

癌に関する実験的研究

第 1 編

Bashford 癌培養細胞に及ぼす各種抗癌剤の影響

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

陸 亮 介

〔昭和 40 年 7 月 23 日受稿〕

第 1 編 内容目次

第 1 章 緒 言

第 2 章 実験材料並びに実験方法

第 1 節 実験材料

I) 培養組織

II) 培養液

第 2 節 実験方法

I) 培養方法

II) 観察方法

III) 使用せる抗癌剤

第 3 章 実験成績

第 1 節 廻転培養法に於ける各種抗癌剤の最小有効濃度の決定

第 2 節 各種抗癌剤の Bashford 癌細胞に与える影響

I) 位相差顕微鏡所見

II) 染色所見

第 4 章 総括並びに考按

第 5 章 結 語

第 1 章 緒 言

近年における組織培養法の発展は実に目ざましいものがあり、医学の各分野において極めて広範囲に應用されている。他方、今日、癌の化学療法剤の登場も枚挙にいとまなく、1946年 Patersen によるウレタンの制癌効果の発見、ナイトロゼンマスタードの白血病治療への應用以来、今日では Alkylating agents, Anti-metabolites, Steroid hormone, Radioactive isotope, 抗腫瘍性抗生物質等極めて広範囲な化学療法剤の登場を見、実際にも臨床に應用され、ある程度の効果を見るに至っている。

従来所謂抗癌剤が、癌細胞自体への直接的破壊作用を主目標とする限り、制癌剤の効果、またその効果の比較、作用機序の検索等は細胞水準において検討されるのが第一であり、また便利でもある。この目的のために動物実験によく用いられる移植腫瘍の組織培養が従来広く用いられて来ている。現在迄莫大な数の物質がスクリーニングされ、また個々の制癌物質も動物腫瘍及び培養細胞についてその効果が調べられ、それぞれ特徴ある抗癌作用が認められて来ている。

さて、培養細胞への抗癌剤の影響は、Moore⁴⁾, Hughes²⁰⁾, Eagle & Foly²⁷⁾²⁸⁾ 等によつて試みられ、我国でも野嶽一派¹⁾²⁾³⁾ は HeLa 細胞、羊膜細胞の静置培養にて、ナイトロミン、チオテパ、カルチノフィリン等を添加し、その増殖抑制効果や、出現細胞についての染色学的追求を行なつており、牧野一派⁵⁾⁷⁾⁸⁾³⁰⁾ もザルコマイシン、マイトマイシンをシロネズミの紡錘細胞肉腫の廻転培養細胞に添加して染色標本を作り、細胞化学的並びに核学的見地より検討した成績を報告し、教室の柴田⁹⁾ は吉田肉腫細胞の液体培養にて数種の抗癌剤の効果を位相差顕微鏡で観察報告した。また教室の鍋島¹⁰⁾、佐藤¹¹⁾ は白血病患者の骨髓体外組織培養を行ない、これに主な抗癌剤を添加し、更に同様な実験を健康人と健康動物についても実施してそれぞれの抗癌剤の特徴ある影響について報告している。一方、教室の水津¹²⁾ は Bashford 癌の廻転培養による長期培養に始めて成功し、その培養学的基礎を確立した。著者は従来理想的培養法でありながら癌組織培養にあまり用いられていない廻転培養法で Bashford 癌の組織培養を行ない、これに抗癌剤としてナイトロミン、チオテパ、マイトマイシン C、クロモマイシンを撰んで

添加し、その増殖抑制効果を、増殖曲線により検討して最小有効濃度を決定、さらに培養細胞への薬剤添加にて、従来あまり記載のない位相差顕微鏡生体観察を行なつて光学顕微鏡的の微細構造の変化を追求した。化学薬品は高濃度で作用させると殆んど全物質が細胞破壊作用を有し、そのような変化はまた非特異的でもあるので最小有効濃度乃至はそれに近い低濃度の薬剤添加により細胞に表れる微細な変化こそ細胞学的に意義があると判断したのである。かく留意して実験を行なう事によつて、各種抗癌剤のそれぞれ特徴ある影響を観察し得、また興味ある若干の知見を得たので報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

I) 培養組織

実験に使用した Bashford 癌は塩野義研究所由来のもので、少なくとも近年は雑系マウスに継代移植され維持されているものである。Bashford 癌は1907年、自然発生マウス乳癌の細胞移植によつて可移植性固形マウス癌として確立されたもので、比較的容易な移植可能固形癌であり、著者も雑系マウスに腫瘍移植を行なつた。すなわち、15日毎に体重約8gの雑系マウスの背部皮下にリンゲル氏液浮遊の細切癌組織片を注射器または移植針にて注入を行なつた。移植陽性率は平均80%以上である。培養に当つては移植2週間前後のやや硬く、潰瘍形成のない中指乃至拇指頭大の腫瘍を持つマウスを撲殺して腫瘍を摘出し、組織断面が淡紅色、半透明の光沢を有する部分を使用した。以上の操作は可及的速に行なつた。

II) 培養液

イ) 血清：家鶏の雄成鶏をあらかじめ12~24時間絶食させ、翼静脈より採血し、約37°C、30分で血餅収縮を待つて後、3000回転20分遠沈し、分離血清をワ氏試験管に分注、さらに56°C 30分間水槽にて非働化、これを氷室に保存し、1~3日以内に使用した。

ロ) 鶏胎圧搾液：入卵後9日目の鶏胎児をリンゲル氏液にて洗滌、注射筒にて圧搾し、ワ氏試験管に分注、直ちに或いは1~2日の内に使用した。

ハ) ハンクス氏液。

ニ) 7%重曹水；(メイロン；大塚製薬製品) pH調節に使用。

ホ) 培養液組成：鶏胎圧搾液5%、非働化血清40

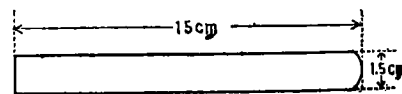
%、ハンクス氏液55%のものを使用。このような組成のものを使用したのは教室の水津¹²⁾がBashford癌の培養法について行なつた研究結果を参考として決定したのである。すなわち彼は増生様式をI~VI型に分類し、中でもIV~VI型は殆んど癌細胞よりなりしかも増殖旺盛である事、就中VI型は一層の模様増殖を示す中間部が多く諸種の観察に適することを示し、さらに血清の種類、ならびに非働化の問題、鶏胎圧搾液の割合等、種々の組み合わせについて行なつた詳細なる研究を報告しているが、これらの成績を検討した結果、上記組成が最適と判断して使用したのである。

第2節 実験方法

I) 培養方法

Carrel に始まり、Gey により実用化された廻転培養法を用いた。本培養法は周知の如く培養試験管壁に組織片を付け、培養液を加えて恒温槽中の廻転ドラムにはめ、約5°Cの傾斜でゆつくり廻転させると培養液と空気が交互に組織片を潤し、細胞の成長と培地の攪拌が適当に行なわれる方式である。培養試験管には長さ15cm、直径1.5cmの丸型硬質ガラス管(第1図)を用い、此れにWゴム栓(W15号)をはめたものを使用した。培養ガラス器具はクローム硫酸の中に浸漬し、充分に水洗した後、さらに蒸留水で洗い、120°C 2時間乾熱滅菌を行ない、他の器具も完全滅菌を施して使用した。摘出した腫瘍はpH7.6に調製せるハンクス氏液で洗滌した後、グレイフェ刀にて凡そ1×1mmに細切し、その小さな組織片を1cm間隔で培養管壁に3ヶ植えた。これにpH7.6に調製せる培養液を1.5cc入れ、Wゴム栓にて密封し、5°傾斜の廻転ドラムに挿入、37°Cで1時間約12回転させて培養を行なつた。尚一群の実験には組織片は1ヶの腫瘍より選択採取し、培地も同時に作つたものを使用した。

第1図 丸型培養試験管



II) 観察方法

イ) 細胞核数算定による増殖曲線：培養試験管内の細胞核数を培養日数を追つてそれぞれ3日、5日、7日目に算出し、各種抗癌剤添加培養液及び対照非添加培養液における細胞核数を比較した。

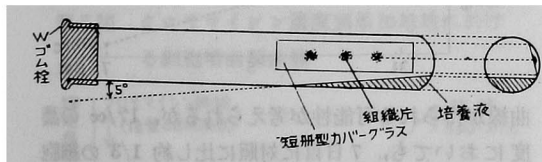
核数算定法は試験管内の培養液を捨て、リンゲル

氏液で一度軽く洗滌した後、白金耳で機械的に増生帯及び原組織を剝離し、次いで0.3%のEDTA液5ccを加え、30分間37°Cの恒温槽中に入れてよく振盪して細胞の浮遊液とする。

次いでこの浮遊液を目盛付スピツグラスに移し1000回転、5分間遠沈し、細胞沈渣0.5ccを残して上澄を捨て、これに蒸留水1000cc、クエン酸21g、クリスタル紫500mg、フォルマリン原液10滴なる組成のクエン酸溶液4ccを加えて、再び37°Cの恒温槽中に入れて30分間よく振盪した後、1000回転10分間遠沈する。次いで残りが正確に1ccとなるように上澄をピペットで静かに、且充分攪拌し、均等な細胞浮遊液としてBürker氏血球計算盤に移し、全区劃内の核数を数え、これを9で割つて10000倍し、一培養管当りの細胞数を計算した。

ロ) 位相差顕微鏡による観察並びに染色標本による観察方法：培養法は前述の廻転培養法に準じて行ない、標本作成のためには口径15mm、長さ150mm、の丸型硬質試験管の中に12×60mmの短冊型カバーグラスを挿入し培養を行なつた。(第2図)

第 2 図

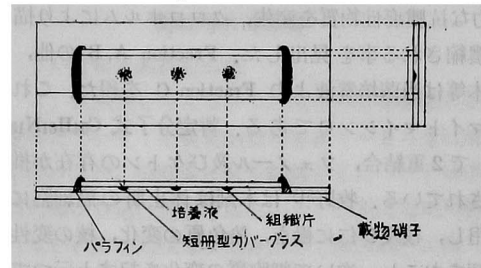


短冊型カバーグラスによる廻転培養法

このカバーグラスの上に直接、1cm間隔で3ヶの組織片を配列し、およそ30分後に組織片がやや乾燥してカバーグラス壁に密着した時に培養管に収め、培養液1.5cc宛加えてこれにWゴム栓をして廻転ドラム内に挿入した。また染色標本作成の場合には、血漿膜を支持体として用いた。すなわち前述のカバーグラスの上に1.5cmはなして血漿1滴宛3ヶ所に置き、胎児浸出液一滴宛加える。血漿の固まらない内にすばやく細いピンセットの先でこの両液をよく混和しながら直径10mm位迄広げ、その中央に組織片1ヶを血漿膜面上でなく出来るだけ深く埋めるように置く。これらは血漿の固まらない内に可及的速やかに行なう必要がある。このカバーグラスを培養試験管に収め、廻転ドラムに挿入する。

位相差顕微鏡による観察のために第3図の如き¹²⁾厚さ0.7mmの特殊な載物ガラスを用い、その上に培養組織片のついた短冊型カバーグラスを組織片を

第 3 図



短冊型カバーグラスに増生せる癌細胞の生態観察法(水津)

下にして載せ、間隙に培養液を流し込み、両端をパラフィンで封ずる。これを37°Cに保つた顕微鏡保温箱内で、日本光学の位相差顕微鏡(DM, DLL)を用いて観察した。固定染色標本作製に当つては、純アルコール数分、70%アルコール数十秒で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、バルサムに封入した。

Ⅲ) 使用せる抗癌剤

抗癌剤としては、ナイトロミン、チオテパ、マイトマイシンC、クロモマイシンの4種を使用した。

イ) ナイトロミン：細胞毒アルキル化剤の中のクロロエチルアミン化合物で、一般にナイトロゼンマスタード系化合物と云われ(CICH₂CH₂)₂N-基を機能群として持つている。ナイトロゼンマスタードの中でN-oxideは毒性が弱く、抗腫瘍性が強い。本剤はMethyl-bis-(β-chlorethyl) amin-N-oxide塩酸塩で、無臭、白色柱状結晶または粉末で、m. p. 109~110°C、水、アルコールによく溶ける。1%水溶液はpH2.8を呈する。従つて本剤の培養液添加に際しては重曹水であらかじめpHを調節しておく事が大切である。

臨床的には血液リンパ系の悪性腫瘍性疾患に特に効果が強いと云われている。(吉富製薬製品)。

ロ) チオテパ：細胞毒アルキル化剤の中、燐酸系エチレンイミン系化合物で、特にチオ燐酸系化合物は安定で副作用が少ない。N, N', N'-Triethylene thiophosphoramidateで、無色、無臭の結晶または白色結晶性粉末、m. p. 55°C、水、アルコール、エーテル等に易溶、水溶液(1:10)は略々中性(pH. 6.5)である。TEM, TEPAより副作用が少なく、造血臓器の悪性腫瘍性疾患に特に有効で、従来の抗癌剤中抗腫瘍スペクトラムは可成り広いと云われている(テスパミン、住友化学製品)。

ハ) マイトマイシンC：1956年、北里研究所の奏

が一新放線菌 *Streptomyces Caespitosus* を分離し、強力な抗腫瘍性物質を産生、クロロホルムにより抽出濃縮される事を見出した。Fraction A, B の他、若木等は当菌培養液より Fraction C を得た。これがマイトマイシン C である。暫定分子式 $C_{64}H_{61}N_{13}O_{19}$ で 2 重結合、フェノール及びケトンの存在が推定されている。牧野³⁴⁾ は本剤は休止期の癌細胞に作用し、核及び仁に働き、染色質の変化、核の変性崩解をおこし、次いで細胞質の変化を起すと云っている。広範囲な抗腫瘍スペクトラムを持つと云われる (マイトマイシン、協和醸酵及び三共製品)。

ニ) クロモマイシン：立岡 (武田) 等が土壌より分離した *Streptomyces griseus* の変種 7 号の作る抗腫瘍性物質で、吸着クロマトグラフィーその他の方法でクロモマイシン混合物より A, B, C, 3 群に分け、A 群をさらに A₁~A₅ に分離し、A₃ が最も有効である事が認められた。輝黄色の粉末で、推定分子式 $C_{22-23}H_{32-34}O_{11}$ 、グラム陽性菌に強い抗菌力がある。抗腫瘍性はエールリッヒ癌、ラッテ腹水肝癌等で認められ、臨床的には副作用としての白血球減少作用が比較的弱いと云われている (武田薬品製品)。

尚細胞増殖曲線の作製に当って感染を避けるために培養液にペニシリン 100units/cc, ストレプトマイシン 100 γ /cc を使用した。

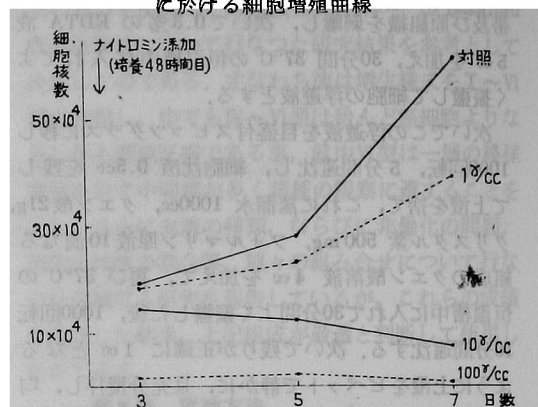
第 3 章 実験成績

第 1 節 廻転培養法における各種抗剤の最小有効濃度の決定

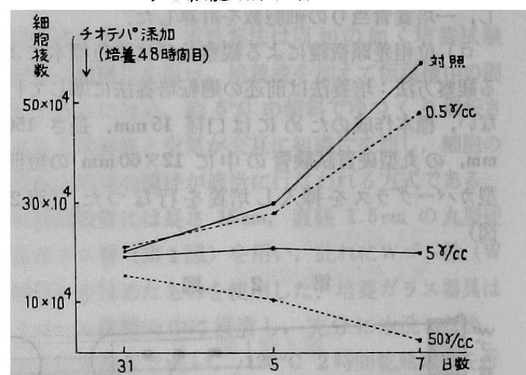
I) ナイトロミン

ナイトロミンの 1 γ , 10 γ , 100 γ /cc の各種濃度における培地中の細胞核数を算定した。すなわち、同時に一本の培養試験管に 3 枚の組織片を植え培養を開始する。48 時間後、ハンクス氏液にナイトロミンを溶かし、培地中にて 1 γ , 10 γ , 100 γ /cc になるように添加し、培養 3 日, 5 日, 7 日目の細胞核数を数え 1 組 3 本の試験管の平均値でもつて算定した。ナイトロミン添加を行なわない対照群では (第 4 図) 培養開始後 3 日, 5 日, 7 日目の細胞核数はそれぞれ 19.37×10^4 , 28.17×10^4 , 6.14×10^4 であるが、ナイトロミン添加群では濃度に比例して細胞核数の減少が見られた。すなわち 1 γ では 7 日目に細胞減少率 35.2%, 10 γ ではすでに増殖曲線はやや下降を示した。100 γ /cc では 3 日目より 1~2 万の細胞が算定出来得るに過ぎなかつた。これ等の増殖曲線より 1 γ と 10 γ の間においては、各濃度に比例した増殖

第 4 図 ナイトロミン濃度別添加培地に於ける細胞増殖曲線



第 5 図 チオテパ濃度別添加培地に於ける細胞増殖曲線



曲線が得られる可能性が考えられるが、1 γ /cc の濃度においても、7 日目に対照に比し約 1/3 の細胞核数の減少が見られたので、Bashford 癌廻転培養法では 1 γ /cc が最小有効濃度と考えてよい。

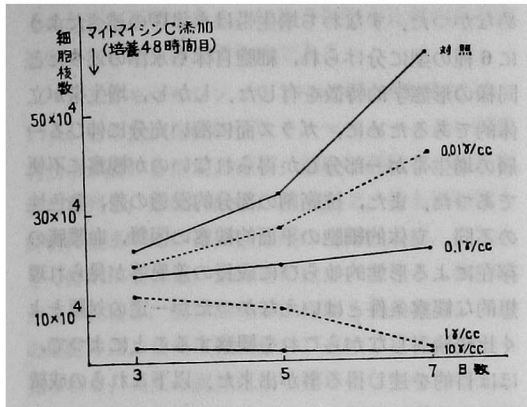
II) チオテパ

チオテパ 0.5 γ /cc では (5 図)、やや抑制効果を認めた。すなわち培養 7 日目 (添加 5 日目) において 16.9% の細胞減少率を見た。また 5 γ /cc では、7 日目に減少率 62% で、曲線は細胞増殖を殆んど示さない事を表わしている。50 γ /cc では 7 日目には殆んど細胞が破壊され、数え得る細胞は 4% 強に過ぎない。3 日目の各種濃度での細胞数値が高い事から効果発現が遅いと推定される。これ等の増殖曲線は 0.5 γ /cc~50 γ /cc 迄の濃度で細胞減少率が大きいため薬剤の有効巾はナイトロミンの如く狭いと解釈される。検索した濃度の中では最小有効濃度は 0.5 γ /cc と解してよい。

III) マイトマイシン C

マイトマイシン C 0.01 γ /cc では (第 6 図)、かなりの増殖抑制効果を認め、7 日目において細胞減

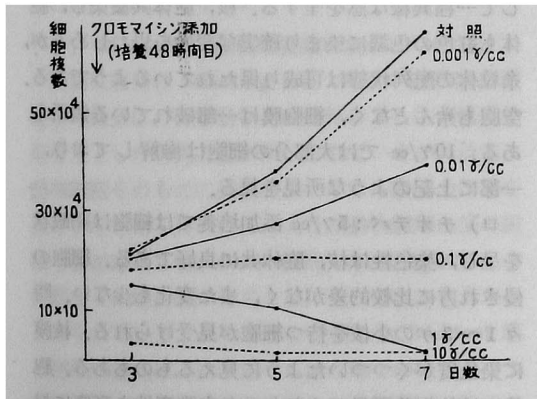
第6図 マイトマイシンC濃度別添加培地に於ける細胞増殖曲線



少率23%, 0.1γ/ccでは64%, 1γ/ccは95.7%となり, 最小有効濃度は0.01γ/ccと考えてよい. 細胞増殖は1桁単位の濃度差に比例して行なわれ, 有効巾は広い. 0.1γ/ccで細胞の増殖は殆んど行なわれず, 1γ/ccでは細胞数は漸減して7日目には殆んど細胞は数えられない. 10γ/ccでは3日目(添加1日目)より大部分の細胞は破壊される.

IV) クロモマイシン

第7図 クロモマイシン濃度別添加培地に於ける細胞増殖曲線



クロモマイシン 0.001γ/ccでは(第7図)7日目で細胞減少率4.8%でやや増殖抑制効果を認め, 同じく7日目で0.01γ/ccでは, 細胞減少率35.4%, 0.1γ/ccでは64%, 1γ, 10γ/ccではそれぞれ97%以上となる. 当薬品もマイトマイシンの如くかなり有効巾を持っていると解釈される. 0.001γ/ccで殆んど有意の差を認め難い所から, 0.01γ/ccを最小有効濃度と考えてよい.

第2節 各種抗癌/剤の Bashford 癌培養細胞に与える影響

I) 位相差顕微鏡所見

イ) 抗癌剤を与えなかつた場合の培養細胞の退行変性について: 培養細胞は培養後7~8日迄は増殖を続けるが, 培養後日数を経過するにつれて増生帯周辺部より退行変性を起し, 7日以後は培地交換を行なわれなければ増生は停止して漸次変性に陥入る. 位相差顕微鏡でかかる退行変性を観察すると, 先づ胞体に変化を起し, ついで核に及ぶ. 胞体の周辺部では細胞膜に接近して中等大の光輝性顆粒を生じ, 糸粒体の運動は漸次不活発となり, 且つ糸状, 紐状の糸粒体の断裂, 短桿状, 粒状の糸粒体の崩壊を来してその数を減少し, ゴルヂー野は濃縮したようになり, 胞体内に浮び上つて見える. 核及び核小体の崩壊は最後迄比較的鮮明に観察出来る. 胞体の縮小と共に, 遂に光輝性顆粒は胞体全部を占め, 糸粒体, ゴルヂー野も認められなくなる. 時にプリスター像を生じる事もあり, 空胞性変化に伴う印環細胞が生じる事もある. 肉眼的にも増生帯は透明度を失い, 白色, 時に淡黄色となり, 縮少して脱落し易くなり一部は培養管に附着, 一部は脱落して下う.

癌細胞は培養3日目頃より原組織周辺から突起状, あるいは網眼状に増生し始め, 5~6日が最も強い増生を示すが, 位相差顕微鏡的に見ると3~4日, 特に3日目に於いては, 光輝性顆粒の出現が殆んど見られないので, 培養48時間を経た細胞に各種抗癌剤を添加して観察した. 以下各薬剤別にその所見について述べる.

ロ) ナイトロミン: 著者は先に培養試験中の細胞核数を数え, 抗癌剤の有効濃度決定の一つの示標としたが, 前節で述べた如くナイトロミンでは1γ/ccを最小有効濃度とし, この値を元として0.1γ/cc, 1γ/cc, 10γ/cc 3種類の濃度で培養48時間程添加, その時24時間にて検鏡した. この場合3種の濃度で, 対照に比し, 変化の表われているのは1γ/cc, 10γ/ccであり, 1γ/ccを細胞形態に与える最小有効濃度と考えて観察に採用した. なお, 他の薬剤についてもこの方法に準じて変化の表れる最小の濃度を使用した.

先づ増生帯はシートより剥離し, 島状に数ヶの細胞集団を形成し, 胞体は球形乃至卵円形となり, 細胞突起を認めない(写真4, 5). 変化の激しい細胞は膨化を起しており, 位相差像は不鮮明となる(写真7). 封入細胞¹⁰⁾が多数認められた(写真6). 核

小体がやや硬化したものや、核膜が一部不鮮明となつた個所も見られた。しかし変性の軽い細胞で核小体の膨化像も見られる。糸粒体は一般に少なく、光輝性顆粒の出現も少ない。

ハ) チオテパ: チオテパ $1\gamma/cc$ では、増生帯はマクトマイシンC同様網眼状を呈して癌細胞個々の連絡は充分保持されている(写真8)。癌細胞は対照に比し一般に縮少し、核異常としては巨大核を有する細胞が多く、多角細胞、対細胞も認められた(写真9~11)。強拡大にては、核の変化は極めて軽度、胞体の変化も増生帯周辺部に多い。糸粒体の断裂が認められ、じゅつ状を示すものが観察された。細胞膜は一部破れたものが散見される。

ニ) マイトマイシンC: マイトマイシンC $0.1\gamma/cc$ の濃度にては、増生帯は網眼状を呈し(写真12)、癌細胞は胞体周辺より気泡状突起を出しているが、なお細胞相互間の連繋は保持されている。胞体の大きさは対照に比し殆んど変化なく、核異常も増加を認めなかつた。光学顕微鏡の微細構造では核に殆んど変化を認めず、胞体の変化が主である(写真13~15)。糸粒体の膨化や(写真14)、太くなつたものが増加し、変性空胞が多数認められる。変性の進んだものではプリスター像が著明なのが特徴である。

ホ) クロモマイシン: クロモマイシン $0.1\gamma/cc$ では、増生帯は網眼状を呈し、癌細胞は突起を出して連なつているが(写真16)、やや島状集団化及び細胞が円味を帯びて来る傾向がある。原組織と増生帯の間には空隙が認められた。癌細胞には大小不同が著明である。また、多数の印環細胞(写真19)が認められた。核膜は薄く、核小体は甚だ縮少し、小円形となり、核内に浮び上つて見える。核内部は透明な感じで核網構造は不明瞭である。胞体では糸粒体が一般に不鮮明で、細胞膜の一部に崩壊個所が認められた(写真17~19)。

II) ヘマトキシリン・エオジン染色所見

ヘマトキシリン・エオジン染色により細胞学的に観察した Bashford 株は、これまで使用していた継代株が途中で杜絶したため、新たに塩野義研究所より分譲されたものである。この Bashford 癌株の培養では、培養時にガラス面に直接附着させる方法によると、増生帯周辺部の薄層の細胞の脱落を見たので、支持体として血漿膜を使用し、この中に組織片を埋めて廻転培養を行つた。培養細胞は増生帯を形成し、血漿膜を消化しながら成長帯を形成、培養可能となつたので、これに抗癌剤を添加し、ヘマトキ

シリン・エオジン染色を施して観察したが、増生方式及び細胞の形態学的特徴は前株と差異を殆んど認めなかつた。すなわち増生帯は水津¹²⁾の述べたように6種の型に分けられ、細胞自体も水津の述べたと同様の形態学的特徴を有した。しかし、増生帯が立体的であるために、ガラス面に沿い充分に伸びる一層の増生帯が一部分しか得られないのが観察に不便であつた。また、抗癌剤の部分的浸透の差、染色性の不同、立体的細胞の平面的観察の困難、血漿膜の存在による形態的並びに成長の差異等が見られ理想的な観察条件とはいえなかつたが一定の対照とよく比較検討しながらこれを観察することによつて、ほぼ目的を達し得る事が出来た。以下これらの成績について述べる。

イ) ナイトロミン: 培養3日目にナイトロミン $1\gamma/cc$ を添加し、24時間後に染色を施した。標本一枚の中にも胞体が軽度の収縮のみを示す部分と全体に亘つて強い変化を起した部分が混在する。明らかに抗癌剤の影響がはつきり表われているもの、すなわち島状の集団を作り、細胞突起の少ない円形乃至紡錘形の細胞が増生帯の中心部に向つて恰も抗癌剤から逃げる如き様相を呈する(写真22~25)。核は細胞の一方に偏より、細胞は縮少し特に核は核濃縮の傾向がある。核小体も核の一方に偏より核膜に接して一種異様な感を呈する。核、胞体共濃染し、胞体も紅色の色調に染まり確実な変性を思わせるが、糸粒体の配列状態は可成り保たれているようである。空胞も殆んどなく、細胞膜は一部破れている個所もある。 $10\gamma/cc$ では大部分の細胞は融解しており、一部に上記のような所見を見る。

ロ) チオテパ: $5\gamma/cc$ 添加培養では細胞は網眼状を呈し、染色性は核、胞体共に良好である。細胞の侵され方に比較的差がなく、また変化も少ない。時々1~3ヶの小核を持つ細胞が見受けられる。核膜に染色質がくつついたように見えるものもある。胞体には位相差所見で少なかつた空胞変性を高度に起したものが多い(写真26~27)。

ハ) マイトマイシンC: マイトマイシンC $0.1\gamma/cc$ 添加培養では増生帯周辺部に特に破壊作用の著明な細胞の押しつけられた集団がある。(写真28~30)。この部分の細胞胞体の染色性はやや薄い紅色の色調を帯びている。 $1\gamma/cc$ でもあまり所見が相違ないが、やや破壊程度が強い。胞体のゴルデー野附近に主として鮮紅色の大きい塊を持つた細胞が多い。空胞変性もあり、細胞膜も一部破れ、プリスター像

を示すものも見られた。核は核小体の廻りが透明になるように見えたものもあり、染色時の操作によるものか否か不明である。繊維芽細胞が比較的高濃度迄生長しているのが印象的である。

ハ) クロモマイシン: 0.17/cc 添加培養では、17/cc との差が比較的少なく、マイトマイシン同様有効巾が広いと推定出来る。細胞は島状または網眼状に排列し、形は紡錘状、楕円形で、核も細胞質も鮮明に染まっている。生き残つた細胞は核、仁共大きく鮮明に染まり、胞体との比が大である。細胞膜が先づ破壊し、胞体四散し、裸核も見られた。深部の細胞では、核内に仁が浮かび上つて見えるものも見られる。高度の変性を起し核片となつたものと、一見正常細胞の如き胞体の少ない細胞が混在するのが特徴である。部分的にはナイトロミンの如く、核が血漿膜深部に向つて逃げるように見える細胞も観察出来た(写真31~34)。

第4章 総括並びに考按

著者は Bashford 癌の廻転培養法を用いてナイトロミン、チオテパ、マイトマイシンC、クロモマイシンの細胞の増殖態及び細胞の形態に及ぼす影響につき検索を行ない、以上述べた如き興味ある知見を得る事が出来たが、以下これらの成績を総括し若干の考按を加えてみたい。

I) Bashford 癌廻転培養法の利点について。

所謂抗癌剤の Screening test、あるいは抗癌作用機序の検索に、担癌動物への投与による生命延長効果を主とした研究方法が用いられているが、他方、腫瘍細胞そのものに抗癌剤がいかなる直接の作用を及ぼすかを知る目的には、人及び動物腫瘍由来の組織培養が応用され、HeLa 細胞、吉田肉腫細胞その他数多くの培養系が樹立され、それぞれの利点がみとめられている。今日著者の使用した Bashford 癌の廻転培養法は、以下述べる如き種々の特徴を持っているが、特に位相差顕微鏡による観察には極めて勝れた培養系と考えられる。すなわち、1) 培養試験管での管壁培養が比較的容易に行なわれること、2) 短冊カバーガラスによる観察にも便利であること、3) 出現せる培養細胞は増生帯中間部で一層のシートを作り、原組織の細胞より培養細胞は非常に大きくなり、且つ伸びているので、光学的に細胞の構造がかなり微細、且明瞭に観察し得る事等である。

II) 各種抗癌剤の添加による Bashford 癌培養細胞の増殖曲線、特に最小有効濃度の決定について

抗癌剤の癌細胞に与える影響を知るためには、先づどの程度の濃度が培養細胞に障害を与えるかを予め知る必要がある。著者は一本の試験管内の細胞数を指標として、その細胞核数を数えて増殖曲線を作り、最小有効濃度を決定することとした。細胞核数算定日を3日、5日、7日目、としたのは培養細胞は3日目頃より増殖を始め、5~6日を頂点とする Logarithmic phase に入り、7~8日頃迄最初の培地にて増殖を続けるからである。薬剤の添加は培養後24時間で培養細胞が培養液に慣れるとされ、これ以後の投与が常識であり、著者は48時間後に添加することとした。

イ) ナイトロミン添加の場合では、対照にくらべ、17/cc で増殖はやや抑制され(第4図)、増殖曲線は107/cc では寧ろ下降曲線を取る。1007/cc にては細胞は殆んど破壊されてしまうと考えられる。しかし1007/cc でも、ごく僅かの核数が算定出来ることより何とか生き伸びた、あるいはまた核そのものの死滅しない細胞が存在するのであろう。これらの成績より著者はナイトロミンの Bashford 癌培養細胞に及ぼす最小有効濃度を17/cc としたが、勿論これは10倍稀釈法なので、阻止濃度は17/cc 以下にて得られる可能性は充分考えられる。野村⁹⁾は HeLa 細胞静置培養によるナイトロミンの最初よりの添加成績で、0.17/cc より増殖抑制を認め、15.67/cc で細胞減少率約50% (IC₅₀) と報告している。

ロ) チオテパ添加の場合では、0.57/cc にて細胞増殖の抑制効果を認め(第5図)、57/cc では、7日目で細胞核数は対照の38%となり、細胞は増加を示さない。これらの成績より、チオテパ最小有効濃度は0.57/cc と考えてよいが、0.57/cc における抑制効果は余り顕著ではないので、私は中間の17/cc を取つて位相差顕微鏡観察に使用した。チオテパでは、Moore⁴⁾などは HeLa 細胞、羊膜細胞にて両細胞共1.257/cc でやや抑制、2.57/cc で細胞減少率50%を示したと報告している。林²⁾は同じ2つの細胞について、細胞形態学的変化を各濃度、作用時間を変え、詳細に追求し、ほぼ類似の結果を報告した。これらと著者の成績は大體一致している。

ハ) マイトマイシンC添加の場合では、最小有効濃度は第6図より0.017/cc 以下と云える、17/cc

以上では増殖は行なわれない。野嶽¹⁾等のHeLa細胞静置法では、0.37/ccで増殖停止、0.00057/ccでもやや抑制の傾各がうかがわれているが、著者の場合0.017/ccで対照と比較、7日目で23%減少を見た。渡辺²²⁾等は腹水肝癌、AHB、AH130のSuspeusion Cultureによるマイトマイシン添加で、0.0057/ccでは36時間以後抑制を見、0.017~0.57/ccで1~3時間作用させた後培地を更新して72時間後、細胞数は約半分になったと云う。神崎²³⁾はマイトマイシン添加後5~7日、HeLa細胞は0.0057/ccでは細胞数は約半分になり、0.00017/ccでは全く正常だったと報告している。Bashford癌よりHeLa細胞がやや敏感なようである。

ハ) クロモマイシン添加の場合、0.0017/ccではやや増殖抑制の傾向がみられ、細胞核数は0.017/ccにて7日目(第7図)約35.4%減少、0.17/ccでは64%、17/cc以上では急激に減少する。0.0017/ccにおける細胞増殖抑制は対照とくらべ明らかな差がないので最小有効濃度は0.017/ccと考えられる。渡辺²²⁾は前述の腹水肝癌組織培養にて、クロモマイシン0.01~0.27/ccを1~3時間作用させ、培地交換後72時間で細胞数は半減し、また0.00017/cc以下では影響なしと報告している。

Ⅲ) Bashford癌培養細胞に及ぼす各種抗癌剤の影響に関する細胞形態学的所見、特に位相差所見について

ナイトロミン17/ccでの位相差顕微鏡観察による変化については、先づ細胞の並び方に特徴がある。すなわち、他の3種の抗癌剤では、細胞は細胞突起でよく連繫されていたが、ナイトロミンでは細胞は突起がなくなり、類円形の細胞があちこちに集団を作っている。また封入細胞出現も興味ある現象である。変性の進んだ膨化細胞も見られるが、今一つの特徴は胞体に殆んど変化がなく核が軽度の変化を起しておることである。すなわち核膜の一部肥厚、一部不鮮明化が認められ、核小体の変化はやや不明瞭ながら認められるが、胞体の変化は比較的変性が進んでもその形態を維持しておる。ナイトロミンの制癌作用に関しては腹水型の癌腫を使つたものが多く、中でも武田¹⁷⁾はエールリッヒ癌のマウス腹腔投与で位相差顕微鏡による観察を行ない、細胞の膨化、染色体及び糸粒体の変化、特に中間期以降の分裂細胞の障害による分裂異常を認めている。分裂中期の染色体の著変にかかわらず、糸粒体に変化が少ないことは著者の所見と一致している。培養細胞への添

加を行なつた実験について述べれば、野村²⁴⁾はHeLa細胞染色標本で異常分裂像、膨化細胞、巨細胞の出現を濃度差、作用時間の組み合わせにより詳細に考察しているが、細胞形態学的にはあまり詳細な検索は行なっていない。これらの成績にくらべ、Bashford癌では異常分裂による細胞出現が少なかった。Bashford癌で特異な細胞の連がり方が見られたのは細胞膜の性質の変化によるものであろう。また、封入細胞が多いのも分裂終期後の細胞分離が悪いが、別々の2ヶの細胞間の強い結束によつて出来るのか、とにかく細胞膜の性状の変化が起つたものと想像してもよさそうに思える。染色標本の所見で、部分的核濃縮や細胞の円形化などの特徴が認められたが、これらも位相差所見と一致している。染色標本で血漿膜深部へ逃避するような形態の細胞が見られたが、軽度の核濃縮を起しておりながらも、なお生きた細胞としての存在を思わせる。

チオテパ17/ccでは、種々の異常細胞が位相差観察にて見られた。すなわち、巨細胞、対細胞、多核細胞等であるが、染色標本にて小核を持つ細胞が見られている。今一つの特徴は胞体の微細な変化で、特に糸粒体の断裂である。林²⁵⁾はHeLa細胞でチオテパを添加し、濃度に応じて巨細胞、空胞化細胞、崩壊小型細胞が出現し、阿波⁷⁾はマウス腹水腫瘍細胞への影響で、マイトマイシンの如く、静止期の細胞に働き、その結果核、細胞質の膨潤、巨細胞、多角細胞、対細胞等の異常細胞出現について報告している。異常細胞出現においては、著者もほぼ一致した所見を得ているが、静止核の著しい膨潤や染色性の低下は見られなかつた。胞体の変化では、位相差所見で糸粒体の断裂が所々見られた。主としてRNAを含み細胞呼吸系の中心と考えられている糸粒体にチオテパが直接に影響を及ぼしたことは注目すべき事実と考える。かくのごとく、著者はチオテパは核に働いて染色質に化学的変化を及ぼし、種々の異常細胞を出現させると推察するが、一方細胞質にも同じ濃度で微細な変化を起すことを観察したわけである。

マイトマイシンC 0.17/ccでの位相差所見の特徴は胞体の変化が著明なことである。胞体に種々の変化が見られるが、たとえば糸粒体は太くなつたものが見られ、変性空胞が非常に著明で泡沫突起を出しながら変性して行く細胞が視野を充滿する。その割りに核があまり侵されていないのは、染色所見でも同様であつた。野嶽¹⁾等はHeLa細胞で、出現細胞

と有効濃度の詳しい研究を行ない、マイトマイシンは有効巾が広く、また 0.17/～0.37/cc の濃度では巨細胞等の異常細胞の出現が大半を占めると報じている。小林⁸⁾はマウス紡錘細胞肉腫の廻転培養でマイトマイシンCを添加、染色にて細胞変態学並びに細胞化学的観察を行ない静止核は及ぼす影響を強張している。すなわち静止核への影響の結果、分裂異常を来し、小核、分葉核、Fragmentation が出現、核のDNAの変動を認めているが、一方細胞質にも空胞形成、染色性消失を認めている。著者が認めた細胞核にあまり変化なく、胞体に変化が著明であつたと云う所見は従来行なわれた諸家の研究とかなり異つているようであるが、これは培養系の相違に基因するのかも知れない。マイトマイシンC 0.17/ccでもミトーゼが散見され、核への著明な変化は無いと思える。以上のように Bashford 癌培養細胞ではマイトマイシンCは核より胞体に形態的影響を及ぼすと云うことは興味ある新知見と考えられる。また増生帯周辺部の繊維芽細胞は他の抗癌剤にくらべ、影響を受けずに増生しているのも特徴である。

クロモマイシン 0.17/cc の位相差観察では、核破壊と細胞質への影響が同等の程度に認められた。すなわち、核では核膜浅薄、核小体の縮小、円形化、核質の透明及び不鮮明化等がみられ、細胞質には細胞膜破壊及び糸粒体の位相差効果の低下がみられた。国香¹⁰⁾は吉田肉腫のラッテ腹水型、津田¹⁰⁾他は人癌の所謂 Krukenberg 腫瘍において腹水中の癌細胞への影響を調べた結果、核の小核化及び細胞質変性が起るが、どちらと云れば細胞質がやや強く侵され、小円形核を持つ胞体の少ない細胞を認めており、津田は人癌腹水細胞でも、核濃縮、小核形成、胞体の破壊等同様の結果を得ている。一方、大里²⁴⁾などは腹水型吉田肉腫への影響を電子顕微鏡的に観察し、制癌効果は核変化(一～±)、胞体変化(卅～卅)であつたと報告し、クロモマイシンの作用は核の変化が殆んどないのが特徴であると云つているが、この所見は上述した著者の結果とかなり相違する。とにかく著者はクロモマイシンの制癌効果として、細胞のすみずみまで、すなわち核小体、核質、核膜、糸粒体、細胞膜のすべてに作用するものと推定している。著者の染色所見で、円形乃至卵円形核

で、核小体及び核網のよく染まつた、胞体の少ない細胞が破壊細胞の中に混在して認められたが、これは生き残りの細胞²¹⁾であろうが、胞体の減少の傾向は多くの研究者の指摘している共通点である。胞体成分の核への移行が、著者の場合は推定された。

第5章 結 論

Bashford 癌の廻転培養細胞に、ナイトロミン、チオテパ、マイトマイシンC、クロモマイシンの4種の抗癌剤を各種の濃度で添加し、先づその細胞増殖に対する抑制的的最小有効濃度を決定し、この濃度及びその附近の濃度で各種抗癌剤を添加した場合の細胞学的変化を位相差顕微鏡並びに染色標本により光学顕微鏡的に観察し、次の如き興味ある知見を得た。

1) ナイトロミン、チオテパ、マイトマイシンC、クロモマイシンの細胞増殖に対する最小有効濃度は、それぞれナイトロミン 17/cc、チオテパ 0.57/cc、マイトマイシン 0.017/cc、クロモマイシン 0.017/ccであつた。

2) 最小有効濃度及びその附近の濃度における各種抗癌剤の Bashford 癌培養細胞に及ぼす影響を要約すれば、イ) ナイトロミン：核に軽度の変化、胞体に変化少なく、細胞の連繋が断たれ、封入細胞を多数見る。ロ) チオテパ：巨細胞、多核細胞、対細胞等の核異常出現を見、胞体では粒体の断裂を見るが、核そのものの変化は少ない。ハ) マイトマイシンC：胞体の変化が主で、空胞変性、糸粒体が太くなり、プリスター像等が著明で、核には著変はない。ニ) クロモマイシン：核、胞体共同様に破壊される。すなわち、核は核濃縮像、胞体は細胞膜破壊及び胞体の不鮮明化等が認められた。

3) Bashford 癌の廻転培養法は抗癌剤の影響の観察に勝れた実験系と考えられる。

撰筆するに当たり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師、平木教授、並びに角南博士、入野講師、水津博士に深甚の謝意を表する。

本論文の要旨は昭和34年11月6日、第18回日本癌学会総会において発表した。

参 考 文 献

1) 野嶽幸雄他：子宮癌培養細胞 (HeLa Cell) の形態とその変貌、特に巨大細胞出現の意義、産婦

人科の実際。8 (1) : 55, 昭34.

2) 林 文裕：Thio-TEPA の影響による HeLa 細

- 胞, 羊膜細胞, 骨髓細胞の細胞病理学的研究. 時疫医学, 第37巻総目録: 1967, 1960.
- 3) 野村 隆: HeLa 細胞の培養生態, 孵化鶏卵漿尿膜移植及び Nitronin による影響の観察. 臨床産科婦人科. 12 (9): 689~700, 1958.
 - 4) Moore, J. E. et al: Evaluation in ovarian and cervical cancer by tissue culture methods. Am. J. Obst. & Gynecol., 77: 780, 1959.
 - 5) Maknio, S. and I, Cornman.: Different cytological effect of chemicals on Ascites Sarcomas IV, A phase microscopio study of the damage to the tumor cells by podophyhyllin. Cytologia. 20; 89~95, 1955.
 - 6) Ohnuki, Y.: A phase contrast microscopic Study on the effect of Sarkomycin upon dividing Spermatoocytes of Grasshoppers. Jap. Jour. Genet. 31; 197~200, 1956.
 - 7) 阿波章夫: Thio-TEPA のネズミ腹水腫瘍に及ぼす細胞学的影響. 遺伝学雑誌. 34: 245~252, 昭34.
 - 8) 小林仁道: 培養した腫瘍に及ぼすマイトマイシンCの影響 (予報). 遺伝学雑誌. 34: 344~350, 昭34.
 - 9) 柴田凡夫: 吉田肉腫細胞の組織培養による形態学的研究 (第三編). 岡山医学会雑誌, 73: 893, 昭36.
 - 10) 鯉島三朗: 各種白血病患者胸骨骨髓培養に於ける各種抗白血病剤の影響に関する研究. 岡山医学会雑誌. 73: 427, 昭36.
 - 11) 佐藤四郎: 抗白血病剤に関する研究—骨髓体外組織培養による—. 岡山医学会雑誌. 73: 399, 昭36.
 - 12) 水津昭: 組織培養による Bashford's Carcinoma の研究. 岡山医学会雑誌. 71: 5741~5772, 昭34.
 - 13) 桜井欽夫: 組織培養と化学療法. 長崎医学会雑誌. 38: 480~487, 昭38.
 - 14) A, Moriwaki: Studies on carcinostatic substances. Chem. parm. Bull. 10: 462—467, 1962.
 - 15) M, Ishidate. et al: Studies on carcinostatic substances. 7: 873~877, 1959.
 - 16) 武田進他: 癌に於ける封入細胞 (inclusion cell) について. 癌. 44: 140~142, 1953.
 - 17) 武田 進: 腫瘍細胞. 永井書店. 1956.
 - 18) 津田福視他: クロロマイシンの人癌に対する細胞学および核学的影響. 福島医学雑誌. 12: 293~302, 1962.
 - 19) 国香明良他: 細胞学殊に核学的に観た抗癌剤 (クロモマイシン及び 6MP) のB 亜系吉田肉腫に対する影響. 福島医学雑誌. 12: 275~279, 1962.
 - 20) 牧野佐二郎: 癌の薬物処理に於ける細胞学的 2, 3 の問題. 第10回日本医師会設立記念大会講演集, 1957.
 - 21) 牧野佐二郎: 癌の細胞学的研究, 広島医学, 12: 155, 1959.
 - 22) 渡辺 顕他: 制癌剤投与法の組織培養による検討. 第23回日本癌学会記事. 化療 127. 昭39.
 - 23) 神崎五郎: HeLa 細胞に対するマイトマイシンCの増殖抑制現象とそれによる MC 血中濃度について. 第21回日本癌学会記事. 昭37.
 - 24) 大里俊吾他: 種々なる制癌剤による微細構造のこうむる変化の比較観察. 癌. 51: 附録. 31~33, 1960.
 - 25) 栗野玄佐武他: 細胞学殊に核学的に観た化学療法剤の腫瘍細胞に対する影響について. 癌. 49: 附録 35頁, 1958.
 - 26) Gellhorn. A, Hirschberg, E. (ed.): Investigation of diverse systems for cancer chemotherapy screening. Cancer Res. Suppl. No3, 1955.
 - 27) Foley, G. E. and Eagle, H.: The cytotoxicity of antitumor agents for normal Haman and Animal Cells in First Tissue Culture Passage. Cancer Res. 18: 1012~16, 1958.
 - 28) Eagle, H. and Foley, G. E.: The cytotoxic action of carcinolytic agents in Tissue Culture. am. J. Med., 21: 739~49, 1958.
 - 29) Hughes, A. F.: The effect of purines and related substances upon cells in chick tissue culture. Exp. Cell. Res. 3: 108~120, 1952.
 - 30) 堀 浩他: ザルコマイシン及びカルチノフィリンの培養細胞に及ぼす影響 (予報). 細胞化学シンポジウム, 7: 133~142, 昭33.
 - 31) デロベルチス他: 一般細胞学, 朝倉書店, 昭31.
 - 32) 勝田 甫: 組織培養法, 納谷書店, 1955.
 - 33) 熊坂鉄郎: 制癌性抗生物質の動物細胞並びに体液との接触による不活性化について. 日本化学療法学会雑誌. 12: 1~9, 昭38.
 - 34) 浜崎幸雄: 細胞核の病理と生理, 永井書店, 昭27.

写真説明

- 写真1：正常 Bashford 癌増生帯，培養3日目，位相差，×100。
写真2：正常 Bashford 癌増生帯，培養3日目，位相差，×400。
写真3：正常同増生帯，正常細胞の中にも多核，巨細胞は見られる。この図ではその染色体の配列が鮮明である。3日目，×1000。
写真4：ナイトロミン 17/cc，3日目（投与24時間）増生帯はシートより剝離，島状に数ヶ以上の細胞集団を作る。×100。
写真5：同上，×400。細胞突起を失い形は類円形化する。
写真6：同上，×1000。封入細胞が見られる。
写真7：同上，×1000，増生帯周辺部の膨化細胞，位相差効果を失い一部泡沫状突起も見られる。
写真8：オチテバ 17/cc，3日目（投与24時間）よく連繋された網眼状増生帯，右下の部分より変性が進む。×100。
写真9：同上，巨核細胞，糸粒体は断裂が見られる，×100。
写真10：同上，出現せる巨態細胞×1000。
写真11：同上，封入細胞，附近に対細胞も見られる。×1000。
写真12：マイトマイシンC 0.17/cc。3日目（投与24時間）増生帯は網眼状に気泡状突起で連なる。×100。
写真13：同上，胞体に光輝性顆粒，プリスター像著明。×400。
写真14：同上，胞体の著変した細胞の他に，中央部の細胞の糸粒体は太くなり，胞体粗な感じとなる。細胞膜も破れている。×1000。
写真15：同上，散見されたミトーゼ前期像。×1000。
写真16：クロモマイシン 0.17/cc の増生帯，培養3日目（投与24時間）網眼又は島状に集団。×100。
写真17：同上，細胞は集団，円形縮小化の傾向あり，大小不同，核小体の円形縮小化，核質透明化，胞体の糸粒体不鮮明となる。細胞膜も一部破壊。×1000。
写真18：同上，核胞体共変性著しい。仁脱出像(?)も見られる。×1000。
写真19：同上，印環細胞も見られる。
写真20：正常増生帯，ヘマトキシリン-エオチン染色。×100。血漿膜使用。培養4日目。
写真21：同上。×400
写真22：ナイトロミン 17/cc の増生帯，細胞間の連絡は不充分，原組織に押しつけられたような像を呈する。×100。
写真23：同上，核には濃縮像が見られるが，胞体は形態をあまり損じない。増生帯深部へ逃避のように見える。×400。
写真24：同上，核濃縮像，胞体も膜が破れるものもあり，薬剤を避けるように見える。×1000。
写真25：同上。
写真26：オチテバ 17/cc 4日目。空胞変性，分葉又は小核が見られる。×400。
写真27：同上，×1000。
写真28：マイトマイシンC 0.17/cc，この写真では細胞破壊著明で，塊状に，増生帯周辺に押しつけられている。×100 培養4日目。
写真29：同上，胞体の飛散，塊状化。胞体染色性は低下。×1000。
写真30：同上胞体の変化著明，細胞膜破壊，細胞質飛散又は塊状化する。突起は夫わない。×1000。
写真31：クロモマイシン 0.17/cc 4日目，正常細胞に近いものと，細胞破片が混在。×100。
写真32：同上，核。胞体共に鮮明に染る。核片の間に裸核，原形型細胞，又核大で胞体小の細胞を見る。×400。
写真33：同上，増生帯深部へ向う細胞を見る。×400。
写真34：同上，×1000。

Experimental Studies on Cancer

Report 1. Studies on the influences of several antitumor agents upon Bashford carcinoma by tissueculture.

By

Ryosuke Kuga

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

For different antitumor agents, Nitromin, thio-TEPA, Mitomycin C, and Chromomycin were added in various concentrations into roller tube culture of Bashford carcinoma cells, and their influences upon the cellular morphology were studied by phase contrast microscopy and by stained preparations. The results obtained are as follows.

1. The minimal growth-inhibiting concentrations of Nitromin, thio-TEPA, Mitomycin C and Chromomycin were 1 r/ml, 0.5 r/ml, 0.01 r/ml and 0.01 r/ml, respectively.

2. The morphological alterations of Bashford carcinoma cells induced these antitumor agents at and around the minimal growth inhibiting concentrations included the following: (a) Nitromin caused dissociation of cells, nuclear alterations and appearance of "inclusion cells" in many cells, (b) thio-TEPA induced rupture of mitochondria and multinucleated giant cells, (c) Mitomycin C was mainly associated with cytoplasmic changes such as vacuolization, mitochondrial rounding and cytoplasmic fusion, (d) Chromomycin was destructive to both nucleus and cytoplasm leading to the nuclear pycnosis and rupture of the cell membranes

3. The roller tube culture technique of Bashford carcinoma cells was considered an excellent system for the in vitro screening of antitumor agents.

陸論文附図

写真 1

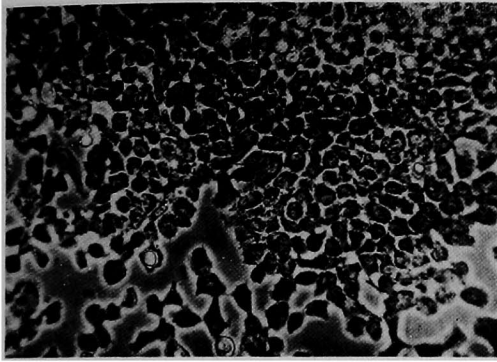


写真 2

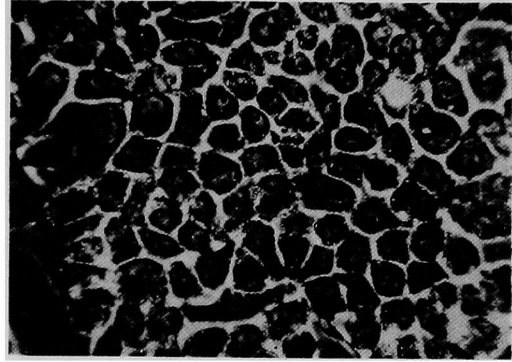


写真 3

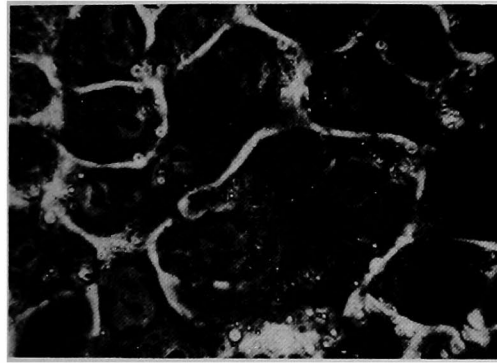


写真 4

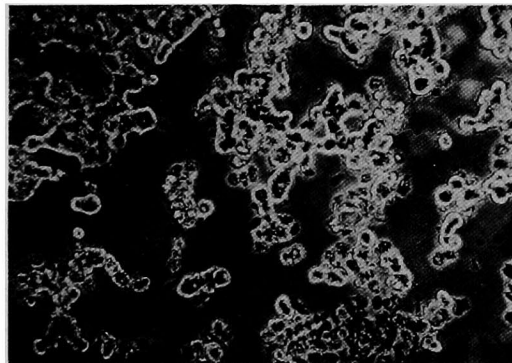


写真 5

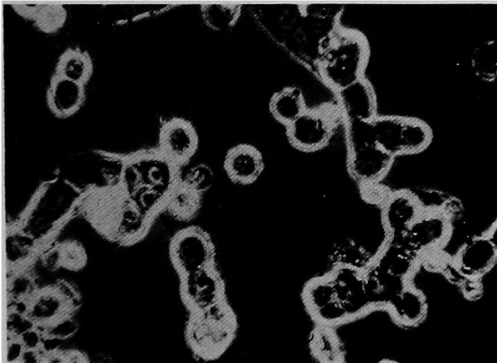


写真 6

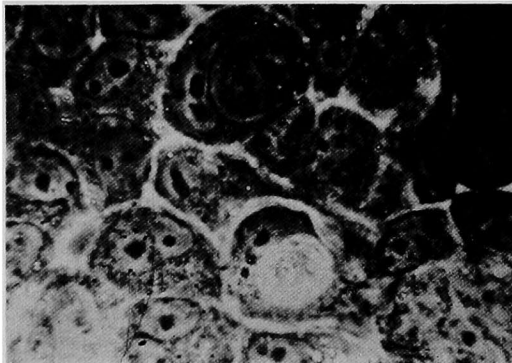


写真 7

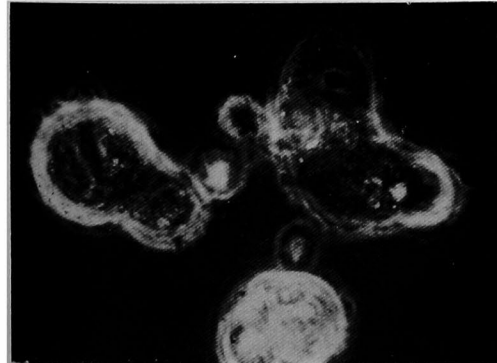
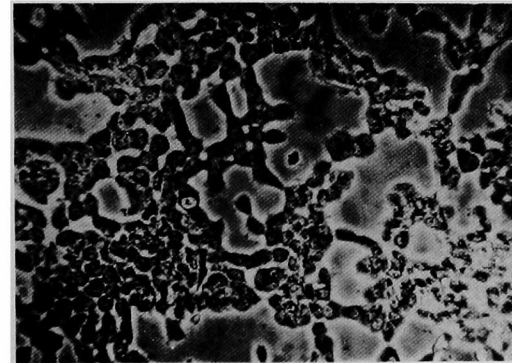
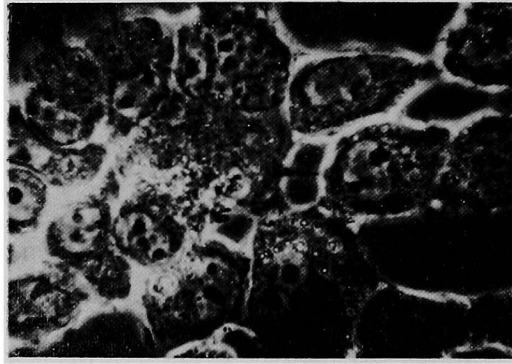


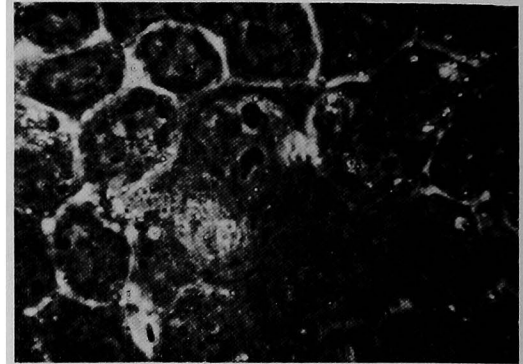
写真 8



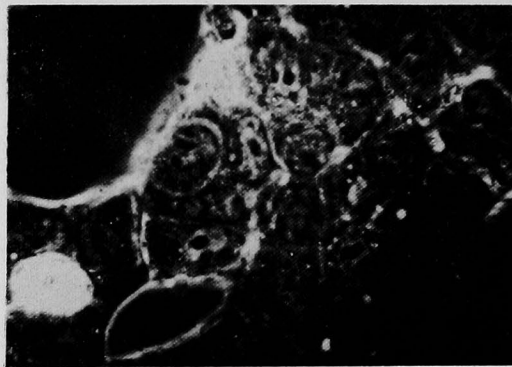
写 真 9



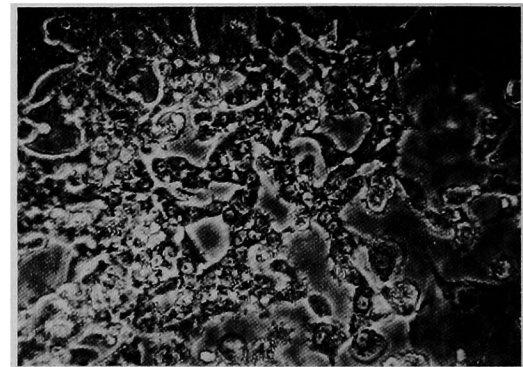
写 真 10



写 真 11



写 真 12



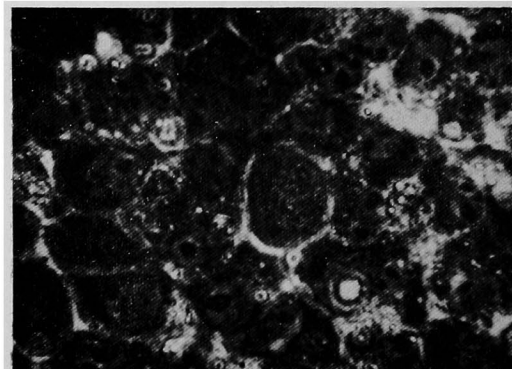
写 真 13



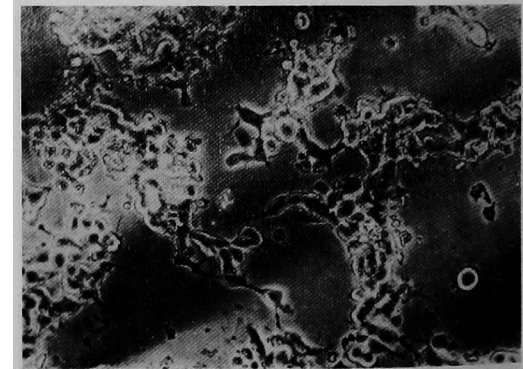
写 真 14



写 真 15



写 真 16



陸論文附図

写真 17



写真 18

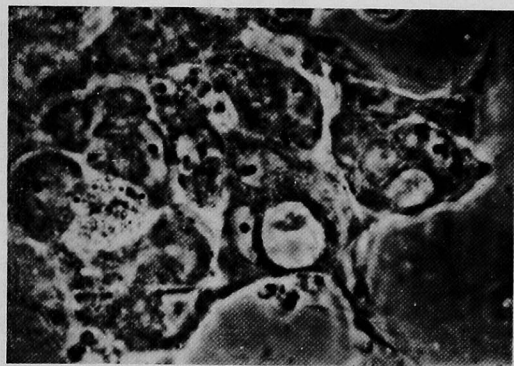


写真 19

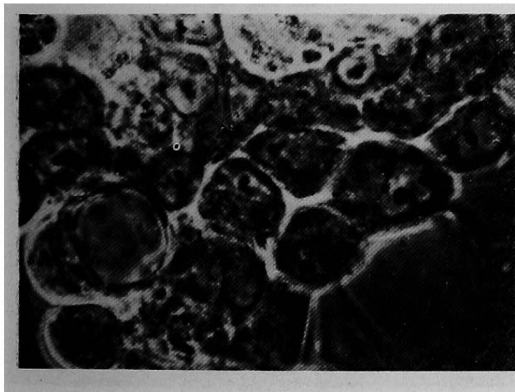


写真 20

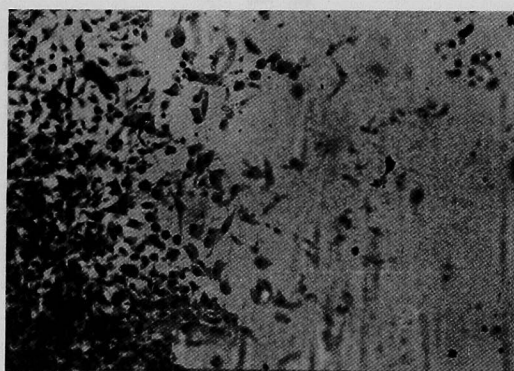
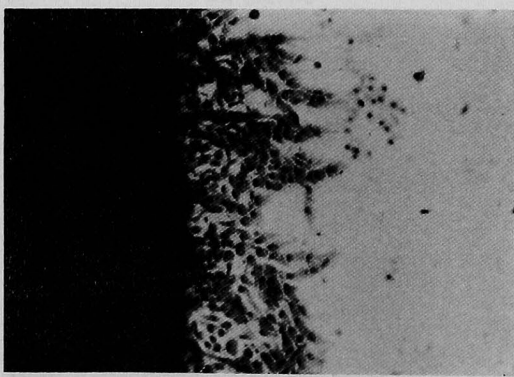


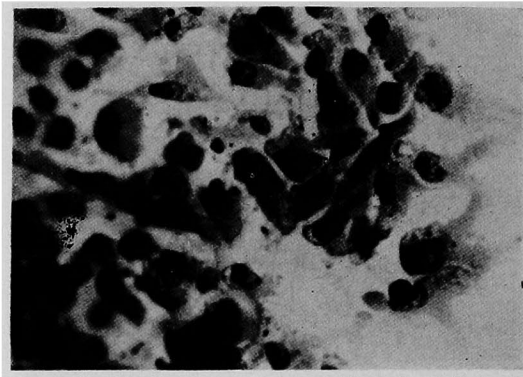
写真 21



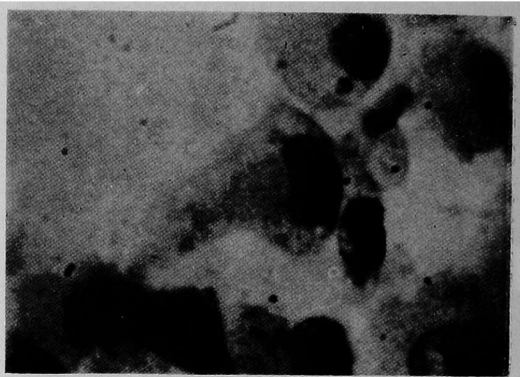
写真 22



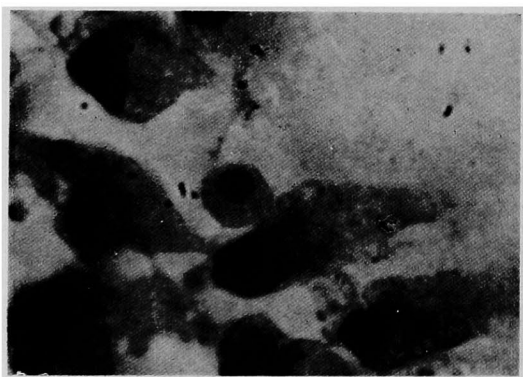
写 真 23



写 真 24



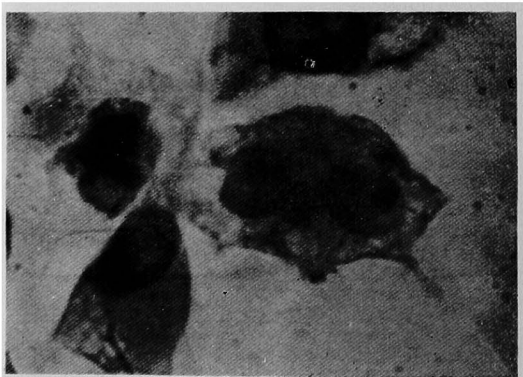
写 真 25



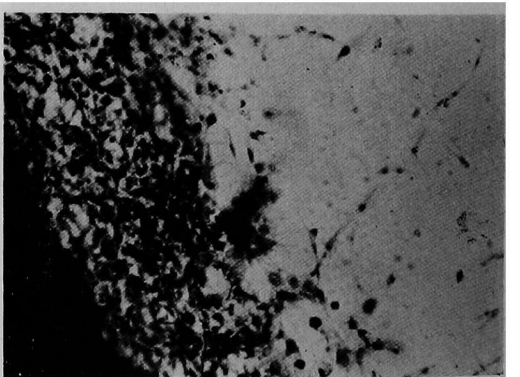
写 真 26



写 真 27

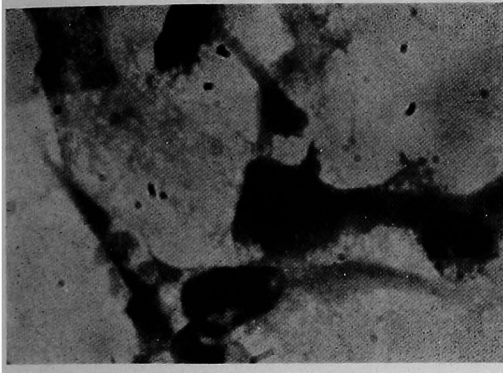


写 真 28

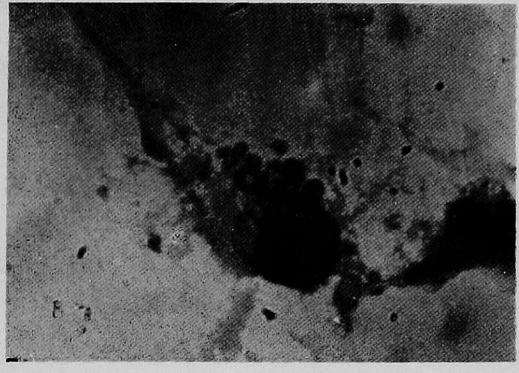


陸 論 文 附 図

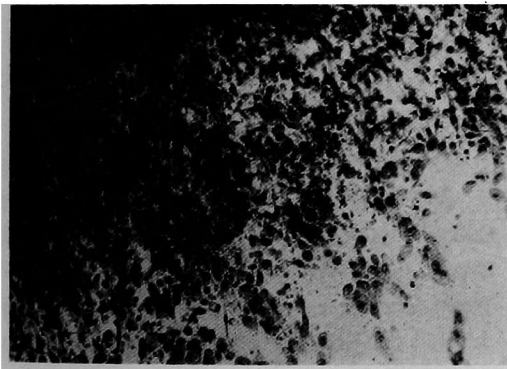
写 真 29



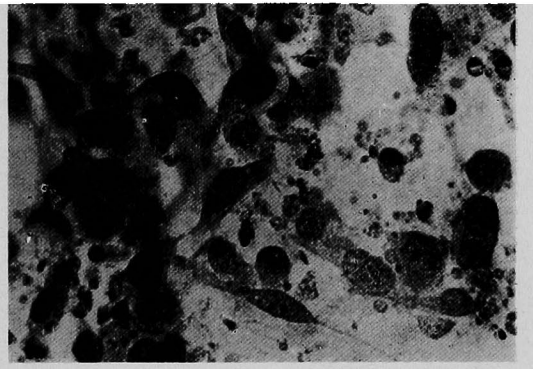
写 真 30



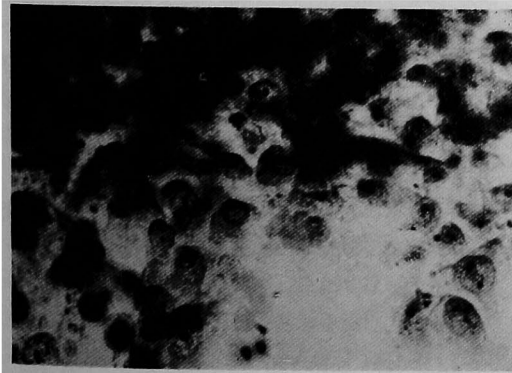
写 真 31



写 真 32



写 真 33



写 真 34

