

Glycine, Serine, Glutamic acid, Aspartic acid, Proline, Methionine sulfone, Lysine, Arginine, Cysteic acid, Tyrosine, 及び所謂 Roberts の Underglutamic acid と思われる Spot の少量出現を見た。Tyrosine は非癌の時と比較して増量している。他のアミノ酸組成はかわらない。

(2) 非癌血清対熱非凝固物質のアミノ酸組成は、癌血清の時と比較して、Tyrosine が少い、又 Roberts の Underglutamic acid と思われる Spot が見出せない。

(3) 癌組織の対熱非凝固物質である中原氏のトキソホルモンのアミノ酸組成は Leucine,

Valine, Alanine, Threonine, Glycine, Glutamic acid, Serine, Aspartic acid, Lysine, Arginine, Proline, Methionine sulfone, Cysteic acid, 及び Roberts の Underglutamic acid と思われる Spot の大量出現を見た。

癌血清対熱非凝固物質と比較して、一般にヘキソン塩基アミノ酸(特に Arginine)が少いこと、Tyrosine が現れないこと、及び大量の Underglutamic acid が存すること等に相違点を認められる。

(本論文の要旨は第10回日本癌学会総会に於いて報告した。)

(文献は第3編の終りにまとめて報告する。)

血清対熱非凝固物質定量による癌診断法 並にその本態的研究

第3編 血清対熱非凝固物質の肝臓カタラーゼ作用に 及ぼす影響に就て

岡山大学医学部津田外科教室(主任 津田誠次 教授)

助 手 奥 島 団 四 郎

[昭和27年3月10日受稿]

目 次

第1章 緒 言	第1節 正常マウスの肝臓カタラーゼ
第2章 実験方法	第2節 トキソホルモン注射マウスの肝臓 カタラーゼ
第1節 トキソホルモンの製法	第3節 血清対熱非凝固物質注射マウスの 肝臓カタラーゼ
第2節 血清対熱非凝固物質の製法	第4節 実験成績の総括
第3節 動物実験	第4章 考 案
1 実験動物	第5章 結 論
2 動物の処置	第6章 全編の総括
3 カタラーゼ測定法	
第3章 実験成績	

第1章 緒 言

癌患者及び担癌動物に於いて、殆んど特異的

に肝臓カタラーゼが減少することは、前編に

述べた如く Greenstein 等 (1947) の研究により、その意義が明らかにされたが、それは癌組織で分泌される毒素が凡らく血行を介して肝臓に作用するものと想像され、Greenstein はその原因を追究することには成功せず、生体に癌が発育していることが必要条件であると結論した。

然るに中原 (1949) は癌組織の有効成分を濃縮して抽出し、その 50~100mg を幼若マウスの腹腔に注射することによつて、既に 20 時間後に著明に肝臓カタラーゼが減少することを発見し、その物質を“トキソホルモン”と命名した。更に 1950 年その物質を銅塩として注射する時には強力な標品となり、5 mg の少量で有効量に達することを発表した。

私はトキソホルモンの作用機転に就て、或は血液中にも之が流出しているのではないかと考え、血清中よりかゝる物質を分離せんと努力し、その過程に於いてはからずも血清対熱非凝固物質が癌血清の場合には著明に増量することを知り、既に第 1 編に於いてその定量法による癌診断法を発表したが、更に癌血清に於ける対熱非凝固物質の増加が、何に原因しているか検討すべく、前編に於いて論じて来た。本編に於いてはそれが腫瘍自身分泌するものであるか否か、即ち癌毒性物質である中原のトキソホルモンであるか否か探究するため、マウスに注射し、その肝臓カタラーゼの作用を調べ、若干結果を得たので茲に報告すると共に、最後に全編を通じて、いさゝか総括を試みる次第である。

第 2 章 実験方法

第 1 節 トキソホルモンの製法

第 2 編に於いて記載したごとく、中原の製法に従い、癌組織中より対熱非凝固で水に可溶性の物質を抽出し、100°C 湯中で濃縮後、2 倍容の局方純アルコールで沈澱物を取り、エーテルで乾燥する。これはトキソホルモンである。更にこれを 1% 硫酸銅で沈澱し、N/10 塩酸で処理し銅塩となしたものを銅塩トキソホルモンと唱えている。

第 2 節 血清対熱非凝固物質の製法

既に第 1 編、第 2 編で記載した如く、トキソホルモンの製法と殆んど同じ操作で血清中より対熱非凝固で蒸溜水に溶け局方純アルコールに沈澱する物質を抽出した。

第 3 節 動物実験

(1) 実験動物

中原に従い、10g 以上 15g 以下の同一系統の幼若マウスを使用した。

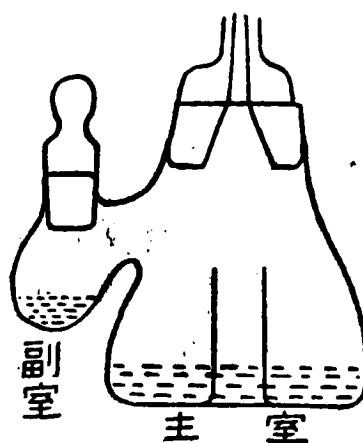
(2) 動物の処置

トキソホルモン及び血清対熱非凝固物質の一定量を蒸溜水に溶かし、滅菌後マウスの腹腔に注射し、20 時間の後出血死に到らしめ、肝臓を正確に 0.1g とり乳鉢で粥状となし、100c.c. の生理的食塩水で充分混和し、24 時間氷室中で抽出する。抽出後 5 分間 3000 回転で遠心沈澱し上清を使用する。即ち上清は肝臓の 1000 倍抽出液である。対然として未処置のマウスも使用した。

(3) カタラーゼ測定法

装置はワールブルグ検圧計を使用した。

第 1 図



主室	蒸溜水	2.3c.c.
	抽出液	0.1c.c.
	PH 6.8	
	磷酸緩衝液	0.5c.c.
副室	1.5% H ₂ O ₂	0.1c.c.

第 1 図の如きコルペンの副室に過酸化水素 (1.5%) を正確に 0.1c.c. 入れ、主室に抽出液 0.1c.c. 蒸溜水 2.3c.c. 更に PH 6.8 の磷酸緩衝液 0.5c.c. を入れ、37°C の恒温槽中にて

主副室を混合し、5分間隔で発生した酸素量を測定するとき、30分後には抽出液中のカタラーゼは完全に過酸化水素を分解するため、30分値の発生酸素量を測定した。

ワールブルグ検圧計を用い、発生単一ガス量を計算する式は Brodie 液を用いた時は次の通りである。

発生ガス量 x cmm

測定器の目盛 h mm とすると

$$x = h \times K \quad (K \text{ は容器恒数})$$

$$K = \frac{V_G \frac{273}{273+t} + V_F \alpha}{10}$$

V_G ……コルベン内のガスの容積

V_F ……液の容積(使用せる全液量)

t …… 37°C

α ……ガスの吸収係数 O_2 37°C の時は 0.02392

予め水銀で検定したコルベンを用いるためコルベンの容積は既知である。

使用せる全液量をコルベンの容積より減じたものが V_G である。

此の場合使用せる全液量は

$$V_F = 0.1\text{c.c.} + 0.1\text{c.c.} + 0.5\text{c.c.} + 2.3\text{c.c.} = 3.0\text{c.c.}$$

である。

故に容易に K の値を知ることが出来る。そこで目盛の mm を乗じて発生酸素量も知ることが出来る。

第3章 実験成績

第1節 正常マウスの肝臓カタラーゼ

正常マウス 15 匹に就ては表1の如くマウスの固体差により、肝臓カタラーゼ作用量にも相当の変動はあるが、酸素発生量は大体 40~60cmm である。

第2節 トキソホルモン注射マウスの肝臓カタラーゼ

トキソホルモン 50~100mg、及び銅塩トキソホルモン 5mg を注射したマウスの肝カタラーゼ量は、表2の如く対照に比べ著明に減少した。然し胃潰瘍及び癌ネクローゼより精製した物質を注射した場合は肝臓カタラーゼの減少をみなかつた。

表 1

マウス No	カタラーゼ作用量 (発生酸素量)
1	67.8 cmm
2	59.8
3	58.6
4	57.5
5	57.2
6	53.4
7	52.1
8	49.2
9	46.4
10	46.1
11	45.0
12	43.7
13	42.8
14	40.2
15	36.9

表 2

マウス No	トキソホルモン種類	注射量	カタラーゼ作用量 (発生酸素量)
1	胃癌	50mg	31.0cmm
2	乳癌	50	27.1
3	胃癌	100	26.7
4	胃癌	100	20.7
5	直腸癌	100	31.0
1	胃癌 銅塩	5	28.7
2	胃癌 銅塩	5	22.1
3	胃癌 銅塩	5	25.4
1	胃潰瘍	100	66.3
2	癌ネクローゼ	100	62.7

第3節 血清対熱非凝固物質注射マウスの肝臓カタラーゼ

癌及び非癌血清中より抽出した対熱非凝固物質の 30~50mg を注射したマウスの肝臓カタラーゼ作用量は、表3に示すごとく、正常マウスの肝臓カタラーゼ作用量と大差なく、又癌及び非癌の両者の間にカタラーゼに及ぼす影響に就ては相違を認めなかつた。

第4節 実験成績の総括

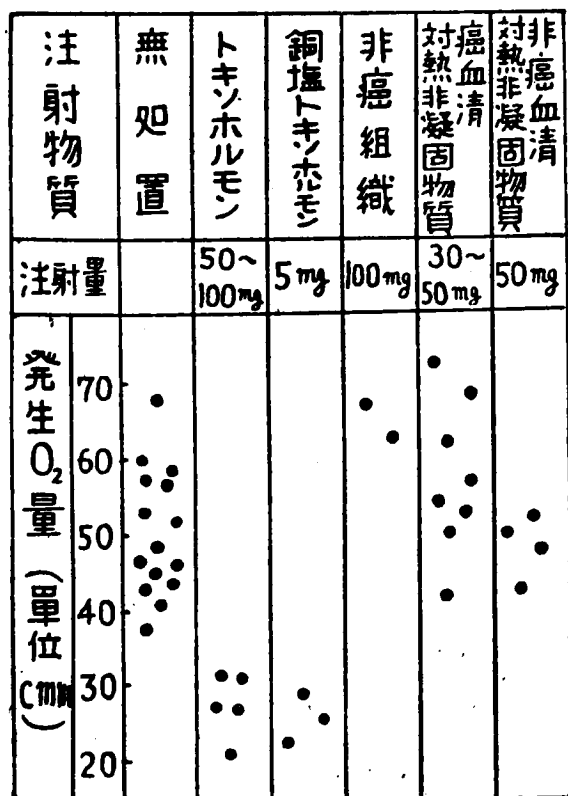
上述の実験成績を一括して、第2図に示す如きグラフを作成した。癌及び非癌の血清対熱非凝固物質を注射されたマウス、及び非癌組織より抽出された物質を注射されたマウス

表 3

マウス No	血清種類	注射量	カタラーゼ作用量 (発生酸素量)
1	胃癌	30mg	54.0cmm
2	胃癌	30	56.4
3	乳癌	30	49.9
4	直腸癌	30	61.9
5	直腸癌	40	73.6
6	乳癌	50	69.4
7	胃癌	50	41.9
8	胃癌	50	52.7
1	健康人	50	43.4
2	健康人	50	50.4
3	胃潰瘍	50	47.8
4	結核	50	52.1

の肝臓カタラーゼ作用量は、対照の未処置マウスの肝臓カタラーゼ作用量と大差なく、トキソホルモン、及び銅塩トキソホルモンを注射されたマウスのそれは著明に減少することを示している。

第 2 図



第4章 考 案

中原氏はカタラーゼ作用量測定に際し、パツテリーステルンの装置を用い発表したが、

私はワールブルグの検圧計を使用した。その測定法が異なるため、発生ガス単位に相違する点はあるけれども、中原氏が行った結果とほぼ同じ結果を得ることが出来た。

抑々正常マウスの肝臓カタラーゼ作用量は、その個体差により相当の変動があり、例え出血死に到らしめて測定しても、なお肝臓に含有せる血液量も異なるため、肝臓のみの正確な結果を得ることは困難といわねばならない。然しトキソホルモンを注射せる場合は、正常マウスの最低値以下の肝臓カタラーゼ作用量であった事実は、中原氏のトキソホルモン中にはマウスの肝臓カタラーゼ作用を減少せしめる有効成分が含まれていることを実証するものである。

凡そ癌組織が何か毒性物質を生産するであろうとゆうことは、かなり古くから考えられ単にカタラーゼ作用量に及ぼす影響のみでなく、あらゆる分野に亘つて研究されて来た。たゞ最近肝臓カタラーゼ作用量の著明な減少が、癌の全身障碍の一つとして Greenstein 等により紹介され、これが殆んど癌に特異的であると認められて、世界の注目を浴るに至つたのである。前述の如く、中原氏はこの肝臓カタラーゼ作用量を減少せしめる物質を、癌組織より抽出してトキソホルモンと命名したが、しからばその毒性物質は如何なる経路を経て肝臓に作用するのであろうか、体の一部で癌が発生すればその新陳代謝産物である癌毒性物質は、体液を介して肝臓に至ることは容易に考えられることで、或は血液中にも存在するのでわなないと推理され得ることである。既に中川氏 (1951) は癌患者尿中にも同様の作用のある物質を検出し得たと発表した。

私は血液中からこの物質の抽出に努力し対熱非凝固、蒸溜水に可溶、アルコールに沈澱し、エーテルに不溶の物質を血清中より抽出したが、トキソホルモンの有効量である 50mg と同量を幼若マウスに注射するも、肝臓カタラーゼ作用量を何等減少せしめることが出来なかつた。之は癌組織より抽出した物質には有効成分を含み、殆んど同様操作で癌血清中

より抽出した物質には有効成分を含まないためか、或は血清中に存在したとしても、あまりに小量であるため有効量に充たないためか、まだ不明である。又反対にあらゆる生体の免疫現象がそうである如く、癌毒性物質に於いても血液中では速かに毒物阻止作用が行われ、癌組織より産出するトキソホルモンは血液中では既に變化しているとも考えられる。

私は先にトキソホルモン及び癌血清、非癌血清対熱非凝固物質のアミノ酸組成を、濾紙クロマトグラフィを用いて検し、癌血清より抽出せるものにはチロチンが存し、トキソホルモンにはチロチンが無いこと、及び Underglutamic acid と思われる Spot の量的相違等を知つたが、それが爲に癌血清対熱非凝固物質は肝臓カタラーゼ作用量を減少せしめなかつたやうなことも断定出来ないし、血清中にはトキソホルモンは存在しないとゆうことも早計であらう。

第5章 結 論

(1) 私は中原の製法に従い、癌組織よりトキソホルモン及び銅塩トキソホルモンを抽出し、マウスに投与して、ワールブルグの検圧計を用い、肝臓カタラーゼ作用量を定量した結果、癌組織より製作せるものにては、著明に肝臓カタラーゼ作用量を減少せしめることを確め、中原の成績を確認した。

(2) 血液中でもかゝる物質の存在を仮定して、対熱非凝固、蒸溜水に可溶、アルコールに沈澱し、エーテルに不溶の物質を、癌及び非癌血清中より抽出し、トキソホルモンと同じく幼若マウスに注射するも、癌血清対熱非凝固物質はマウスの肝臓カタラーゼ作用に何等変化を与えることは出来なかつた。

文

載いた本学生化学清水教授、水原助教授及び津田外科教室砂田助教授に深甚の謝意を表す。

- 1) Ascoli, C. u. Watermann, N; *Ergeb. d. inn. med. u. kinderheilk*, Bd. 25: 944, (1924).
- 2) Brdicka, R; *natur* vol. 139: 330 (1937) vol. 139: 1020 (1937).

第6章 全編の総括

私は癌組織より抽出され、癌毒性物質と考えられる中原氏のトキソホルモンが、血液中に存在するか否か探究していたが、はからずもトキソホルモンと同じ操作で作られた血清中の対熱非凝固物質が、癌血清の場合は非癌に比べ著明に増量することを知り、種々改良の結果第1編で報告した如く簡単な定量法を考案し、癌の化学的診断法としても相当有効であつた。

更にこの血清対熱非凝固物質が癌の場合に増量する原因について探究するため、同じく第1編に於いて該物質増加は必しも血清熱凝固蛋白の減少を伴はず、手術的侵襲によつては増加するが、癌性貧血、赤血球沈降速度の亢進、血液型には関係のないことを知つた。

第2編に於いては濾紙クロマイグラフィを応用して研究し、癌血清対熱非凝固物質のアミノ酸組成は、同様操作で直接癌組織より抽出したトキソホルモンのアミノ酸組成と多少異なることを知り、最後に第3編に於いてそれらを投与したマウスの肝臓カタラーゼ作用を研究し、トキソホルモンと同じ投与量では肝臓カタラーゼを減少せしめないことを知つた。

以上により癌血清に於いて対熱非凝固物質が増加する主な原因は、癌が発育しているために生ずる宿主組織の崩壊に基くものであると考えられる。

本論文の要旨は第10回日本癌学会総会に於いて報告した。

第1編、2編、3編にわたる本研究は文部省科学研究費の補助をうけた、記して謝意を表す。

全編を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲の労を賜つた恩師津田教授を始め、数々の御援助を

献

- 3) Black, M. M., Kleiner, I. S., Bolker, H; *cancer research* vol. 8: 79, (1948).
- 4) Bywater; *Biochem. Z. Bd.* 15: 322 (1909)
- 5) Conden, R., Gordon, A. H., Martin, A. J. P (薬学3巻2号), *J. Biochem.* vol. 38: 224, (1944).

- 6) Duboff, D., Hirshfeld, S; (医学のあゆみ 8巻 4号) cancer research vol. 6: 57, (1946).
- 7) Fuchs; Biochem. Z. Bd. 245: 304, (1932).
- 8) Greenstein, J. P; Biochemistry of cancer. (1947).
- 9) Huggins, C, Miller, G. M., Jensen, E. V; cancer research vol. 9: 177, (1949).
- 10) Huggins, C., Cleveland, A. S, Jensen, E. V; J. A. M. A. (日本版) vol. 4, No2, (1950).
- 11) Kahn, H; kl. W. Jg. 2: 1364(1923) Jg. 6: 452, (1927).
- 12) Kürten; Kl. W. Jg. 18: 667, (1936).
- 13) Kuhn, R., Winterstein, A., Lederer, E; Z. physiol. Chem. Bd. 197: 141, (1931).
- 14) Kögl, F. Erxleben, H. Z. Veersen, G. J; (An. Rev. Biochem. vol. 13: 1944) Z. physiol. Chem. Bd. 277: 251, (1943).
- 15) Kögl, F; (An. Rev. Biochem. vol. 13, 1944) Natur wiss. Bd. 30: 46, (1942).
- 16) Leach, J. E., Robbing, G. F.; J. A. M. A. vol. 135: No1, (1947).
- 17) Lehmann-Facijs, H; z. f. Imm. Forsch. Bd. 46: 137(1926) (Bd. 48: 396(1926) Bd. 51: 196(1927) Bd. 59: 185(1928) Jg. 9: 21(1930) Jg. 11: 1222(1932).
- 18) Martin, A. J. P., Syngé, R. L. M; J. Biochem. vol. 35: 1358, (1941).
- 19) Ozaki; J. Biochem. vol. 24: 73, (1936).
- 20) Petermann, M. L., Hogness, K. R; II Cancer 1: 104, (1948).
- 21) Roberts, E., Tishkoff, G. H; (cancer research vol. 9, 1949). Science vol. 109: 14, (1949).
- 22) Roberts, E., Frankel; Cancer research vol. 9: 645, (1949).
- 23) Rimington, C; J. Biochem vol. 34: 931, (1940).
- 24) Shetlar, M. R., Foster, J. V., Kelly, K. H., Shetlar, C. L., Boryan, R. S., Everett, M. R; Cancer research vol. 9: 515, (1949).
- 25) Seibert, F. B., Seibert, M. V. A., Atno, A. J., Campbell, H. J. (医学のあゆみ 8巻 4号) J. clin. Invest. vol. 26: 90, (1947).
- 26) Savignac, R. J. Gent, J. C. Sizer, I. W; (医学のあゆみ 8巻 4号) Reseach conference on cancer 241~254, (1945).
- 27) Tiselius, A; J. Biochem. vol. 31: 1464, (1937).
- 28) Tswett, M; (薬学 3巻 2号, 1949) Ber. D. bot. ges. Bd. 24: 316, (1906).
- 29) Winzler, R. J., Devor, A. W., Mehl, J. W., Smyth, I. M; J. Clin Invest. vol. 27: No5, (1948).
- 30) Winzler, R. J., Smyth, I. M; J. Clin. Invest. vol. 27: No5, (1948).
- 31) Williams, Kirby; Science vol. 108: 506, (1948).
- 32) Winzler, R. J. Burk. B; (医学のあゆみ 8巻 4号) J. nat. cancer. Institute vol. 4: 417, (1944).
- 33) 藤田; 検圧法とその応用, (岩波) (昭24).
- 34) 日野; (赤堀, 田宮編) 酵素化学の進歩, 第1集 (昭24).
- 35) 引地, 吉住; 日本病理学会誌, 24巻, 509, (昭9).
- 36) 七条; 実験医報, 26年 304号, 312号(昭15), 28年, 331号 (昭17).
- 37) 今村, 伊藤, 常持, 鹿島; 癌, 31巻, 3号, (昭12).
- 38) 吉川, 齊藤; 日本医事新報, No1277, (昭24).
- 39) 森, 鈴江; 実験腫瘍学, (昭10).
- 40) 宮尾; 内分泌及び実験治療, 3巻: 31, (昭9).
- 41) 松原; 日本医事新報, No1202, (昭21), 総合医学, 4巻, 18号, (昭22).
- 42) 中原, 福岡; 癌, 40巻, 1号, (昭24), 41巻, 1号, (昭25).
- 43) 中川, 高杉; 日本病理学会誌, 24巻, 508 (昭9), 25巻, 706 (昭10).
- 44) 佐竹; 化学の領域, 3巻, 7号, (昭24), 4巻 8号 (昭25).
- 46) 砂田, 小見山; 外科, 10巻, 9号, (昭23).
- 47) 津田; 医学, 3巻, 5号, (昭22).
- 48) 藤岡; 薬学, 3巻, 2号, (昭24).
- 49) 医学のあゆみ, 5巻, 5号 (昭23) 8巻, 4号, (昭24).