

氏 名 中 沢 一 郎

授 与 学 位 医 学 博 士

学位授与年月日 昭和36年3月24日

学位授与の根拠法規 学位規則才5条才1項

研究科，専攻の名称 東北大学大学院医学研究科  
内科学系

学位論文題目 血中マリグノリピン証明法の検討について

指 導 教 官 東北大学教授 山 形 徹 一

論文審査委員 東北大学教授 山 形 徹 一

東北大学教授 菊 地 吾 郎

東北大学教授 中 村 隆

# 論文内容要旨

## 血中マリグノリピン証明法の検討

1958年神前らによつて発表された血中マリグノリピン証明法を、臨床的並びに基礎的に検討した結果を報告する。

### I 臨床的検討

神前らは1958年4月仙台の才55回日本内科学会総会に於いて、本法を発表し、これによれば、癌患者25例中陽性25例、陽性率100%、非癌例26例中陰性26、陽性率0%と報告し、本法は癌患者に特異的であると述べ、且つ4例の初期癌を含むので、癌の早期診断にも役立つと述べた。私は本法を東北大学医学部附属病院に入院中の患者について検討し、白血病5例を含む悪性例94例中陽性90例、陽性率95.7%、非悪性例79例中陽性31例、陽性率39.2%の結果を得た。癌例はいずれも、レントゲン診断、細胞診、手術所見、剖検等によつて確められたものである。神前らは其後も、症例を追加し、癌に特異的な反応であると述べている。又追試者はいずれも癌に特異的ではないとの結果を得ている。この相違については、神前はその操作の熟練の差であると述べている。

### II 化学的検討

以上の臨床的検討より見る如く本法は癌に特異的ではなかつた。然しながらRf 0.38に結ぶ物質は癌例に於ても、非癌例に於ても、同一物質なのであろうか。又Rf 0.38物質が所謂神前のマリグノリピンであるかどうかを決定する為、Rf 0.38にマリグノリピンの構成成分が存在するかということ、及びその他のcomponentの有無を追及し、且つRf 0.38物質の代謝上の位置について追及した。材料はddマウスに接種せるエールリツヒ腹水癌で、マウスは東北大学医学部実験動物飼育所から入手せるdd系マウスの18g前後の雄を使用した。化学的検討では、(A)ペーパークロマトグラム上でRf 0.38に、構成成分の検出を行う方法と(B)ペーパークロマトグラムのRf 0.38部分を熱メタノールで抽出し、塩酸加水分解を行なつたものについて、検出を行なう方法とを併用した。

#### (A)ペーパークロマトグラム上の検出

a. 燐の検出：Böhmらの方法を、神前らの方法によつて得たペーパークロマトグラムに適用し、Rf 0.51及びRf 0.26に燐反応陽性を認めたが、Rf 0.38では陰性であつた。然しこの方法の鋭敏度を考慮してI isotopeを使用した。

i) マクロオーラジオグラフィー：エールリツヒ腹水癌接種後8~9日目のマウス腹腔内に $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$ の60~70  $\mu\text{c}$ を生理食塩水に溶解し、中和後投与する。一定時間後腹水1ccをとり、これを前記神前らの方法に従つて処理して得られたペーパークロマトグラムをニンヒドリンで発色し、これをパラフィン紙をはさんで、レントゲン写真フィルムと密着せしめ、レントゲン写真撮影用のカセットに入れ3週間感光後現像して得られたのが、才1図、才2図に示す如きものである。投与後一時間にして已にRf 0.51及びRf 0.38のニンヒドリンの陽性部に一致して、 $^{32}\text{P}$ のincorporateされるのを認める(第1図)。更に3.5時間後には一層著明となる(才2図)。こ

のオートラジオグラフから分るように  $^{32}\text{P}$  によるスポットは、4 個あり、1 個は原点でその他では、Rf 0.25 附近と Rf 0.51 及び Rf 0.38 のニンヒドリン発色部である。すなわち Rf 0.25 附近と Rf 0.51 には、前述せるように燐が証明されたが、更に Rf 0.38 にも燐が存在することが明らかとなつた。オ 3 図は担癌動物の肝である。

ii) Rf 0.38 画分への  $^{32}\text{P}$  の incorporation : 以上のように Rf 0.38 及び 0.51 に燐の存在することを確かめたので、Rf 0.38 及び Rf 0.51 のマリグノリピン及び所謂スペルミン画分への  $^{32}\text{P}$  の incorporation の状態を経時的に追及した。実験に際しては、マウスの個体差による影響を考慮し次の諸点に留意した。使用マウスは前述のように dd マウスの体重 18 g 前後の雄で飼料はオリエンタル酵母会社製の固形試料 Mc 5 を 1 日 8 g ずつ与えた。又実験に使用する際には、同一移植源から、同一量 (0.2 cc 腹水) を、同時に移植した動物群について行なつた。又実験に使用する時期も、エールリツヒ腹水癌移植後のマウス腹腔内の腫瘍細胞密度が比較的一定する移植後 8 ~ 11 日の期間を選んだ。すなわちこの期間には腫瘍細胞密度は、1cc 中に  $(10 \pm 2) \times 10^7$  のオーダーであつた。11 日目を過ぎると腹水量は増加するが、腫瘍細胞密度は減少する。勿論上記の期間内でも、腹水量が多く、細胞密度が非常に低いものもあるので、かかるものは使用をさけた方がよい。かくの如くすれば、腹水 1cc の値で、腫瘍細胞での代謝にかん元でできるのではないかと考えられるが、念の為細胞数も測定して比較した。実験方法は  $\text{Na}_2 \text{H}^{32}\text{PO}_4$  100  $\mu\text{c}$  を生理食塩水に溶解し、中和後、エールリツヒ腹水癌移植マウス腹腔内 (移植後 8 日目のものに) 注入し、経時的に腹水 2cc を採取し、伸前らの方法に従つて処理して得たクロロホルム抽出物を東洋濾紙 No. 50, 20  $\times$  10 cm のものに、一端より 3.5 cm の所に線を引き、両側 2 cm ずつをあげ、中央の 6 cm の所にスポットし、本法の溶媒メチラレー水-ピリジン混液にて 18  $^\circ\text{C}$  で 14 cm 展開して乾燥し、ニンヒドリンで発色後、Rf 0.38 及び Rf 0.51 のニンヒドリン発色帯を切りとり、細切し、各々その放射能を科研製 GM 管で 1150 ボルトで測定した結果をオ 4 図に示した。Rf 0.38 のマリグノリピン部は  $^{32}\text{P}$  投与後 48 時間にて最高となり、腫瘍細胞 1 個当りに直しても矢張り 48 時間目に最高値を示した。Rf 0.51 の画分では、マリグノリピン画分の 3 ~ 5 倍の放射能を示すが、矢張り 48 時間前後にて最高値をとる。担癌動物の肝では 4 個のニンヒドリン発色帯を認める。これを下から  $\text{S}_1 \text{ S}_2 \text{ S}_3 \text{ S}_4$  とするとその Rf 値はそれぞれ 0.3, 0.38, 0.51, 0.59, となる。オ 4 図では右側の目盛で示してある。その他の実験系列での結果から肝では、Rf 0.38 画分の場合、投与後 8 ~ 12 時間に最高値を示すものと考えられる。これは肝の総放射能でも、又肝 1 g 当りに直しても同様である。次に担癌動物の腎では、Rf 0.38 画分の場合、総放射能では 12 時間、1 g 当りに直すと 24 時間に最高値を示した。

iii) invitro での Rf 0.38 及び Rf 0.51 画分への  $^{32}\text{P}$  の incorporation : invitro の実験では個体差の影響があるのでこの因子を除くと共に、癌細胞での代謝を見る意味で、上述のことを、invitro で行なつた。エールリツヒ腹水癌移植マウスの一匹より腹水 5 cc をとり、これを滅菌した 5 本の平型組織培養管中に入れ、又他のマウスから 5 cc の腹水をとる、先の 5 本の培養管に 1 cc ずつ分注する。さらに 5% に牛血清を含む YLE 培地 1 cc を加え、回転培養器で、37  $^\circ\text{C}$ 、10 分間 18 回転で培養を行なう。一定時間後とり出して、エタノール 28 cc を加えて抽出し本法の操作に従つて処理し、前述のニンヒドリン発色帯を切りとつて細切し、日本無線の GM 管にて 1200 ボルトで測定せる結果をオ 5 図に示す。すなわち Rf 0.38 画分は投与後 3 時間にて最高値となる。又、組織培養を行なつてから、経時的にとりだして、エタノールを

加えて不活性化してから  $^{32}\text{P}$ を加えた対照群の場合には、その放射能が、 $(19 \pm 5)$  c.p.m.のオーダーで才5図に見るものより、極めて低く、変化の中も小さいが、ニンヒドリン発色の色調の度合は、本実験の場合は、殆んど変りがなかつた。すなわち Rf 0.38 のニンヒドリン陽性物質へ  $^{32}\text{P}$ が incorporate する為には、癌細胞の中で代謝されなければならない、単なる塩様結合のものではない。才6図は、その他の含磷化合物画分への  $^{32}\text{P}$  incorporation を測定して示したものであるが、分画の方法は才8図に示す Huggins らの方法及び Friedkin らの方法に従つたが、酸溶性画分については右側の目盛りによる。才6図は、各含磷化合物への  $^{32}\text{P}$  incorporation の状態を比較する目的で示した。すなわちまず酸溶性画分から  $^{32}\text{P}$ が失われ、次にマリグノリピン画分、さらに Huggins の Phosphatido-peptide 画分の順で失われ、核酸は6時間まで著明に

$^{32}\text{P}$ による放射能を増加するが、その後9時間までは増加が著明ではない。磷脂質画分は9時間迄著明に増加する。すなわちマリグノリピン画分は、磷の代謝廻転が速い、Phosphatido-peptide と類似せる状態を  $^{32}\text{P}$  incorporation について示した。すなわち磷の代謝が速いものではないかと考えさせる。なおこの実験で二匹のマウスの腹腔内からとつた腹水を混じているのであるが、これは予め、二匹の腹水を混じて移植しても、マウスの腹腔内に腹水のたまる速度には変化がないことから、二匹の腹水を混じて腫瘍細胞の activity には変化ないものと考えられる。

b・その他 choline については Chargaff らの方法を試みたが Rf 0.38 に陽性のスポットを得ることが出来なかつた。

#### (B) Rf 0.38 物質を濾紙から抽出したものについての検討

前述のような神前の手技により 18 cc の腹水より出発して得たクロロホルム抽出物を、東洋濾紙 No. 50,  $20 \times 10$  cm のもの四枚に分けて、本法の溶媒で 14 cm 展開し、その一部をきりとつてニンヒドリンで発色し、Rf 0.38 及び Rf 0.51 に陽性のスポットを見て、これを指標として濾紙を切りとり、各画分を熱メタノール 100 cc にして抽出し、溶媒をとばして、6規定塩酸 2 cc で  $100^\circ\text{C}$  6時間封管内で水解する。次に塩酸をとばして、醋酸ブタノール水 (4:1:5) で展開し、検出に使用した。その成績によれば Rf 0.38 画分のは 2つのニンヒドリン陽性物質と 1つの choline 反応陽性物質を認めた。Rf 0.51 画分には磷と 1つのニンヒドリン陽性物質を認めた。

すなわち Rf 0.38 画分から、磷, choline 反応陽性物質, 2つのニンヒドリン陽性物質を認めた。

なお不飽和脂肪酸については、今後検討する予定である。

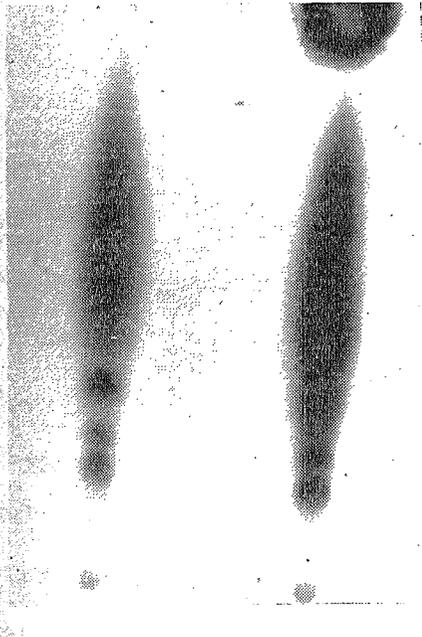
第 1 図



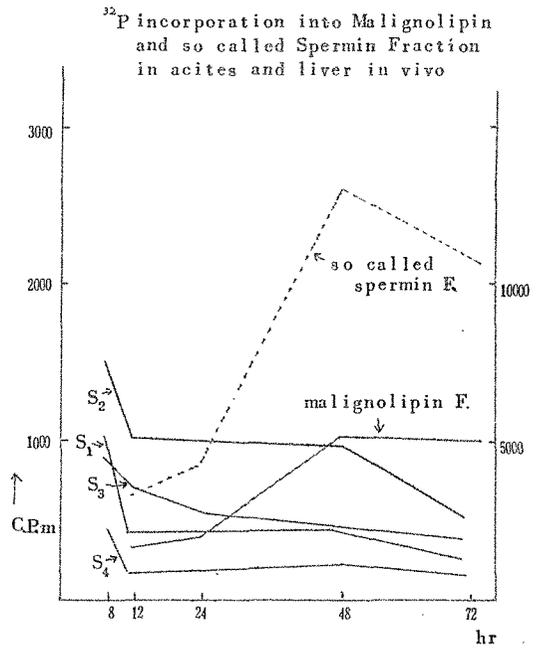
第 2 図



第 3 図

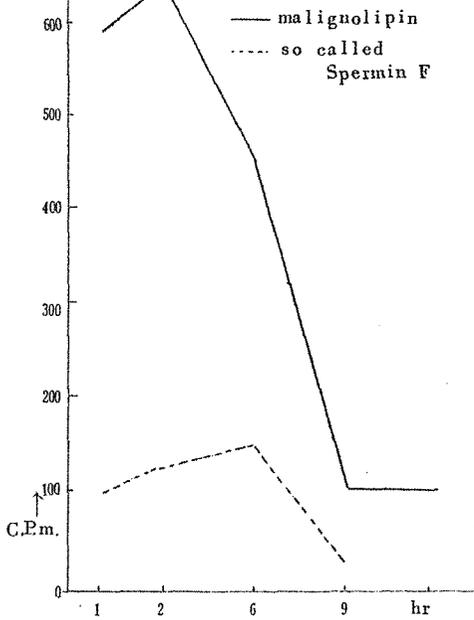


第 4 図



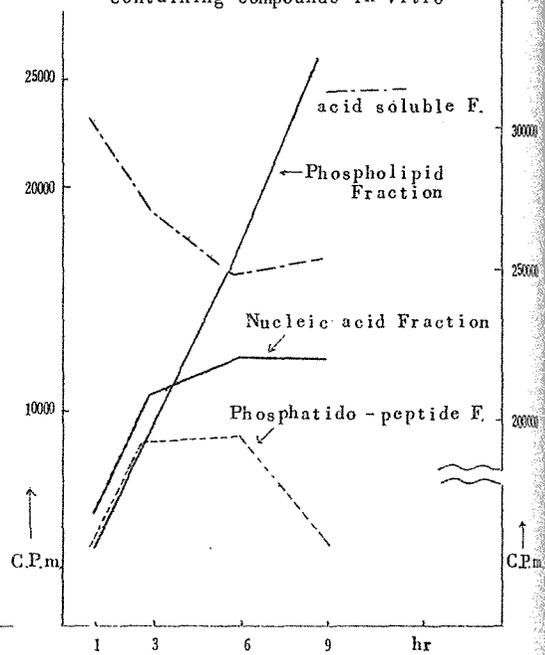
第 5 図

$^{32}\text{P}$  incorporation into malignolipin and Spermin Fraction in vitro



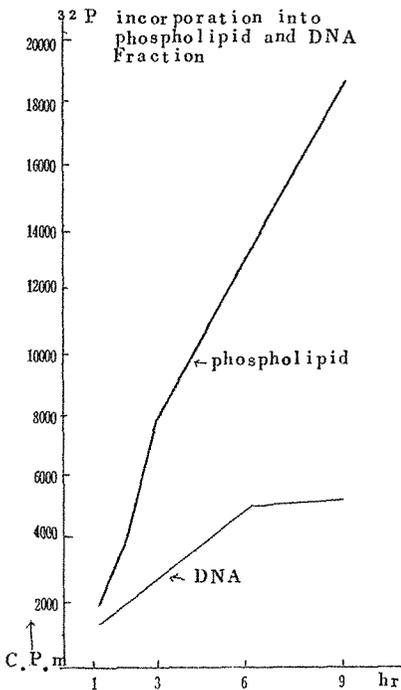
第 6 図

$^{32}\text{P}$  incorporation into some phosphorus containing compounds in vitro



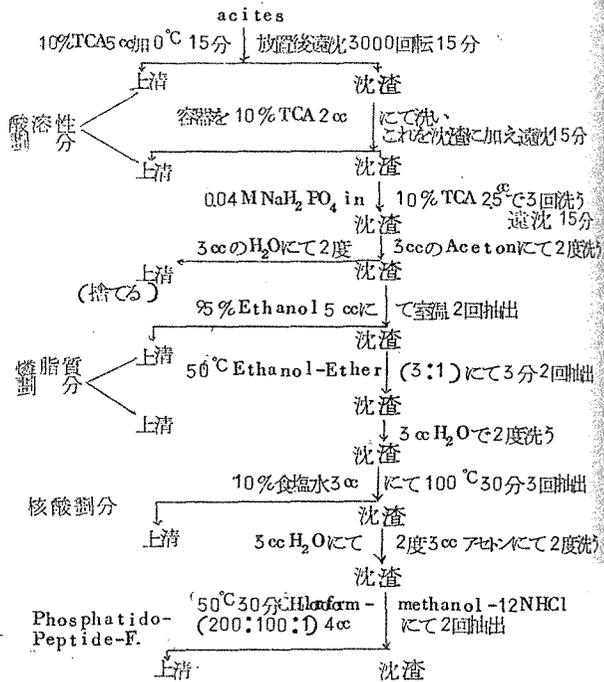
第 7 図

$^{32}\text{P}$  incorporation into phospholipid and DNA Fraction



第 8 図

Isolation of Phosphatido - Peptide Fraction



## 審 査 結 果 要 旨

1958年神前等はポルトポルフィリン染色法を用いて癌組織に特異的に存する小体を認め、この物質のポルフィリン親和性を利用して抽出を行ない、スベルミン、コリン、燐酸、不飽和脂肪酸よりなる燐脂質で、悪性腫瘍組織、担癌動物組織に特異的に存すると述べた。又この物質を血液中より証明する方法を提示し、本法によれば癌患者に100%陽性、非癌患者に100%陰性であつたと述べた。

著者は本法を悪性例94例、非悪性例79例、計173例に施行し、前者にては陽性率95.7%、後者にては陽性率39.2%で、癌患者に特異的であるとの結果を得ることはできなかった。

又山村等は本法にてRf 0.38 にスポットを結ぶニンヒドリン陽性物質は、アミノ酸又はアミノ酸誘導体であると述べている。私は $\text{Na}_2\text{H}^{32}\text{PO}_4$  60 $\mu\text{c}$ を、エールリツヒ腹水癌移植マウス腹腔内に注入し、一定時間後腹水を採取し、これを本法の操作に従つて処理して得たペーパークロマトグラムでマイクロオートラジオグラフィを行ないRf 0.38 及びRf 0.51のニンヒドリン陽性部に一致して $^{32}\text{P}$ によるスポットを認めた。更に $^{32}\text{P}$  100 $\mu\text{c}$ をエールリツヒ腹水癌移植マウス腹腔内に注入し経時的に腹水を採取し、本法の操作に従つて処理して得たクロロホルム抽出物を線状にスポットし、本法の溶媒にて展開し、Rf 0.38 及びRf 0.51のニンヒドリン発色帯を切りとり、GM管にて測定すると、マリグノリビン割分の $^{32}\text{P}$ の放射能は48時間にて最高値をとり、又担癌マウスの肝を処理した場合には8~12時間で最高値をとり、腎にては24時間にて最高値をとる。

更にエールリツヒ腹水癌マウスよりの腹水2 ccとYLA培地1 cc及び $^{32}\text{P}$  20 $\mu\text{c}$ を混じり回転培養法にて、組織培養を行ない、これを経時的に採取して前述の如く処理し、マリグノリビン割分の放射能を測定すると開始3時間後にて最高値(630 C.P.M.)となる。然るにYLA及び腹水のみにて同様の条件にて培養を行ない、経時的に採取し、各々エタノールを加えてから $^{32}\text{P}$  20 $\mu\text{c}$ を混じり本法の処理を施した場合のマリグノリビン割分の放射能は $19 \pm 5$  C.P.M.であつた。以上の事よりRf 0.38 にスポットを結ぶニンヒドリン陽性物質は含燐化合物なることが結論される。又この *in vitro* の条件で、Thanhauser-Schmidt 法及び Schneider法によつて処理せる各含燐化合物の放射能の時間的推移を見るに、酸溶性割分が1~2時間に最高値を有し、以後減少する。マリグノリビン割分、Phosphatido-Peptide 割分が次に続き核酸割分は6時間迄直線的に増加し以後9時間まで増加は著明ではない。燐脂質割分は9時間後にいたるも尚直線的に増加する。