

# 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

岡山大学医学部第一生理学教室（指導：西田勇教授）

藤 井 義 信

〔昭和45年12月18日受稿〕

## 緒 論

細胞分裂及び細胞の分化に関する研究は、細胞、個体、種族の増殖及び維持、若返りなどに関与する他、障碍の治癒、疾病に対する抵抗性の獲得、更に発癌や癌細胞の増殖とその抑制と云う時代的要求の下に現在医学会で最も注目を浴びた課題の一つとなつて来た。しかし細胞分裂の形態学的な研究については広範な知識を我々にもたらしてくれるが、代謝や増殖の調節機構に関しては未だ不明の点が多い。

いま制癌剤一つを考えてみても、今までの膨大な研究はある意味では悉く失敗に帰していると云つても過言ではない。即ち細胞分裂の抑制物質はそのスペクトルがあまりにも広すぎ、癌細胞のみでなく正常細胞の分裂を抑制し、臨床的に応用するためには大きな抵抗を感じざるを得ない。癌細胞の分裂のみを特異的に抑制し、且つ正常細胞には全く影響がないか、或は正常細胞に対しては賦活的に働くと云う物質が期待される制癌剤の理想像である。

生活組織から抽出された cornin に関する研究は、西田、中山、福井、三好、浜村 (1958)<sup>30</sup> がネコの動眼神経を切断した後、或る時間を経ると散大していた瞳孔が急に縮瞳し始め、遂には slit 状にまで収縮する現象を見出し、この縮瞳現象は眼前房水中に角膜から縮瞳物質が浸出したために起る現象であることを実験的に証明したことに端を発する。

福井 (1958)<sup>26</sup> はこの縮瞳物質は角膜から熱水で抽出され alcohol の 70%—90% の間の分画として沈澱精製することが出来、この物質は蛋白の一種でこれに cornin と命名した。

宮原 (1959)<sup>35</sup> は角膜から抽出した cornin が縮瞳作用の他、平滑筋運動の亢進と血圧下降作用のあることを発見した。門 (1961)<sup>28</sup> は家兎の骨格筋からも同様の alcohol 分画法によつて縮瞳作用、血圧下降や心搏を促進させる物質が存在すること、そし

て家兎筋肉から抽出した cornin は角膜から抽出した cornin と化学的性質の異なることを報告した。得本 (1962)<sup>58</sup> は家兎の種々の組織から cornin の抽出を試み cornin の生体内分布は生物学的活性 polypeptide の一種である substance P とよく一致し、小腸、胃の筋層や中枢神経系の視床下部、四丘体、視床部等に多く存在し筋肉や子宮、膀胱等にも僅か存在するが他の内部臓器では僅少であることを報告した。日野 (1962)<sup>25</sup> は角膜 cornin と substance P を用いて、ウニの受精卵の初期分裂に及ぼす影響を調べ、cornin は著しい分裂抑制効果を示すのに対し substance P は分裂の促進作用を持つことを報告した。その後西田、村上、藤、原田 (1965)<sup>42</sup> によつて角膜 cornin と家兎筋肉 cornin の生化学的性質や生理学的特性、及び細胞分裂抑制効果が詳細に検討された。西田、村上、藤、越宗、寺坂、高橋、木本 (1966)<sup>43</sup> はイヌの小腸から抽出した cornin を組織培養したヒトとハムスターの正常の fibroblast に作用させると、その増殖に全く影響がないのに反し SV-40 virus の DNA で誘起させた fibrosarcoma 細胞に対しては dramatic に作用し、細胞分裂の抑制と細胞変性を起させることを報告した。越宗 (1966)<sup>33</sup> は nucleotide への <sup>32</sup>P のとり込みに及ぼす筋肉 cornin の影響を調べ、再生肝及び発性初期のウニ卵では殆んど完全に nucleotide の合成を阻害することを見出した。寺坂 (1967)<sup>67</sup> は家兎と犬の種々の臓器から cornin 分画を抽出し、ウニ卵の初期分裂を指標にして分裂抑制に関する活性を比較した。筋肉 cornin と角膜 cornin が分裂遅延効果を示す最終有効濃度が  $10^{-8}$  g/ml であるのに比べ、他の臓器では肺 cornin が  $10^{-7}$  g/ml、心筋 cornin が  $10^{-6}$  g/ml、腎、胃、小腸、cornin が  $10^{-5}$  g/ml、他は  $10^{-4}$  g/ml、で抽出する組織によつて生化学的な定性分析の結果では各 cornin 間に大差がなくても生理学的活性には差のあることを発見した。原田 (1967)<sup>19</sup> は筋肉

cornin の臨床的応用のための基礎実験を行つた。それによると抗体生成能は殆んどなく、ハツカネズミの移殖腫瘍に対して有効な増殖抑制効果がある。長期間の cornin 投与によつても有害作用と思われる組織像は認められない。cornin の大量投与後一過性の貧血が認められることがあるが、これは Bosmin を投与することによつて防げることを報告した。大屋 (1967)<sup>45)</sup> は Ehrlich 腹水腫瘍細胞と C<sub>3</sub>H の乳癌細胞をマウスに移殖して、筋肉 cornin と小腸 cornin を投与して抗腫瘍効果を調べ、小腸 cornin の方が筋 cornin よりも効果があることを発見した。その後、木本等 (1968)<sup>30)</sup> は呑竜系ラットに DAB を与え癌化の程度の異つた数種の培養細胞を材料として、同種の肝 cornin を作用させたところ正常肝細胞の増殖は抑制し、癌化した細胞には作用のないことを見出した。イヌ、ブタ、ウシ、の小腸 cornin を作用させても、培養した肝細胞には同様の傾向が見られた。又、藤田 (1969)<sup>45)</sup> は Ehrlich 腹水腫瘍細胞を動物に継代増殖させ筋 cornin を投与し、核酸の前駆物質の細胞内と核酸分画へのとり込みに及ぼす影響を調べ筋 cornin は細胞内、核酸分画共に前駆物質のとり込みを抑制していることを報告した。更に高橋 (1969)<sup>55)</sup> 山田 (1970)<sup>59)</sup> は位相差顕微鏡 16mm 映画撮影法により筋 cornin 及び肝 cornin による分裂抑制効果を形態学的に且つ動的に解析しウニ卵に関しては分裂装置の形成の遅延、培養細胞に関しては、細胞膜の運動に大きな変化を起させているために、分裂の障害が生じること、しかし精子の運動に関しては cornin を含まない対照との間に差が認められないことを報告した。

Zimmerman 等 (1968)<sup>60)</sup> は Arbacia 受精卵を用い筋 cornin の 10<sup>-5</sup> g/ml 濃度で 33,000×g の遠心力を作用させると殆んど細胞が小さな球状の小塊となつて破壊することを報告して居る。polypeptide の一種である cornin が抗体生成能に影響がなく特異的な細胞の分裂を抑制する作用のあることから、cornin を臨床的に利用出来る可能性が当然考えられる訳である。著者は臨床的応用のための基礎的研究として細胞分裂に関与して居る生殖細胞の成熟に就いて、筋 cornin の生殖機能に及ぼす影響と、又細胞膜に就いて同じく筋 cornin の赤血球の溶血作用に及ぼす影響を調べ興味ある結果を得たのでここに報告する。

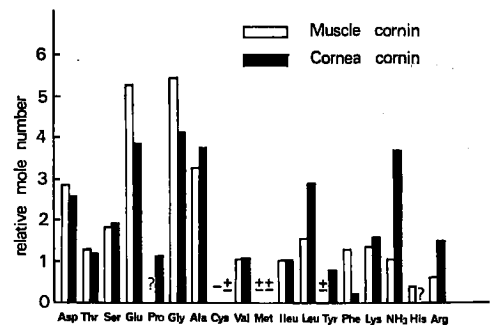
### 実験及び結果

#### 〔1〕筋肉 cornin 及びイヌ小腸 cornin の抽出

筋肉 cornin は家兎骨格筋をひき肉器でミンチし 3L の大型ビーカーに移し、3 倍量の脱イオン水を加えて熱する。時々、ガラス棒で攪拌しながら沸騰させ、10 分間沸騰の状態を保つ。直ちに、ビーカーを流水で冷却し厚手の天竺木綿で濾過する。濾液に 0°C に冷却したエタノールを加え、よく混合して 70% エタノール濃度とする。0°C の冷凍室中に 2~3 時間放置、10,000 rpm の連続遠心器で沈澱物を除く。上清に更にアルコールを加えて 90% とし、0°C の冷凍室中に一夜放置する。再び 10,000 rpm の遠心器で遠沈し、沈澱物は 99% エタノール、100% メタノール、アセトン、エーテルの順に 3,000 rpm の遠心法で洗い、最後に室温でエーテルをガラス棒で攪拌しながら蒸発させ白色の粉末物を得ることが出来る。この粉末物質が粗製の筋肉 cornin である。骨格筋 1 kg から平均約 4 g の筋肉 cornin を得ることが出来た。

著者の用いた筋肉 cornin のアミノ酸組成を調べるため密閉したガラス管中で 6 N-HCl を用いて 12 時間加水分解をし water-bath の上で塩酸を飛ばし、更に NaOH で中和後 Amberlite CG-120 で脱塩乾固し、柳本製作所製アミノ酸自動分析装置 LC-5 型で分析し、角膜 cornin と比較したところ図 1 に示すような結果を得た。各アミノ酸濃度は relative

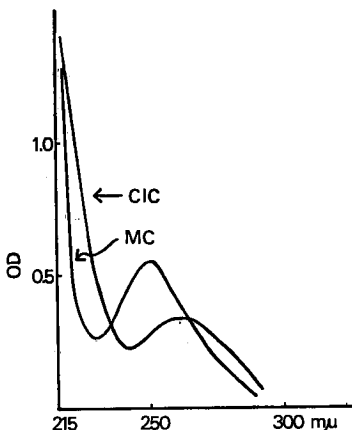
Fig. 1 Comparison of amino acids composition in muscle-cornin and cornea-cornin.



mole number で示してある。なお、cystine はアミノ酸分析機による分析結果では筋肉 cornin は陰性であるが寺坂 (1967)<sup>57)</sup> が報告したように、ポーラログラフィーでは典型的な蛋白波を示すことから、微量の存在が予想される。又、イヌの小腸 cornin も、筋肉 cornin と同様の方法で抽出精製した。収量はイヌ小腸 1 kg につき平均約 4 g であつた。

この実験に用いた家兎の筋肉 cornin とイヌの小腸 cornin 紫外部の吸収曲線を図 2 に示す。

Fig. 2 Ultraviolet absorption spectra of muscle-cornin and intestine-cornin. CIC...dog intestine-cornin, MC...muscle-cornin



筋肉 cornin の紫外部の吸収の極大が 249  $\mu\text{m}$  であるのに対して、小腸 cornin のそれは 260 $\mu\text{m}$  に存在する。

(2) 生殖機能に及ぼす筋肉 cornin の影響

細胞分裂抑制物質は、一般的に生殖細胞の増殖や成熟を抑制し、そして受精能を低下させる性質を持った物質が多い。又、更に胎児に奇形を生じさせるような場合もあり、制癌剤として、臨床的に応用する場合、最も注意しなければならない副作用である。著者は筋肉 cornin が生殖能にどのような影響を与えるかを調べる目的で次の様な実験を試みた。

実験用動物としては ddN 系マウスを用いた。飼育はオリエンタル酵母株式会社製の繁殖用固形飼料を使用し、飼料と水は自由に与えた。

家兎筋肉 cornin は 2% の Ringer 溶液として 0°C で 10,000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を滅菌した Millipore filter (0.45  $\mu$  pore size) で濾過し、無菌的に冷蔵庫に保存した。使用に際し、37°C に温め必要量を注射器にて分注した。

(A) 新生児を用いた実験

新生児マウスを用い、背部皮下に毎日 1 回 2% 筋肉 cornin の Ringer 液を 0.1 ml 宛 15 日間連続注射した (総量 30 mg)。性別が確認出来る生後 3 週間頃に、雌雄を厳重に確認の後、雌雄を別々に別居飼育する。生後満 2 ヶ月後に雄一匹、雌一匹宛 10 日間同居させ、次で再び別居させて分娩の有無を調べ表 1 に示す結果を得た。この内雌一匹は、同居後 5 日目に死亡し、又一匹は不妊であった。

(B) 成体を用いた実験

新生児についての実験と同様、生後 3 週間して厳重に性別を確認し、雌雄を別居させて飼育してあるマウスを用い、以後の実験に供した。

(a) 生後 55 日乃至 60 日の雌雄夫々 5 匹を用い、毎日 1 回 0.5 ml 宛 10 日間腹腔内に注射する、次いで雌雄各一匹宛を 1 組として同居させ、筋肉 cornin は引続き 10 日間連続注入を行つて後別居させた。(筋肉 cornin 総量 200 mg)。対照として同様の条件で雌雄 5 匹あて、同様に 20 日間 Ringer 液を 0.5 ml 腹腔内に注入した。その後分娩の有無を調べたところ表 2 に示す結果を得た。

(b) 成体を用いる実験で、上の実験で行つた方法に準じ筋肉 cornin の量を 1.0 ml 宛とした場合

Table 1. Effect of rabbit muscle cornin on the generative function of mice when injected subcutaneously in new born. (for 15 successive days: total doseage=30mg) now-born

↓ administered s. c. with 0.1 ml of 2% rabbit muscle cornin in Ringer's solution for 15 successive days.  
 ↓ at the age of 21 days  
 ↓ male and female kept separately  
 ↓ at the age of 60 days  
 made in pairs for 10 days

mouse (pair)	accident death (pair)	No. of pairs giving birth	No. of pairs not giving birth	mean of new born No. (heads)	mean of duration of child birth from living together(days)
7	1	5	1	8.8	21.8

Table 2. Effect of rabbit muscle cornin on the generative function of normal adult mice (total doses 200 mg)

at the age of 60 days (male and female, separated)

↓ administered i. p. with 0.5 ml of 2% rabbit muscle cornin in Ringer solution  
for 10 successive days

at the age of 70 days (made in pairs)

↓ made each pair live together for 10 days and administered the same cornin  
for 10 successive days

	mouse (pair)	accident death (pair)	No. of pairs giving birth	No. of pairs not giving birth	mean of new- born number (heads)	mean of duration of child birth from living together (days)
control	5	1	3	1	8.3	21.0
experiment	5	1	3	1	8.3	21.3

Table 3

total doses 400 mg

◦ administered i. p. with 1.0 ml of 2% rabbit muscle cornin in Ringer's solution

◦ made each pair live together on the 70th day after birth

	mouse (pair)	accident death (pair)	No. of pairs giving birth	No. of pairs not giving birth	mean of new- born number (heads)	mean of duration of birth from living together (days)
control	5	0	4	1	9.0	22.5
experiment	5	1	3	1	7.3	23.0

Table 4

total doses 600 mg

◦ administered i. p. with 1.5 ml of 2% rabbit muscle cornin in Ringer's solution

◦ made each pair live together on the 85th day after birth

mouse (pair)	accident death (pair)	No. of pairs giving birth	No. of pairs not giving birth	mean of new- born number (heads)	mean of duration of child birth from living together (days)
5	2	3	0	6.6	22.0

Table 5

total doses 400 mg

◦ made each pair live together for 5 days after administered i. p. with 2.0 ml of 2%

◦ rabbit muscle cornin for 5 successive days

age	mouse (pair)	accident death (pair)	No. of pairs giving birth	No. of pairs not giving birth	mean of new- born number (heads)	mean of duration of child birth from living together (days)
70 days	5	5	0	0	—	—
75 days	10	7	1	2	6.0	21.0
150 days	4	0	4	0	8.5	21.8

(筋肉 cornin の総量 400 mg) 更に 1.5 ml 宛とした場合 (筋肉 cornin の総量 600 mg) 得られた結果を夫々表 3 及び表 4 に示す。

(c) 生後 3 週間して雌雄を別居させ 70 日目のマウス 5 組, 75 日目のマウス 10 組, 150 日目のマウス 4 組を選び筋肉 cornin-Ringer 溶液を 1 回 2.0 ml 宛 5 日間注入, その後 5 日間同居させて同様 2.0 ml 宛 5 日間注入, 再び別居させて, 分娩を調べたところ表 5 に示すような結果を得た。

即ち, 生後 70 日の組においては, 2.0 ml 宛注入すると, 腹腔内に注入後数分以内に死亡する。これは雌雄共に見られる現象である。しかし生後 150 日以後のマウスにおいては, 雌集共全例が生存した。又, 生後 75 日目と 150 日以上のマウスを用い別居の状態背部皮下に筋 cornin 3.0 ml 宛 5 日間注入後同居させて, 5 日間再び背部皮下に同量を注入した場合も, 生後 75 日目の群では 3 例中雌 2 雄 1 が死亡し一群のみが生存し同居開始から 22 日目に分娩した。しかし生後 150 日以上のマウスにおいては死亡例は無かった。

(D) Aschheim & Zondek 法による検定

生後 28 日目の雌のマウス 10 匹を用いて Aschheim-Zondek の方法に従い卵巣の生殖成熟性の変化を調べた。妊娠二ヶ月の妊婦尿を背部皮下に第 1 日に 0.4 ml 宛 2 回, 第 2 日目に同様 0.4 ml 宛 3 回注射した。10 匹の雌を 2 群に分け, 5 匹を対照群とし, 他の 5 匹に第 1 日から第 4 日の間毎日 1 回 2% 筋肉 cornin を 1.0 ml づつ背部皮下に注射した, 対照群には Ringer 液を同様に注射した。全例第 5 日目に開腹し卵胞の成熟度及び子宮卵管の増肥, 卵胞内出血の有無を精検した。得られた結果は表 6 に示す。

即ち Aschheim & Zondek 法による陽性反応に対して, 筋肉 cornin は全く抑制反応は認められない。

以上生殖機能に及ぼす筋肉 cornin の影響を要約すると, マウスの新生児に筋肉 cornin を連続 15 日間注射した場合, そのマウスが成熟すれば雌雄共に生殖能力を有し, 分娩頭数も正常である。そして雌雄を別居させていた成熟したマウスについての実験では, 同居前より同居中にわたり筋肉 cornin を総量 200 mg から 600 mg まで注射した場合, 分娩頭数及び妊娠期間共に Ringer 液を注射した対照群と差は無い。そして生後 70 日乃至 75 日目のマウスは 2% 筋肉 cornin を 2.0 ml (40 mg) 注射した場合数分以内に多く死亡する。従つてこの濃度は腹腔内注射の場合致死量と考えられる。この様な条件下でも生存したマウスについて生殖能力には何等の影響も与えて居ない。又 Aschheim & Zondek 法による陽性反応に対しても, 抑制反応は見られなかった。

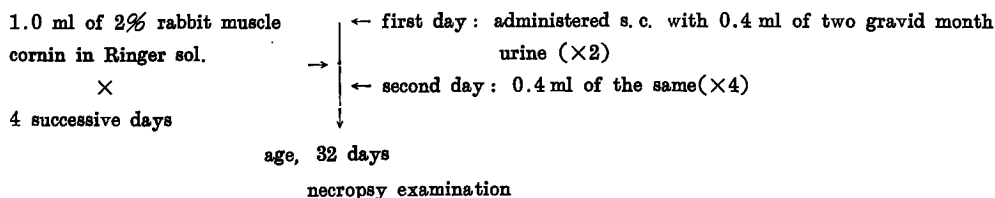
〔3〕溶血現象に及ぼす cornin の影響

受精したウニ卵の初期分裂に筋肉 cornin がどのように作用しているかを位相差顕微鏡と 16 mm 映画撮影法で観察した高橋 (1969)<sup>65)</sup> の報告と, その映画から, 筋肉 cornin が 10<sup>-4</sup>g/ml の濃度では受精直後の受精膜の隆起が対照に比べて著しく遅延し更に隆起した受精膜もいびつである。又ラットの肝細胞を長期間試験管内で継代培養した RLN-10 細胞にラットの肝臓から抽出した cornin を作用させ, その増殖や細胞分裂の進行状況を同じく位相差顕微鏡 16 mm 映画撮影法で観察した山田 (1970)<sup>66)</sup> の報告, 並びにラットに DAB を与えて実験的に発癌させた肝細胞の試験管内培養に成功した細胞系である C83-T, C84-BT 細胞の増殖や細胞分裂の進行状

Table 6. Effect of rabbit muscle cornin on the urine gonadotropin of pregnant woman.

(Method of Aschheim-Zondek)

female mouse, age 28 days



	mouse	negative	H. V. R. I	H. V. R. II
control	5	1	0	4
experiment	5	1	2	2

態に及ぼすラットの肝 cornin やイヌの小腸 cornin の影響を同じく 16mm 映画にした牧山等 (1970)<sup>82)</sup> の報告によると、休止期の細胞で(分裂期以外の細胞周期にある細胞), cornin を作用させると急に線香花火が爆発するように細胞膜が起爆して、細胞が崩壊するのが見られる。又、ウニの一種である *Arbasia punctulata* の受精卵を用いた実験で、*Arbasia* の受精卵は 20°C において受精後60分して第1分裂期に入るが、受精後25~30分の間 844 kg/cm<sup>2</sup> の高水圧と、33,000×g の遠心力を同時に作用させると、実験的に分裂溝を形成させることが出来る。この実験において受精前10分間 10~4g/ml の濃度で筋肉 cornin を作用させ加精そして受精後25~30分の間 844 kg/cm<sup>2</sup> の高水圧と 33,000×g の遠心力を作用させると大部分の卵細胞は小さな球状の碎片に崩壊し実験的に分裂溝を形成した細胞は非常に少ない。又筋肉 cornin 処理後遠心力だけを作用させた場合細胞は小さな球形の碎片になるか、或は遠心力の方向に垂直に引き伸ばされ、赤血球の横断面状となることを Zimmerman, Murakami, & Zimmerman (1968)<sup>60)</sup>, Zimmerman (1970)<sup>61)</sup> は報告している。以上の如く cornin は細胞膜の生理学的機能に何等かの影響を与えている。著者は細胞膜の研究に最も古くから、且つ最も広く研究されている赤血球膜を選び溶血現象を指標にして cornin の影響を調べた。材料として

は、ヒトのO型の赤血球を使用した。ヘパリンで凝血を防いで採血し、採血した血液は冷蔵庫中に貯え、48時間以内に使用した。血液約 5 ml を採り、血清を除くために 0~4°C の冷凍室の中で 0°C に冷やした NaCl の 1% 溶液で 1,500 rpm 5 分間遠心分離を行つた。沈澱した血球を再び NaCl 1% 溶液に浮遊させ遠沈、これを 3 回くり返すと上清は全く無色となる。こうして得られた濃厚血球に再び NaCl の 1% 溶液を加えてよく混和し試料とした。cornin は筋肉 cornin, 小腸 cornin と教室に保存してあるウシの角膜 cornin を用いた。cornin は NaCl の 1% 溶液で 2% 溶液を作り、冷凍遠心機を用いて 10,000 rpm で 10 分間遠心分離した上清を原溶液とした。実験法はまず血球計算を行つて、一定数の赤血球浮遊溶液 5 ml を遠沈用の試験管に分注し、これに、1% の NaCl 溶液と 2% の cornin 溶液を加えて計 10 ml とし cornin の最終濃度は 1% 0.5%, 0.2%, 0.1%, 0% となるようにした。そして、37°C に調節した恒温槽に 30 分間保つ。30 分後に 1,500 rpm 5 分間遠心分離し更に 1% の NaCl 溶液と混和して、同様に遠心分離して cornin を除く。各々の遠沈管に沈澱した赤血球塊に一定量の 1% NaCl 溶液を加えて再びよく混和する。更に、各々の赤血球懸濁液をそれぞれ 1 ml づつ取り出し遠心管用試験管に分注する。それに NaCl の最終濃度が 0.7% ~ 0.4%

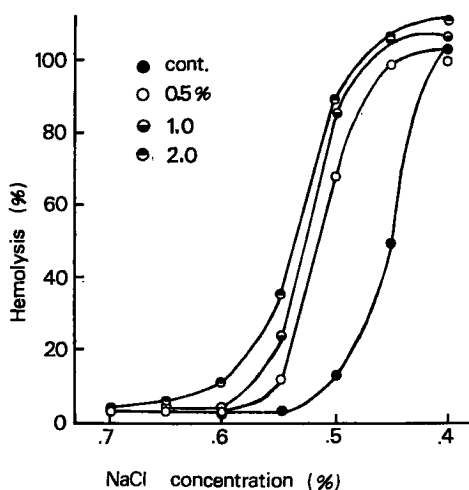
Table 7. Experimental method for hemolysis

5 ml of human blood
↓
wash with 1% NaCl (three times)
↓
resuspend the red cells into 1% NaCl
↓
divide the suspension into several parts
↓
add equal volume of cornin solution with 1% NaCl (final conc. of cornin; 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2%)
↓
incubate at 37°C for 30min
↓
separately wash with 1% NaCl
↓
1 ml suspension + 9 ml NaCl solution (final conc. of NaCl; 1, 0.7, 0.65, 0.6, ..., 0.4, 0.1%)
↓
incubate at 37°C for 30 min.
↓
centrifuge at 1,000 rpm for 10 min.
↓
measure the OD 540 mμ of each supernatant

の間を 0.05% 間隔になるようにした NaCl 溶液を 9.0 ml 加え計 10 ml とする。再び 37°C に保った恒温槽に 30 分間浸け 3,000 rpm で 2~3 分間遠心分離し溶血して上清に溶け出たヘモグロビン量を 540 mμ の吸光度で測定した。分析に用いた分光分析機は日立製作所製 EPU-2A 型である。

以上の方法を図式にして示すと表 7 となる。筋肉 cornin を用いた溶血現象に及ぼす作用を図 3 に示す。

Fig. 3 Hemolytic effect of muscle cornin in hypotonic NaCl solutions.

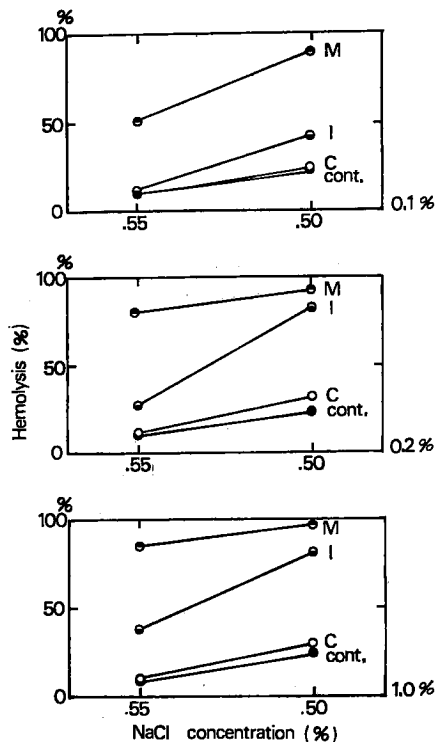


NaCl 濃度が 0.7% 以上の場合は溶血現象は認められないが 0.55% となると cornin で処理してない対照は溶血が起っていないのに 0.5% の cornin で処理した血球はすでに僅かの溶血が認められる。溶血現象は図に依つて明らかなように処理する cornin の濃度が高い程著しい。0.5% の食塩濃度となるとその差は更に明らかとなり、0.4% 食塩濃度となると cornin で処理してない血球も溶血を起している。

次にこの赤血球を低張の食塩水に入れた場合に生じる溶血現象に対して cornin を抽出した組織による差が有るか無いかを見るために筋肉 cornin、イヌの小腸 cornin と牛の角膜 cornin の差を調べて見た。処理方法は前述の方法に従い処理した各 cornin の濃度は最終濃度が 0.1%, 0.2% 及び 1.0% である。得られた結果を図 4 に示す。

M は筋肉 cornin の場合で、3 つの cornin の内、最も溶血を起させ易い、そして処理した濃度が高い程溶血を起させ易くなっている、C は角膜 cornin

Fig. 4 Comparison of hemolytic effect treated with muscle-cornin, intestine-cornin and cornea-cornin at 0.55 percent and 0.5 percent NaCl solution.



の場合で、cornin 処理しない対照の場合と大差はない。そして処理した角膜 cornin の濃度による差も現れない。I は小腸 cornin の場合で、処理する濃度が高い程溶血し易くなっている。そして溶血さす作用は筋肉 cornin と角膜 cornin の中間に位する。

### 考 察

生体内には細胞が常に分裂をくり返して盛んに増殖している組織、例えば生殖細胞や造血組織と細胞が休止期のままで止つていて成長はするが細胞の分裂はしない組織、例えば神経細胞や骨格筋細胞がある。そしてこの中間に位する組織として切除とか損傷を物理的に或は化学的に与えると今迄休止期にあつた細胞が増殖系に移行する。所謂再生能力をもつた組織、例えば肝臓とか腎臓のような組織がある。そして、例えば肝臓の再生についての実験で、肝切除を行い 48~72 時間後には細胞分裂指数 (mitotic index) は最大に達し、約 1 ヶ月後には重量は元に回

復する。しかし決して元より以上に殖えることはないことが明らかとなっている。Stich (1960)<sup>49</sup>, Goutier (1962, 1963)<sup>16,17</sup>等のラットの再生肝を用いての実験によると、肝切除を行い6時間後に正常肝の homogenate のマイクロゾーム画分を腹腔内に注射すると、再生肝の細胞分裂指数が著しく抑制される。この場合特に DNA 合成が抑制されて居る。そして再生肝の homogenate やマイクロゾーム画分にはこのような作用はないことを報告した。その後、肝臓から DNA 合成の inhibitor の分離に成功した Otsuka & Terayama (1966)<sup>46</sup>の報告によると、肝抽出液から sarcoma 180 細胞の DNA 合成を抑制する物質を抽出し、その本態は arginase であるらしいところまで展開された。しかしこのような細胞分裂抑制物質乃至は DNA 合成の阻害物質が再生肝からは抽出されず何故正常肝からのみ抽出されるのかは不明である。しかし生体から細胞分裂の調節作用をもつた物質を抽出する試みは Heilbrunn等 (1954)<sup>23</sup>の報告以後最近では抗癌剤の開発と云う社会的な要求の下にその論文数は急速に増大して来た。最近の Meek (1970)<sup>34</sup>の綜説に従つて大別すると(1), actinobolin, actinogan や asparaginase のような微生物から産生される物質或は微生物から抽出した物質、或は bleomycine, chromomycins, mitomycins, や puromycin のように一般に antibiotics と総称されている物質。(2), 植物から抽出された vinca alkaloid の物質。(3), 海産動物や昆虫類から抽出した物質。(4), ACTH や cortisone acetate, adrenaline 等のホルモン類。(5), 化学的に誘発させたワクチン或いはウイルスによつて誘発させたワクチン類。(6), Isaacs & Lindemann (1957)<sup>63,64</sup>によつて命名された interferon。(7), 組織から抽出された細胞分裂調節物質となる。この内著者の研究に最も関係の深い組織から抽出した調節物質についての最近の一連の報告を纏めてみると、次の様な大きな考え方の流れがある。Szent-Györgyi 及びその協同研究者等 (1962, 1963, a, b, c, d, 1964, 1965 a, d, 1966, 1967)<sup>50)~52), 20)~22), 53, 54), 13, 14</sup>は分裂能力のない臍や大動脈、或は胸腺が退化する年令以後発癌する患者数が増加することに注目して、胸腺に細胞分裂の調節物質があるのではないかと考え、これらの組織から細胞分裂の抑制物質を抽出し retine と命名した。同時に細胞分裂の促進物質も抽出し、これに promine と名付けた。そしてこの promine からは不妊因子である infertine が分離された。しかし

paer chromatography や column chromatography で infertine は分離されるが retine と promine は両者の間で overlapping するところがあり純粋な分離が非常に困難であると述べている。その後 retine はヒトの尿からも抽出され、分子量は約 400 で非蛋白性の ketoaldehyde の一種らしいことがわかり、更に Woods Hoole の臨海実験所辺の海岸で採れるハマグリ的一种から抽出した制癌性を持つた物質は1つは分子量が10,000と、他に低分子の物質の二者の抽出を報告している。そして promine と retine のような細胞分裂促進物質と細胞分裂抑制物質のバランスによつて生体内の細胞の増殖が制御されているのではなからうかと推論した。そして抗生物質による制癌作用に対して組織から抽出した細胞分裂抑制物質を総称して“autobiotics”と命名した。

又 Bullough & Laurence (1964)<sup>2)</sup>はマウスの1日中における活動性のリズム (diurnal rhythm) が adrenaline の活性の変化と関係していることに注目した。そして更にマウスの上皮細胞の分裂活性が高いときは adrenaline 活性が低いと云う逆相関関係があることを確めた。即ち、adrenaline は分裂抑制作用を有することがわかり、この adrenaline による分裂抑制を受け易い組織と感受性のない組織がある、換言すれば adrenaline は細胞分裂の抑制作用に於いて組織特異性を示すことがわかつた。この原因として Bullough 等は組織の中に adrenaline と共に作用する物質が存在し、この物質の有無によつて分裂の抑制作用が表現される。そして、この物質をマウス、ラット、ウサギ、ブタ等の表皮組織から抽出することに成功した。Bullough (1964)<sup>3)</sup>, Bullough & Laurence (1967, 1968 a, b, c, d)<sup>4)~8)</sup>によればこの物質を adrenaline と共に与えた場合、分裂抑制効果は増大され in vivo と in vitro の実験で共にその作用を認め、熱に不安定な透析不能の分子量約40,000の塩基性糖蛋白で chalone と命名した。

その後、Iversen & Elgjo (1967)<sup>27)</sup>はブタおよびマウスの皮膚から抽出した chalone はヒトの皮膚の分裂を抑制するが、肝臓からの抽出物は抑制作用がなく、即ち種特異性はなく組織特異性を持つていることを報告した。更に Teir 等 (1967)<sup>56)</sup>, Mohr 等 (1968)<sup>36)</sup>, Rytömaa & Kiviniemi (1968, a, b)<sup>47, 48)</sup>, Nilsson & Philipson (1968)<sup>37)</sup>, Hall (1969)<sup>18)</sup>, Chopra & Simnett (1966)<sup>11)</sup>, Hinderer 等 (1970)<sup>24)</sup>等によつてカエル、ブタ、ウサギ、ヒト等の種々の組織から Bullough と同様の方法で抽出し、in vivo



や *in vitro* で検定し chalone と同様の作用、即ち分裂抑制作用に対して組織特異性があると云う Bullo-ugh の考えを支持している。

一方 Bardos 等 (1968)<sup>1)</sup> はウシやブタの各種の組織から水で抽出される組織の抽出液から growth regulating factors を見付け出すために、その抽出液を主としてアセトン分画、透析法、硫酸分画法、脂質の抽出法等により計1,140の分画に分け、Ehrlich ascites cell, sarcoma 180, adenocarcinoma 755, と leukemia 21210 ascites cell を使用して、組織培養法やマウスに移殖して CCNSC法(Cancer Chemotherapy National Service Centre (1964)<sup>9)</sup> に従って検定した。更に 1,230 の分画について microbiological assay として *Lactobacillus leichmannii*, *L. arabinosus*, と *E. coli* を用いてその増殖曲線に及ぼす影響を調べた。その結果14の有効分画が血清、赤血球、骨髄、前立腺、脾臓と胸腺から得られた。そして溶血等を引き起こさせる cytotoxicity を示したのが8ケの分画で、特に肝臓、松果腺と肺臓から抽出された。微生物の増殖に対しては促進的に作用する物質或は抑制的に作用する分画もあつた。纏として *in vivo*, *in vitro* 共に “inhibitor” としての作用を持つ物質は蛋白質の性質を示す物質が多く、中には脂質或は低分子の物質であつたと報告した。

今制癌と云う目的から細胞分裂抑制物質の理想像を描くと、その制癌物質は正常細胞には何等の影響も与えない物質、或は癌細胞の宿主に対しては全く副作用のない物質が最も望ましい。抗生物質の多くは確かに癌細胞を死滅さすが、正常細胞の代謝も同一濃度で同程度の抑制を示す。従つて種々の副作用や後遺症を残し、臨床的に利用する場合好ましくない物質が多い。又、“autobiotics” にしても制癌作用があつても cytotoxicity, 受精能, 奇形, 抗原抗体反応等は十分に検査されなければならない。cornin の細胞分裂抑制作用以外の生体に及ぼす作用として宮原 (1959)<sup>36)</sup> はウシの角膜 cornin, 家兎の筋肉 cornin が家兎及びネコの生殖器の平滑筋運動を亢進さす。又、イヌを用いて静脈内注射により一過性の血圧下降作用を示す。門 (1961)<sup>28)</sup> は筋肉 cornin の心搏の促進作用について、金尾 (1965)<sup>29)</sup> は筋肉 cornin が toxohormone 様の作用がないこと原田 (1967)<sup>19)</sup> は家兎を筋肉 cornin で感作して、その血清中の抗体上昇は2~4倍で、抗体生成能は殆んどないと云えること、又、筋肉 cornin をマウスに30mg/mlを

投与した時、一過的に呼吸の亢進と、動作の鈍化が始まり、やがてうずくまる。そして眼球が anemic となるが cyanosis, convulsion や incontinence などは見られない。この現象も30分を経る頃には全くなくなる。そして、これらの症状は Bosmin (塩酸 eprenamine 1/1,000) の1,000倍 Ringer 溶液を0.5 ml cornin 投与前10分、又は投与後5分に皮下投与することにより軽減或は経過時間の短縮を来たすことが出来たと報告した。又、雑系マウスに1%筋 cornin 1 ml づつを週3回5週間に渡つて腹腔内に投与して懐胎するか否かを調べたところ全例に懐胎がみられ、奇形も発見出来なかつたと述べている。又、木本等 (1968)<sup>30)</sup> はイヌの小腸 cornin の抗原性は無視出来ることを報告した。高橋 (1969)<sup>55)</sup> は位相差顕微鏡 16mm 映画撮影法によつてウニの精子の運動には cornin は全く影響を及ぼさないことを報告した。

今度の著者の実験成績から明らかとなつたように、マウスを用いて生後直ちに15日間に渡つて筋肉 cornin を投与し、生後3週間して雌雄を別居させ、生後満2ヶ月後に同居させた場合生殖機能には何等の影響もなく、同居開始から分娩日迄の日数及び分娩頭数も筋肉 cornin を投与してない対照と差がない。又生後3週間して、雌雄を別居させて生後70日—150, 日の間に筋肉 cornin を総量200mg—600mg を前後10日間にわたつて投与して、分娩に及ぼす影響を調べた結果においても、同居から分娩までの日数及び分娩頭数には筋肉 cornin の代りに Ringer 液を投与した対照群と全く差のないことが判明した。これ等の事は筋肉 cornin が生殖細胞の増殖や成熟過程に何等の影響も与えないことを意味し、且つ受精後の発生過程にも何等の影響も与えないことを物語っている。更に Aschheim-Zondek 反応についての実験結果から、筋肉 cornin は卵巣及び子宮の充血肥大、卵胞破裂、交尾現象の発現、更に卵胞内出血や黄体形成に何等の影響も与えておらない。この事は卵胞ホルモンや脳下垂体前葉ホルモン等の hormonal regulation にも何等の影響も与えていないことがわかる。西田等 (1964)<sup>39)</sup> Nisida and Murakami (1965, a, d)<sup>40,41)</sup>, 金尾 (1965)<sup>29)</sup>, 西田等 (1965)<sup>42)</sup>, 西田等 (1966)<sup>43)</sup>, 越宗 (1966)<sup>33)</sup>, 高橋 (1969)<sup>55)</sup>, Kobayashi (1969)<sup>32)</sup> 等のウニ卵の初期分裂に対して筋肉 cornin や角膜 cornin に著しい分裂阻害作用を与え、その最終有効濃度は 10<sup>-8</sup>g/ml であること云う報告が

ある。ウニ卵は多くの研究者によつて明らかにされているように薬品に対する感受性は、他の細胞に比べ著しく高い性質を持つている。従つて検定に用いた動物細胞の差によつて分裂阻害に関する有効濃度は異ると考えられる。一方哺乳動物細胞を組織培養しその分裂に及ぼす影響に関しては西田等(1968)<sup>30)</sup>、山田(1970)<sup>39)</sup>、智方(1970a, b)<sup>40)</sup>、大月(1970 a, b)<sup>41)</sup>の報告にもあるように最終有効濃度は用いた細胞系によつても異なるが $10^{-4}$ g/ml $\sim$  $10^{-5}$ g/mlである。著者の用いた濃度が約 $10^{-3}$ g/ml $\sim$  $10^{-4}$ g/mlで分裂の遅延が現れても良い濃度であるが結果的には現れていないことになる。この理由は未だ明かでない。培養細胞は細胞分裂に関して、再生肝等の場合と異り一定の時期に達しても分裂の制御を受けず増殖系のみ細胞周期をくり返して居るわけで *in vivo* と *in vitro* の差であるとも考えられる。

筋肉 cornin の他の1つの性質として、赤血球を筋肉 cornin と共に低張の食塩水と incubate すると溶血し易くなる結果が得られた。Druckrey (1959)<sup>12)</sup> はラットの肺臓、脾臓、腎臓、精巣、骨格筋、肝臓の同量の Ringer 液で抽出し、2,500 rpm で遠心分離した上清を濾過した液(即ち50%の組織液と考え)が Yoshida sarcoma, Walker 256-carcinoma, T-sarcoma, Dscarcinosarcoma 細胞を溶解(lysis) さす性質を示したことを報告した。更に彼等ははこの溶解現象は赤血球についても認められ、56°C, 70°C で10分処理或は数分間の煮沸でも効果の減少がないことを述べている。又、Bardos 等(1968)<sup>1)</sup> も組織抽出液が cytotoxicity を示すことを報告して居る。筋肉 cornin は等張液では溶血現象は現れないが0.7%以下の食塩濃度とした場合には溶血現象が現れる。この事は筋肉 cornin を使用する場合、生理的食塩水

に溶解すれば何等不安がないことを証明している。従つて筋肉 cornin は Druckrey 等(1959)<sup>12)</sup> や Bardos 等(1968)<sup>1)</sup> の抽出した物質よりも、より安全な物質であると云える。

## 結 論

ウサギの骨格筋から抽出した筋肉 cornin を臨床的に応用するための基礎的実験として生殖能力及ばす影響と赤血球の溶血現象に及ぼす影響を調べ、以下述べるような結果を得た。

1) マウスの新生児に筋肉 cornin を15日間連続注射し、成体となつてから雌雄を同居させた場合同居後からの分娩日数、分娩頭数共に正常であつた。

2) 出生後3週間して雌雄を別居させ、生後70—150日して筋肉 cornin を連続20日間に渡つて総量200mg—600mg を与えた場合、同居後からの分娩日数、分娩頭数共に正常であつた。

3) Aschheim-Zondek 法による陽性反応は第1反応第2反応共に筋肉 cornin によつて抑制反応は認められない。

4) 筋肉 cornin とヒトの赤血球を37°C で30分反応させその後低張の食塩水に浸けると、0.7%以下の濃度では溶血反応が現れるが、等張液では全く安全である。

5) 今迄に報告されている組織から抽出された細胞分裂抑制物質について筋肉 cornin と比較検討し筋肉 cornin は臨床的に応用する場合に、安全な物質の1つであることがわかつた。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師西田勇教授に深く感謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) Bardos, T. J., H. L. Gordon, Z. F. Chielewicz, R. L. Kutz and M. V. Nadkarni: *Cancer Res.*, 28, 1620—1630, 1968
- 2) Bullough, W. S. and E. B. Laurence: *Expl. Cell Res.*, 33, 176—194, 1964.
- 3) Bullough, W. S.: Growth regulation by tissue-specific factors, or chalone. In: *Cellular control mechanisms and cancer*. Pp. 124—145, P. Emmelot and O. Mühlbock (Ed.), Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 1964.
- 4) Bullough, W. S. and E. B. Laurence: Epigenetic mitotic control. In: *Control of cellular growth in adult organisms*. H. Teir and T. Rytömaa (Ed.), Pp. 28—40, Acad. Press, London and N. Y., 1967.
- 5) Bullough, W. S. and E. B. Laurence: *Nature*, Lond., 220, 137—138, 1968.
- 6) Bullough, W. S. and E. B. Laurence: *Nature*, Lond., 220, 134—135, 1968.
- 7) Bullough, W. S. and E. B. Laurence: *Europ.*

- J. Cancer, 4, 587—594, 1968.
- 8) Bullough, W. S. and E. B. Laurence: Europ. J. Cancer, 4, 607—615, 1968.
  - 9) Cancer Chemotherapy National Service Centre: Cancer Chemother. Rep., 37, 1—33, 1964.
  - 10) 智片芳子: 印刷中, 1970 a, b.
  - 11) Chopra, D. P. and J. D. Simnett: Expl. Cell Res., 58, 319—322, 1969.
  - 12) Druckrey, H., D. Schmdhl, D. Steinhoff, M. Rajewsky, P. Bannasch and T. Flschenträger: Z. Krebsforsch., 63, 28—56, 1959.
  - 13) Együd, L. G. and A. Szent-Györgyi: Biochemistry, N. Y., 55, 388—393, 1966.
  - 14) Együd, L. G., J. A. McLaughlin and A. Szent-Györgyi: Biochemistry, N. Y., 57, 1422—1425, 1967.
  - 15) 藤田興: 日本生理誌, 31, 543—552, 1969.
  - 16) Goutier, R. et I. Bologna: Arch. internat. Physiol. Biochim., 70, 570—572, 1962.
  - 17) Goutier, R. et I. Bologna: Biochim. Biophys. Acta, 72, 40—47, 1963.
  - 18) Hall, R. G. Jr.: Expl. Cell Res., 58, 429—431, 1969.
  - 19) 原田英樹: 岡山医誌, 79, 89—96, 1967.
  - 20) Hegyeli, A., J. A. McLaughlin and A. Szent-Györgyi: proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., 49, 230—232, 1963.
  - 21) Hegyeli, A., J. A. McLaughlin and A. Szent-Györgyi: Science, N. Y., 140, 1391—1392, 1963.
  - 22) Hegyeli, A.: Science, N. Y., 146, 77—78, 1964.
  - 23) Heilbrunn, L. V., A. B. Chaet, A. Dunn and W. L. Wilson: Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole, 106, 158—168, 1954.
  - 24) Hinderer, H., M. Volm and K. Wayss: Expl. Cell Res., 59, 414—468, 1970.
  - 25) 日野道夫: 岡山医誌, 74, 729—740, 1962.
  - 26) 福井正男: 米子医誌, 9, 673—681, 1958.
  - 27) Iversen, O. H. and K. Elgjo: The effect of chalone on the mitotic rate and on the mitotic duration in hairless mouse epidermis. In: Control of cellular growth in adult organisms. Pp. 83—91, H. Teir and T. Rytömaa (Ed.) Acad. Press, London and N. Y., 1967.
  - 28) 門長生: 米子医誌, 12, 71—84, 1961.
  - 29) 金尾浩志: 岡山医誌, 77, 631—644, 1965.
  - 30) 木本克彦, 藤田興, 子林芳治, 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: 岡山医誌, 80, 1211—1222, 1968.
  - 31) Kimoto, K.: Acta Med. Okayama, 23, 27—46, 1969.
  - 32) Kobayashi, Y.: Acta Med. Okayama, 23, 569—588, 1969.
  - 33) 越宗猪一郎: 日本生理誌, 28, 308—316, 1966.
  - 34) Meek, E. S.: Antitumour and antiviral substances of natural origin. Recent results in cancer research. vol. 28, Springer-Verlag Berlin, 1970.
  - 35) 宮原昌彦: 米子医誌, 10, 13—20, 1959.
  - 36) Mohr, V., J. Althoff, V. Kinzel, R. Süß, and M. Volm: Nature, Lond., 220, 138—139, 1968.
  - 37) Nilsson, G., and L. Philipson: Expl. Cell Res., 51, 275—290, 1968.
  - 38) 西田勇, 中山沃, 福井正男, 三好実三, 浜村寛: 米子医誌, 9, 545—550, 1958.
  - 39) 西田勇, 村上哲英, 金尾浩志: 細胞化学シンポジウム, 14, 54—70, 1964.
  - 40) Nisida, I. and T. H. Murakami: Acta Med. Okayama, 19, 1—9, 1965a.
  - 41) Nisida, I. and T. H. Murakami: Acta Med. Okayama, 19, 11—18, 1965b.
  - 42) 西田勇, 村上哲英, 藤芳子, 原田英樹: 細胞化学シンポジウム, 15, 225—231, 1965.
  - 43) 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: 細胞化学シンポジウム 17, 207—216, 1966.
  - 44) 大月恒: 印刷中. 1970 a, b.
  - 45) Ohya, T.: Acta Med. Okayama, 21, 227—250, 1967.
  - 46) Otsuka, H. and H. Terayama: Biochim. Biophys. Acta, 123, 274—285, 1966.
  - 47) Rytömaa, T. and K. Kiviniemi: Europ. J. Cancer, 4, 595—606, 1968.
  - 48) Rytömaa, T. and K. Kiviniemi: Nature, Lond., 220, 136—137, 1968.
  - 49) Stich, H. F.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 90, 603—609, 1960.
  - 50) Szent-Györgyi, A., A. Hegyeli and J. A. McLaughlin: proc. natn. Acad. Sci. U. S. A., 48,

- 1439—1442, 1962.
- 51) Szent-Györgyi, A., A. Hegyeli and J. A. McLaughlin: *proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, 49, 878—879, 1963.
- 52) Szent-Györgyi, A., A. Hegyeli and J. A. McLaughlin: *Science, N. Y.*, 140, 1391—1392, 1963.
- 53) Szent-Györgyi, A.: *Current Therapeutic Res.*, 7, 85—90, 1965.
- 54) Szent-Györgyi, A.: *Science, N. Y.*, 149, 34—37, 1965.
- 55) 高橋誠一郎: *岡山医誌*, 81, 59—70, 1969.
- 56) Teir, H., A. Lahtiharju, A. Alho and K. J. Forsell: *Autoregulation of growth by tissue breakdown products. In: Control of cellular growth in adult organisms. Pp. 68—82, H. Teir and T. Rytömaa (Ed.) Acad. Press, London and N. Y.*, 1967.
- 57) 寺坂俊明: *岡山医誌*, 79, 734—742, 1967.
- 58) 得本博充: *岡山医誌*, 74, 679—683, 1962.
- 59) 山田俊典: 印刷中, 1970.
- 60) Zimmerman, S. B., T. H. Murakami and A. M. Zimmerman: *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, 134, 356—366, 1968.
- 61) Zimmerman, A. M.: *High pressure studies on synthesis in marine egg. In: High pressure effects on cellular processes. Pp. 235—257, A. M. Zimmerman (Ed.) Academic Press, New York*, 1970.
- 62) 牧山政雄, 垣内一郎, 半井昭英, 小林芳治, 智片芳子, 村上哲英, 西田勇: 第22回日本生理学会中四国地方会で発表, 1970.
- 63) Isaacs, A., and J. Lindenmann: *Proc. Roy. Soc., B* 147, 258—267, 1957.
- 64) Isaacs, A., J. Lindenmann, and R. C. Valentine: *Proc. Roy. Soc., B* 147, 268—273, 1957.

---

Regulation of Cell Division with "Muscle Cornin".  
The Fundamental Studies on its Application for in vivo

By

Yoshinobu FUJII

Department of Physiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan  
(Director: Prof. Isamu Nisida)

The sterilizing effect and hemolytic effect of cornin, extracted from skeletal muscle of rabbit were studied in vivo and in vitro. The results are summarized as follows:

1. Muscle cornin has no effect whatever on sterility when administrated into new born mice and adult mice.
  2. There is no difference on the period of pregnancy and on the new born numbers as compared with no treated control.
  3. When the erythrocytes are incubated with muscle cornin and then transferred into the hypotonic salt solution, the hemolytic effect occurs below 0.7 per cent salt solution.
-