

マイトマイシンCによる癌転移増強作用

第2報：その血管内皮細胞障害と白血球の関与

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

村 澤 賢 一

〔原稿受付：昭和58年9月2日〕

The Injurious Effect of Granulocytes and Mitomycin C Added to Cultured Human Vascular Endothelium

KEN-ICHI MURASAWA

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Endothelial cells collected from the fresh human umbilical vein were dispersed into small culture wells(Limbro[®], 24 Flat bottom wells 1.7×1.6 cm) numbering $5\sim7\times 10^5$ /ml containing a mixture of 199 culture medium and 20% fetal calf serum. Confluent or subconfluent vascular endothelial cell-sheets were utilized to examine the effect of Mitomycin C(MMC) and human granulocytes on the vascular endothelium.

There was no injury to the endothelium when it was exposed to MMC(100 μ g/ml) for 30 minutes. But exposure of the endothelium to the culture medium containing MMC(100 μ g/ml) and granulocytes (7×10^6 /ml) for 30 minutes evoked severe endothelial injury. This harmful effect of MMC and granulocytes on the endothelium was moderated when 20% fetal calf serum was added into the culture medium. However, successive exposure (about 24 hours) of the endothelium to MMC(10~100 g/ml) induced injury related to the concentration of MMC added. And finally it was observed that exposure of granulocytes to MMC(100 μ g/ml) for 30 minutes revealed less viable granulocytes after 24 hours in comparison with the control.

Because of these findings, it is suspected that MMC influences the granulocytes to release protease which causes injury to the cultured endothelium. Considering this experiment along with a previously submitted report, it is suggested that a one shot administration (iv, ip) of a large amount of MMC in cooperation with granulocytes will cause a certain amount of injury to the endothelium and make it easier for tumor cells, injected into the vein, to lodge themselves on the endothelium, increasing the number of metastatic nodules.

Key words: Mitomycin C, Endothelium leucocytes, Vascular injury, Cell culture.

索引語：マイトマイシンC, 内皮細胞, 白血球, 血管障害, 細胞培養.

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

緒 言

著者は、大量のマイトマイシンC (以下 MMC と略す) をあらかじめ投与 (静注, 門脈注入, 腹腔内注入) したラットに, 腹水肝癌 AH13C の細胞を門脈内より注入したところ肺, 肝の転移結節数が増加することを認めた²⁷⁾. この転移増加は, MMC により血管内皮障害が起った結果, 癌細胞が血管内皮に着床し易くなった為にもたらされたものではないかと考えた. 本稿では, 培養血管内皮細胞を用いて MMC に対する反応を観察した結果を報告する.

実験材料

1. 血管内皮細胞による一層の細胞シートの作製

帝王切開, 又は自然分娩後冷所に保存 (12時間以内) した臍帯を使用した. 内皮細胞の採取手技は, Gimbrone の方法¹²⁾ によった. 即ち 500 ml の生理食塩水で臍帯静脈を静かに洗浄し, コラーゲナーゼ溶液 (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 加 PBS に溶解, 1 mg/ml, Worthington type IV) を 15~20 ml 注入した. 37°C 温浴内に20分間静置し, 数回フラッシングした後, 溶液を取り出した. 1000回転10分間の遠心で3回洗浄 (PBS 溶液で) 後, 20%牛胎児血清 (以下 FCS と略す) を加えた199培地に細胞数 5~7×10⁵ コ/ml の数に調整して浮遊させた. この細胞浮遊液を Flow 社製24穴の培養皿の1穴へ 1cc ずつ注入した. 27°C 恒温槽, 又は 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した. 約2週間で confluent になったものを血管内皮モデルとして使用した (写真1, 2). 培地交換は, 初回が12時間後, 以後は3~4日毎に行なった. 尚, 血管内皮によるセルシート (cell sheet) は, 透過電子顕微鏡による観察で細胞内に多数の Weibel-Palade 小体¹³⁾ を確認した. (写真6-a, b)

2. MMC 液の作製

MMC (協和発酵 K. K.) を199培地に種々の濃度で溶解して作製した.

3. 白血球浮遊液の作製

Boyum¹⁴⁾ の方法に準じて, 白血球浮遊液を作製した. 6%白血球分離用デキストラン (分子量18万, PBS に溶解) 4 ml とヘパリン1000単位を, プラスチック製 20 ml 注射器に入れ 15 ml の人血液を採取した後, よく振盪混和して針を上にし, 37°C で30分間静置した. フィーコールパーク (Pharmacia Fine Che-

micals, Uppsala, Sweden) を1/2容入れたプラスチック試験管を用意して, 注射器の上清を静かに重層した. 500 G 40分で遠心後, 沈渣に0.2%生食水 2 ml を20秒間作用させて混入している赤血球を除いた. 199培地で3回洗浄した後細胞数を数えて細胞浮遊液とした. (写真3)

実験方法

1. MMC を持続的にセルシートに作用させた.

(1) ● 20% FCS 添加199培地に MMC をそれぞれ i) 1000 µg/ml ii) 100 µg/ml iii) 10 µg/ml の濃度になるように加えて, 培養内皮細胞の培養皿へ各 1 ml ずつ注入し, 経時間に観察した.

(2) 20% FCS 添加199培地に, MMC を, それぞれ 100 µg/ml, 10 µg/ml となるように加え, 更に白血球を 7×10⁶ コ/ml となるように加えたものを, 各 1 ml ずつ培養皿に注入して経時間に観察した.

2. MMC を短時間セルシートに接触させた.

(1) 血清無添加199培地に MMC 100 µg/ml の濃度として30分間内皮細胞に作用させた. その後 37°C の PBS で3回洗浄した後, 20% FCS 添加199培地で培養を続けた.

(2) 血清無添加199培地に MMC 100 µg/ml, 白血球 7×10⁶ コ/ml としたものを30分間内皮細胞に作用

表1 血清添加で持続的に MMC を作用させた場合の培養内皮細胞への影響.
(生存内皮細胞の比率)

MMC 濃度	時間	4 hr.	18 hr.	40 hr.
1000 µg/ml		25.3%	17.6%	0%
100 µg/ml		100%	18.3%	0%
10 µg/ml		100%	47.7%	21%

[MMC (+), 白血球 (-), 血清 (+)]

表2 血清添加で持続的に MMC と白血球を作用させた場合の培養内皮細胞への影響.
(生存内皮細胞の比率)

MMC 濃度	時間	4 hr.	8 hr.	40 hr.
100 µg/ml		100%	21.3%	0%
10 µg/ml		100%	54.4%	23%

[MMC (+), 白血球 (+), 血清 (+)]



写真1

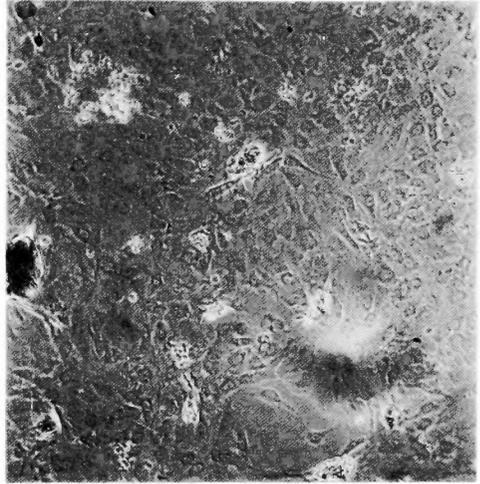


写真2

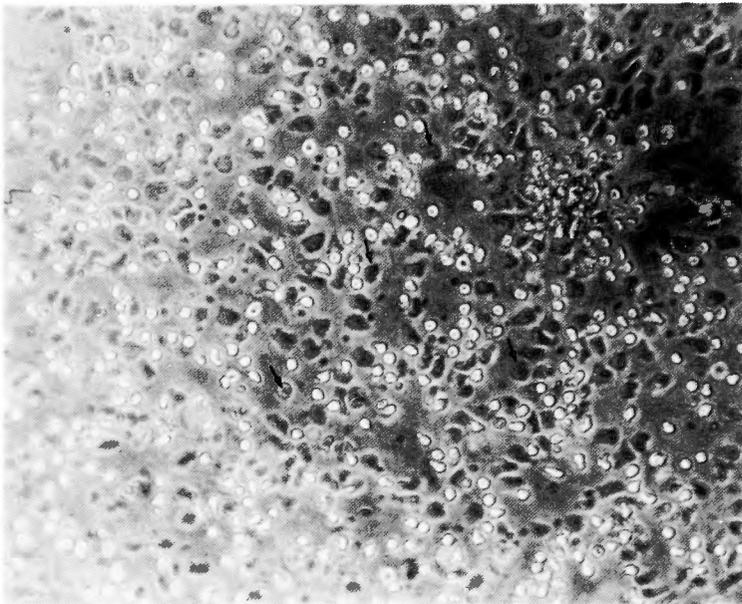


写真3

- 写真1 臍帯より採取して培養開始後12時間の血管内皮細胞 (20×10で撮影)
 写真2 ほぼ Confluent になった10日後の血管内皮細胞 (10×10)
 写真3 ヒトより採取した新鮮な白血球細胞 (矢印)
 (小さい細胞は赤血球……中心陥凹が観察される) (20×10)

させた。その後 37°C の PBS で3回洗浄した後20% FCS 添加199倍地で培養を続けた。

(3) 血清無添加199培地に白血球 7×10^6 コ/ml 加えたものを30分間内皮細胞に作用させた。

*2-(1)(2)(3)では、subconfluent のセルシートを用いた。

(4) 血清添加 (20% FCS) 199倍地中に白血球 7×10^6 コ/ml, MMC をそれぞれ 100 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1

μg/ml, 0.1 μg/ml, 0.01 μg/ml としたものを30分間作用させた。

観察は、位相差顕微鏡（オリンパス）により経時的に行なった。

写真を用いて一定面積の中の生きている内皮細胞数を数えた。図と表は、処置前の内皮細胞数を100%として残存している生細胞数を表わしている。

*実験1—(1)(2), II—(1)(2)(3)(4)の6群は、各群とも3~5のwellのセルシートを用いた。表に示した生細胞数の割合は、その平均値である。

3. 199倍地に白血球を 10⁶コ/ml となるように浮遊させた。

(1) (MMC 100 μg/ml を白血球に短時間作用させた。)

MMC を 100 μg/ml となるように白血球浮遊液に加えて30分間作用させ、その後、199培地で3回洗浄し、0.5%トリパンブルー1容を細胞浮遊液1容に加えて2分間静置後、生細胞数を数えた。その後20% FCSを加えた199培地で24時間培養し、再びトリパンブルーテストを行なった。

(2) (MMC 10 μg/ml を白血球に短時間作用させた。)

MMC を 10 μg/ml となるように白血球浮遊液に加えて、以下(1)と同様に実験を行なった。

(3) (コントロール)

MMC を加えないで30分間静置後、以下(1)と同様に実験を行なった。

結 果

1. (1) MMC を持続的に作用させた場合、血管内皮細胞は、i) 1000 μg/ml では、4時間後に障害が著明(80%以上の細胞がプラスチック底面より剝離)となり、ii) 100 μg/ml では、4時間では障害はみられず8時間後に障害が80%以上となった。40時間後には、i) と ii) は、100%の細胞障害が観察されたが iii) 10 μg/ml では、80%が障害された。(表1、図1)

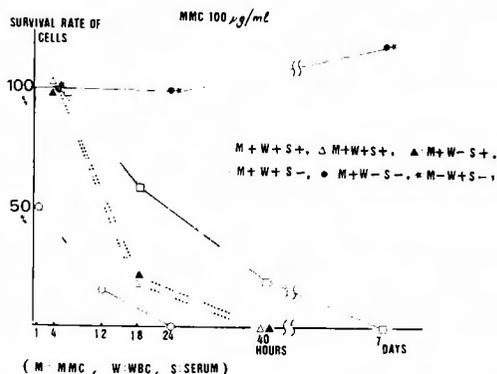


図1 MMC 100 μg/ml を短時間(30分)又は長時間作用させた場合の培養内皮細胞への影響、実線は短時間、破線は長時間 MMC が作用したことを示す。

2. (1) (MMC を血清無添加で 100 μg/ml の濃度で30分間作用させた場合)、内皮細胞は、全く変化を示さなかった。その後培養を継続した場合細胞は、増殖傾向を示し1週間後に confluent となった。(表3、図1、写真4-a, b, c)

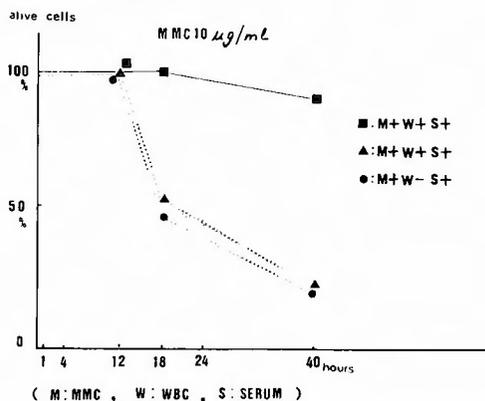


図2 MMC 10 μg/ml を30分、又は長時間作用させた場合の培養細胞への影響。実線は短時間、破線は長時間 MMC が作用したことを示す。

表3 血清(-)で30分間 MMC 又は白血球を作用させた場合の培養内皮細胞への影響。

時間	60 min.	12 hr.	24 hr.	7 d.
MMC 100 μg/ml	100%	100%	100%	120%
MMC 100 μg/ml WBC 7×10 ⁶ /ml	50%	15%	0%	0%
WBC 7×10 ⁶ /ml	100%	100%	100%	120%

[MMC (+), 血清 (-)]

(生存内皮細胞の比率)

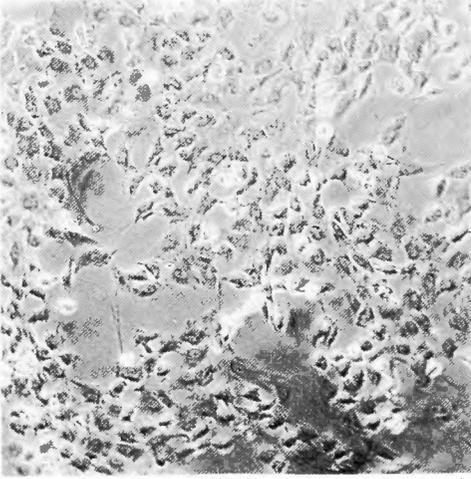


写真4 a

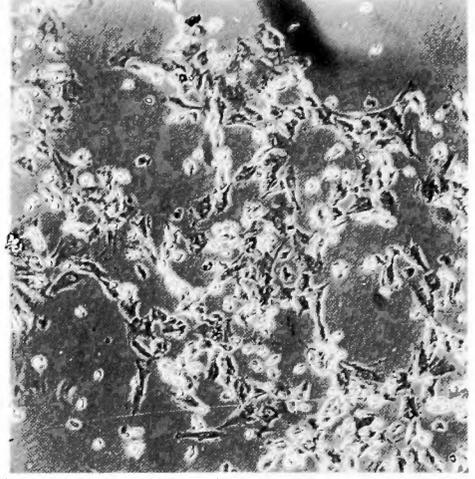


写真5-a

(60分)

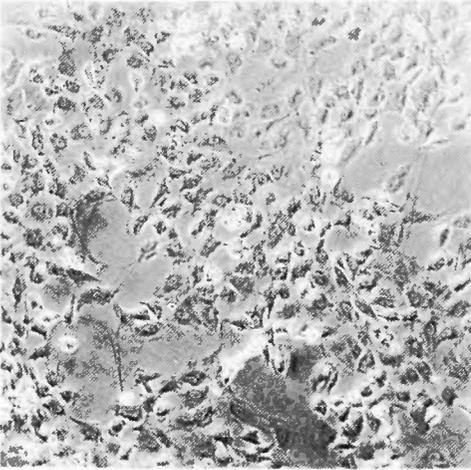


写真4-b

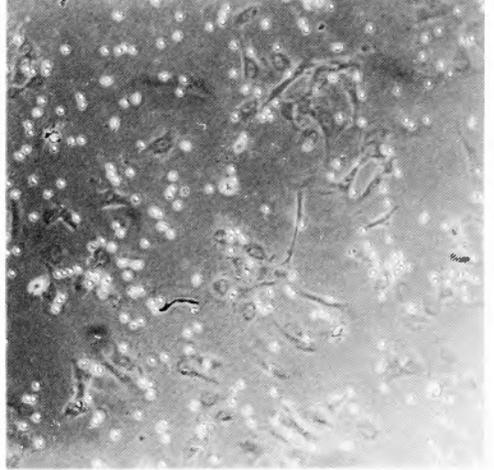


写真5-b

(12時間)

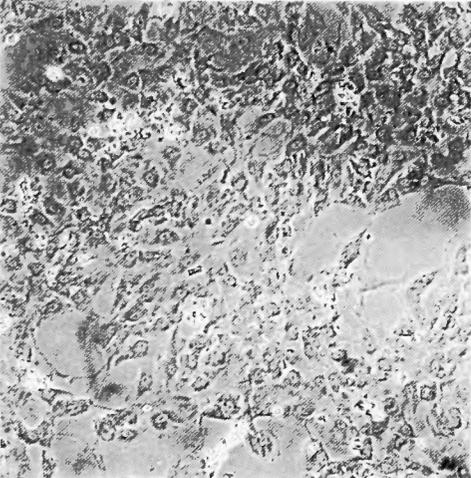


写真4-c

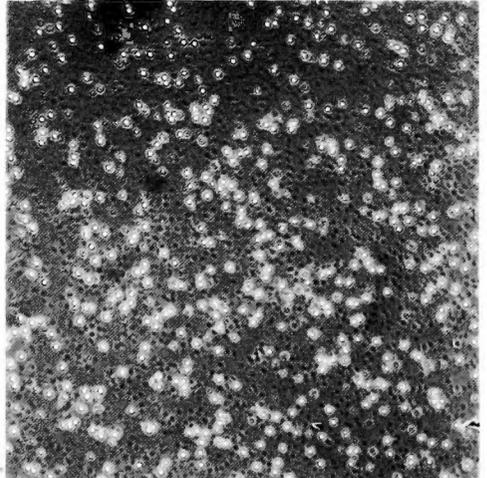


写真5-c

(24時間)

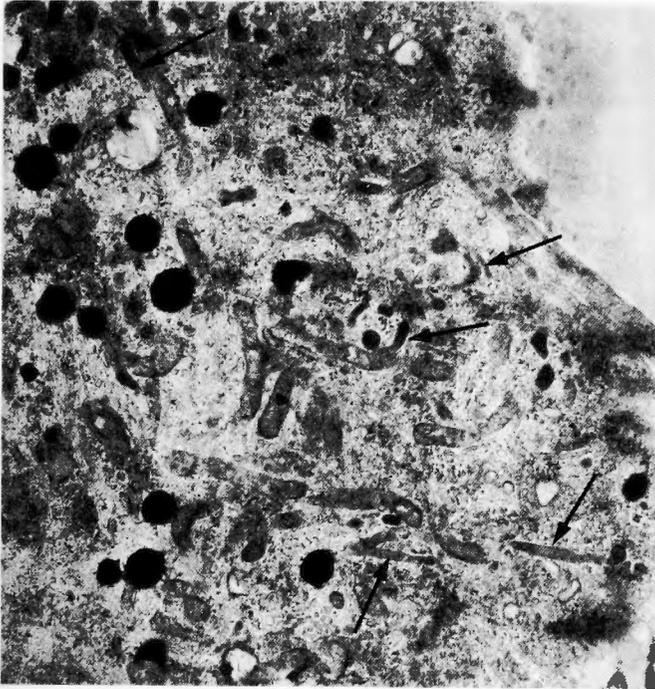


写真6-a (11000×)



写真6-b

(120000×)

写真6-a 培養血管内皮細胞の透過電子顕微鏡写真。臍帯静脈の血管内皮細胞内に多数あるといわれる Weibel-Palade 小体が認められる。(矢印)

写真6-b Weibel-Pallade 小体の強拡大

(2) (MMC を血清無添加で $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度とし、これに白血球を $7 \times 10^6/\text{ml}$ となるよう加え30分作用させた場合) 60分後に80%以上の細胞がプラスチック底より浮離した。残存した細胞を洗浄後続けて培養したところ剥離傾向を示して2日後には100%剥離していた。(表3, 図1, 写真5-a, b, c)

(3) 白血球のみでは、内皮細胞に全く障害は、生じなかった。30分後白血球を除き、洗浄後7日間培養し

た場合、内皮細胞は、増殖して1週間後には confluent となった。(表3, 図1)

(4) 種々の濃度の MMC を血清添加で白血球 ($7 \times 10^6/\text{ml}$) とともにセルシートに30分間作用させた場合は、 $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で(2)と比較すると障害がかなり和らげられていることがわかった。(図1, 表4)又、 $1 \mu\text{g/ml}$ 以下では、障害が全く認められなかった。

3. 30分後のトリパンブルーテストでは、(1)(2)(3)とも

写真4-a 実験2(1) (MMC を血清無添加で $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度で30分間作用させた) 60分後。障害は認められない。(10×10)

写真4-b 実験2(1) 12時間後。障害は認められない。(10×10)

写真4-c 実験2(1) 24時間後。障害は認められない。(10×10)

写真5-a 実験2(2) (MMC を血清無添加で $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度とし、これに白血球 $7 \times 10^6/\text{ml}$ となるよう加え30分間作用させた) 60分後。50%の障害を認める。(10×10)

写真5-b 実験2(2) 12時間後。85%の障害を認める。(10×10)

写真5-c 実験2(2) 24時間後。100%の障害を認める。(10×10)

表4 血清(+)で30分間 MMC と白血球を作用させた場合の培養内皮細胞への影響。
(生存内皮細胞の比率)

MMC 濃度	時間		
	4 hr.	18 hr.	40 hr.
100 $\mu\text{g/ml}$	100%	59.1%	20.2%
10 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	90%
1 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	100%
0.1 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	100%
0.01 $\mu\text{g/ml}$	100%	100%	100%

[MMC (+), 白血球 (+), 血清 (+)]

に97%以上が生細胞であり、有意の差は、認められなかった。24時間後では、トリパンブルーに染る細胞(死細胞と判定)は、(1)が76.1%、(2)が53.9%、(3)が42.3%であり、マイトマイシンと接触させた(1)(2)では、生細胞数が有意に減少していた。(P<0.01)

考 察

動物に薬物、または放射線による前処置を行なうと、静脈内へ注入した細胞の肝、肺転移が増加するという報告は数多く認められる。サイクロフォスマイドの大量投与後に肺転移結節数が著しく増加するという⁷⁾との報告に関連し、著者はサイクロフォスマイドと同様に、アルキル化作用によりその効力を発揮す

表5 白血球に血清(-)で MMC を作用(30分間)させトリパンブルーテストにより生細胞数を数えた。

MMC 濃度	時間	
	60 分 後	24時間後
コントロール	98.3 \pm 1.8%	42.3 \pm 12.8%
MMC 10 $\mu\text{g/ml}$	97.5 \pm 2.6%	53.9 \pm 2.4%
MMC 100 $\mu\text{g/ml}$	98.1 \pm 3.1%	76.1 \pm 7.1%

表は障害細胞の全細胞に対する比率である。

るというマイトマイシンC^{17,34)}(以下 MMC)の大量投与(300~800 $\mu\text{g/kg}$)の場合にも、同様な現象が起り得ることをラットを用いて確認した²⁷⁾。

転移増強の機序については、1) 血管内皮障害⁵⁾、組織障害¹⁸⁾、2) 凝固系の乱れ^{13,26)}、3) 免疫抑制、4) 腫瘍への直接作用¹⁹⁾など種々の報告があるが、Carmel⁷⁾、Eddy²⁰⁾、Putten²¹⁾、Brown⁵⁾らの報告に基づき、血管障害がその大きな要因になるのではないかと考えて本実験を行なった。

癌細胞は、血管内皮に付着すると、血管内皮細胞の接合部へ偽足を挿入させて離開させ内皮細胞下へもぐりこむ^{5,21,22,30)}、(白血球も同様な様式で血管外へ遊走する^{3,23)}。)次に、基底膜を融解^{28,35)}してさらに侵入を

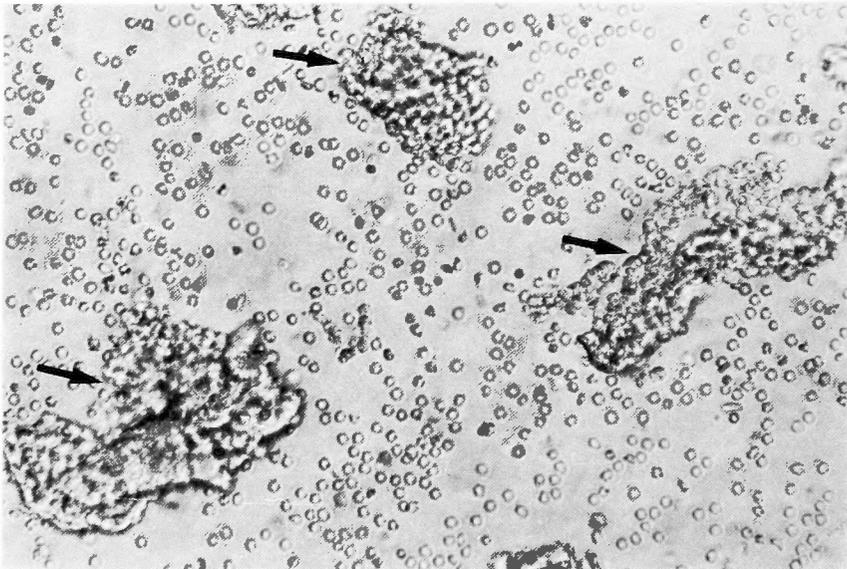


写真7 内皮細胞の Extracellular matrix (矢印) (ECM)。ピペティングにより底面より剝離しかかっている。大部分の内皮細胞は pH の変化により障害され浮遊している。(20 \times 10)

続け、着床を完了する。ところで、癌細胞は血管内皮細胞に対してはほとんど付着しないが^{21,35)}、基底膜へは非常に付着しやすいという^{28,35)}。従って、内皮細胞間隙の開裂、または内皮細胞の剝離により基底膜が露出した場合にはじめて癌細胞の血管壁付着が容易に達せられるであろう。この基底膜は、培養血管内皮細胞下に形成される Extra-cellular matrix (ECM) と同一のものであることか、Vlodavsky³⁵⁾ により証明されている。この報告の中で、ECM はコラーゲン (type IV, V)、アミン、ファイブロネクチン、Sulphated proteoglycan で構成されていると述べている。培養内皮細胞に障害を与えると、内皮細胞は培養皿 (プラスチック、ガラス) より剝離して遊離し、底面に ECM が残ることが観察される。(写真7)

薬剤による血管内皮細胞の障害については種々の報告が行なわれている。ヒスタミンでは、血管内皮細胞間に間隙を生ずるという^{11,24)}。コラーゲナーゼ、トリプシンの双方で著明な血管内皮細胞剝離が起り、トロンピンでは内皮細胞が収縮して基底膜が露出するという²⁶⁾。また、炎症時に白血球が血管外へ遊走する時には、癌細胞同様に内皮細胞間隙を押し広げて遊走するが、この時にも一時基底膜が露出するわけである^{3,23)}。Janoff は、白血球のプロテアーゼに強力な血管障害作用があると述べている¹⁹⁾

著者は、MMC に直接の血管内皮障害性があるか否かを確かめるために、高濃度の MMC (100 $\mu\text{g/ml}$) を無血清で30分間培養血管内皮細胞に作用させてみたが、全く変化が見られず、内皮細胞はその後増殖傾向を示した。従って高濃度であっても短時間であれば、MMC そのものが血管内皮を障害しないと理解した。もっとも、持続的に MMC を血管内皮細胞に作用させると、100 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ では18時間後に、1000 $\mu\text{g/ml}$ では4時間後に障害が認められたので長時間の作用では、直接障害の機作も存在すると判断された。

しかし、MMC を 30 mg の大量ワンショット静注した場合の血中レベルは、最初の数分間は非常に高濃度であるが、30分後に 0.8 $\mu\text{g/ml}$ 、60分後で 0.5 $\mu\text{g/ml}$ と非常に低濃度になるという報告¹⁰⁾ と考え併せれば、生体内で MMC が血管内皮細胞へ及ぼす作用機序が先に述べた直接作用であるとは考え難い。

それでは、MMC が血小板、または白血球を介して血管内皮細胞障害に働きはしないだろうか。血小板には、Gimbrone¹²⁾ により血管内皮細胞を保護する作用のあることが示されている。また、Marcum²⁵⁾ は、血

小板の放出反応は、癌細胞と基底膜との付着に影響を与えないと述べている。

これに反して、白血球に含まれる成分には、著明な内皮障害のあることが報告されている^{6,15,16,19,29,32,33)}。Janoff¹⁹⁾ は、カテプシン、トリプシンと異なる、中性で最大の活性を有し、熱に不安定なプロテアーゼが白血球中にあり、強い組織障害性を持つと述べている。青木 (Y)¹⁾ は、これが白血球のミトコンドリア分画中にあるセリンプロテアーゼだと報告しており、リウマチ様関節炎、慢性骨髄性白血病で血中濃度が増えるといっている。青木 (和)²⁾ は、網膜中心静脈閉塞、ペーチェット病でもセリンプロテアーゼの血中濃度が上昇していると述べている。

補体³²⁾、エンドトキシン⁶⁾ は白血球を介して血管内皮障害を起こすと報告されている。著者の実験では、無血清で白血球と血管内皮細胞を30分間作用させても全く障害は起こらなかったが、MMC 100 $\mu\text{g/ml}$ を同時に作用させた場合、著明な障害が起こった。また、無血清で白血球のみに MMC を30分間作用させた場合は、白血球にはコントロールと比べて障害の程度が有意に大きかった。(P<0.01) これにより、MMC が白血球に働きかけて何らかの障害物質を放出しているらしいと推論された。

セリンプロテアーゼは、プロテアーゼインヒビターでその作用が抑制されているといわれている。本実験で、白血球と MMC を同時に短時間、血管内皮細胞に作用させた場合、血清無添加だと内皮障害が非常に強いのに比較して、血清添加の場合は、障害の程度が非常に軽減されるのが観察され、血清中のおそらくプロテアーゼインヒビターが、白血球より放出されて血管内皮を損傷するおそらくセリンプロテアーゼの作用を中和すると考えられた。

なお、長時間 MMC と白血球を血管内皮細胞に作用させた場合には、血清による内皮障害中和作用は発現しなかったが、このことは、長時間 MMC を作用させることによる MMC の直接障害作用までは血清が抑制しないためと考えられる。

本実験において、大量の MMC で前処置された生体の血管内皮細胞は障害を受けるが、この機作は MMC により放出を促進された白血球内のおそらくプロテアーゼが内皮細胞を障害することによるものであることが示されたが、その結果この障害が血中の癌細胞の血管内面への付着、ひいては血管外に転移を形成することを容易ならしめるであろうことが示唆されるのであ

る。

結 語

a. ヒト臍帯静脈より採取した培養血管内皮細胞に対して、高濃度 MMC の短時間接触は細胞障害を引き起こさなかった。

b. さらに、これに白血球を添加すると、著明な細胞障害が認められた。

c. 上記の障害作用は、20%の血清を添加することで著明に抑制された。

d. 内皮細胞は、白血球のみでは全く障害されなかった。

以上により、高濃度 MMC は白血球を介して血管内皮細胞障害を起こすことが示されたが、MMC により刺激、または障害を受け放出された白血球中のセリンプロテアーゼが血管内皮を障害すると推察される。更に生体に対するワンショットの MMC 大量投与は、血管内皮障害を惹起し、流血中の癌細胞の壁付着を促し転移結節数の増加をもたらすことが推定される。

稿を終るにあたり、御指導・御校閲を賜った京都大学医学部外科学第二講座恩師日笠頼則教授に深甚の感謝を捧げる。第一報に引続き今回も適切な御助言をいただいた東北大学抗酸菌研究所肺病部門佐藤春郎教授に対しても深甚なる感謝を捧げる。また、京都大学医学部外科学第二講座熊田 馨講師の終始かわらぬ御協力はわすれられない。

文 献

- 1) Aoki Y: A new protease inactivating S-aminolevulinic acid synthetase in mitochondria of human bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* **65**: 567-574, 1975.
- 2) 青木和加: 若年者の中心静脈閉塞症の発症機転と IM プロテアーゼ. *日本眼科紀要* **29**: 157-163, 1978.
- 3) Beesley JE: Granulocyte migration through endothelium in culture. *J Cell Sci* **38**: 237-248, 1979.
- 4) Boyüm A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *J Clin Lab Invest* **21** (Suppl. 97) 77-89, 1968.
- 5) Brown JM: The effect of lung irradiation on the incidence of pulmonary metastases in mice. *Br J Rad* **46**: 613-618, 1973.
- 6) Coalson JJ: The pulmonary ultrastructure in septic shock. *Exp Mol Path* **12**: 84-103, 1970.
- 7) Carmel RT: The effect of cyclophosphamide and other drugs on the incidence of pulmonary metastases in mice. *Cancer Res* **37**: 145-151, 1977.
- 8) Dingerms KP: Invasion of liver tissue by blood borne mammary Carcinoma cells. *JNCI* **53**: 1813-1824, 1974.
- 9) Eddy HA: Tumor vascular responses following irradiation. *Microvascular res* **20**: 195-211, 1980.
- 10) 藤田 浩: 抗癌剤の Bioassay ついて. *メディヤサークル* **92**: 1-2, 1967.
- 11) Fox, J: Action of Histamine on the mesenteric microvasculature. *Microvascular res* **19**: 108-126, 1980.
- 12) Gimbrone, M. A. Jr: Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet rich medium. *Nature* **222**: 5, 1969.
- 13) Gasic GJ: Platelet-tumor cell interactions in mice. The role of platelets in the spread of malignant disease. *Int J Cancer* **11**: 704-718, 1973.
- 14) Haudenschild, CC: Fine structure of vascular endothelium in culture. *J ultrastructure res* **50**: 22-32, 1975.
- 15) Henson PM: Complement fragments, alveolar macrophages, and alveolitis. *Am J Path* **97**: 93-105, 1979.
- 16) 堀 久枝: 組織障害における好中球性プロテアーゼの関与. *炎症* **1**: 82-86, 1980.
- 17) Iyer VN: A molecular mechanism of mitomycin action linking of complementary DNA strands. *Proc NAS* **50**: 355-362, 1963.
- 18) 川口隆憲: 腫瘍細胞の脳血管即時通過性と脳転移形成の相関に関する実験的研究. *福島医誌* **24**: 45-54, 1975.
- 19) Janoff A: Vascular injury and lysis of basement membrane in vitro by neutral protease of human leucocytes. *Science* **161**: 702-704, 1968.
- 20) Kondo T: Production of metastases by treatment with carcinostatic agents. *Nagoya J med sci* **36**: 1-10, 1973.
- 21) Kramer RH: Interactions of tumor cells with vascular endothelial cell monolayers: A model for metastatic invasion. *Proc. Natl Acad Sci USA* **76**: 5704-5708, 1979.
- 22) Locker, J: Ultrastructural features of invasion in chick embryo liver metastasis of Yoshida Ascites Hepatoma. *Cancer Res* **30**: 1632-1644, 1970.
- 23) Marchesi VT: Electron microscopic observations on the emigration of leucocytes. *Quart J Exp Physiol* **45**: 343-348, 1960.
- 24) Majno G: Endothelial contraction induced by Histamine-type mediators. An electron microscopic study. *J cell Biol* **42**: 647-672, 1969.
- 25) Marcum JM: The interaction of platelets, tumor cells, and vascular subendothelium. *J Lab Clin Med* **96**: 1946-1053, 1980.

- 26) Mohammad SF: A human model for study of blood-vascular wall interactions. *Arch Pathol Lab Med* **105**: 62-66, 1981.
- 27) 村澤賢一: マイトマイシンCによる癌転移増強作用. *外科宝函* **52**: 670-679, 1983.
- 28) Nicolson GL: Metastatic tumor cell attachment and invasion assay utilizing vascular endothelial monolayers. *J Histochem Cytochem* **30**: 214-220, 1982.
- 29) 永原貞郎: ARDS の肺における初期病変(血管内白血球集積とその意義) *SCOPE* **22**: 8-9, 1983
- 30) 中村久也: 浸潤と転移. *腫瘍病理学* (管野, 小林編) 61-71, 朝倉書店, 東京, 1969.
- 31) Putten LM: Enhancement by drugs of metastatic lung nodule formation after intravenous tumor cell injection. *Int J Cancer* **15**: 588-595, 1975.
- 32) Sacks T: Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes. *Clin Invest* **61**: 1161-1167, 1978.
- 33) 竹内光輝: 酵素-酵素インヒビター-complex の炎症における役割. *炎症* **1**: 77-81, 1980.
- 34) 宇野慶三: マイトマイシンの化学構造と生物活性. *ファルマシア* **1**: 560-564, 1965.
- 35) Vlodaysky I: Tumor cell attachment to the vascular endothelium and subsequent degradation of the subendothelial extracellular matrix. *Exp cell res* **140**: 149-159, 1982.
- 36) Wood S: Experimental studies of the intravascular dissemination of ascitic V₂ carcinoma cells in the rabbit. With special reference to fibrinogen and fibrinolytic agents. *Bull Scienc Acad Med Soc* **20**: 92-121, 1964.