616.006.6-085.7:578.65

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つてきたが、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 Dumlop!) は溶血法を用いてこの問題の 系統的な研究を行なつてきたが、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、 採血の時間的関係、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'- 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

Stilben disulphonic acid hexasodium salt で特異的 に染色^[3]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つてきた。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で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 C_0H/HeN (含) $\times dd$ (♀): F_1 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.

$$\left(\begin{array}{c|c} N-N- & -CH=CH- & -N-N \\ N-N & SO_3H & N-N- \\ SO_2H & SO_2H \end{array}\right)$$

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, 卵白アルプミン(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 \mathbf{F}_1 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まで階段的に調整した。 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 だけの拡散状態をも 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

Na

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

100 V. 2 mA 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 \sim 11.0に整調された 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℃ 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 pH の NTS 溶液の 斑点試験を行ない,その拡散度を螢光スポットをあてて観察してみたところ,写真 1,2 に示す結果をえた. すなわち Aに示すとおり NTS は酸性 (pH 2.3),中性 (pH 6.5), アルカリ性 (pH 11.0) の如何を問わずそれだけの場合にはその拡散状態にとくに変化はみられない.

しかしてれに反し、卵白アルブミンと NTS を混合して同様に 3 通りの pH に調製したものの濾紙上での拡散状態は、写真 1・2のBに示すように、NTS は酸性域の蛋白および酸性域熱変性蛋白とは非常によく結合し、つよい 螢光を発する。BPB 染色を施すとこの NTS・蛋白結合物は 螢光を失つてくる。アルカリ域あるいは中性域の蛋白は螢光の残存がかなりつよくみとめられ、アルカリ域では NTS と蛋白との結合が弱いという結果が得られた。対照のためアルブミンの代りにアミノ酸を用いてみたところでは、アミノ酸には NTS は少しも結合せずニンヒドリン反応後、螢光を観察しても NTS 螢光は斑点全域にみとめられた。

つぎに馬へモグロビンと NTS を混合したものの種々 pH 域における濾紙上での拡散状態は、写真1・2のCに示すように中性域ではアルブミンとほぼ同様の所見であるが、酸性域での1部のヘモグロビンは拡散せず中心に残存し、1部のヘモグロビンは拡散するのを認め NTS とつよく結合することをたしかめた、アルカリ域では中心にヘモグロビンの拡散残存はみとめられないでむしろ NTS と未結合のヘモグロビンが認められる。酸性域での熱変性ヘモグロビンでは酸性域の場合とほぼ同様であるが、中心部に変性ヘモグロビンが一層増加している。すなわち NTS はヘモグロビンの場合は中心に残存

する1部の高分子へモグロビンを除いては卵白アルブミンとほぼ同じような結合の様式をなすといえる.

つぎに牛血清と NTS の反応では、写真1-2の D に示すようにほぼ pH の全域において卵白アルブミンと同じような結合を行なつている。しかしくわしく観察すると、この卵白アルブミン、馬へモグロビン、牛血清の3者の間には中性およびアルカリ性域で拡散輪の大きさにわずかの差がみられ、その結合の状態にわずかの差があるものと考えられる。

つぎに正常マウス肝、エールリッヒ腹水癌細胞から抽出した粗核蛋白は前3者と全く行動を異にし(写真1・2の E・F)、酸性 (pH 2.3)、中性 (pH 6.5)、アルカリ性 (pH 11.0) 各領域における NTS の拡散はきわめて悪い。このことは、DNA-P は酸性に傾くと BPB の染色度がおち、かつ DNA-P が酸性中ではとくに fibrous になり易く、粘調度が高くて拡散されにくくなる特性を有する。しかし、斑点のNTS と DNA-P との拡散は酸性域では BPB 染色の場合と 螢光染色の場合とがよく一致しており、DNA-P と NTS とはよりよく結合している事実がよく示されている (表1).

次に、これらの現象をさらにくわしく検討するため、NTS だけおよび NTS と混合された牛血清を種々の pH で電気泳動してみると、NTS 単独ではいかなる pH 域でも全く電気的に泳動されないことが示された (図1).

しかし 血清を混合した場合には、図2,3に示すように、酸性 (pH 2.0) 域では NTS は蛋白とともに ⊕側に向つてつよく泳動し、中性 (pH 6.5) 域、アルカリ性 (pH 8.6) 域では NTS はほとんど泳動を示さず 基本線上に残り、BPB 染色では 血清蛋白

	DISPERSE				PROTEIN					AMINO ACID											
	ALK.	NEU.	ACID	-	ALF	ζ.	N	E	J.	1	ACI	D	A	LF	ζ.	ı	Œ	J.	I	CI	D
				A	В	C	A	В	C	A	В	C	A	В	C	A	В	С	A	В	C
LIVER N. P.	Ĭ -		_	+				+	+		+	_	+				+	+		+	+
EHRLICH N. P.	_	_		+				+	±		+	_	+				+	+		+	+
HEMOGLOBIN	_	<u>+</u>	+	ļ	+	+	+			+				+	+		+	+	+		
SERUM		±	+		+	+	+			+				+	+	+			+		
ALBUMIN	_	±	+		+	+	+		i	+				+	+	٠,			+		
HEAT Hb.											+	±			ĺ					+	+
HEAT SERUM			+							+									+		
HEAT ALBUM			_								+	±								+	+
DYE	-																				

表1. 各種蛋白の各種 PH 域における拡散度.

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)

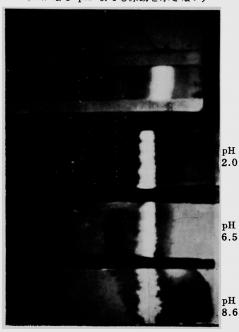
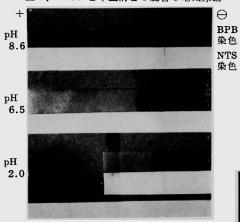


図2. NTS と牛血清との混合の電気泳動



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つた.

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 染色を行なつた結果、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($\mathbf{Q4,5}$)、

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

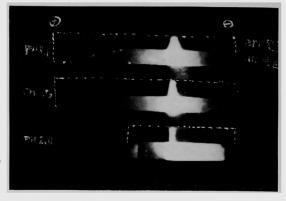


図4. 牛血清を pH 8.6 で電気泳動した後, 種々の pH の NTS で染色 (酸性域ではもつとも強い染色を示す)

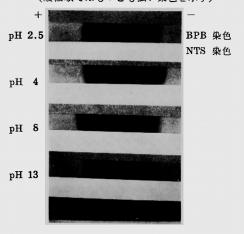


図5. 牛血清を pH 8.6 で電気泳動した後,種々の pH の NTS で染色して螢光観察



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

胞核蛋白)を濾紙上に滴下して斑点を作り, 100° C 10分で乾燥,蛋白変性を行なつたものを種々 pH の NTS で染色した結果は表 2 に示すようである。すなわち,アルブミン,ヘモグロビン,牛血清などはそれぞれ酸性域 $(pH \ 1.8 \ \text{k})\ pH \ 3,\ pH \ 6.5 \ \text{ま} \ \text{で}$ で染色されるが,それ以上の pH では染色度 は急減する。しかし肝,エールリッヒ癌細胞の核蛋白は $pH \ 11.0$ においてもなお染色可能である。

表 2. 種々の蛋白を変性し、NTS で染色。 (NTS 染色は蛋白の等電点と関係ある ことを示している)

	Al.	Hb.	Ser.	Ehr.	Liv.
pH 1.8	+	+	÷	+	+
pH 3	+	+	+	+	+
pH 6.5	±	+	÷	+	+
pH 7.0		_	_	+	+
pH 8.6	-	_	_	+	+
pH 11	_	_	_	+	+

てれらのことは、NTS が蛋白を染色し、しかも その染色はある程度蛋白の等電点と関係し、静電結 合により染色されることを示すものである。

次に、以上の基礎実験から、マウスの白血球およびエールリッヒ腹水癌細胞をメタノールで固定変性し、種々の pH で NTS 染色を行なつてみた。その

結果は表3のように、鰲光顕微鏡で観察しうる限りでは、核も胞体も低い pH 域では NTS による染色性の差がないが、高い pH ではエールリッヒ癌細胞の方が正常白血球よりもよく染色されることがわかつた、写真3はその螢光写真で、1 印は腹腔内非癌細胞である。

表3. マウスの白血球およびエールリッヒ癌 細胞の NTS 染色

РН	WHITE	CELL	EHRLICH				
г п	CYTO- PLASM	NUCLEUS	CYTO- PLASM	NUCLEUS			
11.7	<u>+</u>		±	±			
11.0	±	±	+	±			
10.0	±	±	+	+			
9.0	±	+	+	+			
8.0	+	+	+	±			

次に、人膿汁、リンパ節、肝細胞、家兎白血球、人胃癌患者末梢血、人胃癌患者組織切片、エールリッヒ腹水癌細胞、MH-134 腹水癌細胞等を固定したのち、種々の Glycin 緩衝液 および NaOH でそれぞれ pH を調整し、各 pH 液で NTS により染色して螢光顕微鏡下で観察した結果は、表 4,5 に示すようで、やや癌細胞の方が高い pH 域まで染色可能であることが明らかになつた。ただし、非癌細

表4. NaOH 緩衝液で pH を調整し、NTS 染色

	pН		6	7	8	9	10	11	11.5	11.7	12
人	膿	汁	+	+	+	+	+	+	+	+	_
淋	巴	節	+	+	+	+	+	+	+	_	_
肝		膜	+	+	+	+	+	+	+	_	-
家 兎		珠	+	+	+	+	+	+	+	+	土
エール	リッヒ腹	水癌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MH-13	34 腹 水	癌	+	+	+	+	+	+	+	+	+

表 5. GLYCIN 緩衝液で pH を調整し, NTS 染色

	рF	[6	7	8	9	10	11	11.5	11.7	12
人	膿		}	+	+	+	+	+	+	+	+	-
淋	巴		節	+	+	+	+	+	+	+		_
肝			朠	+	+	+	+	+	+	+	_	_
家	兎 白	血	球	+	+	+	+	+	+	+	+	±
人	胃癌	細	胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+
人旨	引癌 組	織切	片	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 –	ルリッ	ヒ腹ス	k 癌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MH	-134 腹	水	癌	+	+	+	+	+	+	+	+	+

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.

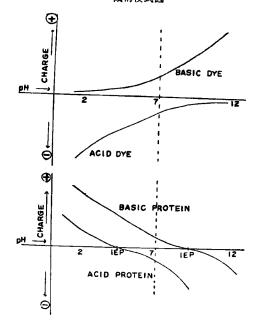
また、この場合、NaOH あるいは HCl 等 pH 調整のための緩衝液イナン濃度は最少限 (minimum ion concentration) に止めたが、これと Glycin 緩衝液で染色されたものとの間には結果的には大した差は認められず、また DNA を過クロール酸あるいはトリクロール酸で抽出したものについても大差はなかつた。

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 efect18). DPN・TPN の減少¹⁹⁾, RNA の guanin の量の増加²⁰⁾, deoxycytidylete deaminase 活性の上昇21), Phosphatase 活 性の変動²⁹⁾, Toxohormon の産生⁹³⁾ 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 域では一に荷電し、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 以上では一に荷電し、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 の染色は必ら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. 解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 てみると、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つ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20. 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ろ 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、人腹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 との結合は静電気的結

文

- Pool, E. H. et al.: Am. J. Cancer, 21, 99~ 102, 1934.
- 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) 字野:最新医学, 13, 2641~2649, 1958.
- Engel, H. C. Acta chir. Scand. 201, Suppl., 1~70, 1955.
- 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.

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 に確認する
- 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ら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源研究所内海耕慥助 教授に深く感謝する。

- 献
- 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.
- 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.
- G. de Lamirand, C. Allared, A. Cantero.: Cancer Res. 15, 329, 1955.
- 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 elucibating 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

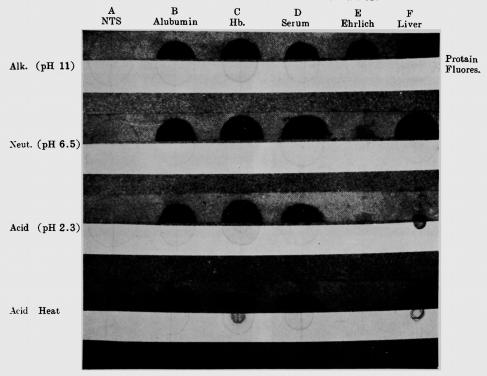
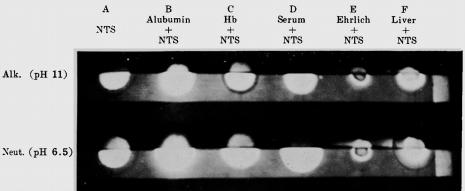


写真 2. 各種蛋白の拡散斑点試験 (NTS 螢光染色) の螢光観察

D



Protein Fluores.

Acid (pH 2.3)

A

В

Acid Heat

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

