

癌細胞の螢光染色ならびに界面活性物質を併用した癌化学療法の研究

第 1 編

螢光色素 NTS による癌細胞の染色機序に関する研究

岡山大学医学部第 1 外科教室 (指導: 陣内伝之助前教授, 田中早苗教授)

森 下 和 郎

[昭和 38 年 5 月 14 日受稿]

内 容 目 次

第 1 章 緒言ならびに文献

第 2 章 実験方法

第 1 節 実験動物

第 2 節 実験材料

第 3 節 実験方法

第 3 章 実験成績

第 4 章 総括ならびに考按

第 5 章 結 論

文 献

英文抄録

第 1 章 緒言ならびに文献

近来, 癌は局所疾患であると同時に全身疾患であるとの考え方が強くなってきたが, これは比較的早期の癌患者の流血中にも癌細胞の出現がかなり高率にみられることが明らかにされてきたからである。Pool および Dumlop¹⁾ は溶血法を用いてこの問題の系統的な研究を行なってきたが, その後多くの研究者²⁾⁻¹²⁾ により各臓器の癌腫患者の流血中の癌細胞検出率に関する種々の成績が相ついで発表されている。これらの検出率は10%前後からおよそ60~80%までの巾があり, その成績は報告によつて全くまちまちである。このように成績が区々であるのは, 癌種の進行状態, 血中よりの腫瘍細胞収集技術の優劣, 採血の時間的關係, さらに腫瘍細胞を判定する基準の差異などによることが主なる原因であろうと思われる。流血中の腫瘍細胞の判定基準は人によつて著しい差異があることは, その検出の技術的困難を物語るとともに, 腫瘍細胞の形態学的判定に現在確固たる基準がないことが原因となつていると考えてよい。実際問題として癌細胞に特異的な染色法がない限りは, 癌細胞検出は形態学的には非常に困難な問題であるといわねばならない。

このような意味から癌細胞を螢光色素 NTS 4,4'-Bis (5'',7''-disulfonaphtho-1'',2''-triazol-2-yl)2,2'-

Stilben disulphonic acid hexasodium salt で特異的に染色¹³⁾できはしないかとする試みが, 多くの人々によつてなされるようになってきた。わたくしはこの色素が本当に癌細胞のみを特異的に染色し, 血中癌細胞の検出にも有力な手掛りを与えはしまいかとの考えから, その染色機構を明らかにする必要を感じて, 2, 3の実験を試みた。本編ではその染色機構に関して得た基本的な知見と NTS を用いて動物癌細胞, 人癌細胞などについて得られた結果についてのべることとする。

第 2 章 実験方法

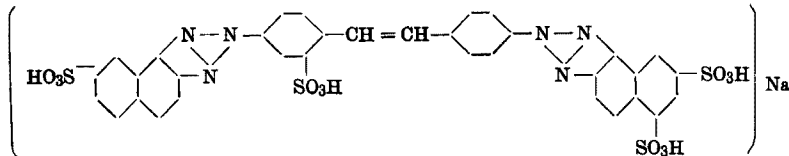
螢光色素 NTS が生体細胞を染色する機構は, 一般の染色機構から考えて色素と細胞内蛋白との静電結合によるものではないかと考え, 種々の蛋白質と各 pH 域の NTS 溶液とを用意し, これらをいろいろな組合せて適当に混合したり或いは蛋白質を固定したりして, 電気泳動法と拡散法とを利用してその結合状態を観察し, しかる後, 実際種々の生体細胞を用いて NTS 染色を行なつてその染色状態と染色の特異性を明らかにしようと試みた。

第 1 節 実験動物

実験に使用した動物は, 大沢飼育場で育成された C₃H/HeN (♂) × dd (♀) : F₁ マウス, 市販雑系 dd 系マウス, および成熟家兎を使用した。

第2節 実験材料

1. 染色液として、黄色粉末の螢光色素 NTS No. 23 (住友化学) を使用した。NTS No. 23 の化学名は 4, 4'-Bis (5'', 7''-disulfonaphtho-1'', 2''-triazol-2-yl)-2, 2'-Stilben disulfonic acid hexasodium salt で次の構造式を有する。



2. NTS の細胞染色機構を究明するために、等電点の異なる種々の蛋白質として、卵白アルブミン (三光純薬製)、馬血球ヘモグロビン¹⁴⁾、牛血清蛋白、正常家兎肝より Mirsky, Pollister の方法¹⁵⁾ により抽出した DNA-蛋白 (DNA-P)、エールリッヒ腹水癌細胞より抽出した DNA-P を使用した。

3. 実験に使用した悪性腫瘍は、エールリッヒ腹水癌細胞、佐藤¹⁶⁾¹⁷⁾ により発表されたマウスの腹水肝癌 MH-134 の第276代および277代を前記の F₁ マウスに継代移植した腹水型のものを用いた。この MH-134 は移植後晩期には流血中にも癌細胞が出現する点で特徴のあるものである。

4. 人体材料としては、胃癌患者の転移リンパ節、末梢血、および膿汁等を使用した。

第3節 実験方法

実験にはモデルとして次のような方法をとつた。

1. 一般の細胞染色機構と同じく、NTS が主として静電結合によつて蛋白を染色するものではないかとの考えから、上記の種々の蛋白を約0.3%溶液とし、その10cc に NTS の5mg を混合し、pH を2.3~11.0まで段階的に調整した。このNTS、蛋白混合液を HCl および NaOH にて水素イオン濃度を変化せしめ、それを一定の濾紙 (電気泳動濾紙 No. 51) 上に滴下し、斑点を作り、その蛋白と NTS の濾紙上における泳動、拡散状態をみた。すなわち写真1, 2のごとく電気泳動用濾紙は従軸に半分に切りその一方を蛋白の BPB 染色で、他方の NTS はそのまま千代田光学の螢光顕微鏡装置用光源で観察し、同時にアミノ酸の反応をもニンヒドリン反応でテストした。またこれと平行して、対照の目的で、これら種々の pH 域での NTS だけの拡散状態も合わせて検討した。

2. 次に NTS 自体が溶媒の pH によつてその荷電状態に変動をきたすことが考えられるので、NTS

溶液の pH 2.0~11.0 の範囲で KCl-HCl, Beronal, Na₂CO₃-NaHCO₃ などの Buffer 中で電気泳動を行ないその泳動像を検討した。

3. また種々の蛋白に NTS を混合したものを上記同様の Buffer により種々の pH のもとに濾紙電気泳動を行ない、蛋白の泳動像と NTS の泳動像と

をそれぞれ BPB 染色および螢光検査から結果を求め、その相関関係を観察した。電気泳動は

100V. 2mA で12時間行なつた。

4. 次に固定変性蛋白に対する NTS の染色態度をみようとの企図から、あらかじめ pH 8.6 の Beronal Buffer 中で牛血清を電気泳動し、それに100°C 10分の熱処理をほどこし乾燥固定し、pH 2.0~11.0に調整された NTS 溶液により染色し、蛋白の染色される pH 域を求めた。

5. 同様にまた種々の蛋白すなわちアルブミン、ヘモグロビン、牛血清、エールリッヒ腹水癌 DNA-P、家兎肝 DNA-P を濾紙上に滴下し拡散泳動せしめた後、100°C、10分の熱処理を行ない、同様乾燥固定し、種々の pH の NTS 溶液で10分間染色し、NTS 染色可能の pH 域を決定した。

6. 動物細胞の染色については、まず細胞を塗沫乾燥し、メタノール或いはホルマリン液で固定したものを、最低イオン濃度の HCl, NaOH で、pH5.0~12.0の範囲に調整した NTS 溶液で5分間染色し、それぞれ同一の pH で十分洗浄し、千代田光学螢光顕微鏡により細胞の染色される状態を観察した。この場合、多くの標本は癌細胞と正常細胞とをまぜて同一のスライド上に塗沫してできるだけ染色条件を一定にして、癌細胞の染色度ならびに正常細胞のそれとの差異について観察した。また NTS はとくに核を濃染し、DNA-P との親和性がうかがわれるので、核のみについて詳細に観察する目的をもつて、一般に DNA-P 染色が行なわれると同様の方法、すなわちあらかじめ5%の PCA (過クロール酸) で95°C 10分熱処理し DNA を抽出した後種々の pH の NTS 液で5分間染色を行なう方法でその染色態度を観察した。

第3章 実験成績

まず NTS のみの荷電の変化に基く濾紙上での拡散状態の変化を観察する目的で、濾紙上に種々の

図 1. NTS のみの電気泳動
(いかなる pH 域でも泳動を示さない)

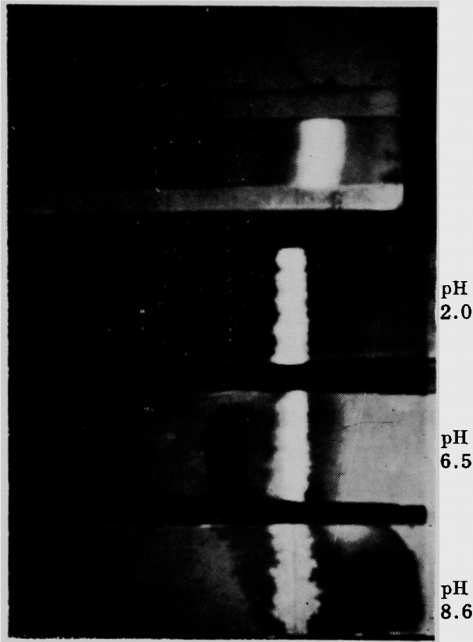
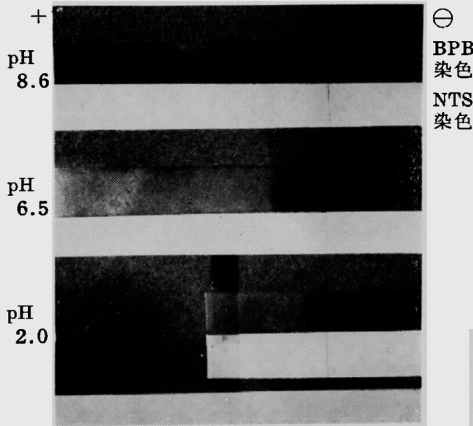


図 2. NTS と牛血清との混合の電気泳動



のみが⊕に泳動する。すなわち牛血清は酸性域のみにおいて NTS と結合し、蛋白ともども泳動されることがわかった。

さらにあらかじめ牛血清を pH 8.6 で濾紙電気泳動し、蛋白を乾燥固定して変性せしめた際、それを種々の pH で NTS 染色を行なった結果、酸性域ではもつとも強い結合を示すが、中性アルカリ性になるにしたがつて NTS と蛋白は結合しにくくなり、そのため染色度は減退して来ている (図 4, 5)。

図 3. NTS と牛血清の電気泳動の蛍光観察
(pH 2.0 の場合のみは一泳動を示す)

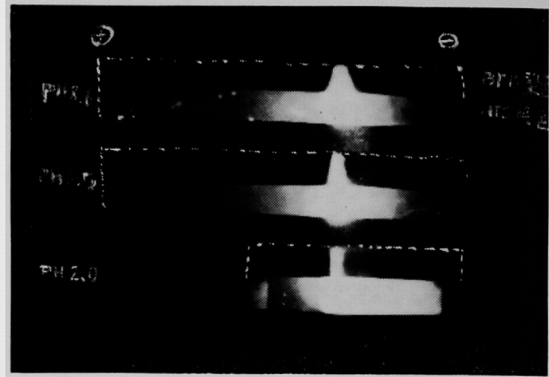


図 4. 牛血清を pH 8.6 で電気泳動した後、種々の pH の NTS で染色
(酸性域ではもつとも強い染色を示す)

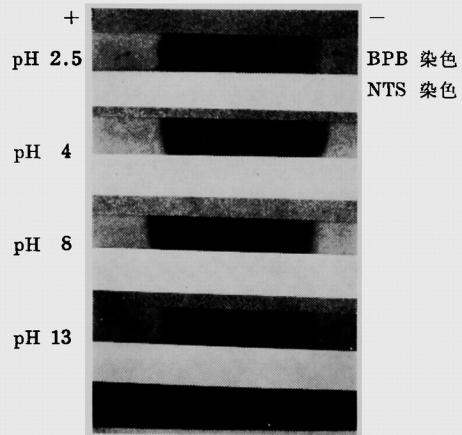
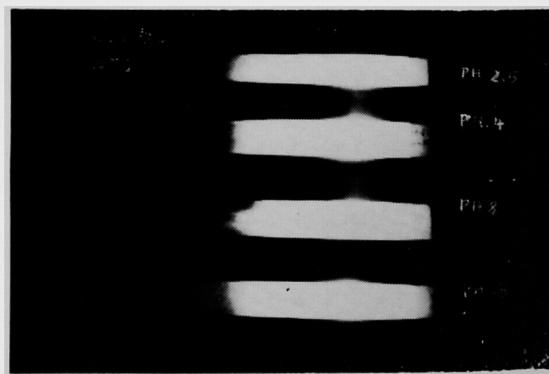


図 5. 牛血清を pH 8.6 で電気泳動した後、種々の pH の NTS で染色して蛍光観察



また種々の蛋白 (アルブミン, ヘモグロビン, 牛血清, 正常マウス肝核蛋白, エールリッヒ腹水癌細胞

胞のうち家兎白血球だけはかなり高い pH 域まで染色される。

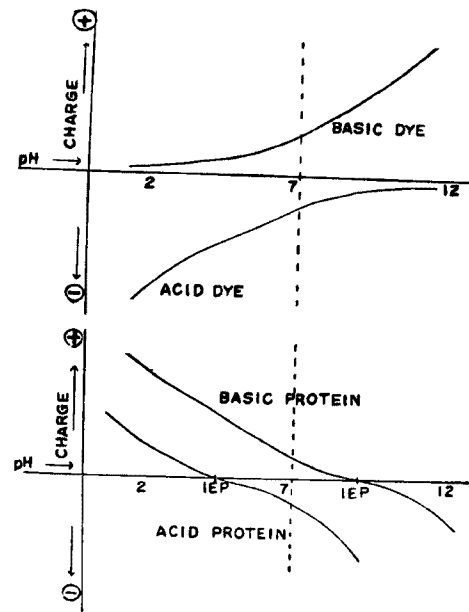
また、この場合、NaOH あるいは HCl 等 pH 調整のための緩衝液イオン濃度は最少限 (minimum ion concentration) に止めたが、これと Glycin 緩衝液で染色されたものとの間には結果的には大した差は認められず、また DNA を過クロール酸あるいはトリクロール酸で抽出したものについても大差はなかった。

第4章 総括ならびに考按

現在においてもなお癌細胞の染色上の特異性についてはほとんど把握されていない。もちろん、癌細胞の特異性としては Crabitree effect⁽¹⁸⁾、DPN・TPN の減少⁽¹⁹⁾、RNA の guanin の量の増加⁽²⁰⁾、deoxycytidyle deaminase 活性の上昇⁽²¹⁾、Phosphatase 活性の変動⁽²²⁾、Toxohormon の産生⁽²³⁾ など生化学的な性格の変動については数多く示されており、また形態学的には細胞の異型性、染色性の不動等があり、概念的には幼若細胞の性格をもつことが知られている。しかし、これら種々の性格の特異性はあくまでも相対的または量的な変動であつて、正常細胞でも幼若細胞などでしばしばそれに類似した性格が示されている。ここに示した NTS による細胞染色の結果も、やはり同様で、癌細胞に特有な質的な特異性はみられなかつた。すなわち、NTS による染色は+に荷電した蛋白を染色する性格を示している。一般にはこのような静電結合によつて細胞が染色される機構は、図6に示すように種々の pH 域での被染色物と染色色素との間の荷電の変化によるものと理解されている。すなわち塩基性色素は高い pH 域で強く+に荷電し、両性電解質である蛋白はその等電点 (Isoelectric point: IEP) より高い pH 域では-に荷電して塩基性色素に染色され、逆に酸性色素は低い pH 域では-に荷電し、蛋白は等電点より低い pH 域で+に荷電するので酸性色素に染色される。

この現象からすると、NTS は酸性色素としての性格を有していることになる。しかし、アルブミンの等電点は pH 4.6 附近であるので、pH 4.6 以上では-に荷電し、酸性色素には染まらぬはずであるが、それにもかかわらず、実際には pH 6.5 においても染色されるので、この NTS の染色は必ずしも静電結合のみによるものではないらしい。しかし NTS の染色機構は上述の濾紙電気泳動法による実

図6. 静電結合によつて細胞が染色される機構模式図



験から、やはり静電的結合が主役を演じていると考えて差し支えなさそうである。

癌細胞が正常細胞に比して酸性色素 NTS で高い pH 域でよく染色されるという本実験の結果を考えると、次の2つのことに要約されよう。すなわち、第1は現在までの多くの研究結果では、癌細胞には多倍体が多く、従つてこれには RNA や DNA の蛋白量が正常のものよりずっと多いことが考えられ、それと NTS とが強く結合すること。第2には幼若細胞は1部のものでは protamin が核蛋白を構成し、一般には核蛋白に多量の塩基性アミノ酸があるためであろう。最近の研究では、肺癌細胞の塩基性蛋白のアミノ酸組成が同様に多量の塩基性アミノ酸よりなつていることが報告されている⁽²⁴⁾。すなわち一方では核蛋白の量が、他方ではそのアミノ酸組成が多量の塩基性アミノ酸からなつており、その結果等電点が上昇していることが考えられ、これら2つの因子により癌細胞が正常細胞に比較して、はなはだ高い pH 域でも NTS に濃染されるものであらうと考えられる。

このような染色の機構からすれば、NTS はどうも癌細胞特異的染色色素としての価値は少ないようである。

しかし、癌細胞や幼若細胞には染色体の多倍体が多く、塩基性蛋白が多いという証拠が示されねばならない。これに関しては第2編でのべるつもりである。

第5章 結 論

癌細胞を濃染する NTS 螢光色素の染色機構を明らかにするため、モデル実験として種々の蛋白質と NTS とを結合せしめ、その染色状態をいろいろの pH 域で斑点拡散試験および濾紙電気泳動法により追求し、さらにエールリッヒ腹水癌細胞、MH-134 腹水肝癌細胞、正常家兎肝、白血球、人胃癌患者リンパ節、人胃癌患者末梢血、人膵汁等を用いて細胞染色を行ない、次のごとき結果を得た。

1. 種々の蛋白質と NTS との結合は静電氣的結

合が主役を演じている。

2. 癌細胞は正常細胞に比して高い pH 域でも NTS に強染する。

3. 以上から、NTS は癌細胞の染色に好都合ではあるが、同様塩基性蛋白の多い幼若細胞にも特異性があるので、癌特異染色物質としての価値は必ずしも満足すべきものでないことが判つた。

(尚本論文要旨は第19回日本癌学会総会に於いて発表した。)

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を頂いた陣内伝之助前教授ならびに田中早苗現教授に深謝するとともに、直接御援助頂いた本学癌研究所内海耕健助教授に深く感謝する。

文 献

- 1) Pool, E. H. et al.: *Am. J. Cancer*, 21, 99~102, 1934.
- 2) Sandberg, A. A. et al., *J. Nat. Cancer Inst.*, 19, 1~11, 1957.
- 3) 宗像ほか: *日本病理学会雑誌*, 47, 541~542, 1958.
- 4) Seal, S. H. et al.: *Cancer*, 12, 590~595, 1959.
- 5) 宇野: *最新医学*, 13, 2641~2649, 1958.
- 6) Engel, H. C.: *Acta chir. Scand.* 201, Suppl., 1~70, 1955.
- 7) Sato, H.: *Acta Pathologica Japonica*, 9, Suppl., 685~706, 1959.
- 8) 吉田: 第18回日本癌学会総会記事, 199, 1960.
- 9) 松永: 昭和35年度文部省研究費による研究報告集録癌編, 33, 1961.
- 10) 山形: 昭和35年度文部省研究費による研究報告集録癌編, 33~34, 1961.
- 11) 田崎: 昭和35年度文部省研究費による研究報告集録癌編, 34, 1961.
- 12) 武藤ほか: 昭和35年度文部省研究費による研究報告集録癌編, 34~35, 1961.
- 13) 堂野前ほか: *阪大医学雑誌*, 12巻, 10・11, 1960.
- 14) 菊池: *標準化学実験法*, P. 114, 文光堂, 東京, 1953.
- 15) Mirsky, A. E., Pollister, A. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 28, 344, 1942.
- 16) Sato, H. et al.: *J. Nat. Cancer. Inst.*, 17, 1~21, 1956.
- 17) Sato, H. et al.: *Fukushima J. Med. Sci.*, 5, 155~173, 1958.
- 18) H. G. Crabtree.: *Biochem. J.* 23, 536, 1929.
- 19) R. K. Morton.: *Nature* 181, 540, 1958.
- 20) G. de Lamirand, C. Allared, A. Cantero.: *Cancer Res.* 15, 329, 1955.
- 21) G. F. Maley and F. Maley: *J. Biochem.* 234, 2075, 1959.
- 22) 寺山: 発癌の生化学, 癌の生化学中原和郎編, 医学書院, 東京, 1960.
- 23) Nakahara, W. and Fukuoka, F.: *Japan. Med. Jour.* 1, 271, 1948.
- 24) 宮崎ほか: *Gann. 日本癌学会記事*, 19回総会, 1, 1961.

Studies on Fluorescence Staining of Cancer Cells and Cancer
Chemotherapy with Concurrent Use of Surfactants

1. Staining Mechanism of Cancer Cells By Fluorescent NTS Dye

By

Kazuo MORISHITA

Department of Surgery Okayama University Medical School
(Director : Prof. Dennosuke Jinnai, Sanae Tanaka)

Author's Abstract

For the purpose of elucidating the staining mechanism of fluorescent NTS dye that deeply stains cancer cells, some model experiments were conducted using fluorescent NTS dye mixed with a variety of proteins to pursue the manner of staining by means of stripping method at varying pHs as well as by paper electrophoresis. In addition, staining of cells was performed with the use of Ehrlich ascites tumor cells, MH-134 ascites liver cancer cells, normal rabbit liver cells, normal rabbit leucocytes, lymph nodes and peripheral blood of gastric cancer bearing patients, and human pus, and the following results were obtained.

1. Static electrical binding seems to play a principal rôle in the combination of fluorescent NTS dye with various proteins.
 2. Cancer cells are stained deeply with the fluorescent NTS dye at higher pH range as compared with normal cells.
 3. From these findings it has been clarified that, although fluorescent NTS dye is a suitable material for staining cancer cells, as young cells with abundant basophilic proteins possess specificity, fluorescent NTS dye is not necessarily so satisfactory a material with respect to its specificity to cancer cells.
-

写真1. BPB 染色による各種蛋白の拡散斑点試験

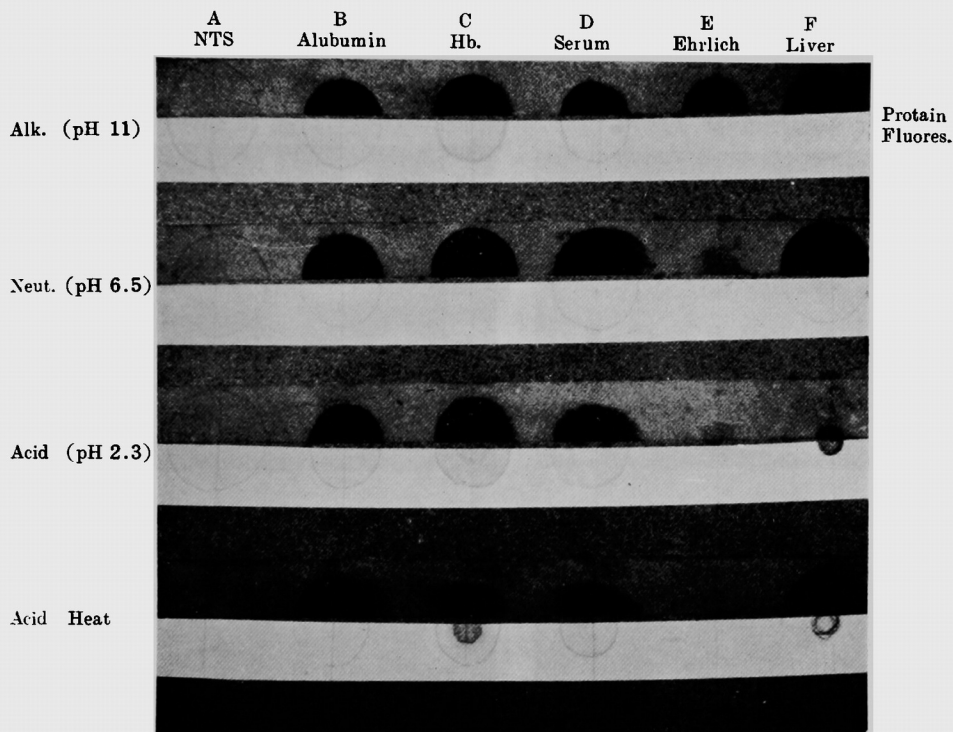


写真2. 各種蛋白の拡散斑点試験 (NTS 螢光染色) の螢光観察

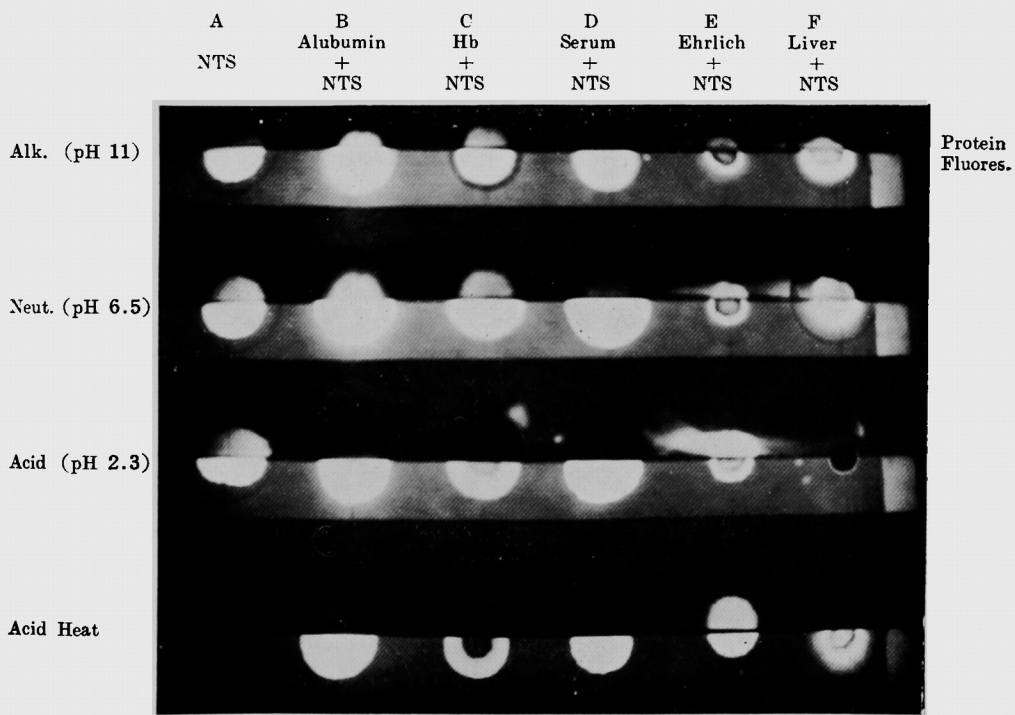
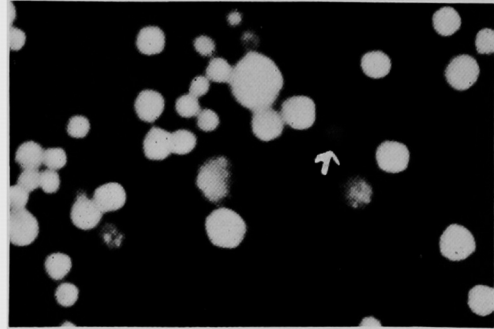


写真3. マウスの白血球およびエールリッヒ癌細胞の NTS 蛍光染色の蛍光観察
(矢印は白血球を示す).

White cells
pH 10.5



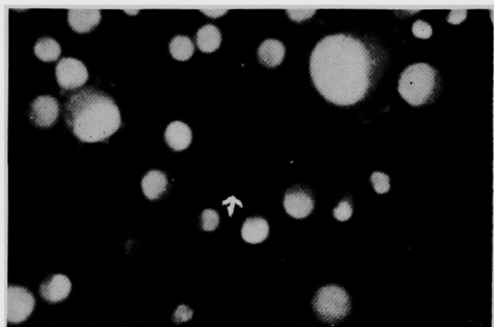
Ehrlich
pH 10.5



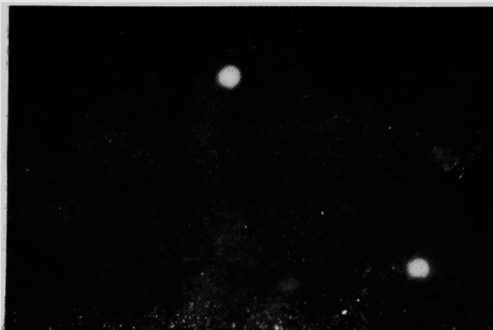
pH 9.5



pH 9.5



pH 8.5



pH 8.5

