものの作用ではないかとの疑問が起るが一般に Fibrinolysin は易熱性で 45°C 30分間の加熱で大部分が破壊されるとせられており、この点癌腫毒中の毛細血管透過亢進物質と名づけたものが耐熱性である点異なるように思われる。

Menkin, 町口によれば leucotoxine 様物質は非動化された血清中には存在しないとされ、一般に正常血清には毛細血管の透過性亢進は認められないとされている。私の実験においても非動化した正常な血清は毛細血管の透過性を亢進せしめなかつた。畔柳は癌患者の血清は毛細血管透過亢進作用および線維素溶解現象が陽性であることを報告している。

それでは癌エキス、トキソホルモンならびに癌腫透過性物質が如何なる機序により毛細血管透過作用および線維素溶解現象が発生するかは多くの問題を含んでおり、最近 Ungar⁴⁵⁾ によれば、Profibrinolysin は Fibrinolysin の酵素源で血漿グロブリン分屑中に存在し、Lysokinase によつて活性化されて Fibrinolysin となる。この Lysokinase には細胞に由来する Cytofibrinokinase、血清中の serofibrinokinase ならびに炎症時の主役を演ずる Bacteriofibrinokinase とに分けられ、細胞性の Cytofibrinokinase はあらゆる組織の細胞内にあり細胞が障害を受けると遊離される。serofibrinokinase は血清中に不活性の形で存在し、抗原抗体反応あるいはアナフィラキシー様刺激が加わると爆発的に活性化される。このごとく Lysokinase により血漿中に存在する Profibrinolysin から Fibrinolysin へ

の活性化が起り、ヒスタミンないし leucotoxine が産生されて毛細血管透過亢進作用が起るとされている。

Nolf³⁰⁾ はペプトンショックに際して、Rocha e Silva, Ungar³¹⁾ などとはアナフィラキシーに際して線維素溶解現象が認められることを報告し、ペプトンショックに際して毛細血管透過作用が亢進することは多くの学者によつて認められている。畔柳³⁰⁾ はペプトンショック、アナフィラキシーショックに際しての毛細血管の透過亢進作用および線維素溶解現象との関連性について、生体内での諸種のストレスに対する生体反応として発現すると述べている。しかもこのような生体反応が甚しく強烈であるか継続的に起つた場合には生理的範囲を逸脱して適応の失調を起し、Fibrinolysin の強度な、もしくは継続的な活性化、血清の毛細血管透過作用の発現、ついで全身の毛細血管透過亢進作用が継続的に起こるものと考えられると述べている。

私の実験の癌腫毒素による毛細血管透過亢進作用と線維素溶解現象は有意の相関関係を有することは、癌腫毒による生体における或る種の反応過程すなわち細胞中に存在する Cytofibrionkinase、血清中の serofibrinokinase 等により Profibrinolysin から fibrinolysin への活性化、次いで蛋白溶解の結果 Polypeptides が産生されて毛細血管透過性亢進作用が起るものと考えられる。

第3章 癌腫毛細血管透過性物質 注射時における細網系お よび間葉系臓器の態度

第1節 序

放射性同位元素を生体の諸反応の解明に追跡子として応用した先駆者はハンガリア生れの物理学者 Hevesy である。当時は天然のアイソトープが唯一の材料であつたのでその応用範囲も非常に局限されておつたが、1934年 Curie および Joliot によつて発見された人工アイソトープによつてその利用は急速に展開され、1934年には Chiewity および Hevesy によつてはじめて人工放射性同位元素の P^{32} を動物の代謝研究に応用した。以来人工放射性同位元素による幾多の研究報告が生物学および医学の分野で発表され、生物の新陳代謝の動的な把握や、生体内諸物質の分解合成などの諸機構が次第に明らかになりつつある。

第2次大戦のはじまるまでは主として米国でサイ

クロトンより生産された放射性同位元素および天然に存する安定同位元素を分離濃縮したもので広範囲にわたる生化学的研究が開始され、我国においても仁科博士などが放射性同位元素を用いて研究に着手したのであつたが、不幸にして大戦のため我国の放射性同位元素利用の研究は困難となり、一頓挫したが戦後米国より輸入が許可され、ことに最近に至り原子炉の設置などにより、放射性同位元素の医学的応用は目覚ましい発展を遂げ、各部門にわたり広く活用せられるに至つている。すなわち悪性腫瘍の診断ならびに治療に、また追跡実験等の研究業績が数多く発表されてきた。

なかでも P^{32} は安価に得られること、 β 線のエネルギーが高いこと、半減期が適当 (14.3日) の長さであること、磷は細胞を構成する元素の一つで重要な部位をしめ、生体内で種々重要な有機化合物の磷酸エステルとして存することなどの理由で、以前から盛んにトレーサーとして利用されている。

私は第1章において癌腫組織より毛細血管透過亢進物質を抽出し、その物理化学的性状を明らかにし、また第2章において毛細血管透過作用と線維素溶解現象は有意の関連性を有することを述べた。つぎに癌腫毛細血管透過性物質の投与時における細網系 (肝、脾、骨髓、淋巴腺) および間葉系 (血液、心、筋、骨) 組織の機能を P^{32} を追跡子として追求した。

第2節 実験材料および実験方法

実験動物は体重 2 kg 前後の正常健康なる白色家兎を使用し、 P^{32} は稀塩酸中に溶解されてあるのでフェノールフタレイン 1 滴を加え、NaOH で中和し、さらに生理食塩水で所要の放射能をふくむ溶液にまで希釈した。

P^{32} 投与量は家兎 100 $\mu\text{c}/\text{kgw}$ とし、癌腫毛細血管透過性物質は 25 mg/gw を静注し、また他方対照比較のため家兎に同量の P^{32} を静注し、両家兎における P^{32} の時間的分布を追求するため、1, 2, 3, 4, 5 時間および 6 時間後に両頸動脈を切断し、血液をとり、その後充分脱血させて目的の臓器組織を採取し、血液はザリー氏血色素測定用ピペットにて 20 cmm 吸引採血し、他の諸臓器は正確に 1 g 宛秤量して測定用試料とした。

P^{32} を測定するには、試料を液体の状態で測定する方法と固体の状態で測定する方法とがあるが、いずれの場合にも試料中における β 線の自己吸収が問題となる。固体の状態で測定するには試料を一様に分散せしめることが困難なこと、容器の内壁に液

がはい上ること、あるいは燐以外に種々の塩類が存在するために自己吸収を一定ならしめることが困難なことなどの欠点があるため測定結果が試料中に含まれている P^{32} の量と平行しないおそれがあるとされている。私は家兎の諸臓器組織を Hevesy の方法⁴⁶⁾ にならつて湿性灰化し、カウンターは神戸工業製ガイガー・ミューラー計算管、高圧電源装置、増幅器などを使用した。すなわち P^{32} を含んだ一定量の臓器組織をキエルダールフラスコに入れ、硫酸、硝酸各 1 cc を加えて湿性灰化した。灰化完了後 carrier として 0.2M KH_2PO_4 溶液 4.0 cc を加え、蒸溜水 10 cc を添加してよく混和する。つぎに指示薬としてフェノールフタレイン溶液を 2~3 滴滴下した後マグネシア混液 2 cc を加えた、20%アンモニア溶液を全体が微紅色を呈するまで加えた。更に

全量の $1/4$ まで 20%アンモニア水を追加し、30分以上放置、燐マグネシウムアンモンの沈殿が完全に析出した後に、吸引濾過によつて測定用濾過皿にとつた。この測定用濾過皿は軟膏かん (1 g) にて自製せるもので測定条件を同一にするため、規格を同一に定めた。この測定用濾過皿の上で試料を充分乾燥せしめ、測定には一試料につき 2 分間宛 5 回の計算結果を平均し、その 1 分当り換算値から予め測定せる自然係数を減じたものを測定値とし、 P^{32} 濃度を算出して比較した。

$$P^{32} \text{ 濃度} = \frac{P^{32} \text{ counts per min. per g}}{\text{全投与 } P^{32} \text{ counts per min.}}$$

第3節 実験成績

1. 細網内皮系臓器組織 (表16)

表 16 細網内皮系臓器組織 P^{32} 濃度

			1 時 間	2 時 間	3 時 間	4 時 間	5 時 間	6 時 間
肝	癌 群	C. P. M.	12524	16422	17027	21403	36482	37926
		P^{32} 濃度	49.8×10^{-5}	65.3×10^{-5}	67.7×10^{-5}	85.1×10^{-5}	145.0×10^{-5}	150.8×10^{-5}
	対 照 群	C. P. M.	17706	24521	28318	28973	34531	26935
		P^{32} 濃度	$70.4 \times "$	$97.5 \times "$	$112.6 \times "$	$115.5 \times "$	$137.5 \times "$	$107.1 \times "$
脾	癌 群	C. P. M.	1534	2012	2087	1810	1559	1358
		P^{32} 濃度	6.1×10^{-5}	8.0×10^{-5}	8.2×10^{-5}	7.2×10^{-5}	6.2×10^{-5}	5.4×10^{-5}
	対 照 群	C. P. M.	1332	2313	2841	2942	3395	3596
		P^{32} 濃度	$5.3 \times "$	$9.2 \times "$	$11.3 \times "$	$11.7 \times "$	$13.5 \times "$	$14.3 \times "$
骨 髄	癌 群	C. P. M.	8098	14939	27504	16422	13374	11015
		P^{32} 濃度	32.2×10^{-5}	59.4×10^{-5}	69.6×10^{-5}	65.3×10^{-5}	53.3×10^{-5}	43.8×10^{-5}
	対 照 群	C. P. M.	12952	22936	26684	28671	30356	31261
		P^{32} 濃度	$51.5 \times "$	$91.2 \times "$	$106.1 \times "$	$114.0 \times "$	$120.7 \times "$	$124.3 \times "$
リン パ 腺	癌 群	C. P. M.	21253	26181	26156	24270	21226	18433
		P^{32} 濃度	84.5×10^{-5}	104.1×10^{-5}	104.0×10^{-5}	96.7×10^{-5}	84.4×10^{-5}	72.3×10^{-5}
	対 照 群	C. P. M.	17152	29324	33298	37272	39259	40491
		P^{32} 濃度	$68.2 \times "$	$116.6 \times "$	$132.4 \times "$	$148.2 \times "$	$156.1 \times "$	$161.0 \times "$

C. P. M. — Counts per min.

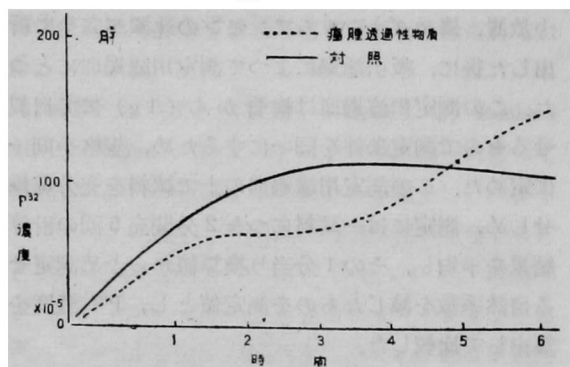
(1) 肝 (図6)

癌腫毛細血管透過性物質群においては対照非投与群に比して該物質投与後 4~5 時間まで P^{32} 濃度は低値を示した。

(2) 脾 (図7)

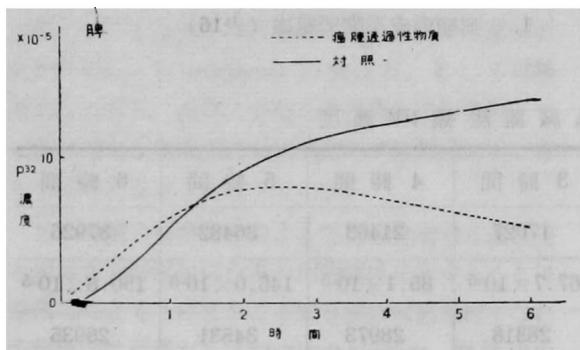
癌腫毛細血管透過性物質投与の際の P^{32} 濃度は投与後 1 時間以内は対照非投与群の P^{32} 濃度と大差を認めなかったがそれ以後において P^{32} 濃度は対照に

図 6



比して徐々に低値を示す傾向を認めた。

図 7



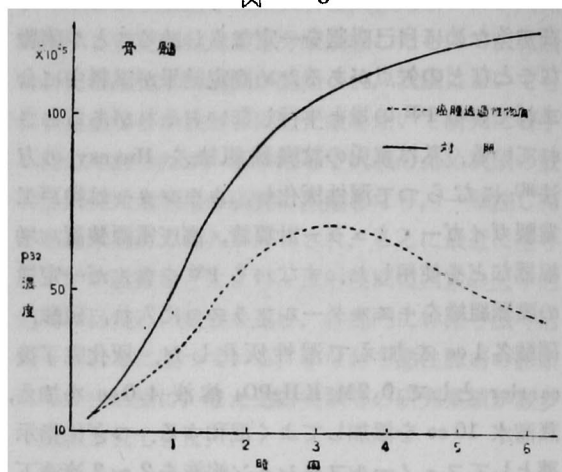
(3) 骨髄 (図 8)

家兔大腿骨髄を抽出して測定した P^{32} 濃度は対照同部位骨髄 P^{32} 濃度が短時間 (6 時間) 内に急激に増量する傾向を有するに反して癌腫毛細血管透過性物質投与群においては投与後約 3 時間までは次第に高値を示す傾向を認めるが 3 ~ 4 時間以後においては P^{32} 濃度は徐々に低下する。

(4) リンパ腺 (図 9)

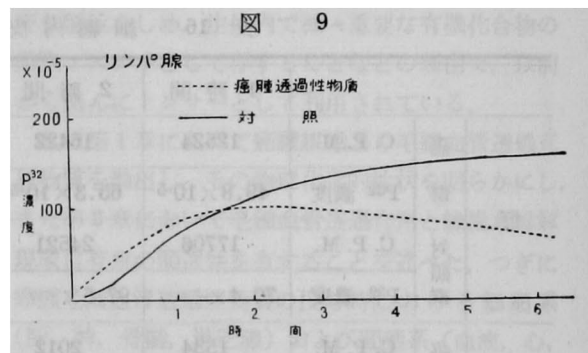
癌腫毛細血管透過性物質投与後 2 ~ 3 時間までは

図 8



対照に比して P^{32} 濃度は大差を認め得ないが以後次第に低値を示した。

図 9



2. 間葉系臓器組織 (表17)

(1) 血液 (図10)

癌腫毛細血管透過性物質投与後 6 時間までの P^{32} 濃度は対照群に比していずれも高値を示した。

(2) 心 (図11)

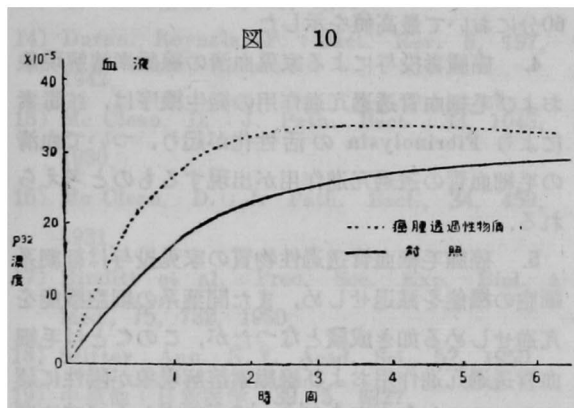
対照群は癌腫毛細血管透過性物質投与群に比して P^{32} 濃度は徐々に上昇するが投与後 5 ~ 6 時間で癌

表 17 間葉系臓器組織 P^{32} 濃度

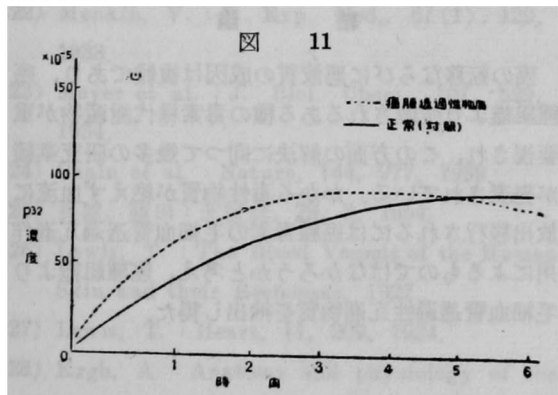
			1 時間	2 時間	3 時間	4 時間	5 時間	6 時間
血 液	癌 群	C. P. M.	6815	8098	6237	8576	8451	8374
		P^{32} 濃度	27.1×10^{-5}	32.2×10^{-5}	33.5×10^{-5}	34.1×10^{-5}	33.7×10^{-5}	33.3×10^{-5}
	対照群	C. P. M.	4149	5985	8425	6639	6865	7667
		P^{32} 濃度	$16.5 \times "$	$23.8 \times "$	$24.8 \times "$	$26.4 \times "$	$27.3 \times "$	$28.5 \times "$
心	癌 群	C. P. M.	16171	21176	23238	23666	23037	21629
		P^{32} 濃度	64.3×10^{-5}	84.2×10^{-5}	92.4×10^{-5}	94.1×10^{-5}	91.6×10^{-5}	86.0×10^{-5}
	対照群	C. P. M.	10563	16121	19818	21931	23138	23716
		P^{32} 濃度	$42.2 \times "$	$64.1 \times "$	$78.8 \times "$	$87.6 \times "$	$92.0 \times "$	$94.3 \times "$

筋	癌群	C. P. M.	2590	4350	5985	6639	6841	6991
		P ³² 濃度	10.3×10 ⁻⁵	17.3×10 ⁻⁵	28.3×10 ⁻⁵	26.4×10 ⁻⁵	27.2×10 ⁻⁵	27.8×10 ⁻⁵
	対照群	C. P. M.	1534	2213	2791	2993	3143	3244
		P ³² 濃度	6.1× "	8.8× "	11.1× "	11.9× "	12.5× "	12.9× "
骨	癌群	C. P. M.	1332	1961	2590	3244	4275	5331
		P ³² 濃度	5.3×10 ⁻⁵	7.8×10 ⁻⁵	10.3×10 ⁻⁵	12.9×10 ⁻⁵	17.0×10 ⁻⁵	21.2×10 ⁻⁵
	対照群	C. P. M.	201	427	829	1332	1911	2641
		P ³² 濃度	0.8×10 ⁻⁵	1.7×10 ⁻⁵	3.3× "	5.3× "	7.6× "	10.5× "

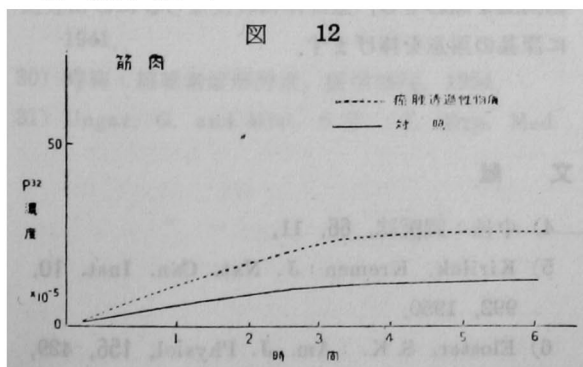
C. P. M. — counts per min.



腫毛細血管透過性物質投与群よりも高値を示すにいたる。

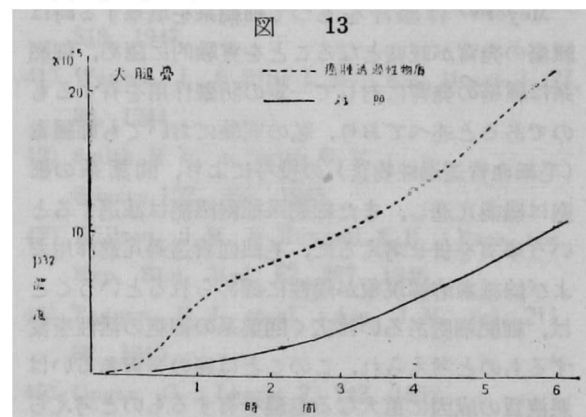


(3) 筋肉 (図12)



家兎大腿筋の P³² 濃度を比較するに癌腫毛細血管透過性物質投与群は対照群に比していずれも高値を認めた。

(4) 骨 (図13)



骨における P³² 分布は部位によりて異なるので大腿骨幹部をとつて測定した。実験値は癌腫毛細血管透過性物質投与群は対照群に比して P³² 濃度はいずれも高値を認めた。

3. 小 括

(1) 細網系臓器すなわち肝、脾、骨髓、リンパ腺における癌腫毛細血管透過性物質投与時の P³² 濃度はいずれも対照に比して低値を示した。

(2) 間葉系臓器組織すなわち血液、心、筋肉、骨の P³² 濃度はいずれも癌腫毛細血管透過性物質投与群の高値を認めた。

第4節 考 按

P³²を追跡子としての実験は Chiewity & Hevesy⁴⁷⁾, Cohn & Greenberg⁴⁸⁾, Pecher⁴⁹⁾, Perlman⁵⁰⁾ などは P³² の体内分布が投与後短時間では非常に大きい動揺値を示すことを指摘している。従つて既往の実験報告は投与してから長時間後のものが多い。しかし Greenberg⁵¹⁾ らも報告しているように、P³² を

投与した場合体内での最大蓄積率が投与後短時間内にあるとすればむしろ短時間内での P^{32} の臓器組織における分布も意義があると考えられる。一方実験例数を多く重ねれば、そこに自ら一定の分布率が短時間内においても知ることが出来ると思われ、私は癌腫組織中より抽出した毛細血管透過性亢進物質の投与時における細網ならびに間葉系臓器組織の P^{32} 濃度の比較的短時間内における分布を追求した。一方このことは癌腫毛細血管透過性物質投与時における毛細血管透過作用ならびに線維素溶解現象の陽性時における細網、間葉系臓器組織の機能の一端を知り得るに役立つと考えられる。

P^{32} は投与後急速に体内に分布されることは実験結果に示された通りであり、それが細胞代謝の旺盛な臓器組織において極めて高い値を示していることも、すでに諸家の示した実験成績と一致している。

Meyer⁵²⁾ は墨汁をもつて細網系を填塞する時は腫瘍の発育が旺盛となることを実験的に認め、細網系は腫瘍の発育に対して一定の防禦作用を有するものであると述べており、私の実験においても癌腫毒(毛細血管透過性物質)の投与により、間葉系の細胞は機能亢進し、また細網系細胞機能は減退するという事実を併せ考えるに、毛細血管透過亢進作用および線維素溶解現象が陽性に認められるということは、細網細胞あるいは広く間葉系の細胞の活性を変ずるものと考えられ、このことは癌の発育あるいは悪液質の成因に重大なる意義を有するものと考えられる。

総 括

以上私は癌腫毒の毛細血管透過亢進作用について検索し、またその発現機序について追究した。

1. 癌エキス、トキソホルモンおよび癌尿エキスは毛細血管透過亢進作用を有する。

2. 癌腫組織中より毛細血管透過性物質を Menkin の leucotoxine 物質の抽出法により抽出した。

(1) 該抽出物質はトキソホルモンおよび癌尿エキスの毛細血管透過亢進作用に比して強度であり、5%以下の危険率において有意の差を有する結果を得

た。

(2) 該抽出物質は組織透過性を有するが臓器毒または拡散因子そのものの作用とは該抽出物質は耐熱性である点で異なる。

(3) 該抽出物質は弱アルカリ弱酸性に於て有効で、拡散性を有し硫酸アンモン分割によつてグロブリン分屑中に存し、蛋白、アミノ酸試験などの成績より Polypeptide 群に属する物質と考えられる。

3. 癌エキス、トキソホルモンおよび癌腫毛細血管透過性物質を静注せる家兎血清には線維素溶解現象が陽性に認められ、また毛細血管透過作用と該現象とは有意の相関関係を有し、いずれも最初の30~60分において最高値を示した。

4. 癌腫毒投与による家兎血清の線維素溶解現象および毛細血管透過亢進作用の発生機序は、該毒素により Fibrinolysin の活性化が起り、ついで血清の毛細血管の透過亢進作用が出現するものと考えられる。

5. 癌腫毛細血管透過性物質の家兎投与は細網系細胞の機能を減退せしめ、また間葉系の細胞機能を亢進せしめる如き成績となつたが、このことは毛細血管透過亢進作用および線維素溶解現象が陽性に認められることとを考え併せ、癌の発育および悪液質の成因に重大なる意義を有するものと思われる。

結 論

癌の転移ならびに悪液質の成因は複雑であり、癌腫組織より生産されるある種の毒素様代謝産物が重要視され、この方面の解決に向つて幾多の研究業績が発表されている。かかる毒性物質が絶えず血流に放出移行されるには癌腫毒素の毛細血管透過亢進作用によるものではなからうかと考え、癌腫組織より毛細血管透過性亢進物質を抽出し得た。

擧筆するに当り、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜わりし、恩師津田教授ならびに砂田教授に深甚の謝意を捧げます。

主 要 文 献

- 1) Coman : Science. 105, 347, 1947
- 2) Seiter, J. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 74, 796, 1950.
- 3) 尾崎 : GAN. 42, 97,

- 4) 中邑 : 岡医誌, 66, 11,
- 5) Kiriluk, Kremen : J. Nat. Can. Inst. 10, 992, 1950.
- 6) Eloster, S. K. : Am. J. Physiol, 156, 429,

- 1949.
- 7) Zweifach, B.W. and K. Chamber : Ann. N.Y. Acad. Sc. 52, 1047, 1950.
- 8) Menkin, V. : Dynamics of Inflammation, New York, MacMillon, 1940.
- 9) Moore, D. F. and Tobin, L. H. : J. Clin. Invest. 21, 471, 1942.
- 10) 町口 : 医学と生物学, 5, 275. & 466, 1944.
- 11) 畔柳他 : 日新医学, 38, 684~690, 1951.
- 12) 中原他 : Jap. Med. J. 1, 271, 1948, 癌, 40, 45, 1949 ; 41, 47, 1950.
- 13) 笠 : 東北医誌, 5, 29, 昭10.
- 14) Duran. Reynals, F. : Bact. Rev. 6, 197, 1942.
- 15) Mc Clean, D. : J. Path. Bact. : 33, 1045, 1930.
- 16) Mc Clean, D. : J. Path. Bact., 34, 459, 1931.
- 17) Binditt et al. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 75, 782, 1950.
- 18) Seifter : Anu. N.Y. Acad. Sci., 52, 1950.
- 19) 中原他 : 日新医学, 39, 5, 昭27.
- 20) 中川他 : 癌, 42, 103, 1951.
- 21) 中川他 : 日内誌, 40, 6, 1951.
- 22) Menkin, V. : J. Exp. Med., 67 (1); 129, 1938.
- 23) Meyer et al. : J. Biol. Chem., 107, 629, 1934.
- 24) Chain et al. : Nature, 144, 977, 1939.
- 25) 長屋, 藤田 : 北医誌, 29, 8, 1954.
- 26) Lewis, T. : The Blood Vessels of the Human Skin and their Responses, 1927.
- 27) Lewis, T. : Heart, 11, 209, 1924.
- 28) Krgh, A. : Anatomy and physiology of the capillaries, New Haren, 1924.
- 29) Feldberg, W. : Ann. Rev. physiol. 3, 671, 1941.
- 30) 畔柳・線維素溶解酵素, 医学書院, 1954.
- 31) Ungar, G. and Mist. S. H. : J. Exp. Med. 90, 39, 1949.
- 32) Loomis, E. C., George, C., and Ryder. A. : Arch Biochem. 12, 1, 1947.
- 33) Lewis. H., and Fergusson H. J. : J. Clin. Invest, 29, 286, 1950.
- 34) Mac. Farlane, R. G. and Biggs, R. : Lancet 2, 862, 1946.
- 35) Shulman, N. R., and Tagann, H. J. : J. Biol. Chemist 186, 69, 1950.
- 36) Green, J. R. : G. Physiol. 8, 372, 1887.
- 37) Rolot, H. : Arch. internat. de Physiol. 1, 152, 1904.
- 38) Nolf, P. : Arch. internat. de Physiol. 3, 1, 1905.
- 39) Mac farlane R. G. : Lancet 1, 10, 1937.
- 40) Kaulla K. N. : Schweiz. Med. Wehnschr. 77, 313, 1947.
- 41) Wexler, J. & Ellis L. B. : Am. Heart J. 27, 86, 1944.
- 42) Smith H. P. & Smith G. V. : Science 102, 253, 1945.
- 43) Willson, J. R. & Munnell E. R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 62, 277, 1946.
- 44) Tagnon, H. J. et al. : Am. J. M. Sci. 211, 88, 1946.
- 45) Ungar, G. : Lancet 2, 742, 1952.
- 46) Hevesy, G. : Rodioactive Indicators, Interscience Publishers, Inc, New York, 1948.
- 47) Chiewitz, O. and Hevesy, G. : Neture 136, 754, 1935.
- 48) Cohn, W. E. and Greenberg, D. M. : J. Biol. Chem. 123, 185, 1938.
- 49) Pecher, C. : Proc. Soc. Exper. Biol. Chem. 129, 125, 1939.
- 50) Perlman, I., Ruben, S. and chaikoff, I. L. : J. Biol. Chem. 122, 169, 1937—8.
- 51) Cohn, W. E. and Greenberg, D. M. : J. Biol. Chem. 128, XVI, 1939.
- 52) Meyer : Z. Krebsforsh, 33, 1120, 1931.

Experimental Study on the Capillary Permeable Substance in Cancer Toxin

By

Takashi HIRAGA, M. D.

From the II. Surgical Dept. Okayama University Medical School
(Director; Prof., Seiji Tsuda, M. D.)

The author has studied on the Capillary Permeability Promoting (C. P. P.) Action of cancer toxin and its genesis, obtaining following results.

- 1) Cancer extract, toxohormone and urine extract of cancer patients have C. P. P. action.
- 2) A capillary permeable substance, which is heat-resisting and diffusive, is extracted from cancer tissue. This substance has a notable difference in sampling as compared with the capillary permeability of toxohormone and urine extract of cancer patients, and is contained in the globulin fraction on ammonium sulfate method. The substance is found to belong in the polypeptides group according to the results obtained above and to protein and amino acid tests.
- 3) In the serum of rabbit administered cancer toxin C. P. P. action and fibrinolysis are observed, and these two actions are significantly interrelated in sampling
- 4) The C. P. P. action and fibrinolysis produced by administration of cancer toxin are thought to be derived from activation of profibrinolysin to fibrinolysin followed by appearance of permeability of capillaries.
- 5) On the study of C. P. P. substance in cancer tissue, used radioactive isotope P^{32} as a tracer, function of reticuloendothelial cells is declined and that of mesenchymal cells is accelerated.

From the experimental results described above, the action of C. P. P. substance in cancer tissue is considered to play an important role on the growth of cancer and occurrence of cachexia, on thinking the fibrinolysis and the functional decline of cells of the reticuloendothelial system.
