

各種血漿의 組織成長抑制物質에 關한 研究

Tissuc Growth Inhibiting Substance in Various Plasma

서울大學校 醫科大學 外科學教室

<指導 秦炳鎬 教授>

金 宗 國

緒 論

腫瘍細胞의 成長을 抑制하는 物質에 對하여는 自來로 많은 研究가 있다.

Baker & carrel(1925)¹⁾는 血清中에서, 石原(1930)²⁾는 胎盤과 臍帶에서, Murphy & Helmer(1931)³⁾은 鷄腫瘍에서 成長抑制因子를 抽出하였으며 Maisin, Pourbaix(1935)⁴⁾는 腦, 胸腺, 乾燥胃粘膜, 淋巴腺等 各種臟器組織에서 癌成長을 抑制하는 物質을 抽出하였다. Walton(1941)⁵⁾은 脾組織抽出物質中에 肝細胞成長을 抑制하는 強力한 因子가 存在한다고 하였으며 Nutini(1961)⁶⁾는 組織培養으로 mouse 腫瘍에서 水溶性이며 無蛋白의 抑制因子를 얻었고, Rothman(1961)⁷⁾은 C₃HBA 腫瘍의 壞疽液의 無細胞濾液中 可透折部에서 mouse 乳癌의 成長을 抑制하는 水溶性物質을 抽出하였다. De cavahro(1961)⁸⁾는 正常白鼠肝의 RNA는 Novikoff 肝癌細胞를 破壞하며 腫瘍의 RNA는 腫瘍形成을 助長한다고 하였다. Herbut(1960)⁹⁾은 海溟의 肝, 脾, 腎, 肺, 心臟과 筋肉等의 組織均質液을 腫瘍 mouse 에 注射한 바 肝均質液은 腫瘍의 成長을 抑制하는데 다른 臟器의 그것은 이러한 作用이 없다 하였으며 이것을 根據로 羊, 家兔, 牛, 馬 및 人肝의 均質液을 13,000/r.p.m 으로 遠沈하고 濾過한 物質을 腫瘍移植後 4日째 mouse 에 注射하여 9日째에 檢査한 바 海溟肝은 腫瘍成長을 顯著히 抑制하고 다른 肝들은 多少 이를 抑制하나 人肝은 거의 抑制作用이 없는것 같이 보이었다고 한다. 또 最近 György(1963)¹⁰⁾는 正常犢牛, 胸腺, 大動脈, 筋肉과 臍에서 腫瘍成長抑制物質을 發見하였다고 報告하였다.

그런데 本敎室 秦教授와 金昌松(1958)¹⁴⁾은 이미 正常白鼠肝에서 mouse 에 移植한 Ehrlich 腹水癌과 N-F 肉腫의 成長을 顯著히 抑制하는 因子를 抽出하는데 成功하였고 그後 金(1961)¹⁵⁾은 同一한 方法에 依하여 白鼠

各種臟器에서 癌成長抑制物質을 抽出할 수 있었음을 報告하였다.

以上은 各種臟器에서 抽出한 組織因子의 腫瘍成長抑制에 對한 研究이거나 이러한 物質의 正常 또는 增殖性組織의 成長에 對하여는 Teir(1953)¹⁶⁾와 Blombquist(1957)¹⁷⁾는 肝均質液을 가지고하는 實驗에서 刺戟과 抑制는 그 投與量의 多少에 依存한다고 하였으며 敎室 石世一¹⁸⁾는 白鼠各種臟器組織因子가 部分的肝切除를 施行한 白鼠의 殘遺肝增生組織에 對하여 癌組織成長에 對한 抑制作用보다는 顯著하지 않으나 그 肝細胞核分裂을 顯著히 抑壓하였다고 報告하였으며 또한 李華永¹⁹⁾은 白鼠肝 및 皮膚組織因子가 正常肝細胞核分裂 및 表皮細胞增殖에 對하여도 癌組織이나 增生組織에 對한 作用에 比할바는 아니나 亦是 抑制作用을 나타내나 繼續注射에 依하여 後期에는 그 抑制作用이 減弱하여진다고 報告하고 있다. 또 한便 李東植²⁰⁾은 白鼠肝 및 脾組織에서 抽出한 組織因子가 mouse 의 正常肝 및 脾組織 DNA 生合成에 미치는 影響을 研究하는 實驗에서 組織因子의 少量投與時는 正常組織 DNA 生合成을 抑制하고 大量投與는 이를 增強하였다 한다. 그리고 孫奎元²¹⁾은 正常 mouse 에 幼若家兔骨髓組織因子의 少量投與時는 그 骨髓 및 肝細胞核分裂을 抑制하고 投與量이 繼續되면 도리어 促進한다고 하였다.

이와같이 各種臟器를 一定方法에 依하여 抽出하여 腫瘍 및 正常組織의 成長 乃至는 細胞分裂의 抑制作用을 觀察한 研究는 多數이거나 血漿 乃至 血清을 一定한 方法에 依하여 抽出한 物質에 對하여 施行한 研究는 比較的 드물다. 이미 前述한 바와 같이 Malmgren & Mills(1961)²²⁾, Stich & Florian(1948)²³⁾ 및 李濟九와 李元承(1962)²⁴⁾ 등은 白鼠血清中에 肝細胞核分裂을 抑制하는 物質 乃至 因子가 있다고 報告한 바 있고 Herbut^{10, 11, 12)} 등은 各種 正常動物血清의 腫瘍에 對한 作用을 研究한 結果 海溟血清은 一定하게 顯著한 抑制作用을 일으키나 羊과 人血清은 그 抑制作用이 一定치 아니하며 白鼠, 鷄,

*本 論文의 要旨는 1963年 第15次 大韓醫學協會 綜合學術大會 外科分科 學會에서 發表하였음

犬, 牛, 犢牛, 馬, 家兔 등에 있어서는 이러한 作用이 없다고 하였고, 또 다른 人間血漿에 對한 實驗에서도 이 作用이 一定치 아니하나 그 抽出方法에 따라서 모든 動物에서 이것을 包含하고 있을 것이라고 하였다. 이에 著者は 本敎室에서 各種臟器組織에 適用한 同一한 抽出方法에 依據하여 人間을 爲始하여 各種 動物의 血漿을 抽出하여 그것이 各種動物癌과 正常組織成長에 어떻게 作用하는 가를 觀察코지 하였다.

I. 各種血漿因子가 Mouse 移植癌成長에 미치는 影響

實驗材料와 實驗方法

實驗動物癌과 移植方法

腫瘍의 種類와 移植方法은 敎室 黃勵²⁵⁾의 施行한 바와 同一한 方法에 依據하여 體重 19 乃至 20 gm의 mouse에 Ehrlich 腹水癌과 N-F 肉腫을 背部 皮下에 移植하여 實驗에 提供하였다.

組織因子抽出方法

抽出方法은 秦과 金¹⁵⁾의 白鼠臟器에서 抽出한 方法에 依據하였다.

即 胎兒血漿은 分娩直後의 臍帶血液에서 人血漿은 成人血液에서, 牛血漿은 屠殺直後의 犢牛心臟血液에서, 海溼血漿은 心臟을 穿刺하여 얻은 血液에서, 各各 採取한 血漿을 一旦 冷藏庫에 靜置한 後 그 上層液을 International Centrifuge Model PR1을 使用하여 每分 15 000 回轉에 依하여 沈澱시킨 後 그 上清液에 95% ethyl alcohol을 加하여 沈澱를 얻었다. 이 沈澱를 濾紙電氣泳動法^{26, 27, 28, 29, 30, 31, 32)}에 依하여 分離한 後 그 緩動部物質³³⁾을 trypsin³⁴⁾으로 處理하고 이것을 다시 95% ethyl alcohol로 沈澱시킨 後 그 沈澱를 cellophane tube에 넣어서 蒸溜水에 透折시켰다. 끝으로 透折管内物質에 acetone을 加하여 沈澱시킨 後 그 沈澱를 10% 水溶液으로 만들어 使用에 供하였다. 胎兒血漿은 高速遠沈分離하여 그 上清液에 95% ethyl alcohol을 加入하여

沈澱시켜 얻은 沈澱를 10% 水溶液으로 만들어 實驗하였다.

實驗方法

上記抽出物(濕)의 10% 水溶液 0.1cc, 0.2cc, 0.3cc와 0.4cc를 mouse에 腫瘍을 移植함과 同時에 各各 每日 一定한 時間에 腹腔內에 注射하였다. 移植後 3日마다 腫瘍의 크기를 移動計測器로 測定하여 그 最大長徑과 最大 橫徑의 平均値를 對照動物의 그것과 比較觀察하였으며 또 第 18日 또는 最終日에 腫瘍을 摘出秤量하여 對照動物의 그것과 比較觀察하였다.

實驗成績

1. 血漿因子 10% 溶液 0.1cc 注射가 Ehrlich 腹水癌(瘤型)成長에 미치는 影響(第 1表)

胎兒血漿에 있어서는 9日까지 腫瘍은 對照動物에서 만큼 成長하나 注射 第 12日부터는 腫瘍成長의 完全停止를 보았다.

注射 第 18日에 摘出した 腫瘍은 對照의 그것이 平均 4.50gm 인데 比하여 注射動物에서는 2.70gm으로 抑制됨을 볼 수 있었다. 人血漿은 全抽出過程을 걸친 物質로서 注射 第 6日까지는 對照만큼 成長하였으나 第 9日以後 成長이 完全히 停止되고 注射 第 18日에 腫瘍을 摘出秤量하여 본 結果 對照 4.50gm에 比하여 1.75gm까지 縮少함을 알 수 있었다.

犢牛血漿도 全抽出過程을 거친 物質로서 注射 第 6日부터 成長이 停止되고 第 18日에 摘出した 腫瘍은 1.40gm으로 顯著히 縮少됨을 볼 수 있었다.

海溼血漿도 同樣으로 全抽出過程을 거친 物質로서 가장 顯著한 抑制作用을 보이었으며 注射 第 6日부터 成長이 完全히 停止되었으며, 摘出腫瘍은 0.54gm에 不過하였다.

一般的으로 사람의 血漿보다 動物血漿에서 더 顯著한 腫瘍抑制作用을 나타내었으며, 胎兒血漿에서 가장 적은 抑制度를 보이었고 이로써 各血漿에는 抑癌性因子가 包含되어 있음을 알 수 있었다. 또 各動物은 注射 第 15日

Table 1. Effect of Tissue Factor from various Plasma on Ehrlich Ascites Cancer Transplanted Mouse(solid form). (Dose 0.1cc of 10% solution)

Day Plasma	3		6		9		12		15		18		Weight gm
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	
Embryonic	0/15	0.4	0/15	0.8	2/15	1.1	5/15	1.3	5/15	1.3	5/15	1.3	2.70
Human	0/15	0.4	0/15	0.9	3/15	0.9	5/15	0.9	7/15	0.9	10/15	0.9	1.75
Calf	0/10	0.4	0/10	0.7	5/10	0.7	8/10	0.7	8/10	0.7	8/10	0.7	1.40
Guineapig	0/ 5	0.4	0/ 5	0.6	2/ 5	0.6	3/ 5	0.6	4/ 5	0.6	5/ 5	0.6	0.54
Control	0/15	0.4	0/15	0.8	0/15	1.2	0/15	1.5	0/15	1.8	0/15	2.1	4.50

D=No. of Death/No. of Experimental Animal

S=Average of 2 Diameters of Tumor in cm

Table 2. Effect of Tissue Factor from various Plasma on N.F. Sarcoma Transplanted Mouse.
(Dose: 0.1cc of 10% Solution)

Day Plasma	3		6		9		12		15		18		Weight gm
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	
Embryonic	0/15	0.6	0/15	0.8	2/15	1.2	5/15	1.4	6/15	1.4	6/15	1.4	2.90
Human	0/15	0.6	0/15	0.9	4/15	0.9	6/15	0.9	6/15	0.9	6/15	0.9	1.90
Calf	0/10	0.6	0/10	0.8	3/10	0.8	5/10	0.8	7/10	0.8	7/10	0.8	1.60
Guineapig	0/ 5	0.6	1/ 5	0.6	2/ 5	0.6	4/ 5	0.6	4/ 5	0.6	4/ 5	0.6	0.75
Control	0/15	0.6	0/15	0.9	0/15	1.2	0/15	1.5	0/15	1.7	0/15	2.0	3.85

D=No. of Death/No. of Experimental Animal
S=Average of 2 Diameters of Tumor in cm

Table 3. Effect of Tissue Factor from various Plasma on Ehrlich Ascites Cancer Transplanted Mouse(Solid form).
(Dose: 0.2cc of 10% Solution)

Day Plasma	3		6		9		12		15		18		Weight gm
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	
Embryonic	0/15	0.4	0/15	0.8	1/15	1.2	3/15	1.2	5/15	1.2	6/15	1.2	2.60
Human	0/15	0.4	0/15	0.8	2/15	0.8	8/15	0.8	9/15	0.8	9/15	0.8	1.80
Calf	0/10	0.4	0/10	0.7	3/10	0.7	8/10	0.7	8/10	0.7	10/10	0.7	1.20
Guineapig	0/ 5	0.4	0/ 5	0.5	4/ 5	0.5	4/ 5	0.5	4/ 5	0.5	5/ 5	0.5	0.50
Control	0/15	0.4	0/15	0.8	0/15	1.2	0/15	1.5	0/15	1.8	0/15	2.0	4.30

D=No. of Death/No. of Experimental Animal
S=Average of 2 Diameters of Tumor in cm

Table 4. Effect of Tissue Factor from various Plasma on N.F. Sarcoma Transplanted Mouse.
(Dose: 0.2cc of 10% Solution)

Day Plasma	3		6		9		12		15		18		Weight gm
	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	D	S	
Embryonic	0/15	0.6	0/15	0.8	2/15	1.3	5/15	1.3	5/15	1.3	5/15	1.3	2.80
Human	0/15	0.6	0/15	0.9	4/15	0.9	8/15	0.9	9/15	0.9	10/15	0.9	1.70
Calf	0/10	0.6	0/10	0.7	5/10	0.7	9/10	0.7	9/10	0.7	10/10	0.7	1.30
Guineapig	0/ 5	0.6	1/ 5	0.6	3/ 5	0.6	4/ 5	0.6	4/ 5	0.6	4/ 5	0.6	0.65
Control	0/15	0.6	0/15	0.9	0/15	1.2	0/15	1.5	0/15	1.7	0/15	1.9	4.00

D=No. of Death/No. of Experimental Animal
S=Average of 2 Diameters of Tumor in cm

을 前後하여 約半數可量이 死亡하였다.

2. 血漿因子 10% 溶液 0.1cc 注射가 N.-F 肉腫成長에 미치는 影響(第 2 表)

各種血漿에서 抽出한 物質 10% 水溶液 0.1cc 씩을 N.-F 肉腫動物에 注射한 結果는 Ehrlich 腹水癌에서의 그것과 大差가 없었으며 一般的으로 注射初에 成長이 抑制된 後 繼續하여 그대로 또는 胎兒血漿에서 만든 若干 增大한체로 停止됨을 볼 수 있었다. 各血漿의 抑癌程度와 動物의 死亡率은 前項과 大略 비슷하였다.

3. 血漿因子 10% 溶液 0.2cc 注射가 Ehrlich 腹水癌 成長에 미치는 影響(第 3 表)

이때에 腫瘍은 0.1cc 씩 注射時보다 그 成長抑制力이 若干 增強되어 있고 對照動物腫瘍에 比하여 注射 第 18 日에 大體로 2分 1 乃至 4分 1 程度로 腫瘍의 縮少를 보이며 또 注射 18 日에 腫瘍을 摘出秤重하여 본 結果 對照 4.30gm에 比하여 胎兒血漿因子를 注射한 動物腫瘍은 2.60gm, 人血漿 1.80gm, 牛血漿 1.20gm 海溟血漿 0.50gm 까지 0.1cc 注射時보다도 좀더 縮少함을 알 수 있

Table 5. Effect of Tissue Factor from various Plasma on Ehrlich Ascites Cancer Transplanted mouse(Solid form) (Dose: 0.3, 0.4cc of 10% Solution)

Plasma	Day	3		6		9		12		15		18		Weight gm
		cc	D S	D S	D S	D S	D S	D S	D S	D S				
Embryonic	0.3	0/15	0.4	0/15	0.8	3/15	1.1	6/15	1.1	7/15	1.1	10/15	1.1	2.70
	0.4	0/15	0.4	0/15	0.8	2/15	1.1	8/15	1.1	10/15	1.1	11/15	1.1	2.20
Human	0.3	0/15	0.4	0/15	0.7	5/15	0.7	8/15	0.7	10/15	0.7	10/15	0.7	1.60
	0.4	0/15	0.4	0/15	0.7	7/15	0.7	10/15	0.7	14/15	0.7	15/15	0.7	1.40
Calf	0.3	0/10	0.4	0/10	0.5	8/10	0.5	9/10	0.5	10/10	0.5			1.00
	0.4	0/10	0.4	3/10	0.5	9/10	0.5	10/10	0.5					0.90
Guineapig	0.3	0/5	0.4	0/5	0.5	5/5	0.4							0.45
	0.4	0/5	0.4	0/5	0.4	5/5	0.4							0.40
Control		0/15	0.4	0/15	0.8	0/15	1.2	0/15	1.5	0/15	1.7	0/15	1.9	4.20

D=No of Death/No. Experimental Animal
S=Average of 2 Diameters of tumor in cm

Table 6. Effect of Tissue Factor from various Plasma on N. F. Sarcoma Transplanted Mouse. (Dose; 0.3, 0.4cc of 10% Solution)

Plasma	Day	3		6		9		12		15		18		Weight gm
		cc	D S	D S	D S	D S	D S	D S	D S	D S				
Embryonic	0.3	0/15	0.6	0/15	0.9	5/15	1.2	8/15	1.2	10/15	1.2	10/15	1.2	2.80
	0.4	0/15	0.6	0/15	0.8	7/15	1.2	10/15	1.2	12/15	1.2	13/15	1.2	2.45
Human	0.3	0/15	0.6	0/15	0.8	3/15	0.8	10/15	0.8	12/15	0.8	13/15	0.8	1.75
	0.4	0/15	0.6	0/15	0.8	6/15	0.8	12/15	0.8	14/15	0.8	14/15	0.8	1.60
Calf	0.3	0/10	0.6	5/10	0.6	9/10	0.6	10/10	0.6					1.10
	0.4	0/10	0.6	4/10	0.6	10/10	0.6							0.80
Guineapig	0.3	0/5	0.6	3/5	0.5	4/5	0.5	5/5	0.5					0.65
	0.4	0/5	0.6	2/5	0.5	5/5	0.5							0.60
Control		0/15	0.6	0/15	0.8	0/15	1.1	0/15	1.4	0/15	1.8	0/15	2.0	3.95

D=No of Death/No. Experimental Animal
S=Average of 2 Diameters of Tumor in cm

었다. 注射動物의 死亡은 大體로 0.1cc 注射時와 比 等하였다.

4. 血漿因子 10% 水溶液 0.2cc 注射가 N-F 肉腫成長에 미치는 影響(第 4 表)

一般的으로 0.1cc 注射時보다도 抑制作用은 若干增加되어 있으며 動物血漿에 있어서는 注射 第 18 日까지에 그 大部分이 死亡함을 볼 수 있었다. 이때 注射를 施行 後 아닌 對照腫瘍動物은 第 18 日까지 1 例의 死亡例도 볼 수 없었다.

5. 血漿因子 10% 溶液 0.3cc, 0.4cc 注射가 Ehrlich 腹水癌成長에 미치는 影響(第 5 表)

注射腫瘍動物은 注射 第 6 日까지는 腫瘤가 若干成長은 하나 그 以後 腫瘤는 停止 乃至 縮少됨을 볼 수 있

었다. 一般的으로 0.3cc, 0.4cc 注射時는 0.2cc 注射時보다도 成長抑制作用이 一律的으로 多少增強되어 있고 動物血漿因子를 注射한 腫瘍動物은 注射 第 12 日 前後에 全例 死亡하였다.

6. 血漿因子 10% 溶液 0.3cc, 0.4cc 注射가 N-F 肉腫成長에 미치는 影響

一般的으로 前項과 同一하나 Ehrlich 腹水癌에서 보다 抑制度가 多少弱하며 注射量을 增加할 수록 그 成長抑制作用이 多少增強됨을 볼 수 있으며 胎兒 人血漿抽出物 質注射動物은 注射 第 18 日까지는 不過 1~5 例를 除外 하고는 그 大部分이 死亡함을 볼 수 있었고 動物血漿抽出物 質注射例에서는 注射 第 12 日까지 全例 死亡함을 보았다.

II 人血漿因자의 正常組織成長에 미치는 影響

實驗材料와 實驗方法

實驗動物

實驗動物은 19~20gm 의 年齡이 同一한 雄性幼若 mouse 를 擇하여 約 2週間 stock diet 로 飼育한 後 健康한 것을 擇하여 實驗에 供하였다. 또 同一 條件下에서 實驗하기 위하여 通氣, 室溫, 汚物處理, 水分供給, 飼料供給의 量과 時間等에 特別히 注意하였다³⁵⁾.

實驗方法:

a. 血漿因子注射實驗方法

前述한 方法에 依하여 抽出한 人血漿因子(濕) 10% 溶液을 mouse 30 마리를 一羣으로하여 0.3cc 式 每日 同一時間에 腹腔內에 注射하고 對照群에 있어서는 血漿因子와 同量의 生理的食鹽水를 腹腔內에 注射하였다. 그리고 肝과 腎組織의 細胞核分裂數를 每 3日間隔으로 檢査하였다.

b. Colchicine 의 使用法

Colchicine 은 細胞核分裂을 主로 metaphase 에서 停止케함으로서 細胞核分裂의 數의 觀察을 便利케 한다^{36~41)}. 이런 意味에서 著者도 肝 및 腎細胞核分裂數値의 計算을 便利하게 하기 爲하여 colchicine 을 實驗動物體重 100gm 當 0.1mg 의 比例로 屠殺 4時間前에 實驗動物의 腹腔內에 注射하고 一定하게 午後 1時에 屠殺하였다.

c. 細胞核分裂數의 檢査法

前述한 注射動物과 對照動物을 每 3日의 間隔으로 一定時間에 屠殺한 後 切取한 肝 및 腎組織片을 即時 carnoy 氏 固定液에 3時間 固定한 後 100% alcohol 과 xylol 을 거쳐서 paraffin 에 包埋하고 約 5 μ 의 두께로 切片을 製作한 後 hematoxyline 과 eosin 複染色을 施行하여 病理組織標本을 만들어 對眼 lens 10倍 對物 lens 43倍 即 430 倍下에서 組織標本 100 視野中에 觀察되는 有絲核分裂數을 計算하였다.

實驗成績

人血漿因子 0.3mg 式 注射時 肝組織細胞核分裂狀況

a. 3日間 注射群

肝細胞核分裂數는 9.2 \pm 1.7 로 對照 59.0 \pm 5.0 에 比하여 顯著히 減少하였다.

b. 6日間 注射群

肝細胞核分裂數는 14.4 \pm 2.5 로 對照 60.0 \pm 11.0 에 比하여 顯著히 減少하나 3日 注射群에서 보다 若干 輕하였다.

c. 9日間 注射群

肝細胞核分裂數는 21.0 \pm 1.4 로 對照 61.0 \pm 8.9 에 比하여 顯著히 減少하나 6日 注射群에 比하여도 若干 輕하였다.

d. 12日間 注射群

肝細胞核分裂數는 21.2 \pm 1.9 로 對照群 57.0 \pm 3.7 에 比하여 減少하였으나 9日 注射群과 거의 差異가 없었다.

e. 15日間 注射群

肝細胞核分裂數는 28.0 \pm 1.6 로 對照群의 61.2 \pm 7.8 에 比하여 亦是減少되어 있으나 第12日 實驗群에서 보다 是 더욱 輕하였다.

f. 18日間 注射群

肝細胞核分裂數는 33.4 \pm 4.4 로 對照群의 61.8 \pm 7.0 에 比하여 減少되어 있으며 第15日 實驗群에서 보다 是 더욱 輕하였다.

Table 7. Average Number of Mitosis of the Liver after the Injection of Human Plasma Factor per Mouse
(Dose: 0.3cc of 10% Solution daily)

Day	Control(Saline)		Human Plasma Factor	
	N	M	N	M
3	5	59.0 \pm 5.0	5	9.2 \pm 1.7
6	5	60.0 \pm 11.0	5	14.4 \pm 2.5
9	5	61.0 \pm 8.9	5	21.0 \pm 1.4
12	5	57.0 \pm 3.7	5	21.2 \pm 1.9
15	5	61.2 \pm 7.8	5	28.0 \pm 1.6
18	5	61.8 \pm 7.0	5	33.4 \pm 4.4

TF=Tissue factor

N=No. of mouse

M=No of mitosis in 100 fields

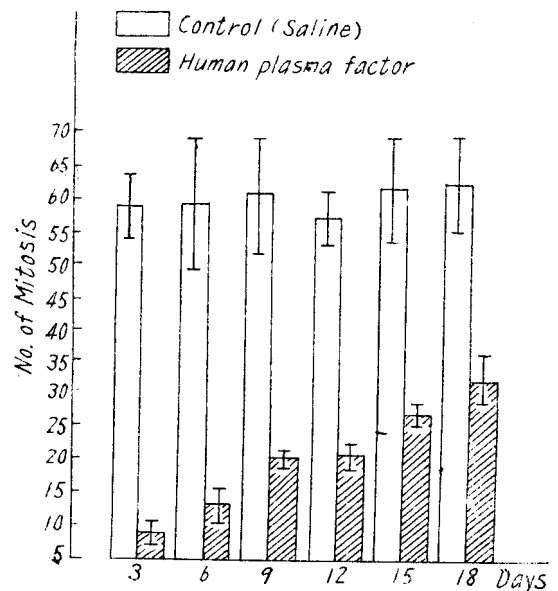


Fig. 1 Mitosis of Liver after the consecutive Injections of Human plasma Factor

人血漿因子 0.3mg 式 注射時 腎組織細胞核分裂狀況

a. 3日間 注射群

腎細胞核分裂數는 3.4±1.0 로서 對照 11.4±2.1 에 比하여서 顯著히 減少하였다.

b. 6日間 注射群

腎細胞核分裂數는 4.8±1.6 으로 對照 12.1±2.0 에 比하여 顯著히 減少하였으나 3日注射群에 比하여는 若干輕하였다.

c. 9日間 注射群

腎細胞核分裂數는 8.0±2.0 으로 對照 11.6±2.1 에 比하여는 減少하고 있었으나 6日注射群에 比하여는 若干輕하였다.

d. 12日間 注射群

腎細胞核分裂數는 9.4±1.8 로 對照 11.8±1.7 에 比하여 若干減少하고 있었으나 9日注射群에 比하여는 別差異가 없었다.

e. 15日間 注射群

腎細胞核分裂數는 對照群의 11.4±2.3 에 比하여 그數가 15.6±3.6 으로 若干增加되어 있다.

f. 18日間 注射群

腎細胞核分裂數는 對照群의 11.6±3.6 에 比하여 그數가 16.8±5.1 으로 增加되어 있으며 第15日實驗群에서 보다는 若干 더 增加를 나타내고 있다.

Table 8. Average Number of Mitosis of the Kidney after the Injection of Human Plasma Factor per Mouse (Dose : 0.3cc of 10% Solution daily)

Day	Control(Saline)		Human Plasma Factor	
	N	M	N	M
3	5	11.4±2.1	5	3.4±1.0
6	5	12.1±2.0	5	4.8±1.6
9	5	11.6±2.1	5	8.0±2.0
12	5	11.8±1.7	5	9.4±1.8
15	5	11.4±2.3	5	15.6±3.6
18	5	11.6±3.6	5	16.8±5.1

TF=Tissue factor

N=No. of mouse

M=No of mitosis in 100 fields

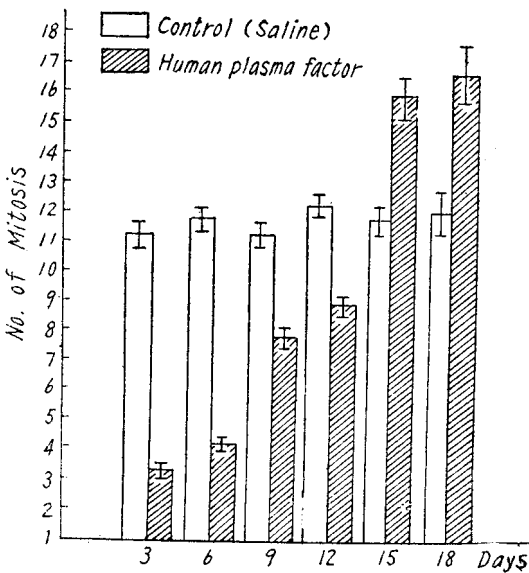


Fig. 2 Mitosis of Kidney after the Consecutive Injections of Human Plasma Factor

總括 및 考按

金昌松¹¹⁾, 金洙泰⁴²⁾, 孫奎元²¹⁾ 등은 白鼠의 各種臟器, 人胎盤과 家兔骨髓에서 癌成長抑制因子를 抽出하는데 成功하였으며 權寧吉⁴³⁾은 胎兒副腎皮質均質液이 動物移植 癌의 成長을 抑制함을 보았고 石世一¹⁸⁾, 李東植²⁰⁾ 등은 이러한 組織因子가 再生組織 및 正常組織成長에서 初期에는 抑制的으로 作用하나 後期에는 도리어 若干 促進的으로 作用함을 觀察하였다.

著者は 이러한 物質이 各種血漿中에도 包含되어 있지 나않는가의 與否를 究明하여 보기로 하였다. 爲先 人胎兒, 人, 牛, 海溟 등의 各種血漿을 採取하며 高速遠沈法, 濾紙電氣泳動法 및 透折法 등으로 處理하여 血漿因子를 抽出하였다. 다음 次에 實驗으로 Ehrlich 腹水癌과 N-F 肉腫을 皮下에 移植한 mouse 에 그 10% 溶液 0.1cc, 0.2cc, 0.3cc 와 0.4cc 를 各各 每日 mouse 腹腔內에 注射하고 每 3日間隔으로 腫瘍의 크기를 測定하였으며, 注射第 18日에 腫瘍을 摘出秤量하여 各各 對照動物腫瘍의 그것과 比較하였다. 둘째 實驗으로는 人血漿因子를 正常 mouse 의 腹腔內에 注射한 後 肝組織과 腎組織에 있어 그 核分裂數를 計算하여 이 因子의 正常組織細胞核分裂에 미치는 影響을 觀察하였다.

그 結果 腫瘍動物에 各種血漿因子를 注射한 實驗에 있어서 10% 水溶液 0.1cc 注射群에 있어서는 大體로 注射第 6日부터 成長이 完全히 停止되거나 對照에 比하여 越等히 縮少抑制됨을 볼 수 있었으며 注射第 18日에 動物의 腫瘍을 摘出秤量하여 본 結果 對照에 比하여 顯著한 縮少를 認定할 수 있었다.

한便 注射量이 增加할 수록 그 抑制度가 若干 增加하는 것 같이 보이었으나 反듯이 注射量과 平行하지는 않았다.

擔癌動物에 있어서는 注射量이 많아짐에 따라 腫瘍의 크기는 縮少하는데 反하여 動物의 死亡率이 높아졌다. 그런데 이 抽出物質의 毒性을 檢査하기 爲하여 正常 mouse에 各種血漿因子 0.3cc 式을 18日間 每日 反復 腹腔內注射하여 보았으나 이 實驗範圍內에서는 1例의 死亡例도 볼 수 없었음을 보아(第9表) 그 死亡率增加가 반듯이 이 物質의 毒性에만 緣由하는 것 같지는 않으며 이 事實은 이미 金¹²⁾도 指摘한 바 있거니와 그 理由에 對하여는 아직도 不明하며 앞으로의 研究對象으로 남을 것이고 이러한 傾向은 人間血漿物質에서 보다 動物血漿物質에서 더욱 顯著하다.

Table 9. Toxicity of tissue factor

Plasma	Dose (cc)	Day					
		3	6	9	12	15	18
		D/S	D/S	D/S	D/S	D/S	D/S
Embryonic	0.3	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Human	0.3	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Calf	0.3	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
Guineapig	0.3	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

D/S=No. of Death/No. of Experimental Animal

抽出物質의 高速遠沈分離만을 거친 胎兒血漿因子는 高速遠沈分離, 濾紙電氣泳動法 및 透折等を 거친 成人, 犢牛, 海溟血漿因子 보다 그 抑癌作用이 弱한 것으로 보아 化學過程을 거칠 수록 그 抑制因子가 純粹化되는 것이라 생각되며 이러한 現象은 이미 孫¹⁸⁾의 家兔骨髓의 抑癌物質에 關한 研究에서 報告한 바와 같이 이 抽出液中에는 成長促進性物質이 共存하여 있어 그 抑癌性을 弱화한 것이 아닌가 生覺된다.

一般的으로 各種血漿因子의 癌抑制制度는 海溟, 牛, 人, 胎兒의 順으로 強함을 볼 수 있었으며 N-F肉腫에서 보다 Ehrlich 腹水癌(瘤型)에서 더욱 抑制됨을 볼 수 있었다. Herbut^{12, 10)} 등은 海溟血清에는 顯著한 癌抑制作用이 있고 羊과 人血清에서는 이 作用이 一定치 아니하며 犢牛等에서는 이러한 作用을 볼 수 없었고 人血漿의 Cohn 分屑을 使用한 研究에서도 β -globulin과 γ -globulin, fibrinogen 分屑에서는 抑制作用을 보이었으나 全般的으로 弱하다고 하였다.

然이나 氏의 血漿因子抽出은 黃酸암모니아 沈澱에 依한 單純한 方法을 使用했으나 著者는 各種臟器抽出에 使用하여 一律적으로 抑制的因子를 抽出할 수 있었든 여러 段階의 抽出法을 利用하여 抑制制度에 強弱은 있으나 海溟, 人, 胎兒, 犢牛等 各種動物血漿을 비롯하여 成人血漿에 있어서는 一律적으로 抑制性因子의 存在를 認定할 수 있었다.

다음 動物移植癌을 抑制하는 人血漿因子가 正常組織

成長에는 如何한 影響을 미치는가를 보기 爲하여 前述한 바와 같은 人血漿因子 10% 溶液 0.3cc 式을 每日 同一時刻에 正常 mouse 腹腔內에 注射하고 肝 및 腎臟의 細胞核分裂數를 計算하였으며 生理的食鹽水를 注射한 對照動物의 그것과 比較觀察하였든 바 人血漿因子注射에 依하여 肝細胞核分裂은 初期에는 顯著히 抑壓되나 繼續注射함에 따라 漸次 正常値를 向하여 回復되었으나 第18日에 있어서는 아직 正常對照値의 그것에 到達치 못하고 後期에 있어서 차츰 正常値로 回復함을 보았다.

또한 이러한 傾向은 腎細胞核分裂에 있어서는 볼 수 있었으나 後期에서는 對照値에 比하여 도리어 若干 增加함을 볼 수 있었다. 그러나 大體적으로 그 抑制制度가 肝臟에 있어서 보다 弱하게 나타났으며 이것으로 보아 同人血漿이 臟器에 따라 그 作用에 強弱이 있거나 아니한가 生覺된다.

以上の 實驗成績으로 보아 各種血漿因子는 大體적으로 動物腫瘍成長을 抑制하는 同時에 正常組織에 對하여는 처음에는 抑制的으로 作用하며 繼續注射는 그 抑制力이 도리어 減弱되어 차츰 正常値로 回歸함을 알 수 있으며 이와같이 正常組織에 對한 結果는 教室 李華永¹⁶⁾의 白鼠肝 및 皮膚組織因子가 正常組織에 미치는 影響에 對한 研究의 結果와 一致된다고 生覺된다.

以上 著者가 各種血漿에서 抽出한 血漿因子의 本態에 關한 究明은 以後 더 研究對象으로 남게 되겠거니와 이 血漿因子가 動物體內에서 腫瘍成長抑制와 正常組織成長에도 어느 程度 關與되고 있으리라고 生覺할 수 있다.

結 論

各種血漿에서 抽出한 血漿因子가 mouse의 Ehrlich 腹水癌과 N-F肉腫成長에 미치는 影響과 人血漿因子가 正常 mouse의 肝 및 腎細胞核分裂에 미치는 影響을 檢討한 結果 아래와 같은 結論을 얻었다.

1. 胎兒, 人, 犢牛, 海溟血漿因子는 mouse의 Ehrlich 腹水癌과 N-F肉腫의 成長을 抑制한다. 그 抑制現象은 繼續注射에 依하여 持續되며 注射量이 增加할 수록 增強된다.

2. 抑癌作用은 人血漿因子 보다 動物血漿因子에서 더욱 強하며 또 N-F肉腫보다 Ehrlich 腹水癌에서 더욱 顯著하다.

3. 人血漿因子는 正常 mouse의 肝 및 腎細胞核分裂을 初期에는 抑制하나 繼續注射에 依하여 도리어 차츰 抑制力이 減少되어 正常値로 向한다.

4. 人血漿因子에 依한 細胞核分裂抑制制度는 腎에서 보다 肝에서 더 強하다.

(獨筆함에 있어서 本研究에 對하여 指導와 本稿校閱의 勞苦를 아끼지 않으신 秦炳鎬教授에게 深甚한 謝意를 表

하는 바이며 또 本研究遂行에 積極的인 協力을 하여 주신 白承龍 講師, 李華永 講師와 外科學敎室員 一同에게 아울러 謝意를 表하는 바이다.)

ABSTRACT

Tissue Growth Inhibiting Substance in Various plasma

Jong Kook, Kim, M.D. Byong Ho, Chin, M.D.,
Dept. of Surgery, College of Medicine, Seoul
National University, Seoul, Korea

Many workers have reported that inhibiting substance on tumor and tissue growth can be obtained from various organs and tumors. Malmgren & Mills²²⁾, Stich & Florian²³⁾, Lee & Lee²⁴⁾ and Herbut²⁵⁾ also reported that such a substance had been extracted from serum and plasma. However, no uniform result was obtained.

The following experiments were carried out in order to study the presence of such substance using various plasma. The method by which Chin and Kim extracted the inhibiting factor from various organs was applied to extract it.

Materials and Methods

1) Ehrlich ascites cancer and N-F sarcoma were used. The ascites containing cancer cells was aspirated, and two tenth ml. of the aspirated fluid was inoculated subcutaneously.

2) Tissue factors were prepared from various plasma specimens in the following manner. Plasma was centrifuged in Model PRI international centrifuge at 15,000/rpm. Ethyl alcohol was added to the supernatant and the mixture was kept in the refrigerator for 24 to 48 hours. The resulting precipitate was resuspended in a small amount of distilled water and subjected to paper electrophoresis in sodium barbital and acid barbital buffer system at pH 8.6. The slow-moving fraction was treated with trypsin in 37°C incubator under pH 8. The liquid was shifted into a cellophane tube and dialyzed in the refrigerator for 72 hours against distilled water. The substances in the cellophane tube were removed and precipitated by adding the same volume of acetone.

3) The sediment was then ready for injection as a 10% solution. The injections started on the day of the tumor transplantation of the mice. The daily doses per animal consisted of 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4 ml. each

of 10% solution. The size of the tumor was directly measured from the skin with clippers every three days. On the 18th day after the tumor transplantation, animals were sacrificed and the tumors were removed and weighed. The growth of the tumor was measured by one half of the value of the largest in length and largest in width.

4) 0.3cc of 10% tissue factor extracted from human plasma was injected intraperitoneally to the mice everyday. After sacrificing the mice, which had been injected for three, six, nine, twelve, fifteen and eighteen successive days, respectively, tissue slices were cut from the liver and kidney in approximately 2 mm thicknesses, and fixed in Carnoy's fluid for three hours, and then paraffin sections were made 5 micron thick and stained with hematoxylin and eosin. The mitotic cells of the liver as well as the kidney were counted for 100 fields on each slide with the help of 43 x objective lens and 10 x oculars, and compared with controls.

Results

1) The tissue factors extracted from the plasmas of human, calf, guineapig, and human embryo, as shown in table, 1, 2, 3, 4, 5 and 6, equally inhibited the growth of both Ehrlich ascites cancer and N-F sarcoma.

The action of this growth-inhibition was more prominent by increasing the dosage of the tissue factors in comparison with the small dosage.

2) The inhibiting action of animal plasma factors on tumor growth was stronger than that of the human plasma factor, and this inhibition was more significant in Ehrlich ascites cancer than in N-F sarcoma.

3) The consecutive injections of human tissue factor generally inhibited cellular mitosis of the liver and kidney, with a marked inhibition in the early stages, but with a tendency to diminish in the inhibition power following the consecutive injections.

4) The inhibitory action of human plasma factor on cellular mitosis was more apparent in the liver than in the kidney.

REFERENCES

- 1) Baker, L. E. and Carrel, A.: *J. Exp. Med.*, 42:148, 1925. Cited from *Proceedings Am. Cancer Res.* 3:234, 1961.
- 2) 石原俊士: 臍帶ホルモン學說と癌腫の治療: 關西ペロ

- セス印刷研究社 日本大阪市 1930.
- 3) Murphy, J. B., Helmer, O. M., Claude, A. and Sturm, E.: *Science*, 73: 266, 1931. Cited from *Growth*, 8:13, 1944.
 - 4) Maisin, J. and Pourbaix, Y.: *Growth Promoting and growth inhibiting substances extracted from normal organs, An experimental Study of Diet In Tar Cancer. Am. J. Cancer*, 24: 357, 1935.
 - 5) Walton, A. J.: *The effect of Various tissue extract upon the growth of adult mammalian cells in vitro. J. Exp. Med.*, 20: 554, 1941.
 - 6) Nutini, L. G., Fardon, J. C., Cook, E. S., Perez, N. T., Medley, D.L. and Mamola, N.J.: *Tumors as a source of growth inhibitors and accelerators. Proceedings Am. Ass. Cancers. Res.*, 3:255, 1961.
 - 7) Rothman, H.: *A Dialyzable C₃HBA Tumors. Proceedings Am. Ass. Cancer Res.*, 3: 263, 1961.
 - 8) De Carvalho, S.: *Effects of RNA from normal rat liver and Novikoff Hepatoma on tumor and normal liver cells. Proceedings Am. Ass. Cancer Res.*, 3: 218, 1961.
 - 9) Herbut, A. A., Kraemer, W. H.: *Presence of a tumor inhibitory principle in liver. Am. J. of Path.* Vol. 36, 105, 1960.
 - 10) Herbut, P. A., Kraemer, W. H. and Kckeon, F. A.: *Human plasma Cohn fractions and mouse tumor; effect on lymphosarcoma. 6C₃HED in C₃H mice, Archives of Pathology. Vol. 71, 1961.*
 - 11) Herbut, P. A. and Kraemer, W. H.: *The effect of animal serums on lymphosarcoma 6C₃HED and C₃H Mice, Am. J. path.* 34: 767-774, 1958.
 - 12) Herbut, A. A., Kraemer, W. H. and Pillemer, L.: *The effects of components of quinea pig serum on lymphosarcoma 6C₃HED in C₃H Mice, Blood* 13: 732-739, 1958.
 - 13) György, S.: *Science* 140, 1391, 1963.
 - 14) 秦柄鎬, 金昌松: 惡性腫瘍成長抑制物質에 관한 研究, 大韓外科學會雜誌, 1:21, 1958.
 - 15) 金昌松: 各種器管 및 組織에 있어서의 成長抑制物質에 관한 研究, 大韓外科學會雜誌, 3:293, 1961.
 - 16) Teir, H. and Reventi, K.: *Mitotic activity and growth factors in the liver of the white rat. Exp.*
 - 17) Blomquist, K.: *Growth stimulation in the liver and tumor development following intraperitoneal injections of liver homogenates in the rat. Acta Path. et Micro. Scand. Supple.*, 131, 1957.
 - 18) B. H. Chin., S.I. Suk.: *The Effect of tissue factor from normal organs on hyperplasia of normal tissue. (Report to Damon Runyon Fund 1962)*,
 - 19) B.H. Chin, H. Y. Lee: *The effect of tissue factor from normal organs on normal tissue growth (Report to Damon Runyon Fund 1963)*.
 - 20) 李東植: 各種組織에서 抽出한 組織成長抑制因子가 正常組織 D. N. A. 生合成에 미치는 影響; 大韓外科學會雜誌, 4:12, 1962.
 - 21) 孫奎元: 動物骨髓의 組織成長抑制物質에 관한 研究, 中央醫學雜誌, Vol. 4, No. 5, May. 1963.
 - 22) Malmgrem, R. A. and Mills, W.: *Studies of properties of the liver mitotic stimulant(LMS) in mouse tumor tissue. J. Nat. Cancer Inst.*, 26, 525, 1961.
 - 23) Stich, A. F. and Florian, H.L.: *The presence of a mitosis inhibitor in serum and liver of adult rats. Canada J. Bio Chem. and Physio. (in press)cited from Cancer Research.*, 18 981. 1948.
 - 24) 李濟九, 李元承: 正常白鼠血清이 正常白鼠 및 部分的肝切除白鼠의 肝細胞核分裂에 미치는 影響, 綜合醫學. Vol. 7, No. 1, 1962.
 - 25) 秦柄鎬, 黃勳: 惡性腫瘍成長抑制에 관한 研究, 3-Methoxy steroid의 制癌作用에 관한 實驗的 研究, 大韓外科學會雜誌, 3: 47, 1961.
 - 26) Sorof, S. and Cohen, P.P.: *Electrophoretic Studies of the Soluble Proteins of Rabbit Liver. J. of Biolog. Chem.*, 190: 303-307, 1951.
 - 27) Hoch, H.: *Biochem. J.*, 46: 199, 1950. Cited from *Cancer Research*, 18:781, 1958.
 - 28) Kunkel, H.G. and Wallenius, G.: *New Hemoglobin in Normal Adult Blood. Science*, 122: 288, 1955.
 - 29) Henry, R.J., et al.: *Some of the Variables Involved in the Fractionation of Serum Proteins by Proper Electrophoresis. Clin. Chem.*, 3:49, 1957.
 - 30) Dodson, V. N. and Haynie, T.P.: *Paper Electrophoresis of Serums from Apparently Normal Adults by a Standardized Method. Am. J. Clin. Pathol.*, 31:404, 1959.
 - 31) Sunderman, F. W. Jr. and Sunderman, F. W.: *Studies on the serum Proteins. IV. The Dye-Binding of Purified Serum Proteins Separated by Continuous-Flow Electrophoresis. Clin. Chem.*, 5:171, 1959.
 - 32) 小林茂三郎: 濾紙電氣泳動法の檢討, 日本醫事新報, 1562:26, 1954.

- 33) Miller, E.C.: *Studies on the Formation of protein Bound Derivatives of 3, 4-Benzpyrene in the Epidermal Fraction of Mouse Skin. Cancer Research, 11:100-108, 1951.*
- 34) Miller, E.C. and Miller, J.A.: *The Presence and Significance of Bound Aminoazo Dyes in the Livers of Rats Fed P-Dimethylamino-azobenzene. Cancer Research, 7:468-480, 1947. Cited from Cancer Research 12:547, 1952.*
- 35) Ann, M.: *Regeneration in the fatty liver of the rat after partial hepatectomy. J. Path. and Bact., 71:403, 1956.*
- 36) Austin, M. and Brues.: *An analysis of mitosis in liver regeneration. J. Exp. Med., 65:15, 1937.*
- 37) Bureau, V. and Vilter, V.: *Bend. Soc. Biol. 132: 553, 1939.*
- 38) Dustin, A. P.: *Bull Acad. Med. Belg.; 14. 487. 1927. Cited from 5*
- 39) Gelfant, S.: *A. Study of mitosis in mouse ear epidermis in vitro; Exp. Cell. Res., 423, 1958.*
- 40) Malmgren, R. A. and Mills, W.: *Studies of properties of the liver mitosis stimulant in mouse tumor tissue; J. Nat. Can. Inst., 26:3, 1961.*
- 41) Teir, H, Schuman. A. and Sundell, B.: *Act Anat; 16:233, 1952. Cited from Acta Path. et Microb. Scand., 112:36, 1956.*
- 42) 金洙泰: 人體胎盤의 成長抑制物質에 關한 研究, 大韓外科學會雜誌, Vol. 4, No. 12, 1962.
- 43) 秦柄鎬, 權寧吉: 惡性腫瘍成長抑制에 關한 研究, 大韓外科學會雜誌, 1:23, 1958.