

多和肉瘤組織中

酸性粘質多醣類之研究(二)

■ 蕭松瑞 ■

緒 言

間質結合組織填充於實質細胞間，不但有支持組織的功能，且在維持細胞環境的恆常性上亦有相當的貢獻。例如它與細胞外液容量及離子的調節有關外，所有實質細胞之必須物質由開始至代謝的整個途徑都有關連。因此說實質細胞是生存於結合組織中亦不為過。

由實質細胞與結合組織的關係，亦可推知腫瘤細胞與結合組織間的關係。結合組織是由纖維成分，基質及細胞成分所構成，而發揮上述生理機能的却是基質成分中與蛋白質結合的酸性粘質多醣類①。

出於這個觀點，筆者及研究室同仁以恩師發現之多和肉瘤去探討其所含之酸性粘質多醣類，以明瞭惡性腫瘤中無限增殖的機構，至今已有若干的報告，諸如榑等(1970)②及筆者(1970)③所發表的，是由多和肉瘤移植後第四日、第七日、第十一日及腫瘤死亡前之結締型腫瘤中，抽出酸性粘質多醣類以觀察腫瘤增殖中 hyaluronic acid 及 chondroitin sulfate 相伴着增加的情況。又如鶴身(1970)④以投與 *Staphylococcus aureus* 209 株死菌疫苗而產生抗體之 rat，移植多和肉瘤，使其一度增殖而自然痊癒。然後逐日的觀察此結締型腫瘤中酸性粘質多醣類的變化。特別是本多(1971)⑥試由 silicone 埋入皮下誘發之腫瘤組織中，探索酸性粘質多醣類，以追求與腫瘤惡性化的關連性，其結果發現屬於良性腫瘤之纖維肉腫及纖維腺腫與 hyaluronic acid 及 chondroitin sulfate B 有關連性的變化。而惡性腫瘤之纖維肉瘤則與 hyaluronic acid 及 chondroitin sulfate B 有關之外，亦與 chondroitin sulfate A 有關係。因此臆測 chondroitin sulfate A 是與腫瘤之增殖或惡性化有關的物質。

由上述的結果，顯然的酸性粘質多醣類與腫瘤之增殖及惡化有關連，而詳細的情形尚未知道。

一般認為腫瘤組織是腫瘤的細胞與間質結合組織混合之組織像，惡性腫瘤無限增殖及對其他組織之浸潤或轉移等特性是取決於腫瘤細胞本身之性質。因此筆者採用腫瘤細胞及相當於間質的腹水中，抽取並分離酸性粘質多醣類以檢討其存在的意義。亦特別將多和肉瘤細胞移植入已預先注入 chondroitin sulfate A 及 hyaluronic acid 之 rat 之腹腔內，以測定其增殖度，並觀察粘質多醣類對腫瘤細胞增殖的影響，而得到本報告。

(A)腹水型多和肉瘤中之酸性粘質多醣類

實驗材料及方法

1. 實驗材料

使用玻璃毛細管將大約 10⁷ 個純培養期之多和肉瘤細胞無菌移植到 Donryu rats (♀, 5 週齡) 並以日製 CE-2 固型飼料及自來水飼養之。腫瘤細胞移植後第 5 日屠殺並開腹採取腫瘤性腹水。加入少許檸檬酸後將細胞成分與腹水離心分離, 測定分離腹水之容量後進行粘質多醣類之抽取。另一方面以 0.45% 之 NaCl 液反覆將細胞成分洗淨, 去除血球成分, 再以 0.9% NaCl 液繼續洗之, 然後加入五倍量之丙酮並研磨 (homogenize) 再以氯仿—甲醇 (2:1) 脫脂, 乾燥後測定其產量, 再將其浮懸 (suspension) 於蒸餾水中以進行酸性粘質多醣類之抽出。

2. 酸性粘質多醣類之抽出法

將乾燥粉末之浮懸液及腹水之 pH 值調至 7.8, 然後以蛋白酶 (科研化學, 東京) 在 37°C 下消化 48 小時, 消化後之濾過液加入 trichloroacetic acid 至 10% 的濃度, 離心去除沉澱物, 澄清液中加入醋酸鈣及醋酸使其濃度達 0.25N 及 25%, 再加入 1.25 倍量之冰冷乙醇, 然後放置 24 小時, 又離心收集沉澱物, 以 80% 的乙醇洗淨, 把沉澱物再溶於 5% 的醋酸鈉和 0.5N 的醋酸混合緩衝液, 再以 Sevag 法去除殘餘的蛋白質。也以 Llogol 試藥將混於其中之低分子醣類除去, 然後加入 1.5 倍量冰冷的乙醇, 離心收集沉澱物, 以 80% 乙醇洗淨後溶於蒸餾水, 在自來水中透析 48 小時, 再於蒸餾水中透析 24 小時, 在透析內液中加入 1% 之乙醇液, 得到白色沉澱物, 以乙醇和乙醚洗淨, 乾燥而得到酸性粘質多醣類。

3. 分畫方法

採用 SCHILLER et al. (1961) ⑧ 之方法, 將抽出之粘質多醣類溶於 0.04 M NaCl 液, 加入 cetylpyridinium chloride (以下以 CPC 稱之) 攪拌後在 37°C 之下放置 1 小時使其產生沉澱, 離心收集沉澱物。以含有 0.1% CPC 之 0.04 M NaCl 洗淨, 再分別以含有 0.1% CPC 之

0.4 M NaCl 及 2.1 M NaCl 由沉澱物中抽出酸性粘質多醣類, 各抽出液中加入 3 倍量之乙醇使酸性粘質多醣類沉澱出來, 將沉澱物溶於蒸餾水後於水中透析 48 小時, 加入乙醇沉澱出酸性粘質多醣類, 以乙醇、乙醚洗淨後乾燥之。

4. 分析方法

以 Carbazol 硫酸反應之 Bitter-Muir 法 ⑨ 行 uronic acid 的定量。hexosamine 之定量是將試料在 4 N HCl 中 100°C 加水分解 16 小時, 再以 Elson-Morgan 反應之 Belcher 法 ⑩ 行之。硫酸基是以鎔酸法定量 ⑪。

5. Cellulose acetate 膜電氣泳動法

以 SELECTA (Carl Schleicher und Schull, Germany) 為支持體, 在 0.2 M 醋酸鈣 1mA/cm² 下泳動 3 小時, 或在 0.1 M barium acetate 1mA/cm² 下泳動 2 小時 ⑫

染色法是以 0.5% toluidine blue 之 3% 醋酸液經 20 分鐘後以 1% 醋酸洗淨, 更在流水中浸漬 10 分鐘以脫色。

純的 chondroitin sulfate A, B 和 C 是採用東京生化學工業出品, 而 rat 腎臟中抽出之 neparitin sulfate 是佐佐木研究所長瀨博士贈送的。

6. 畢丸 hyaluronidase 消化試驗

磷酸、檸檬酸緩衝液 (pH 5) 0.5 ml 中溶入酸性粘質多醣類 2mg 及牛畢丸 hyaluronidase (350 N.F.U./mg Sigma chemical Co., U.S.A.) 2mg 在 37°C 下反應 15 小時。

對照用的是比 hyaluronic acid 更不易被畢丸 hyaluronidase 分解的 chondroitin sulfate A 在同一條件下反應之。

這些反應生成物在 0.2 M 醋酸鈣液中以 cellulose acetate 膜電氣泳動後, 由 spots 來檢討酸性粘質多醣類和畢丸 hyaluronidase 的作用。

實驗結果

腫瘤細胞及腹水中抽出之酸性粘質多醣類之定量質文於 Table I

Table I Acid mucopolysaccharides obtained from tumor cell and ascites of Tawa sarcoma-bearing rat

	No. of rats	Cell dry weight (g) or amount of ascites (ml)	Whole acid mucopolysaccharides (mg)
Cell	6	2.30 ± 0.22	9.23 ± 1.44
Ascites	6	46.1 ± 2.30	7.23 ± 0.23

Each value is the mean standard deviation of three experiments

此收取量是每次實驗 6 隻鼠，3 次實驗的平均值。實驗結果腫瘤細胞及腹水兩者皆有很好的再現性，此後之分析操作及 CPC 分畫是以 3 次實驗獲得的合起來使用。

酸性粘質多醣類之分析值於 Table 2 腫瘤細胞中 uronic acid 及 hexosamine 之含量都大約 19%，而腹水中 uronic acid 22%，hexosamine 23.2%

Table 2 Analytical data on whole acid mucopolysaccharides from tumor cells and ascites

	Uronic acid (%)	Hexosamine (%)	Sulfuro (%)
Cell	19.5	18.8	1.2
Ascites	22.2	23.2	1.1

比前者略高。硫酸基則腫瘤細胞 1.2%，腹水 1.1%，因此兩者大約都是硫酸化酸性粘質多醣類及非硫酸化酸性粘質多醣類混合存在。為了更進一步的檢討再行 cellulose acetate 膜電氣泳動及羧基 hyaluronidase 消化試驗。使用 0.2M Calcium acetate 緩衝液泳動結果 chondroitin sulfate A, B 和 C 之分離情形良好，hyaluronic acid 及 heparitin sulfate 之易動度很接近，故再以 0.1M barium acetate 緩衝液泳動，其結果示於 Fig 1 腫瘤細胞及腹水兩者之結果皆顯示出兩個 spots，此 spots 與同時展開之 hyaluronic acid 和 chondroitin sulfate A 的位置相一致。本實驗未採用 heparin 及 kerato-sulfate，因為 0.1M barium acetate 中泳動結果

heparin 之易動度比 heparitin sulfate 小，而在 0.2M Calcium acetate 中泳動結果易動度比 chondroitin sulfate 大 (6)、(14)，所以由是推知腫瘤細胞與腹水中之抽出物中並無 heparin 及 Kerato-Sulfate 的存在。

羧基 hyaluronidase 不僅能分解 hyaluronic acid，也能分解 β -型的 chondroitin sulfate A 和 C，但對 heparin 及 heparitin sulfate 等 α -型的則完全無作用。

羧基 hyaluronidase 消化結果生成物行電氣泳動的結果示於 Fig 2 除了對照用的以外，腫瘤細胞及腹水兩者原來與 chondroitin sulfate A 同樣的 spots 都消失了。由此可推知腫瘤細胞與腹水中所含的酸性粘

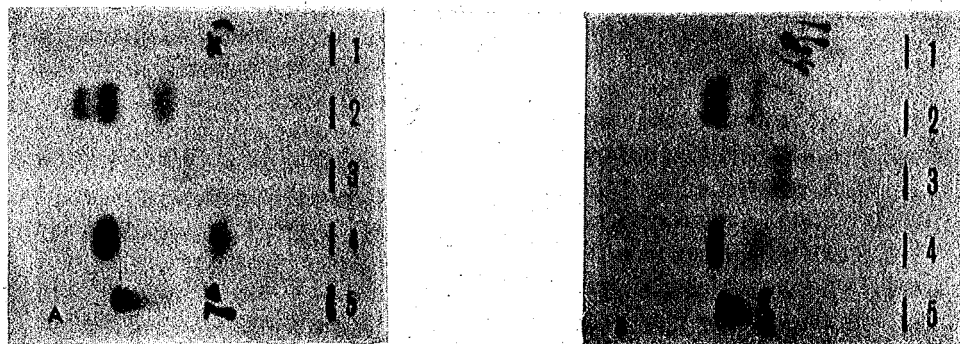


Fig. 1 Electrophoretogram of whole acid mucopolysaccharides from tumor cells and ascites

A — Buffer solution : 0.2M calcium acetate at 1 mA/cm for 3 hr.

Staining : 0.5% toluidine blue

B — Buffer solution : 0.1M barium acetate at 1 mA/cm for 2 hr.

Staining : 0.5% toluidine blue

1 — Hyaluronic acid

2 — Chondroitin sulfate C, A, B.

3 — Heparitin sulfate

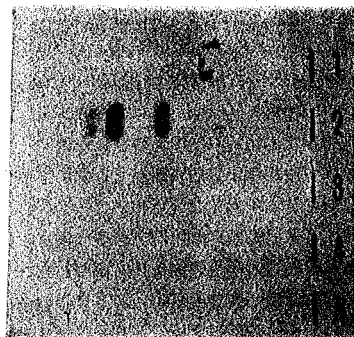
4 — Tumor cell

5 — Ascites

Fig. 2 Electrophoretogram of acid mucopolysaccharides digested with testicle hyaluronidase

Buffer solution : 0.2M calcium acetate at 1 mA/cm for 3 hr.

Staining : 0.5% toluidine blue



- 1 Hyaluronic acid
- 2 Chondroitin sulfate C, A, B.
- 3 Chondroitin sulfate A + hyaluronidase
- 4 Acid mucopolysaccharides from tumor cell + hyaluronidase
- 5 Acid mucopolysaccharides from ascites hyaluronidase

質多醣類是 chondroitin sulfate A 及 hyaluronic acid.

其次爲了檢討腫瘤細胞及腹中水 hyaluronic acid 及 chondroitin sulfate A 之比率，行

CPC之分畫，結果於 Table 3 腫瘤細胞方面在 0.4 M NaCl 分畫中爲 10.7 mg，在 2.1M NaCl 分畫中爲 7.2 mg，0.4M NaCl 分畫佔全部的 59.8%，另一方面，腹水部分在 0.4M NaCl 分畫中爲 9.6 mg，2.1

Table 3 Separation of acid mucopolysaccharides after precipitation with cetylpyridinium chloride

	Whole acid mucopolysaccharides (%)	Amount in fraction (mg)	
		0.4M NaCl	2.1M NaCl
Cell	20.0	10.7	7.2
Ascites	15.0	9.6	3.6

MNaCl 分畫中 3.6mg，前者佔全部之 72.7%。

上述分畫之分析結果示於 Table 4，在 0.4 M NaCl 分畫中，不論腫瘤細胞或腹水皆無硫酸基，而在 2.1M NaCl 分畫中則顯示出 3.1% 及 4%，此說明了 hyalurmic acid 及 chondroitin sulfate A 是完全被分開。

由上述結果中，腫瘤細胞每 1g 乾燥重量中約有 4 mg 之酸性粘質多醣類，其中 60% 爲 hyaluronic acid，其餘爲 chondroitin sulfate A，腹水中每 1ml 中含 1.2mg 酸性粘質多醣類，其組成大體與腫瘤細胞相似，唯 hyaluronic acid 有略高的傾向。

Table 4 Analytical data on acid mucopolysaccharides in each fraction

	Fraction	Uronic acid	Hexosamine	Sulfur
		(%)	(%)	(%)
Cell	0.4M NaCl	20.3	20.0	0
	2.1M NaCl	19.7	19.1	3.1
Ascites	0.4M NaCl	24.5	24.1	0
	2.1M NaCl	23.8	24.6	4.0

(B)Hyaluronic acid 及 chondroitin Sulfate A 對腹水型多和肉瘤增殖之影響

實驗材料及方法

1. 實驗動物及移植腫瘤

實驗動物之飼育條件及腫瘤移植與實驗 A 同。腫瘤腹水以滅菌生理食鹽水稀釋至每 0.1 ml 含 10^7 個腫瘤細胞之浮懸液以供應用。

2. 酸性粘質多醣類之給與法及腫瘤細胞移植法。

Hyaluronic acid (Fluka, Switzerland) Chondroitin sulfate AC special grade 生化學工業, 東京) 以下列濃度溶於生理食鹽水, 將 1ml 注入 rat 腹腔內, 再於同一位置注入 0.1 ml (10^7) 腫瘤細胞浮懸液。

對照用的是以 1 ml 生理食鹽水在上述腫瘤移植前注入 rats 的腹腔內。

Hyaluronic acid 以 2% 濃度, chondroitin sulfate A 則以 1%, 2% 和 5% 分別使用, 以觀察不同濃度所發生的影響。

3. 腫瘤細胞數之測定

參照神等⁽¹⁵⁾之報告, 逐日檢討腫瘤之增殖度, 作下列各項觀察:

(1) 腫瘤細胞數之測定

腫瘤細胞移植後第 3 日以玻璃毛細管由腹腔中抽出 1 滴腫瘤性腹水, 為了觀察腫瘤細胞出現頻度, 製作塗抹 Giemsa 染色標本。

隨後殺死 rats, 盡可能吸取全部腫瘤性腹水, 再開腹以含有少量之檸檬酸鈉之生理食鹽水反覆洗淨, 洗液與前吸取腹水混合為稀釋腹水備用。其次取一部分加入 crystal violet 液 (crystal violet 0.5g, 蒸餾水 1000 ml) 以 Thoma 之 hemocytometer 測定稀釋腹水中 1 mm^3 之腫瘤細胞數, 進而推算出每一宿主個體之總腫瘤細胞數。

細胞密度之測定是將每隻稀釋腫瘤腹水混勻狀態下測定三次再取其平均值。

腫瘤增殖度是以實驗群總腫瘤細胞數之平均值與對照群比較, 檢定後確定之。

(2) 分裂期細胞出現頻度之測定

將製作之塗抹 Giemsa 染色標本測定分裂期細胞數, 即每一隻 rat 腫瘤細胞 1000 個為對像算出分裂期

腫瘤細胞之出現頻度, 取其平均值與對照群比較, 作為增殖度判斷之補助。

(3) 大網部及生殖器腫瘤性浸潤觀察

將採取腹水後之 rats 加以剖檢, 以肉眼深加觀察移植後較早期腫瘤細胞浸潤大網部及生殖器的情形, 以補助增殖度之判斷。

4. Chondroitin sulfate A 投注宿主之生存日數

1% 及 5% chondroitin sulfate A 溶液 1 ml 注入腹腔後, 再於同部位注入 0.1 ml 之腫瘤細胞液, 與同一飼養條件下之對照群比較各生存日數。(以死後剖檢為腫瘤死者)

實驗結果

1. Hyaluronic acid 對腹水型多和肉瘤之影響

2% hyaluronic acid 對腹水型多和肉瘤增殖的影響, 由 12 隻 rats 觀察結果示於 Table 5, 投注 2% hyaluronic acid 之腫瘤細胞數為 2.07×10^8 個, 而對照群為 2.13×10^8 個, 分裂期細胞頻度, 2% hyaluronic acid 投與群為 4.13%, 而對照群為 4.18%, 雖皆稍低, 但是兩者皆無顯出具有意義的差別。

腫瘤浸潤方面示於 Table 6 對照群 12 例中有 1 例是大網部浸潤及另一可疑例, 而 2% hyaluronic acid 投與群之 12 例中有 1 例是可疑的。在生殖器方面兩群皆無浸潤現象, 由上之結果, 2% 的 hyaluronic acid 對腹水型腫瘤之增殖似無影響。

2. Chondroitin sulfate A 對腹水型多和肉瘤增殖之影響

以 15 隻 rats 觀察, 其結果示於 Table 7, 8, 由 Table 7 1% chondroitin sulfate A 投與群之腫瘤細胞數為 2.22×10^8 個, 與對照群之 2.14×10^8 個比較雖有增加, 但無意義之差。而 2% 之 chondroitin sulfate A 投與群為 2.74×10^8 個, 比 1% chondroitin sulfate A 投與群已有顯著的差別, 與對照群比之更顯出有意義的差。此外 5% chondroitin sulfate A 投與群之細胞數為 3.16×10^8 個, 約為對照群之 1.5 倍, 乃具相當有意義之差。

其次由分裂期細胞出現頻度觀之, 投與 chondro

Table 5 Effect of hyaluronic acid on the growth of ascites Tawa sarcoma

	No. of rats	No. of tumor cell (mean S.D.)	Mitotic rate (%) (mean S.D.)
Control	12	$2.13 \pm 0.32 \times 10^8$	4.18 ± 0.29
2% Hyaluronic acid		$2.07 \pm 0.26 \times 10^8$	4.13 ± 0.26

Two percent hyaluronic acid solution was injected intraperitoneally, immediately followed by 0.1 ml of ascitic fluid containing 10 tumor cells.

The rats were sacrificed on the 3rd day and the number of tumor cells in ascitic fluid was calculated.

The percentage of mitotic cells was calculated on the basis of 1000 tumor cells in each rat.

Table 6 Gross observation of tumor cell infiltration into various tissues of rats injected with hyaluronic acid

	No. of rats examined	No. of rats with tumor infiltration	
		Omentum	Genital organ
Control	12	1 (1)	0
2% Hyaluronic acid	12	0 (1)	0

The number in parentheses shows the number of rats with doubtful infiltration of tumor.

Table 7 Effect of different concentration of chonditin sulfate A on the growth of ascites Tawa sarcoma

	No. of rats	No. of tumor cells (mean S.D.)	Mitotic rate (%) (mean S.D.)
Control	15	$2.14 \pm 0.24 \times 10^8$	4.16 ± 0.33
1% Chondroitin sulfate A	15	$2.22 \pm 0.30 \times 10^8$	4.29 ± 0.27
2% Chondroitin sulfate A	15	$2.74 \pm 0.30 \times 10^8$ *	4.43 ± 0.59
5% Chondroitin sulfate A	15	$3.16 \pm 0.29 \times 10^8$ *	4.57 ± 0.68

Chondroitin sulfate A solution was injected intraperitoneally, immediately followed by 0.1 ml of ascitic fluid containing 10^7 tumor cells.

The rats were sacrificed on the 3rd day and the number of tumor cells in ascitic fluid was calculated.

The percentage of mitotic cells was calculated on the basis of 1000 tumor cells in each rat.

* Statistical significant at 5% level between experimental and control groups

Table 8 Gross observation of tumor cell infiltration into various tissues of rats injected with chondroitin sulfate A

	No. of rats examined	No. of rats with tumor infiltration	
		Cmentum	Genital organ
Control	15	1 (2)	0
1% Chondroitin sulfate A	15	1 (2)	0
2% Chondroitin sulfate A	15	3 (2)	0 (1)
5% Chondroitin sulfate A	15	7 (5)	3 (3)

The number in parentheses shows the number of rats with doubtful infiltration of tumor.

itin sulfate A 濃度的增加，其結果亦隨著增加，由 Table 7 對照群 4.16 % 時 chondroitin sulfate A 1 % 投與群為 4.29 %，2 % 投與群為 4.43 %，而 5 % 投與群則達 4.57 %。

Table 8，就腫瘤性浸潤觀察的結果，腫瘤細胞數與分裂期細胞出現頻度之動態有相同的傾向。對照群與 chondroitin sulfate A 1 % 投與群的 15 例中，有 1 例是大網部浸潤的，2 例是可疑的，2 % 投與群的 15 例中有 3 例是大網部浸潤的，2 例是可疑的，亦有 1 例是生殖器浸潤之可疑例。特別是 5 % 投與群之 15 例中，7 例是大網部浸潤，5 例是可疑的。生殖器方面亦有 3 例浸潤，3 例可疑的。顯然的，大網部和生殖器的浸

潤是隨着 chondroitin sulfate A 濃度而增加。

由上述的結果，2 % 以上濃度的 chondroitin sulfate A 對腹水腫瘤之增殖有促進的作用，其效果隨着濃度而增加。

3. Chondroitin sulfate A 投與和宿主生存日數之影響。

Chondroitin sulfate A，1 %，5 % 投與群，每群 8 隻，觀察結果示於 Fig 3 對照群生存之日數最長為 10 日，最短 7 日，1 % 投與群最長 9 日，最短 7 日，而 5 % 投與群最長 8 日，最短 6 日，至腫瘤死前平均生存日數，對照群為 1 % 投與群是 7.6 日，而 5 % 投與群則為 6.8 日，由是觀之生存日數亦有縮短的趨勢。

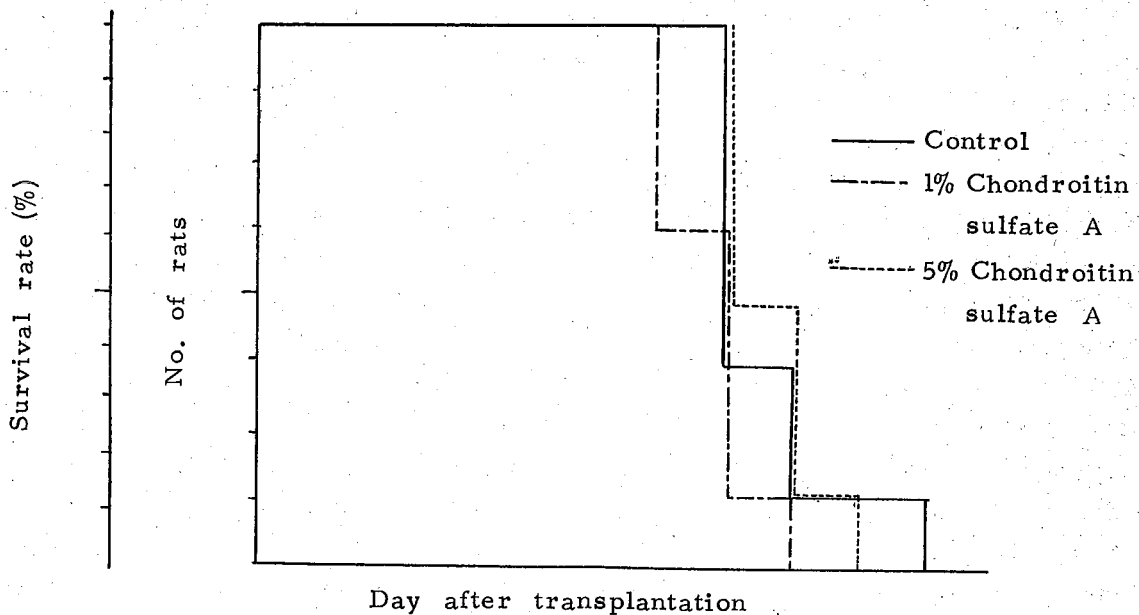


Fig. 3 Effect of different concentration of chondroitin sulfate A on the survival time of tumor-bearing rat

討 論

近年來酸性粘質多醣類精製法的進步，使酸性粘質多醣類之結構^①及在生物界之分布^⑦亦趨明朗，研究方面對此一領域之關心與期待也日增。然而有關腫瘤組織中酸性粘質多醣類的問題大多以組織學的方式探索，在生化學方面所知尚有限。

一般認為酸性粘質多醣類是由肥滿細胞和纖維芽細胞或纖維芽細胞所分化的細胞所產生^{②④、⑤}。因此腫瘤組織中所含酸性粘質多醣類亦被認為是由間質結合組織之細胞成分而來。

最近長瀨等(1971)^⑥由腹水肝癌(CAH 190 A, AH 60 C, AH 66 F)細胞，中村等(1971)^⑦由腹水肝癌(AH 130)細胞及Ehrlich 癌細胞中找出酸性粘質多醣類。此外馬場等(1971)^⑧亦由in vitro之觀察而提出了人類子宮扁平上皮癌而來之HeLa-S₃細胞合成hyaluronic acid的報告。這些報告認為上皮性細胞及癌化細胞能合成酸性粘質多醣類，其與腫瘤細胞之分化及增殖亦有密切的關連性。特別是，他們一致認為酸性粘質多醣類除了來自間質結締之細胞成分外，也來自實質的腫瘤細胞。

因此筆者以腹水型多和肉瘤中分離酸性粘質多醣類，以檢討其存在意義。結果乾重腫瘤細胞每1g中含酸性粘質多醣類4mg，每1ml腹水中含0.2mg，其組織為hyaluronic acid及chondroitin sulfate A，無論腫瘤細胞或腹水中前者的量皆高於後者。

腹水中的酸性粘質多醣類與腫瘤細胞中的組成一致，所有腹中之酸性粘質多醣類很可能是由腫瘤細胞內合成而排出細胞外的。中村等^⑦在腹水肝癌(AH 130及Ehrlich 腹水癌之腫瘤細胞及腹水中抽出的酸性粘質多醣類亦皆相同，因此腹水中的是來自細胞內合成的可能性非常高。假如腹水中的酸性粘質多醣類是來自腫瘤細胞，那麼有關腫瘤細胞內酸性粘質多醣類與腹水中者其高次結構是否相同，倒是值得推敲的。THORP et al曾就鷄胚軟骨細胞中之chondroitin sulfate加以分析，其結果認為細胞內與排於細胞外之酸性粘質多醣並無差異。

本實驗之分析加以檢討的話，無論0.4MNaCl分畫或2.1MNaCl分畫，其由腫瘤而來的和腹水來的比較，其Uronic acid和hexosamine之值皆高。即使cellulose acetate膜電氣泳動的結果，兩不同來源的酸性粘質多醣類在易動度之間有着微妙的差別。此差別可能是在腫瘤細胞中的酸性粘質多醣類含有腫瘤細胞中之核酸或中性多醣等高分子物質或hybrid構造存

在的緣故。因此腫瘤細胞之酸性粘質多醣類與腹水的有差別是無疑的。

酸性粘質多醣類在生物體內之生理作用，至今仍不明朗，然而以目前了解的分子構造或物理化學性質為基礎來推論時，其生理機能是親水性的，因具有陰電荷而與K⁺或Na⁺等陽離子具有特別的親和力，就本實驗而言，腹水中亦有多量的酸性粘質多醣類，此可能是為了要造成腫瘤增殖有利的環境而產自細胞再排於外者。

根據鶴身^④以各種酸性粘質多醣類在rats背部檢討腫瘤移植效果，chondroitin sulfate A和C對腫瘤增殖有促進的作用，而Chondroitin sulfate B和hyaluronic acid則無促進效果，而且增進增殖效果隨着濃度而增加。堤之(1971)亦以chondroitin sulfate A之分解酵素或構成酸性粘質多醣類之acetylgalactosamine及glucuronic acid以同樣的方法進行實驗，來檢討chondroitin sulfate A增進腫瘤增殖的機轉。結果加入分解酵素的，chondroitin sulfate A對增殖促進作用之效果消失。此說明了chondroitin sulfate A對腫瘤細胞增殖之促進作用是緣自其高分子物質本身之物理化學性質。

然而，結締腫瘤重量及腫瘤徑之增加量由於腫瘤細胞的增加或間質結合組織的增加，亦或與兩者之增加皆有關，現今仍不清楚。根據WOOD^⑩in vitro實驗的報告chondroitin sulfate A, C及kerato sulfate對collagen之形成有促進的作用，而chondroitin sulfate B及hyaluronic acid則沒有。此與鶴身^④之實驗結果甚為相同，因此腫瘤重量之增加，似乎可認為與間質結合組織之增加有關。

本實驗觀察的結果，腹水型多和肉瘤移植後第三日之腫瘤細胞數，分裂期細胞出現頻度，以及大網部和生殖器之浸潤與結締型的情況相同，hyaluronic acid似乎促進的作用，而2%以上的chondroitin sulfate A則對腫瘤細胞之增殖有促進的作用，隨着濃度的增加，促進作用亦增強。

Chondroitin sulfate A影響宿主生存日數的實驗檢討中5%投與群的生存日數有縮短的傾向，因此chondroitin sulfate A使結締腫瘤之腫瘤重增加，雖然相伴着間質組織的增加，但是最終的主體仍然是腫瘤細胞增加而引起腫瘤死亡的結果，因此可認為chondroitin sulfate A對腫瘤細胞有增殖促進作用，B則無。又根據神等^⑫之報告，結締腫瘤中含hyaluronic acid, chondroitin sulfate A

和 B，而腫瘤細胞中才只有 hyaluronic acid 和 chondroitin sulfate A，腫瘤細胞自己產生的粘質多醣類，特別是硫酸化的粘質多醣類是腫瘤細胞增殖時，來增進達成最適宜環境之因素，同時與細胞本身之分裂，增殖有密切的關係。

假如把本實驗投與 Chondroitin sulfate A 之濃度增加使大網部及生殖器之浸潤增加的事實加以綜合討論時，chondroitin sulfate A 即然對細胞分裂

及浸潤有管制的作用，預料其與細胞表面特異性之變化有相當密切的關連，這將是今後擬加研究的部分。

由上述的結果得知多和肉瘤有合成 hyaluronic acid 和 chondroitin sulfate 的能力，更將其排於細胞外而成腹水之成分，其中 chondroitin sulfate A 更負起達成腫瘤增殖最適宜環境的使命，並與腫瘤細胞本身之分裂，增殖具有密切的關係。

結 論

由腹水型多和肉瘤之腫瘤細胞及腹水中分離酸性粘質多醣類，並檢討其存在意義，更觀察酸性粘質多醣類對多和肉瘤增殖的影響，檢討得下列結果。

(1) 每一克乾重之腫瘤細胞含 4mg 之酸性粘質多醣類，其組成爲 hyaluronic acid 及 chondroitin sulfate A。

(2) 每 1 ml 之腹水中含 0.2mg 酸性粘質多醣類，其組成與腫瘤細胞相同。

(3) 腹水與腫瘤細胞中所含酸性粘質多醣類之比較結果，腹水中 hyaluronic acid 的比率較高。

(4) 將兩種多醣類投與 rats，發覺 chondroitin sulfate 有增進腹水腫瘤增殖的作用而 hyaluronic acid 則無。

(5) 投與的 chondroitin sulfate A 之濃度提高，移植腫瘤之增殖度亦隨着提高。

(6) 5% chondroitin sulfate A 投與移植的癌 rats，其生存日數比對照群短。

綜合上述結果，chondroitin sulfate A 是提供腫瘤增殖最適宜的環境因子，能促進腫瘤細胞本身之增殖。

終稿之際，謹向賜予指導及校閱的多和敏一教授表示由衷的謝意，本實驗進行中承柳鐵也助教授之協助，在此一併申謝。

參考文獻

- 1) 鈴木 旺；ムコ多糖の化學，機能，代謝：代謝，6,74,1969。
- 2) 柳 鐵也，鶴身紀雄，河村宏はか；腫瘤組織の酸性ムコ多糖類 第1報 結節型多和肉瘤の酸性ムコ多糖類：齒基礎誌，12,14,1970。
- 3) 蕭 松 瑞；腫瘤組織の酸性ムコ多糖類に關する生化學的研究：齒科醫學，33,1,1970。
- 4) 鶴身紀雄；腫瘤組織の增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。
- 5) SAKAKI, T., TSURUMI, N., MADEA, J. et al.; Studies on the Influences of Acid Mucopolysarrides on Growth of TAWA Sarcoma : J. Japan dent., 4, 113, 1970
- 6) 本多忠敬；腫瘤組織の酸性ムコ多糖類，第2報 Siliconeinduced Tumor の酸性ムコ多糖類；齒科醫學，34,413,1971。
- 7) 堤三柳太郎；ユンドロイチン硫酸Aの多和肉腫增殖促進作用について：齒科醫學・投稿中
- 8) SCHILLER, S., SLOVER, G. A. and DORFMAN, A.; A Method for the Separation of Acid Mucopolysaccharides Its Application to the Isolation of Heparin from the Skin of Rats : J. Biol. Chem., 236, 983, 1961.
- 9) BITTER, T. and MUIR, H. M.; A Modified Uronic Acid Carbazole Reaction: Anal. Biochem. 4, 330, 1962.
- 10) BELCHER, R., NUTTEN, A. J. and SAMBROOK, C. M.; The Determination of Glucosamine : Analyst, 79, 201, 1954.

- 11) EGAMI, F. and TAKAHASHI, N.; A Simple Method of Sulfate Microdetermination: Bull. Chem. Soc. Jap., 30, 442, 1957.
- 12) SENO, N., ANNO, K., KONDO, K. et al.; Improved Method for Electrophoretic Separation and Rapid Quantitation of Isomeric Chondroitin Sulfates on Cellulose Acetate Strips: Anal. Biochem. 37, 197, 1970.
- 13) 鈴木旺; 實驗講座, 分解酵素を用いるムコ多糖類構造の研究法: 蛋白, 核酸, 酵素, 14, 55, 1969.
- 14) 木村篤, 鶴見隆一, 大兼俊太郎; セルローズアヒテート膜電気泳動法による尿中酸性ムコ多糖の分別定量法および mucopolysaccharidoses への應用: 生化学, 42, 816, 1970.
- 15) 榊鐵也, 鶴身紀雄, 前田純典ほか; 多和肉腫に関する研究(8) 腫瘍細胞の増殖像上細胞生化学的特性について: 齒基礎誌, 12, 173, 1970.
- 16) IRAKO, Y.; Growth of Yoshida Sarcoma: Gann, 55, 129, 1964.
- 17) 鈴木旺; 結合組織の素物質としへのムコ多糖-タンパク質複合体-分子進化, 分子分化, 生合成-: 生體の化学, 19, 62, 1968.
- 18) GRISHMAN, E.; Histochemical Analysis of Mucopolysaccharides Occurring in Mucus-Producing Tumor Mixed Tumors of the Parotid Gland, Colloid Carcinomas of the Breast, and Myxomas: Cancer, 5, 700, 1952.
- 19) 木村勇; 胃癌發育時に於ける間質多糖類の態度: 信州醫誌, 4, 160, 1955.
- 20) OZZELLO, L. and Speer, F. D.; The Mucopolysaccharides in the Normal and Diseased Breast Their Distribution and Significance: Amer. J. Pathol., 34, 993, 1958.
- 21) ZIMMERMAN, L. E.; Applications of Histochemical Methods for the Demonstration of Acid Mucopolysaccharides to Ophthalmic Pathology: Trans. Amer. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol., 62, 679, 1958.
- 22) WINSLOW, D. J. and ENZINGER, F. M.; Hyaluronidase-Sensitive Acid Mucopolysaccharides in Liposarcoma: Amer. J. Pathol., 37, 497, 1960.
- 23) SYLVEN, B.; Ester Sulphuric Acids of High Molecular Weight and Mast Cells in Mesenchymal Tumor: Acta Radiol. (Suppl.), 59, 1, 1945.
- 24) GROSSFELD, H., MEYER, K. and GODMAN, G.; Differentiation of Fibroblasts in Tissue Culture, as Determined by Muco polysaccharide Production: Proc. Soc. exp. Biol. Med., 88, 31, 1955.
- 25) CRANE, W. A. J.; Sites of Mucopolysaccharide Synthesis in the Lesions of Experimental Hypertension in Rats: J. Pathol. Bacteriol., 83, 183, 1962.
- 26) 長瀬すみ, 齊藤重野, 有泉桂子ほか; 擔癌動物のムコ多糖(第四報) AH60C及びAH66Fについて: 日癌會記事, 30, 109, 1971.
- 27) 中村允人, 末松俊彦, 小泉岳夫; 腫瘍組織の酸性ムコ多糖とその意義: 生化学, 43, 452, 1971.
- 28) 馬場恒易, 青木健, 小島清秀, がん細胞膜特異性の研究 III, in vitro-S₂細胞の Hyaluronic acid 合成と膜構成糖類添加培地による合成促進について: 日癌會記事, 30, 229, 1971.
- 29) THORP, F. K. and DORFMAN, A.; The Occurrence of Intracellular Chondroitin Sulfate: J. Cell Biol., 18, 13, 1963.
- 30) WOOD, F. C.; The Formation of Fibrils from Collagen Solutions 3. Effect of Chondroitin Sulphate and Some Other Naturally Occurring Polyanions on the Rate of Formation: Biochem. J., 75, 605, 1960.
- 31) 箱守仙一郎; ガン細胞の抗元物質と表面特異性の化学: 生化学, 43, 113, 1971.

Acid Mucopolysaccharides in Tawa Sarcoma (II)

S. J. Shiow

Influences of acid mucopolysaccharides on the growth of ascites Tawa sarcoma were pursued in two series.

In the first series of experiments, acid mucopolysaccharides were isolated from Tawa sarcoma cells and tumorigenic ascites 5 days after tumor transplantation into Donryu rats, and separated with the method of Schiller et al. Which is based on the differential solubility of cetylpyridinium chloride-acid mucopolysaccharide complexes in the presence of salt. To identify acid mucopolysaccharides the electrophoretic techniques of Seno et al. on cellulose acetate strips and the analyses of uronic acid hexosamine and sulfur were employed.

The acid mucopolysaccharides contained in tumorigenic ascites proved to be hyaluronic acid and chondroitin sulfate A similar to those in tumor cells. The ratio of hyaluronic acid to chondroitin sulfate A was higher in tumorigenic ascites than in tumor cells.

In the second series, one ml of acid mucopolysaccharide solution was intraperitoneally administered to Donryu rats, immediately followed by Tawa sarcoma cells transplanted into the same site. On the third day after tumor transplantation the average number of free tumor cells in an experimental group was compared with that in a control group injected with isotonic saline.

The number of free tumor cells in chondroitin sulfate A-treated rats was increased, but not in hyaluronic acid-treated rats. In other experiments on the effects of concentration of chondroitin sulfate A, it was found that the higher the concentration, the more increase the free tumor cells.

It may be considered that chondroitin sulfate A contained in ascites Tawa sarcoma facilitates the proliferation of tumor cells.