

岡山医学会雑誌

第84巻7, 8合併号 (第932, 933号)

昭和47年8月30日発行

イヌの小腸から抽出したコルニン分画の 細胞分裂抑制作用に関する研究

牧 山 政 雄

岡山大学医学部第一生理学教室

(指導: 西田勇教授)

(昭和47年7月20日受稿)

緒 論

種々の動物組織から細胞分裂の調節物質を抽出する試みは、近年多くの発表に接する事が出来る。そして系統的な研究が現在も行われつつあるものは大別して次の様に分類する事が出来る。一つは Bullough & Lawrence (1964, 1968)¹⁾²⁾³⁾に代表される "Chalone" と総称される物質である。chalone は動物の種による差が無く、組織特異性のある細胞分裂抑制物質で種々の組織から水で抽出され Visking の cell-o-phane 膜に対して非透析性で熱に対して安定な物質で、分子量約25,000の glyco-protein である。

次は Szent-Györgyi 等 (1963, 1965)⁴⁾⁵⁾ によって抽出された retine と promine と呼ばれる物質である。これ等は最初子牛の胸腺から抽出され、retine は細胞分裂を抑制し、promine は細胞分裂を促進する性質を持ち、この両者の balance によって生体内の細胞増殖が調節されているのではないかと考えられた。その後 retine は大動脈、腱や骨格筋など分裂像の少ない組織からも抽出されるという報告があったが、ヒトの尿からも抽出され、この本態は methyl-glyoxal ではなからうかといわれている。この他 retine は海産動物からも抽出されているが胸腺や尿から抽出された物質とは化学的性質は異っている。

更に Isaacs & Lindenmann (1957)⁶⁾ によって命

名された "interferon" と総称される物質がある。この物質は熱で不活性化した virus を発生中のニワトリの胚に注射し、その結果産生されるこの virus の増殖阻止作用を持った蛋白である。interferon は分子量約18,000~100,000、或いはそれ以上で、熱に不安定で紫外線の照射によっても不活性化され、等電点は pH6.8~8.0 にある。

又昔から多くの人によって報告されつつある hormone 類もあげられる。たとえば adrenaline, androgen や ACTH 等である。hormone 類は種々の生物学的作用をあわせもっているため細胞分裂調節物質として論ずる場合には、複雑さを免れないきらいがあるのはやむを得ない。

一方我々の教室では、最初縮腫物質として抽出したコルニンが、その生体内分布を調べているうちに分裂像の少ない組織から抽出した場合に活性の強い事がわかり、コルニンの細胞分裂に及ぼす影響が研究されはじめた。初期の研究では細胞が大きく、かつ完全な同期分裂を行なうウニの受精卵が分裂細胞の材料として用いられ、コルニン分画は縮腫作用の強いウシの角膜及び家兎の骨格筋から抽出した物質が用いられた。その後西田等 (1966)⁷⁾ はイヌの小腸の筋層から抽出したコルニン分画 (イヌ小腸コルニン。CIC と略す) が二ヶ月のヒトの胎児から発生した初代培養細胞や Don 細胞 (ハムスターの diploid

fibroblast) の増殖に対しては培養液中に1%の濃度にしてもなんらの影響を与えないのに対して、SV40のDNAで誘起したNA-FS細胞(ハムスターの皮下組織に誘起されたfibrosarcoma)の増殖に対しては0.5%の濃度ですでに完全に細胞を死滅さす作用のある事を報告した。又Ohya (1967)⁸⁾はEhrlich腹水癌細胞の増殖に及ぼす筋肉コルニンとCICを比較したところ、両コルニン共にその増殖を抑制するが、CICの方がより効果的である事を報告した。木本等(1968)⁹⁾も培養細胞であるJTC-11細胞の増殖に対して、イヌ、ウシ、ブタの小腸から抽出したコルニン分画の作用を調べたところ、イヌの小腸コルニンが最も細胞増殖の抑制作用が著しく、又この細胞を動物に移植した場合においても、CICが最も増殖抑制効果が大きい事を報告した。

著者は今回、ヒトの子宮頸癌由来の培養細胞であるHeLa S₃系の細胞を組織培養し、その増殖に及ぼすイヌ小腸コルニンの影響を調べた。そしてCICを透析によって非透析性分画、透析性分画に分け、さらにSephadex columnにより細分画、或はDiafilterにより分子量の差による細分画を行ない、有効分画の精製を試み、分画中の-SH基の酸化に対してはDTTによる再賦活を行ない、コルニンの蛋白部分が必要か否かはtrypsin処理を行なってその効果を調べ、興味ある結果を得たのでここに報告する。

材料及び方法

I-1. イヌ小腸コルニン (canine intestine cornin, CIC) の抽出

小腸はイヌを屠殺直後に摘出し、粘膜を除去してdeep freezer box (-15°C)に凍結保存したものを抽出の材料とした。抽出は金尾(1965)¹⁰⁾の方法に従い、100°C 10分間の熱水抽出液を用いエタノール濃度70%から90%の間で沈澱したものを更にエタノール、メタノール、アセトン、エーテルの順に洗浄、乾燥し得られたコルニンをcrude CICとしdesiccaterに保存した。

I-2. 透析によるCICの分画

CICの透析は3% crude CIC水溶液をcollodion bag (sartorius membrane filter) に入れ4°Cの水室で吸引し48時間後bagを通過したものをD-fraction(dialysable)とした。更にbag内に残ったものはcellophane tube (Visking Co.)に入れ、0°C~4°Cで脱イオン水に対して透析し数回外液の交換を行ない、tube内に残ったものをN-fraction(nondialysa-

ble)とした。それ等を直ちに凍結乾燥しdesiccaterに保存した。

I-3. DTT処理

crude CICの2%水溶液を弱アルカリ性にpH調整を行ない、0.01M DTTになる様にDTTを加え室温で1時間攪拌し冷凍遠沈機で9,000rpm 10分の遠沈後、上清にエタノール濃度90%になる様にエタノールを加え、この混合液と等量のエーテルを加え9,000rpmで10分間遠沈し、沈澱をエーテル、アセトンで洗浄し、乾燥したものを氷室内のdesiccaterに保存した。

I-4. Diafilterによる分画

Diafilter (日本真空技術株式会社製Model MC-2型)を用いて分子量によるcrude CICの分画精製を試みた。filterは55,000(Abcor社 HFA300), 20,000 (Abcor社 HFA200), 10,000 (日本真空技術株式会社G-10T)の三種を用いた。crude CIC 3gを100mlの脱イオン水に溶かし、10,000rpmで30分の遠沈後、上清をHFA300のfilterを用いて3kg/cm²の窒素ガスの圧でcrude CICの分子量55,000以下の成分の濾過を行なった。コルニン液が十分濃縮された後15mlの脱イオン水を加え再び濾過濃縮し十分濃縮された後に15mlの脱イオン水を加え濃縮する操作を行ない、chamberに残った分子量55,000以上の成分の濃縮液を凍結乾燥にまわした、濾液についてHFA200のfilterを用いて同様の操作を行ない、分子量55,000から20,000の成分を得た。又HFA200のfilterを通過した分子量20,000以下の成分の細分画をG-10Tのfilterを用いて行ない、分子量20,000から10,000の成分を得た。以上の操作は0°C~4°Cの水室内で行なった。G-10Tのfilterを通過した分子量10,000以下の成分はrotary evaporaterで濃縮し凍結乾燥した。得られた4成分の回収率は85%で、その内分子量55,000以上は34.5%、分子量55,000から20,000のものは2.4%、分子量20,000から10,000のもの18.1%、分子量10,000以下のもの45%であった。

I-5. Sephadex columnによる分画

Sephadex G200をM/15 phosphate bufferで膨潤させ、直径3cmのガラス管に40cm充填した。Diafilterを用いての濾過濃縮によって得られたCICの分子量55,000以上と思われる成分240mgをM/15 phosphate buffer 6mlに溶かし、10,000rpmで10分の遠沈操作後、上清5mlをSephadex G200 40cmのcolumnに重層の後M/15 phosphate bufferで

毎秒4 mlの速さで流しfraction collectorで集めた。

Fig. 1 Ultraviolet absorption spectra of CIC MW over than 55,000 component fractionated by Sephadex G200 column.

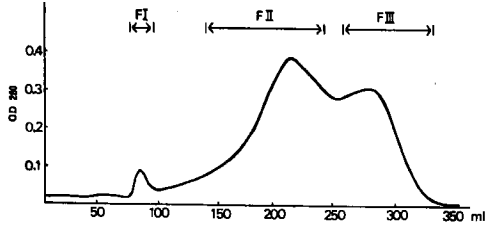
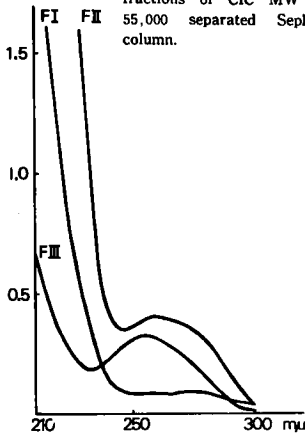


Fig. 2 Ultraviolet absorption curves of 3 fractions of CIC MW over than 55,000 separated Sephadex G200 column.



Sephadex G200でコルニンを細分画した pattern を示す。(図1)。試験管番号の各分画はOD260 μ で測定し、3つの分画を得、それぞれの紫外部の吸収曲線を示す。(図2)。FIは特別な吸収の極大、極小を有せず、FIIは吸収の極小を246 μ に、極大を258 μ に有する。又FIIIは吸収の極小を234 μ に、極大を256 μ に有する。得られた3分画を0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ Cの氷室内でcellophane tubeを用いて3日間、1日2回脱イオン水に対して透析脱塩Rotary evaporatorを用いて濃縮、凍結乾燥した。回収率は約74%でその内F I 2.5%、F II 90.0%、F III 7.5%であった。

II-1. 培養細胞及び培養液

CICの分裂抑制効果検定に用いた培養細胞は37 $^{\circ}$ Cに保たれたふ卵器内で5 $^{\circ}$ の傾きを持った試験管内で静置培養されているヒト子宮頸癌由来のHeLa S3 strainである。細胞は大体一週間に一度 Millipore filterで濾過した無菌的な0.25% trypsin液 [Dulbecco 燐酸緩衝塩類溶液よりCaCl₂、MgCl₂·6H₂Oを除いた液 (PBS(-))と略] にDifco社製のtrypsin 1:250を0.25%の濃度に溶かしたものでtrypsin消化法により継代維持されている。

培養液はEagle MEM (大五栄養化学研究所)に

56 $^{\circ}$ Cで30分の加熱により非動化したウシ血清を10%含む液 (Eagle MEM BS10と略す)を用いた。

II-2. 同型培養法

細胞の植込みは試験管内静置培養しているHeLa細胞の培養液をすて、37 $^{\circ}$ Cに加温した0.25% trypsin液を5分間作用させ、pipettingにより細胞を浮遊させる。この細胞浮遊液に等量のEagle MEM BS10を加えてtrypsinの作用を停止させ、1,000rpmで4分の遠沈後静かに上清をすて、Eagle MEM BS10を加えて細胞を再浮遊させ、生細胞数を血球計算板で算定する。そして所定の細胞数の濃度になるようにEagle MEM BS10を加えて稀釈した細胞浮遊液を試験管に1mlずつ分注し、4本を一単位として同型培養する。この内、任意の4本をぬき取り、細胞数を試験管1本当たり6回数え、最多最少の値を除いた4回の平均細胞数をその試験管の細胞数とし、4本の平均を植込時の細胞数とした。

II-3. コルニンの添加

HeLa細胞植込後2日目に同型培養している試験管の内の任意の4本をぬきとり、37 $^{\circ}$ Cに温めた0.25%のtrypsin液を20分間作用させ、pipettingによって得た細胞浮遊液の細胞数を1本当たり6回数え、最多最少を除いた4回の平均を植込後2日目のその試験管の細胞数とし、4本の平均を植込後2日目の細胞数とした。CICはEagle MEM BS10に所定の濃度に溶かし、10,000rpmで10分の遠沈後上清をMillipore filter (0.45 μ pore size)で濾過滅菌し、37 $^{\circ}$ Cに温めて同型培養している試験管の培養液をすてた後に所定の量を加えて培養した。増殖率の立直を調べる実験では、植込後2日目に予め調製した0.5% crude CIC Eagle MEM BS10を2日間 preincubateした培養液及び2日間HeLaを培養していた0.5% crude CIC Eagle MEM BS10を培養液として加え実験した。又CICのtrypsin処理はDiafilterで分けたCICの分子量55,000以上の成分を0.5%の濃度になる様にEagle MEM BS10に溶かした後に0.025%のtrypsin濃度になる様にtrypsinを加えMillipore filterで濾過滅菌後37 $^{\circ}$ Cのふ卵器で2日間 preincubateしたコルニン液を用いた。

II-4. CICの細胞分裂抑制効果の判定

コルニンを加え培養後2日目及び実験によっては4日目にも37 $^{\circ}$ Cに温めた0.25% trypsinを各試験管に2mlずつ加え20分間作用させた後にpipettingし細胞浮遊液とし細胞数を算定した、1本当たり6回数え、最多最少の値を除いた4回の平均をその試験管の細胞数とし、4本の平均をその系の細胞数としてコル

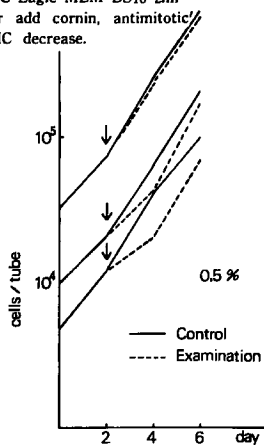
ニンの細胞分裂抑制効果の判定をした。

実 験 成 績

I. crude CICの細胞分裂抑制効果

a. 静置培養している HeLa 細胞を trypsin 消化法によって浮遊させ 1,000rpm で 4 分の遠沈によって細胞を集め、Eagle MEM BS10 に再浮遊させ細胞数を算定した。この細胞浮遊液を Eagle MEM BS10 で細胞濃度を 1 ml 当り 5,000 個、10,000 個、30,000 個となる様に稀釈し、各々 24 本ずつ 3 系、合計 72 本の試験管に 1 ml ずつ分注し、37℃ のふ卵器に 5° の傾斜角をもって静置同型培養した。各系任意の 4 本をぬき取り、細胞数を算定し 4 本の平均を植込時の細胞数とした。植込後 2 日目に各系任意の 4 本をぬき取り 20 分間 0.25% trypsin を作用させて細胞を浮遊させ、細胞数を算定し、4 本の平均を各々の系の 2 日目の細胞数とした。crude CIC を 0.5% の濃度になる様に Eagle MEM BS10 に溶かし、10,000 rpm で 10 分の遠沈後 Millipore filter (0.45μ pore size) で濾過滅菌し 37℃ に温めた。各系培養液をすて 8 本に 0.5% crude CIC Eagle MEM BS10 を 2 ml ずつ分注して実験群とし、対照として各系 8 本ずつに 37℃ に温めた Eagle MEM BS10 を 2 ml ずつ分注した。植込後 4 日目に各系実験群 4 本、対照群 4 本をぬき取り、20 分間の trypsin 処理で細胞を浮遊させて細胞数を算定し、4 本の平均を各々の系の実験群及び対照群の細胞数とした。そして植込後 6 日目に残りの試験管の細胞数と同様の trypsin 処理で算定し、各系実験群、対照群の 4 本ずつの平均を各々の系の細胞数とした。

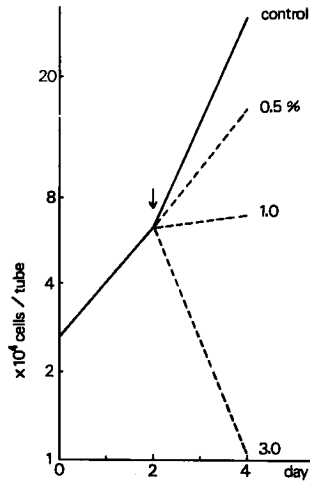
Fig. 3 Antimitotic effect of CIC. a. control medium Eagle MEM BS10 2ml examination medium 0.5% CIC Eagle MEM BS10 2ml 2 days after add corrin, antimitotic effect of CIC decrease.



結果は図 3 に示す様に各系の対照群の増殖率は殆んど差が見られない。そして細胞数が少ない方が同じコルニン濃度でもより抑制効果は高い。そして抑制効果は 4 日目以降は低下している。

b. 細胞濃度 $3 \times 10^4 / \text{ml}$ の細胞浮遊液を 4 系 24 本の試験管に分注し、37℃ のふ卵器で同型培養し、その内任意の 4 本の細胞数を算定し、その平均を植込時の細胞数とした。植込後 2 日目に trypsin 処理により任意の 4 本の細胞数を算定し、その平均を 2 日目の細胞数とした。crude CIC を 0.5%、1%、3% の濃度になる様に Eagle MEM BS10 に溶かし、10,000rpm で 10 分の遠沈後 Millipore filter で濾過滅菌し、同型培養している試験管の培養液をすてた後に各々の濃度の crude CIC Eagle MEM BS10 を 4 本ずつ 2 ml 分注し、対照には Eagle MEM BS10 を 2 ml 分注して培養し、植込後 4 日目に細胞数を算定した。

Fig. 4 Antimitotic effect of CIC. b. control medium Eagle MEM BS10 2ml examination medium. 0.5% CIC Eagle MEM BS10 2ml 1% CIC Eagle MEM BS10 2ml 3% CIC Eagle MEM BS10 2ml



結果は図 4 に示す様に同一の細胞濃度でもコルニン濃度が高い方が抑制効果は大きく、3% のコルニン液では細胞は死滅して細胞数は少なくなっている。

c. 32 本の試験管に $3 \times 10^4 / \text{ml}$ の細胞浮遊液を 1 ml ずつ分注し、任意の 4 本の細胞数を算定し、4 本の平均を植込時の細胞数とした。植込後 2 日目に任意の 4 本をぬき取り細胞数を算定し、4 本の平均を 2 日目の細胞数とした。0.5% の濃度になる様に crude CIC を Eagle MEM BS10 に溶かし、10,000rpm で 10 分の遠沈後 Millipore filter で濾過滅菌し、培養

液をすてた試験管に2ml, 4ml, 6ml各4本ずつ分注した。そしてEagle MEM BS10を2ml, 4ml, 6ml各4本分注したものを対照として用いた。植込後4日目に細胞数を算定した。

Fig. 5 Antimitotic effect of CIC. c.
I : medium 6ml II : medium 4ml
III : medium 2ml
control medium Eagle MEM BS10
examination medium
0.5% CIC Eagle MEM BS10

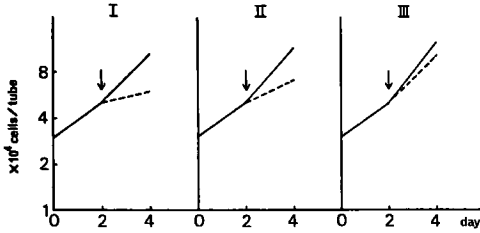


図5に示す様に培養液量が多い程即ち、含まれるコルニンが多い程抑制効果は高い。そして対照群は培養液量が少ない方が増殖率は高かった。

d. コルニンの分裂抑制効果は先に a. の実験で述べた様に、添加後2日目に降は減弱している。この抑制効果の低下の原因を調べるために以下の実験を行なった。

37℃で2日間の加温の影響を調べるため0.5% crude CIC Eagle MEM BS10を調製後2日間37℃のふ卵器でpreincubationしたコルニン液を細胞植込後2日目の4試験管に2mlずつ分注し、植込後4日目に細胞数を算定した。対照としては直前に調製した0.5% crude CIC Eagle MEM BS10とコルニンを含まないEagle MEM BS10を2mlずつ分注して培養し、植込後4日目に細胞数を算定した。

Fig. 6 Antimitotic effect of CIC. d.
control medium Eagle MEM BS10
examination medium
0.5% CIC Eagle MEM BS10
a. 2 days preincubated cornin
medium in 37°C.
b. cornin medium made just before
medium change.

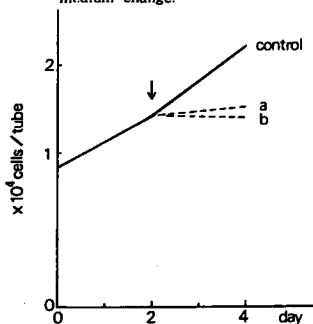
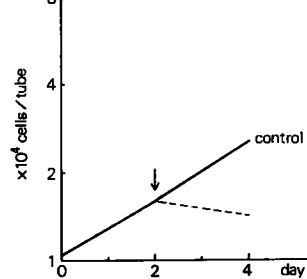


図6に示す様にコルニンは直前に調製したものと2日間 preincubate したものと殆んど差が無く、いずれも同様の抑制効果を示した。又コルニンが培養中

に破壊される事が考えられる。3日間HeLa細胞に作用させていた0.5% crude CIC Eagle MEM BS10を回収し、再遠沈、Millipore filterで濾過滅菌後、同型培養している4本にコルニン濃度を細胞10,000当り5mgとなる様に分注した。対照としては2日間培養していたEagle MEM BS10を実験群と同量ずつ4本に分注し、4日目に細胞数を算定した。

Fig. 7 Antimitotic effect of CIC. e.
control medium Eagle MEM BS10
examination medium
0.5% CIC Eagle MEM BS10



結果は図7に示す様に2日間培養後のコルニン液もHeLa細胞の分裂を抑制している。以上の実験によりコルニンは2日間の培養によって破壊されず、加温による影響も殆んど無い。そして a. の実験で示された増殖率の立直りは細胞のadaptationの一種ではないかと考えられる。

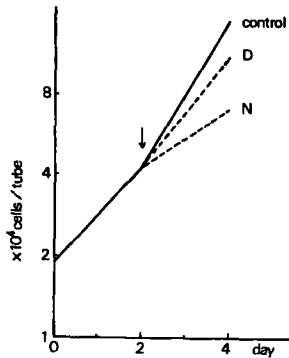
II. 透析膜による crude CIC の精製物の抑制効果
crude CICの3%水溶液をcollodion bagに入れ、4℃で48時間吸引濾過を行ない、膜を通過した成分をD-fractionとし、膜を通過しなかった成分を更に cellophane tubeに入れ脱イオン水に対して透析し、tubeに残った成分をN-fractionとし、各々を凍結乾燥し desiccater に保存した。20本の試験管に2×10⁴/mlの細胞浮遊液を1mlずつ分注し同型培養を行ない、任意の4本の細胞数を算定してその平均を植込時の細胞数とした。植込後2日目に同型培養している試験管の任意の4本の細胞数を算定した。

N-fraction及びD-fractionを最終濃度0.5%になる様にEagle MEM BS10に溶かし、10,000rpmで10分の遠沈後上清をMillipore filterで濾過滅菌し各々4本ずつ、コルニン添加時の細胞10,000当り5mgになる様にN及びDコルニン培養液を分注した。植込後4日目に細胞数を数え、4本の平均をその系の増殖率として効果の判定を行なった。

結果は図8に示す様にN-fractionの方がD-fractionよりも有効であるが、D-fractionも抑制効果を有する。

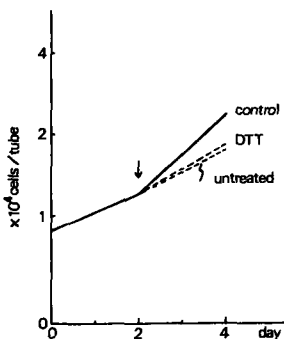
III. DTT処理した crude CIC の抑制効果

Fig. 8 Antimitotic effect of dialysable and undialysable fraction separated by cellophane tube.
D : dialysable N : nondialysable
control medium Eagle MEM BS10
examination medium
0.5% each fraction soluted Eagle MEM BS10



DTT処理し氷室内のdesiccaterに保存されたDTT処理CICとcrude CICを各々0.5%の濃度になる様にEagle MEM BS10に溶かし10,000rpmで10分の遠沈後Millipore filterで濾過滅菌した。20本の試験管に約 1×10^4 /mlの細胞浮遊液を分注し、その内の4本の平均を植込時の細胞数とした。植込後2日目に任意の4本の細胞数を算定し、上記のコルニン液を37℃に温め、各々4本ずつに2ml分注した。対照としてコルニンを含まないEagle MEM BS10を用いた。細胞植込後4日目に各試験管の細胞数を算定した。

Fig. 9 Antimitotic effect of DTT treated CIC.
control medium Eagle MEM BS10
examination medium
0.5% DTT treated CIC Eagle MEM BS10
0.5% untreated CIC Eagle MEM BS10



結果は図9に示す様にDTT処理したものと、未処理のものでは殆んど差が見られない。この事はCICによる細胞分裂抑制作用の活性の中心が-SH基に依存している割合が少ないためか、或は、desiccater中にCICを長期間保存しても-SH基は酸化に対して

安定な型をとっているためではないかと考えられる。

IV. Diafilterによって分けられたCICの分裂抑制効果

28本の試験管に 2×10^4 /mlの細胞浮遊液を1mlずつ分注して同型培養し、その内4本の平均の細胞数を植込時の細胞数とした。そして分子量55,000以上、20,000~55,000、10,000~20,000、10,000以下の各コルニンを0.5%の濃度になる様にEagle MEM BS10に溶かし、10,000rpmで10分の遠沈後Millipore filterで濾過滅菌し37℃に温めて植込後2日目の細胞10,000当り5mgとなる様に各々のコルニン液を4本ずつに分注し、対照としてEagle MEM BS10を4本に分注し、植込後4日目に細胞数を算定し、各成分の抑制作用の効果判定を行なった。

Fig. 10 Antimitotic effect of 4 components separated Diafilter membrane.
control medium Eagle MEM BS10
examination medium
0.5% each component soluted Eagle MEM BS10
A : component MW 20,000~10,000
B : component MW below 10,000
C : component MW 20,000~55,000
D : component MW over than 55,000

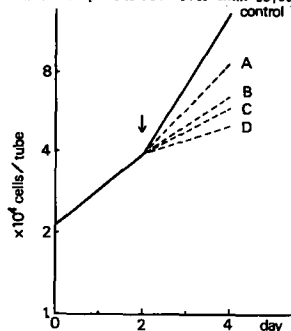


図10に示す様にDiafilterで分けたcrude CICの成分は分子量10,000~20,000、10,000以下、20,000~55,000、55,000以上の順で抑制効果が高い。

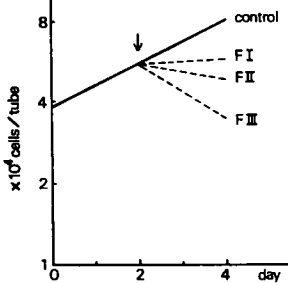
V. Sephadex columnによって分けた成分の分裂抑制効果

Sephadex G200の縦40cm、径3cmのcolumnによって分けたCICの分子量55,000以上の3分画を脱塩し凍結乾燥してdesiccaterに保存した。 5×10^3 /mlの細胞浮遊液を24本の試験管に1mlずつ分注して同型培養し、その内4本の細胞数の平均を植込時の細胞数とした。

Sephadex G220 columnで分けた3成分を0.5%の濃度になる様にEagle MEM BS10に溶かし、Millipore filterで濾過滅菌後37℃に温めた。細胞植込後2日目に同型培養している内から任意の4本の試験管をぬき取り、4本の平均の細胞数を植込後2日目の細胞数とした。この植込後2日目の細胞10,000当

り各成分 5 mg となる様に直前に調製し、37°C に温めた 0.5% コルニン液を各 4 本ずつに分注し、対照として Eagle MEM BS10 を 4 本の試験管に 1.5 ml ずつ加えて培養した。植込後 4 日目に細胞数を数えて各成分の効果の判定をした。

Fig. 11 Antimitotic effect of 3 fractions CIC MW over than 55,000 component separated Sephadex G200 column. control medium Eagle MEM BS10 examination medium 0.5% each fraction soluted Eagle MEM BS10

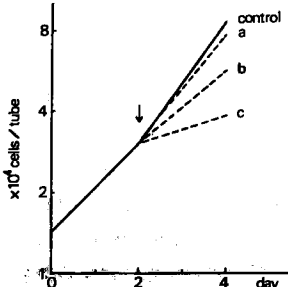


結果は図11の様に F I, F II, F III の順で抑制効果は高かった。

VI. trypsin 処理した CIC の抑制効果

Diafilter で分離した CIC の分子量 55,000 以上の成分を 0.5% 含む Eagle MEM BS10 に trypsin 濃度 0.025% になる様に trypsin 液を加え、Millipore filter で濾過滅菌する。そして trypsin を含まない CIC の分子量 55,000 以上の成分の 0.5% Eagle MEM BS10, Eagle MEM BS10 に 0.025% の trypsin を含んだ培養液、Eagle MEM BS10 のみの各培養液を作り、Millipore filter で濾過滅菌し、37°C のふ卵器内で 2 日間 preincubate して trypsin を作用させた。1 × 10⁴ / ml の細胞浮遊液を 24 本の試験管に 1 ml ずつ分注し同型培養する。植込んだ試験管の任意の 4 本をぬき取り細胞数の算定をし、その平均を植込時の

Fig. 12 Antimitotic effect of 0.025% trypsin treated CIC MW over than 55,000 component. control medium Eagle MEM BS10 examination medium a : Eagle MEM BS10 0.025% trypsin b : 0.5% CIC Eagle MEM BS10 0.025% trypsin c : 0.5% CIC Eagle MEM BS10



細胞数とする。植込後 2 日目に任意の 4 本の細胞数を数え植込後 2 日目の細胞数とし、2 日間 preincubate した各培養液をコルニン添加時の細胞 10,000 当り 5 mg となる様に 4 本ずつに分注し植込後 4 日目に細胞数を算定した。

trypsin 処理したコルニンは図12に示す様にコルニン単独のものに比して増殖率が高い。即ちコルニンの抑制効果は trypsin 処理する事によって低下している。

考 按

西田等 (1958)¹¹⁾ はネコの動眼神経を切断した後、長時間経過すると極度に散大した瞳孔が急に縮小し、スリット状になるという奇異な現象を発見した。そして縮瞳した眼の前眼房水をアトロピンで散大させた健康なネコの眼房に注入すると短時間に著しい縮瞳が起る事を見出し、そしてこの現象は角膜から強力な縮瞳物質が浸出したために起ったと考えた。そしてこの縮瞳物質は縮瞳作用の他にモルモットの摘出小腸運動を亢進させ、ガマの下肢血管を拡張させる作用のある事を報告した。福井 (1958)¹²⁾ はこの縮瞳物質をウシの角膜より熱水で抽出する事に成功しコルニンと命名した。そしてこの精製物の生化学的反応よりコルニンは蛋白質ないしアミノ酸であろうと推定した。又コルニンはエタノール 70%~90% の間の分画として得られ、クロロフォルム、エーテルに可溶、アセトンに不溶の物質である。宮原 (1959)¹³⁾ はウシ角膜より抽出したコルニンの生物学的性状について検討し、一般にコルニンは平滑筋運動を亢進させ、血管拡張作用、血圧下降作用のある事を報告した。門 (1961)¹⁴⁾ はウサギの骨格筋からもエタノール分画法によってコルニンを抽出し、この縮瞳物質コルニンはセロファン膜に対し透析性を有し、塩酸加水分解、トリプシン加水分解、100°C で 20 分の加温によって破壊されない事、又呈色反応でウサギ筋コルニンは蛋白質ないしアミノ酸であろうと思ひ縮瞳効果を有するアミノ酸とウサギ筋コルニンとの比較を paper-chromatography で行なった。得本 (1962)¹⁵⁾ は縮瞳作用を目印にコルニンの家兎の体内分布を調べた結果、コルニンは全ての臓器抽出液に存在するが、大部分は消化器系と中枢神経系、特に視床下部に含まれ、内臓臓器には殆んど含まれず、骨格筋、膀胱、子宮等に中等度含まれる事を発見した。これにより一般に分裂像の少ない組織にコルニンは多く含まれ、分裂像の多い組織にコルニンが少ない事からコルニンと細胞分裂との関係が注目された。日野 (1962)¹⁶⁾ はウシ角膜コルニンのウニ受精卵の初期分

裂に及ぼす影響について調べ、その著しい分裂抑制作用について報告した。西田、村上等 (1964)¹⁷⁾ Nisida & Murakami (1965)¹⁸⁾¹⁹⁾はウシ角膜コルニンをelectrophoresisとDEAE-cellulose columnで3つの分画に分け、各々の分画のウニ受精卵の分裂抑制作用について調べた結果、各分画は分裂抑制作用を有し、特にFraction II, Fraction IIIが抑制作用が強い事、Fraction II, Fraction IIIは260m μ に紫外外部吸収のpeakを持つがRNAの定性反応は陽性でDNA反応は陰性である。又、組織培養細胞やミトコンドリアのP:O ratioを低下させ、ウニ受精卵の核酸分画や³²PのDNA合成への取込みを抑制する。ミトコンドリアや組織片の酸素摂取やカタラーゼ活性に影響を及ぼさない。ウシ角膜コルニンは非透析性で核蛋白の一種でアデニンをベースとしている。ウサギ筋コルニンは透析性でDEAE-cellulose columnで3分画に分けられ、Fraction Iはウニ卵の分裂抑制作用を持たず、Fraction II, Fraction IIIが分裂抑制作用を持ち、Fraction IIはヒポキサンチンをベースとする核蛋白の一種である。ポーラログラフによる分析ではウシ角膜コルニン、ウサギ筋コルニン共に典型的な蛋白液を示し、溶液の状態を通過するとその波高を減少するがdesiccaterに粉末状で保存すると大変安定な物質である事を報告した。そしてコルニンはウニ卵の分裂装置の形成を阻害し、核酸合成を阻害するという。西田、村上等 (1966)⁷⁾、越宗 (1966)²⁰⁾はイヌ及びウサギの種々の組織からコルニンの抽出を行ない、その化学的分析を行なった結果、これ等のコルニンは角膜、筋より抽出したものによく似ており、独特の構造としてイノシンを基本として、アデニン、グアニンを持つが、ピリミジン基は持っていない。又他の組織から抽出したコルニンはウシ角膜コルニンやウサギ筋コルニンと比較するとウニ卵の分裂抑制効果は弱い。そして筋コルニンはラット肝、ウニ未受精卵への³²Pの取込みは余り抑制しないが、酸可溶性分画への取込みは $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ に押え、nucleotideへの取込みは完全に阻止し、DNA合成は $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ に抑制するがRNA合成には変化がなかった事を報告した。又、イヌ小腸コルニンの注目すべき分裂抑制効果については、イヌ小腸コルニンはSV40のDNAで誘発された線維芽細胞に著しい増殖抑制効果を示すが、ヒト胎児由来の正常と考えられるdiploidの線維芽細胞には影響を及ぼさないという悪性腫瘍とコルニンとの関係について考察した。原田 (1967)²¹⁾、T. Ohya (1967)⁸⁾はマウスを用いてin vivoでのコルニンの抗腫瘍効果を確か

めた。それによればイヌ小腸コルニン、ウサギ筋コルニン共にEhrlich 腹水腫瘍に対し毎日の腹腔内投与で増殖抑制作用を示し、特にイヌ小腸コルニンが強力であった。皮下投与では筋コルニンは無効で、イヌ小腸コルニンは雄にやや抑制作用を示した。C3H mouse mammary tumorに対しイヌ小腸コルニンの腹腔内投与は殆んど無効であるが、雌に対してはコルニンを増量するとやや有効であった。皮下投与で筋コルニンは無効で小腸コルニンは雄にやや有効であった。in vitroではJTC-11細胞に対しイヌ小腸コルニンは増殖を抑制し、腫瘍細胞は形態的变化を起した。寺坂 (1967)²²⁾は各種内臓臓器よりコルニンを抽出し、ポーラログラフ、紫外外部吸収、電気泳動、糖反応、燐、蛋白等を調べた結果、抽出した組織によるコルニンの化学的な差は殆んど無い事が判明した。ウニ卵を用いて調べた分裂抑制作用は抽出した組織によって最終有効濃度に相当差があった。木本等 (1968)⁹⁾はウシイヌ、ブタの小腸平滑筋よりコルニンを抽出してJTC-11に対する分裂抑制作用について比較した結果、イヌより抽出したコルニンが一番抑制作用が強く、透析膜によって得た分画は透析性、非透析性分画共に抑制効果は僅かでも認められず、マウスを用いた動物実験ではEhrlich 腹水腫瘍に対してイヌ小腸コルニンの抗腫瘍効果が最も大であって、治癒例も認めた。そしてタンニン酸処理ヒツジ血球を用いた凝集反応でイヌ小腸コルニンの抗原性は無視出来る事を報告し、ラット肝コルニンはin vitroでラット肝由来の短期培養細胞に対し著明な細胞増殖抑制作用を示すが、DAB腹水肝癌由来の細胞に対しては殆んど影響を認めず、イヌ小腸コルニンも同様の結果を示した。高橋 (1968)²³⁾はウサギ筋コルニンのウニ卵に対する影響を顕微鏡映写撮影法によって調べ、コルニンの濃度と分裂装置出現時間の関係について考察した。又 Kobayashi (1969)²⁴⁾、藤田 (1969)²⁵⁾はウニ卵、Ehrlich 腹水腫瘍細胞の核酸合成に対するコルニンの影響をアイソトープを用いて調べ、ウサギ筋コルニンはウニ卵の³H-uridineの取込みを増すが、³H-thymidine、³H-thymine、³H-uracilの取込みを抑制し、又、Ehrlich 腹水腫瘍の³H-thymidineの取込みを抑制する事を報告した。藤井 (1970)²⁶⁾はコルニンの臨床的応用の基礎的実験としてウサギ筋コルニンのマウス新生児に対する作用を調べ、ウサギ筋コルニンはマウス新生児に対し催奇形作用を持たず、妊娠も正常に維持される事を報告した。山田 (1970)²⁷⁾はラット肝コルニンのラット肝由来の細胞に対する影響を顕微鏡映

画像影法で調べ、細胞運動、細胞周期との関係について考察した。智片(1970)²⁹⁾はウサギ筋コルニンはヘルペスウイルスの増殖を抑制するという。コルニンはDNA合成を抑制する作用があり、細胞の核内で増殖するDNAウイルスであるヘルペスウイルスは間接的に増殖を抑制されたと考えた。又、in vitroで哺乳動物細胞のDNA合成に及ぼすコルニンの抑制効果は濃度0.5%で24時間³H-thymidineの取込みを測った場合殆ど1/2に減少し、この抑制効果は数時間で失われる。

コルニンは殆んど全ての組織の熱水抽出液よりアルコール分画法で得られる化学的には余り組織による差の無い物質である。しかしその細胞分裂に及ぼす影響はコルニン抽出の材料となった組織、用いた細胞により相当の差が有る。ウニ卵に対してイヌ小腸コルニンより抑制効果の高いウサギ筋コルニンが培養細胞に対しては抑制作用が弱いとか、イヌ小腸コルニンはSV40のDNAで誘起された線維芽細胞に対して著しい抑制効果を示すが、ヒト胎児由来の線維芽細胞に殆んど影響を与えず、ラット肝由来の正常細胞と考えられるRLM-1に対し抑制作用を示し、悪性と思われるC84BTに対し無効である。著者は最も一般に用いられている悪性腫瘍細胞由来のHeLa細胞にイヌ小腸コルニンが分裂抑制作用を有しており、その効果は濃度が等しくても細胞当りの投与量に関係し、投与量が多くなる程抑制効果は強くなる事を発見した。イヌ小腸コルニンは3年余りデシケータに保存していたものを使用したか、長期間の保存にもかかわらずコルニンは抑制作用を有して居り、DTT処理したものと未処理のもので抑制作用に差は殆んど無く、この事はコルニンの活性の中心が-SH基に必ずしも大切な関係を有していないか或いは-SH基が非常に安定な状態になっているものと考えられる。又、2日間の37°Cの加温によっても抑制作用は殆んど失われず大変安定な物質である事も発見した。透析膜を用いて分離精製では透析性成分、非透析性成分共にHeLa細胞に対して分裂抑制作用を有しているが、非透析性成分の方がより強力であった。Diafilterを用いての分離精製では分子量55,000以上のものが最も抑制作用が強く、続いて分子量20,000~55,000, 10,000以下, 10,000~20,000の順であった。分子量55,000以上の成分をSephadex G200で細分画したものでは最後に流出したFraction IIIが最も有効であった。これは分子量55,000のfilterを通過しなかった成分の内では比較的分子量の小さなものである事を示す。そして分子量55,000以上の

成分の分裂抑制効果は2日間37°Cのtrypsin処理で減弱した。

一方生体組織に含まれる分裂調節物質に関しては多くの報告がある。Heilbrunn等(1954, 1957)²⁹⁾³⁰⁾はウニ、カエル、ニワトリ、イヌ、ウシ、ネズミの卵巣よりヘパリン様の分裂調節物質を抽出した。この物質は透析可能で蛋白反応陰性、糖反応陽性であるという。Kidd(1953)³¹⁾、Broome(1961)³²⁾はL-asparaginaseが本態と考えられるモルモット血清及び肝抽出物の抗腫瘍作用について報告し、Stich(1960)³³⁾、Goutier et Bologna(1962, 1963)³⁴⁾³⁵⁾はラット正常肝のホモジネートを腹腔内に注射すると再生肝の分裂細胞が減少する事を報告した。これはDNA合成が抑制されたためと考えられ、この作用はホモジネートのミクロゾーム分画に存在し、再生肝のミクロゾーム分画には無いという。Menkin(1956)³⁶⁾はウニ卵巣より分裂促進物質と抑制物質を抽出した。促進物質は透析性でnucleotideの一種であり、抑制物質は非透析性で熱に安定であるという。Wolfson(1959)³⁷⁾はウニの卵、卵巣、精巣、腸等より耐熱性、charcol吸着可能、透析可能、chloroformで抽出不能の分裂抑制物質を抽出している。Szent-Györgyi et al.(1963, 1965)³⁸⁾は生体組織の分裂率は分裂促進物質と抑制物質のバランスの上に乗っていると考えた。彼等はthymusより促進物質prominと抑制物質retineを抽出した。そしてこれは尿、筋からも抽出可能で癌化傾向の少ない組織にretine活性が高い事を報告し、又正常細胞の方が腫瘍細胞より感受性が低いという。そしてretineの本態はmethylglyoxalの誘導体であろうと考えている。Bullough & Lawrence(1964, 1968)¹⁾²⁾³⁾は健康なヒト皮膚から細胞分裂を調節する物質を抽出し"chalone"と名づけた。chaloneはadrenalin, glucocorticoidと共同で更に強力な分裂阻害作用を示す。そしてchaloneは種々の組織に含まれ、抽出に用いた動物の種による種特異性を持たず、それに反し組織特異性を有し、水溶性、非透析性、耐熱性の物質で皮膚のchaloneは分子量25,000位のglycoproteinではないかと考えている。chaloneについてはRyötömaa & Kiviniemi(1968)³⁹⁾、Mohr & Althoff(1968)³⁹⁾等の総説もある。

Parshley(1965)⁴⁰⁾は大動脈、腱、筋のトリプシン消化物がin vitroでヒトの腫瘍、特にsarcomaに対し抑制作用を有するという。又、Miller & Kinsey(1967)⁴¹⁾はmouse sarcoma 180のnecrotic tissueがin vivoでマウスの腫瘍細胞に抑制的に働くという。

これは熱に安定で塩類液に不溶な、自然状態で lipid と考えられる物質で37℃, 4年間の貯蔵に失活せず, 正常な肝や脾にも存在するという。Glick & Goldberg (1965)⁴²⁾は正常な胸腺よりのDNAがleucemic mouce cellに対し抑制的に働き, Glick (1967)⁴³⁾は種々の材料から得たDNAが in vitro で細胞と DNA 抽出の材料となった組織との間に specificな阻害作用を有するという。Mirsky等(1961)⁴⁴⁾はRNA合成に及ぼすarginine riche histonについて, 又, Shah & Reilly (1967)⁴⁵⁾は lysine rich histon が DNA dependent RNA の抑制の結果, 腫瘍の増殖を抑制する事を報告した。

我国においても多くの研究がある。Nakahara et al. (1965)⁴⁶⁾はウシ肝抽出液の遠心分画上清が in vitro で Ehrlich 腹水腫瘍に抑制作用を示し, hexose が肝抽出液と同様の抗腫瘍性を持っているという。Suzuki (1959)⁴⁷⁾は鶏胚浸出液, 正常ラット肝浸出液がラット腹水肝癌に抑制作用を示す事を報告し, Terayama 等 (1966)⁴⁸⁾, Otsuka 等 (1967)⁴⁹⁾は正常肝ホモジネートの可溶性分画がラット腹水肝癌のDNA合成を著しく阻害するという。この分画成分は熱に不安定で, 長時間の透析で失活し, その失活は Zn, Mn の添加によって再賦活される蛋白体と考えられ, このDNA合成阻害物質の本態を Terayama は arginase と考え, Otsuka は 磷酸化過程を直接阻害する物質の存在を考えている。Sugihara & Araki (1966)⁵⁰⁾は平滑筋肉腫のアルコール分画成分の抗腫瘍作用について報告し, 又, 勝田等 (1968)⁵¹⁾はラット肝浸出液, ウシ肝浸出液, 鶏胚浸出液, 更に肝癌細胞自身の浸出液がラット腹水癌細胞に抑制的に働くという。

その他, 細胞の分裂を調節する生体物質についての報告は枚挙にいとまがない。そして現在も多くの

報告がなされつつある。化学的な分析結果からその組成がかなり明らかになっているものもあるが, 殆んどが粗製の状態にある。そしてより活性の高い分画を得るために種々の分画法が試みられつつある現状である。コルニン分画との差異もすでに多くの論文によって論じられ, これは西田, 村上 (1972)⁵²⁾によって総説されているが要するに, 以上述べた多くの研究者達の報告による種々の分裂抑制物質とはコルニンは異なる化学的性質の物質である。

結 論

1. イヌ小腸コルニンは HeLa 細胞の分裂を抑制する作用がある。コルニンが同一濃度の場合, 細胞数が少ない程その抑制効果は著しい。
2. イヌ小腸コルニンは大変安定な物質で, 長期間のデシケート保存, 2日間37℃の加温によっても抑制効果は失活しない。
3. cellophane tube の透析性で分けた透析性分画, 非透析性分画共に分裂抑制作用を有するが, 非透析性成分の方がより強力である。
4. Diafilter を用いて分子量による分画を試みた。分子量55,000以上のものが最も有効で, 続いて分子量20,000~55,000, 10,000以下, 10,000~20,000の順である。
5. 分子量55,000以上の成分の分裂抑制作用は2日間37℃のトリプシン処理で減弱する。
6. 分子量55,000以上の成分は Sephadex G200 column で3分画に分けられる。その内では分子量の小さいFraction III が最も抑制作用が強い。

稿を終るに当り, 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師, 西田勇教授ならびに村上哲英助教授, 大月恒助手に深甚なる感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) Bullough, W. S., and Lawrence, E. B. : Epidermal chalone and mitotic control in the VX2 epidermal tumor. *Nature*, **220**, 134, 1968.
- 2) Bullough, W. S., and Lawrence, E. B. : Melanocyte chalone and mitotic control in melanomata. *Nature*, **220**, 137, 1968.
- 3) Bullough, W. S., and Lawrence, E. B. : Mitotic control by internal secretion. (The role of the chalone-adrenalin complex.) *Exptl. Cell. Res.*, **33**, 176, 1964.
- 4) Szent-Györgyi, A., Hegyeli, A. and McLaughlin, J. A., : Cancer therapy. a possible new approach. *Science*, **140**, 1391, 1963.
- 5) Szent-Györgyi, A. : Cell division and cancer. *Science*, **149**, 34, 1965.
- 6) Isaacs, A., and Lindenmann, J. : *Proc. roy. Soc. Ser. B.*, **147**, 258, 1957.
- 7) 西田 勇, 村上哲英, 藤 芳子, 越宗猪一郎, 寺坂俊明, 高橋誠一郎, 木本哲夫: 生物学的活性

- polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響 (III), 細胞化学シンポジウム, 17, 207, 1966.
- 8) Ohya, T. : Studies on the effect of tissue substance "cornin" on transplantable malignant tumor in mice. *Acta Med. Okayama*, 21, 227, 1967.
- 9) 木本克彦, 藤田 興, 小林芳治, 高橋誠一郎, 藤井義信, 山田俊典, 智片芳子, 大月 恒, 村上哲英, 西田 勇 : 生物学的活性 Polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響 (IV), 岡山医誌, 80, 1211, 1968.
- 10) 金尾浩志 : 筋肉から抽出した CORNIN の細胞分裂抑制作用に関する研究. 岡山医誌, 77, 631, 1965.
- 11) 西田 勇, 中山 沃, 福井正男, 三好実三, 浜村寛 : 動眼神経切断後にみられる奇異なる縮腫現象について. 米子医誌, 9, 545, 1958.
- 12) 福井正男 : 角膜から抽出される縮腫物質 cornin に関する研究. 米子医誌, 9, 673, 1958.
- 13) 宮原昌彦 : 角膜から抽出される縮腫物質 CORNIN の生物学的性状について. 米子医誌, 10, 13, 1959.
- 14) 門 長生 : 角膜より抽出される縮腫物質 cornin に関する研究, 米子医誌, 12, 71, 1961.
- 15) 得本博允 : 縮腫物質 Cornin の体内分布について. 岡山医誌, 74, 679, 1962.
- 16) 日野道夫 : CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響. 岡山医誌, 74, 729, 1962.
- 17) 西田 勇, 村上哲英, 金尾浩志 : 生物学的活性 Polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響. 細胞化学シンポジウム, 14, 57, 1964.
- 18) Nisida, I., and Murakami, T. H. : Antimitotic action of cornin as a biologically active polypeptide I. *Biochemical properties of cornin.* *Acta Med. Okayama*, 19, 1, 1965.
- 19) Nisida, I., and Murakami, T. H. : Antimitotic action of cornin as a biologically active polypeptide II. *Physiological effect of cornin on dividing cell.* *Acta Med. Okayama*, 19, 11, 1965.
- 20) 越宗猪一郎 : ウニ卵及び再生肝の酸可溶性磷酸分画におよぼす筋肉 CORNIN の影響 日本生理誌, 28, 308, 1966.
- 21) 原田英樹 : 筋肉 cornin の抗腫瘍効果とその in vivo 応用への基礎的研究. 岡山医誌, 79, 89, 1967.
- 22) 寺坂俊明 : 各種臓器より抽出した CORNIN の細胞分裂抑制作用に関する研究. 岡山医誌, 79, 734, 1967.
- 23) 高橋誠一郎 : 筋肉コルニンの細胞分裂抑制作用について——位相差顕微鏡映画撮影法による観察. 岡山医誌, 81, 59, 1969.
- 24) Kobayashi, Y. : Effect of cornin on nucleic acid synthesis during early development in sea urchin eggs. *Acta Med. Okayama*, 23, 569, 1969.
- 25) 藤田 興 : 腫瘍細胞の核酸合成におよぼす筋肉 cornin の影響. 日本生理誌, 31, 543, 1969.
- 26) 藤井義信 : 筋肉コルニンの細胞分裂調節作用と, その in vivo 応用への基礎的研究. 岡山医誌, 82, 549, 1970.
- 27) 山田俊典 : ラットの肝臓から抽出した cornin のラット肝細胞の分裂に及ぼす影響——位相差顕微鏡映画撮影法による観察. 岡山医誌, 82, 561, 1970.
- 28) 智片芳子 : ウイルスの増殖および哺乳動物細胞の DNA 合成におよぼす cornin の影響. 日本生理誌, 32, 803, 1970.
- 29) Heilbrunn, L. V., Chaet, A. B., Dunn, A., and Wilson, W. L. : Antimitotic substances from ovaries. *Biol. Bull.*, 106, 158, 1954.
- 30) Heilbrunn, L. V., Wilson, W. L., Tosteson, T. R., Davidson, E., and Rutman, R. J. : The antimitotic and carcinostatic action of ovarian extracts. *Biol. Bull.*, 113, 129, 1957.
- 31) Kidd, J. G. : Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds of mice and rats given guinea pig serum, horse serum or rabbit serum. *J. exp. Med.*, 98, 565, 1953.
- 32) Broome, J. D. : Evidence that the L-asparaginase activity of guinea-pig serum is responsible for its antilymphoma effects. *Nature*, 191, 1114, 1961.
- 33) Stich, H. F. : Regulation of mitotic rate in mammalian organism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 90, 603, 1960.
- 34) Goutier, R., and Bologna, I. : Presence d'un inhibiteur des enzymes de synthese de l'acide desoxyribonucleique au niveau des microsomes du foie de rat. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.*, 70, 570, 1962.
- 35) Goutier, R., and Bologna, I. : Localisation intracellulaire, dans le foie rat, d'un facteur inhibiteur de la synthese de l'acide desoxyribonucleique in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*,

- 72, 40, 1963.
- 36) Menkin, V. : Presence of accelalator and retarding cleavage factors in an extract of ovary in sea urchins. *Expl. Cell. Res.*, **11**, 270, 1956.
- 37) Wolfson, N. : Retardation of cleavage in sea urchin eggs by cell extracts. *Expl. Cell. Res.*, **18**, 504, 1959.
- 38) Rytömaa, T., and Kiviniemi, K. : Control of DNA duplication in rat chloroleukemia by means of the granulocytic chalone. *Europ. J. Cancer*, **4**, 595, 1968.
- 39) Mohr, U., and Althoff, J. : Epidermal chalone and mitotic control in the VX2 Epidermal tumor. *Nature*, **220**, 134, 1968.
- 40) Parsley, M. S. : Effect of inhibitors from adult connective tissue on growth of a series of human tumors. *Cancer Res.* **25**, 387, 1965.
- 41) Miller, A. J., and Kinsey, L. S. : Biological inhibition of trausplantable mouse tumors. *Cancer*, **20**, 471, 1967.
- 42) Glick, J. L., and Goldberg, A. R. : Inhibition of L1210 tumor growth by thymus DNA. *Science*, **149**, 997, 1965.
- 43) Glick, J L. : The specificity of inhibition of tumor cell viability. *Cancer Res.*, **27**, 2338, 1967.
- 44) Allfrey, V. G., Littan, V. C., and Mirsky, A. E. : On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, **49**,414, 1961.
- 45) Shah, V. C., and Reilly, P. : Effect of histones other basic proteins and some antibiotics on the transplantability of mouse mammary tumors. *Nature*, **213**, 403, 1967.
- 46) Nakahara, W., Fukuoka, F., Maeda, Y., Tokuzen, R., and Tsuda, M. : Effect of liver fractions of the growth of transplanted tumors. *GANN*, **58**, 87, 1965.
- 47) Suzuki, S. : The growth-inhibiting substances in liver extract of rats for rat ascites hepatoma cells in tissue culture. *Japan. J. Exp. Med.*, **29**, 341, 1956.
- 48) Otsuka, H., and Terayama, H. : Inhibition of DNA synthesis in ascites hepatoma cells by normal liver extract. *Biochim. Biophys. Acta*, **123**, 274, 1966.
- 49) Otsuka, H., and Együd, L. G. : Nucleic acid and protein synthesis of malignant ascites cells in the presence of liver extract and methyl-glyoxal. *Cancer Res.*, **27**, 1498, 1967.
- 50) Sugihara, Y., and Araki, F. : Growth inhibiting substance prepared from human leiomyosarcoma. *GANN*. **57**, 287, 1966.
- 51) 勝田 甫, 高岡聡子 : ラッテ正常及び腫瘍細胞間の培養内相互作用. *細胞化学シンポジウム*, **19**, 105, 1968.
- 52) 西田 勇, 村上哲英 : 組織から抽出される細胞分裂調節物質について. *日本生理誌*, **34**, 131, 1972.

The antimitotic effect of cornin extracted from dog intestine.

by

Masao Makiyama

Dept. of Physiol. Okayama Univ. Med. School.
(Director : Isamu Nisida)

The antimitotic effect of cornin extracted from dog intestine, are summarized as follows.

1. Canine intestine cornin (CIC) inhibit the proliferation of HeLa cell in tissue culture. It's antimitotic effect, however, increases depend on the cornin dose per cell.
2. CIC is stable substance. Antimitotic effect of CIC does not decrease after stocking in desiccater over 3 years, and also 2 days preincubation in 37°C. DTT treated CIC show no differences with untreated CIC in growing HeLa cell.
3. Both dialysable and nondialysable fractions show antimitotic effect to HeLa cell. And nondialysable fraction is more effective.
4. Ultrafiltration is done by Diafilter membrane. The most effective fraction of molecular weight is over than 55,000. The next is molecular weight 20,000~55,000, the third is molecular weight below 10,000. The component molecular weight 10,000~20,000 is slightly effective.
5. The antimitotic effect of molecular weight over than 55,000 fraction decreases by 2 days treatment in 0.025% trypsin at 37°C.
6. CIC is separated in 3 fractions by Sephadex G200 column. The most effective fraction is FIII. It suggests that the antimitotic action of CIC is more effective in relatively small molecular weight of molecular weight over than 55,000 fraction.