616-006.6-085.7

癌の化学療法に関する研究

特に制癌剤並びに制癌強化剤の担癌生体内代謝に及ぼす影響について

第 2 編

制癌剤および制癌強化剤の担癌生体核酸代謝に及ぼす影響，並びに癌細胞分裂像との相関に就いて

岡山大学医学部砂田外科教室（指導：砂田輝武教授）

松　浦　梅　春

〔昭和38年6月17日受稿〕

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項　実験材料
　第2項　実験方法
第3章　実験成績
　第1項　腫瘍組織核酸代謝への影響について
　第2項　正常および担癌動物肝組織核酸代謝について
　第3項　制癌剤および制癌強化剤の担癌動物肝組織核酸代謝への影響について
　第4項　遊離癌細胞内核酸代謝への影響について
　第5項　核酸代謝と癌細胞分裂像との相関について
第4章　総括並びに考按
第5章　結　語
　主要文献

第1章　緒　言

担癌生体における物質代謝，とくに蛋白および酵素合成過程で，核酸は重要なる役割を演じている[1]．核酸には DNA (Deoxyribonucleic Acid) と RNA (Ribonucleic Acid) とあり，DNA は染色体に特異的に存在し，遺伝に関係し，RNA は蛋白合成にあずかるのである．

即ち悪性腫瘍の特異的性質に対して，蛋白とともに，核酸は重大なる関連をおよぼすことは明らかである．

核酸は細胞内で塩基性蛋白質と結合し，核蛋白質を形成している．DNA は細胞核ないし染色体に存在し，RNA は細胞質特に microsome に存在する．一般に RNA は細胞の nucleolus で合成されて，細胞質の microsome に移行し，この microsome において，各種の蛋白質が合成される．細胞分裂では細胞核の DNA の合成がそれに先行する．

癌細胞では核酸および蛋白質の合成が盛んであるが，これは癌に限つた現象ではなく，分裂能旺盛な細胞では癌でなくても認められる．即ち旺盛な核酸代謝の亢進は，何も癌に特異的反応ではない．

Bennett[2] らは，核酸前駆物質が正常組織よりも，腫瘍組織に強く入ると報告している．

一方 Graff[3] らは，正常組織とマウス腫瘍組織とで，adenine は両核酸にほぼ同程度に入るが，guanine は腫瘍組織よりも，正常組織核酸により多量にとりこまれると報告している．

即ち癌組織並びに担癌宿生生体の核酸代謝に関しては，今日までにいろいろの報告[4)5)6)7)]があるが，いまだ明らかな知見がない．

特に In Vitro[8)9)] と In Vivo[10)11)] における成績が，非常な差異を示しているのは注目すべきことで

ある．即ち癌—宿主の相互関係は，核酸代謝においても重大なる関連を及ぼすものである．

著者は制癌剤 MC，および制癌強化剤 OA，GA，TA，等の Ehrlich 癌移植マウスの In Vivo における核酸代謝への影響を検討し，特に担癌動物の腫瘍組織および肝の核酸量の変動関係，および癌細胞内核酸量におよぼすこれら薬剤の影響を考察し，さらに癌細胞分裂像との相関々係を検討し，多少の知見を得たので茲に報告する．

第2章 実験材料並びに実験方法

第1項 実験材料

1) 実験動物

体重22g前後の健康な成熟雄性純系マウス Strong A を使用した．飼育は前編で既述せる如く，何れも一定期間，一定の飼料（オリエンタル固型飼料）と，水道水を給水壜で充分に与えた．

2) 実験用腫瘍

岡大病理学教室保存の Ehrlich 腹水癌を使用した．

3) 実験用薬剤および投与量

前編と同様に，制癌剤には Mitomycin-C (MC) 0.5mg/kg，制癌強化剤には核酸前駆物質 Orotic Acid (OA) 40mg/kg，その他 Glucuronic Acid (GA) 40mg/kg，Thioctic Acid (TA) 4mg/kg などの肝機能賦活剤を使用した．

第2項 実験方法

1) 癌移植法および薬剤投与方法

実験用マウス約150匹を次の如く3群に分けた．

第1群：純培養状態の Ehrlich 腹水癌0.2ml（腫瘍細胞約 2000×10^4 個含有）を，マウスの右側腹部皮下に接種した．移植後10日目に移植腫瘍結節を確認し，11日目より薬剤を10日間連続して腹腔内に注射し，癌移植3週後に，腫瘍組織核酸量を定量し，同時にその肝核酸量を定量した．

第2群：純培養状態の Ehrlich 腹水癌を生理的食塩水で10倍に稀釈し，その 0.2ml（腫瘍細胞約 200×10^4 個含有）を，ツベルクリン用皮内針で正確に腹腔内に注入移植した．

移植後1週間目に，制癌剤および制癌強化剤をそれぞれ腹腔内に投与し，12時間後，24時間後に，Olympus 製顕微分光測光計により遊離癌細胞内 DNA 量を定量した．

第3群：第2群と同様に，純培養状態の Ehrlich 腹水癌を生理的食塩水で10倍に稀釈し，その 0.2ml（腫瘍細胞約 200×10^4 個含有）を，ツベルクリン用皮内針で正確に腹腔内に注入移植した．

癌移植5日後に，腫瘍細胞が腹水中で充分増殖したのを確認したのち，制癌剤および制癌強化剤をそれぞれ腹腔内へ直接注射し，6，12，24時間後に腹水を採取して，腫瘍細胞の変化を時間的に追求した．

さらに24時間後からは，制癌剤および制癌強化剤を連日24時間毎に腹腔内に注入し，連続注射による腫瘍細胞への影響を3日，5日，7日目に検討した．

2) 肝および癌組織の核酸定量法

(a) 肝および癌組織の核酸分劃の定量は，Ogur, Rosen の方法[12]にによつた．

Ogur, Rosen 氏法：

1) 撲殺直後のマウスの肝および癌組織を濾紙でよく血液成分を吸着した後，その 0.5g を正確に Torsion Balance で秤量し，これを約 2～3ml の 70～95%エタノール中で 0°C で電気ホモジネータで充分に磨砕し，組織ホモジネートを作り，次にこれを70%冷エタノールで遠心管中に洗いこみ，4°C で約5分間 2,000 rpm で遠心する．上澄みは捨て，残分を70%エタノールに0.1% Perchloric acid（以下 PCA，過塩素酸）に浮べ，再び 4°C で約5分間遠心する．

2) 上澄みを捨て残分を5ml のエタノールエーテル混液（3：1）に懸濁させ，上を封じたガラス毛管を入れた水浴中で加温し，内容物が約3分間沸騰するようにする．遠心して上澄みを捨て，この操作を2回くりかえす．

3) この残分を 5ml の冷0.2N PCA にうかべ，4°C で約5分間遠心する．この操作をも一度なるべく早く操りかえす．

4) これの残分を 5ml の 1 N PCA にうかべ，4°C に3日間おく．この間に RNA のほとんど全部が抽出され，DNA はほとんど抽出されない．遠心して残分を冷 1 N PCA 5ml で，2回抽出する．抽出液を合して 15ml にする．ここに得られた抽出液は RNA 分劃である．

5) 上の残分を 5ml の 0.5 N PCA にうかべ，水浴中で 70°C に20分間加熱する．この操作を3度くりかえし，上澄みを集め，15ml にする．ここに得られた抽出液は DNA 分劃である．かくして得られた RNA および DNA 分劃を次の如く，リン量定量法により定量する．

(b) 次に有機燐酸化合物を定量的に分解して，無機燐真値 Pi (true inorganic phosphate) とし定量した．このため Allen 氏[13] 法による湿性灰化を行なつた．

Allen 氏法：

上述の操作によつて得られた RNA および DNA 分劃を，それぞれ 0.5 ml をとり，60% PCA 0.9ml を 10 ml の硬質分解びんにとり，ミクロケルダールのバーナー上で加熱する．

この際，微細なガラス玉を沸石として入れておく．加熱は砂ざらを通して 190～200°C に加熱する．液の濃縮とともに内容は褐変化し，やがて無色になり，白煙が分解びんを還流するようになる．無色になつて後，数分間更に加熱を続けて残存する過酸化水素を除く．約30分～1時間で分解が終る．分解が終れば放冷し，3～5 ml の水を加え，烈しく沸騰している温浴中に15分間つけて，灰化中に生じたポリリン酸を加水分解して正リン酸にする．

これを流水でよく冷却し，蒸溜水およびスポイドを用いて，分解びんの内容を定量的に 10 ml のスピッツグラスに移す．

(C) 次に高橋氏[14] 法により無機燐真値 Pi を定量した．

高橋氏法：

1) 試薬

2%モリブデン酸ナトリウム水溶液

1.5 N 硫酸

純イソブタノール

純エタノール

0.5%アスコルビン酸液

2) 定量操作

あらかじめ有せん試験管 (2×10 cm) に試薬 2% モリブデン酸ナトリウム水溶液および 1.5 N 硫酸各 1ml をとり，イソブタノール 4 ml を加え，それに試料 (前述の正リン酸試料) 1 ml を加え，ただちに約10秒強く振盪したのち静置し，イソブタノール層と水層とが分離したら (30～40秒)，ただちに Ostwald pipett でイソブタノール層 2 ml を別の試験管にとり，0.5%アスコルビン酸液 2 ml，次に純 H タノール 1 ml の順に加え，よく混じて一層とし，37°C のサーモスタット中に30分間加温して発色させ (モリブデン青形成)，水で室温まで冷やしたのち，Coleman Universal Spectrophotometer, Model 14で，720 mμ で吸光度を測定した．

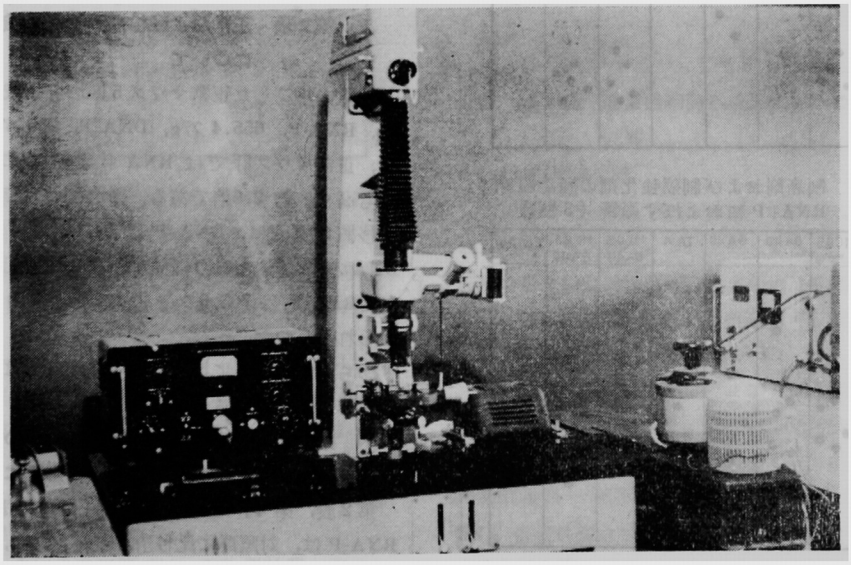
対照としては，Pi を含まない試薬のみのブランクを用いた．

3) 遊離癌細胞内 DNA 含有量測定法

癌細胞内 DNA 含有量の測定は次の方法で行なつた．即ち被検マウスの腹水癌を注射器でとり出し，25×50mm² の micro cover glass 上に塗抹乾燥後，Acetic-Alcohol (1：3) で約15分間固定[15] し，柴谷氏[16] 法により Feulgen 反応[17][18][19] を行なつた．

これを脱水後バルサムで封入し，Olympus 社製 Microspectro Photometer (MSP) (第1図) を使用

第1図 microspectro Photometer (MSP)



し，直良の方法[20]で核あたりのDNA量を求めた．

この際 S-V 効果を少なくするために，核の直径の 1/3 以下の光束を作り，光点を核の中心に当て 560 mμ の光束でその吸光度を求めた．

即ち吸光度Eと核の半径の自乗 γ^2 をかけた $E\gamma^2$ で DNA の相対値を求めた[21]．

4）癌細胞分裂像測定法

Ehrlich 腹水癌細胞の塗抹標本を作製し，この塗抹標本をギムザ染色を行ない，各群標本について，癌細胞1000個中の正常分裂，異常分裂，巨細胞，破壊細胞の4型に分類し，それぞれを算定した．

第3章　実験成績

第1項　腫瘍組織核酸代謝への影響について

Ehrlich 癌皮下移植3週後の各群の皮下腫瘍核酸量の測定結果は第1表に，各々の分布状態は第2図および第3図に示す通りである．

即ち対照無処置群では，5匹の平均腫瘍核酸量は RNA-P，776.6 γ/g，DNA-P，1079.6 γ/g であつた．

MC 群は，DNA 代謝活性度が著明に抑制されその平均核酸量は約 1/2.5 に減少した．

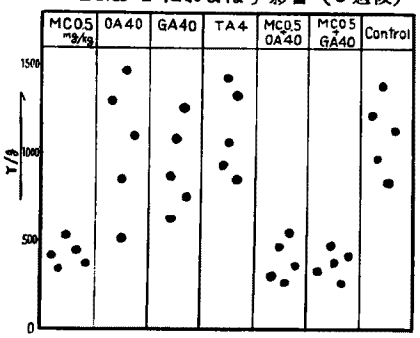
RNA 代謝に対する影響は少なく，核酸量は 695.0 γ/g であつた．

OA 群では，一般に OA は癌細胞の核酸代謝を亢進するとの説もあるが，担癌動物腫瘍核酸量への影響よりみると，RNA-P で極めてわずかの増加がみられたが，DNA-P ではむしろわずかながら減少している．GA も OA とほぼ同様の傾向を示した．TA は DNA，RNA ともに多少増加の傾向を認めた．然しながらこれら制癌強化剤の影響は何れも極めてわずかであり，腫瘍核酸量への有意の効果を認めなかつた．

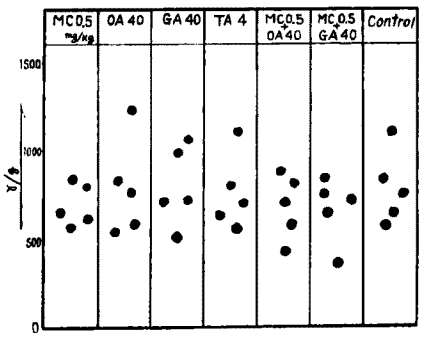
第1表　制癌剤および制癌強化剤の腫瘍組織核酸量におよぼす影響　(γ/g)

	MC	OA	GA	TA	MC + OA	MC + GA	Control
DNA-P	418.6	1047.0	985.2	1095.8	389.1	370.5	1079.6
RNA-P	695.0	790.6	793.5	785.1	682.5	668.5	776.2

第2図　制癌剤および制癌強化剤の腫瘍組織 DNA-P におよぼす影響（3週後）



第3図　制癌剤および制癌強化剤の腫瘍組織 RNA-P におよぼす影響（3週後）



併用療法では，MC と GA が顕著な効果を示し，DNA，RNA ともにかなりの抑制効果を認めた．MC と OA の併用群では RNA への抑制効果は少ないが，DNA はかなりの代謝抑制が認められた．

第2項　正常および担癌動物肝組織核酸代謝について

体重の平均した正常マウス5匹の肝核酸量平均値は，RNA-P，655.4 γ/g，DNA-P，256.4γ/g であり，正常マウス肝では RNA 代謝が DNA 代謝よりも高く，約 2.6倍である．担癌マウスでは，癌皮下移植3週後に，DNA-P は 641.0 γ/g で正常肝 DNA の約2.5倍となり極めて顕著な代謝亢進を認めた．RNA-P は 705.6 γ/g であり，あまり変化は認められなかつた．

即ち正常動物肝に比し，担癌動物肝では DNA 代謝が非常に亢進するのが特長と思われる．

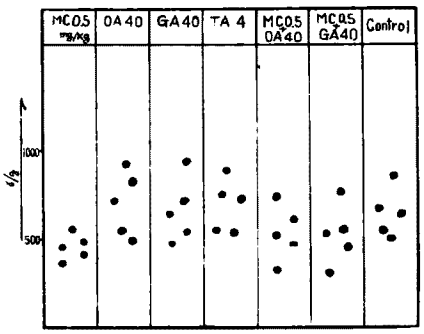
第3項　制癌剤および制癌強化剤の担癌動物肝組織核酸代謝への影響について

第2表，第4，5図に示す如く MC 群では，RNA-P は，対照群に比し殆んど変化なく，DNA-P

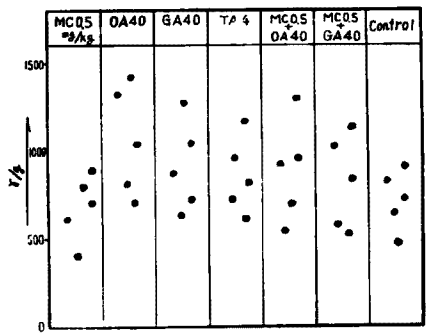
第 2 表　制癌剤および制癌強化剤の担癌宿主肝核酸量におよぼす影響　(γ/g)

	MC	OA	GA	TA	MC + OA	MC + GA	Control
DNA-P	455.7	680.5	691,2	658.7	532.8	518.5	641.0
RNA-P	682.4	1060.4	905.3	850.6	875.5	810.0	705.6

第4図　制癌剤および制癌強化剤の担癌宿主肝核酸量におよぼす影響 (DNA-P)　(3週後)



第5図　制癌剤および制癌強化剤の担癌宿主肝核酸量におよぼす影響 (3週後) (RNA-P)



は，対照群の約 3/4 に低下し，顕著な DNA 合成阻害が認められた．即ち MC は腫瘍組織のみならず担癌宿主肝組織の DNA 生合成をも阻害するものである．OA 投与群では，RNA は，著しい代謝の亢進がみられる．即ち RNA-P は対照群の約1.5倍となるが，DNA-P は，殆んど変化しない．GA 群でも，DNA-P はあまり変化がないが，RNA-P は 905.3 γ/g で，対照群に比しかなり増加する．TA 群でも，RNA-P はかなりの増加を認めるが，DNA-P は殆んど変化がない．

MC と OA の併用群では，MC 単独群に比し，DNA-P はあまり変化しないが，RNA-P で約 1.3 倍に増加し，対照群 RNA 量よりも多くなる．

MC と GA の併用群でも，同様の傾向が認められた．即ち担癌体肝組織核酸量特に DNA は正常肝に比し，顕著な生合成の亢進がみられるが，制癌剤 MC では担癌体肝 DNA の生合成が阻害され，一方制癌強化剤では，DNA への影響は少ないが，RNA 生合成はかなり促進がみられる事は宿主生体の蛋白代謝を亢進し癌への抵抗力増加を示すものであり興味深い事と思われる．この見地より制癌剤と制癌強化剤の併用は，担癌宿主核酸代謝の面より考えて，癌化学癌法で極めて効果的と考えられる．

しかしながら，各群個々の腫瘍核酸量について考えると，DNA では OA 群は，5匹中2匹に顕著な代謝亢進がみられるが，他の3匹は比較的核酸量は少ない．

このように OA は，腫瘍核酸量に対して高底の差甚しく，代謝的にやや不安定な影響をおよぼすものと思われる．

この点より考えると，OA は腫瘍に対し単独で使用するよりも，制癌剤との併用療法が望ましいと思われる．

同様の事は GA についても考えられる．

第4項　遊離癌細胞内核酸代謝への影響について

1) 対照無処置群

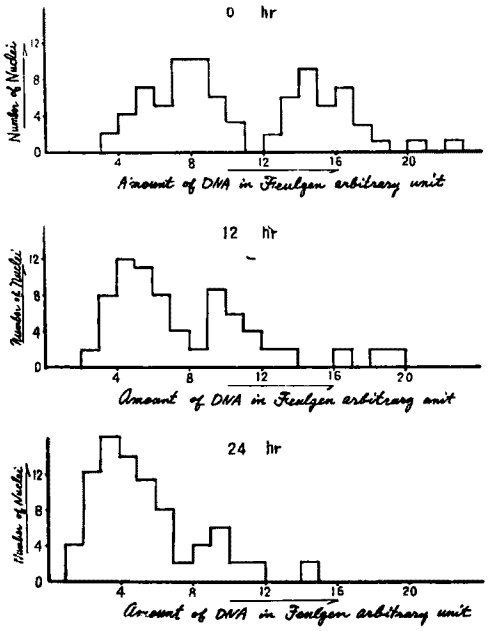
対照群の Ehrlich 腹水癌細胞 DNA は，第 6 図の 0 時間に示す如く，2峰型を呈する．

即ち第1の山は4倍体，第2の山は8倍体相当の DNA 量を含有する細胞の分布を示すものである．

2) MC を投与した場合 (第6図)

MC 投与12時間後において，すでに DNA 量の変化は著しく，DNA 含量の少ない細胞が多数出現し，又8倍体当りの分布ピーリが減少する．その傾向は24時間後に一層著明となる．即ち MC は癌細胞 DNA 合成を強力に阻害し，癌細胞分裂能力を抑制するものと思われる．

第6図　遊離癌細胞 DNA におよぼす MC の影響



3) OA を投与した場合（第7図）

12時間後で4倍体と8倍体の中間に1つの山を形成し，3峰型となる．

a 峰は，4倍体を示すもので，24時間後にはこの DNA 含有量の少ない細胞が，やや増加の傾向を認める．

b 峰の出現は，OA に特異のもののようである．これは DNA 合成を量からでなく，その速度から判断する上で意味があると思われる．即ちそのスピードがゆがめられ，DNA 合成過程にくるいが生じたことを示すものと思われる．この結果異常分裂，変形細胞等の出現が考えられる．

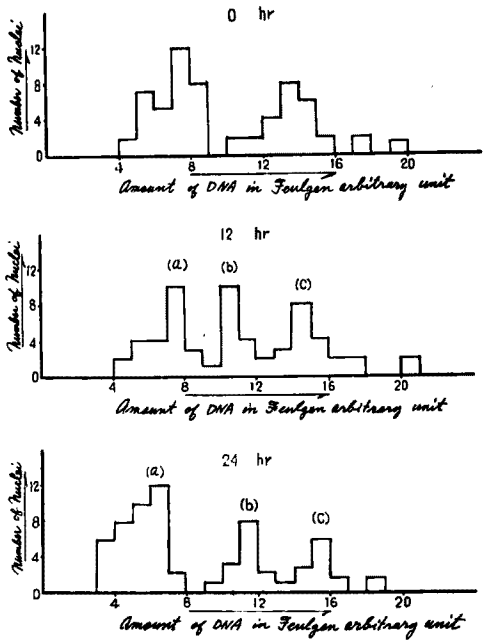
c 峰は，8倍体あたりの細胞分布を示すもので，尚かなり多く，MC にみられる如き顕著な分裂能抑制は認められない．

さらに，b，c 2峰を8倍体と考えれば，8倍体ピークはなお大であり，分裂能力は以然として大と考えねばならない．

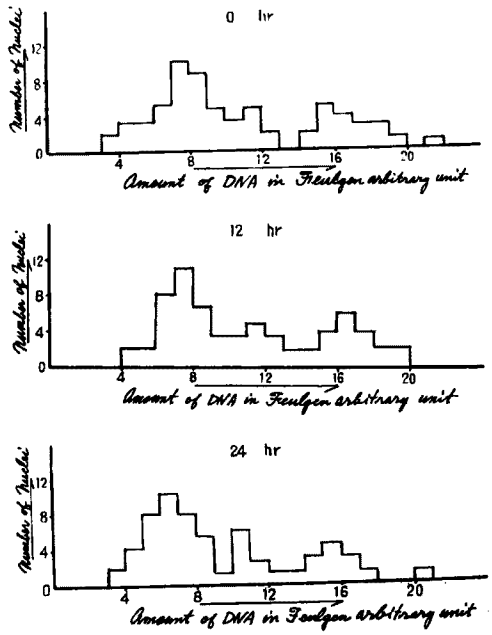
即ち OA により DNA 合成過程の歯車にくるいを生じ，合成速度がゆがめられ，その結果異常分裂，変形細胞等の出現が考えられるが，一方分裂能力に関しては，その分裂能阻害作用は認められず，尚分裂能は大である．

4) GA 投与の場合（第8図）

第7図　遊離癌細胞 DNA におよぼす OA の影響



第8図　遊離癌細胞 DNA におよぼす GA の影響

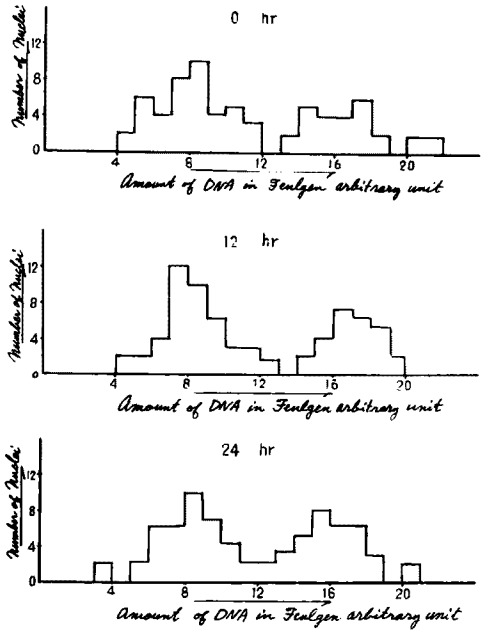


12時間後には，明らかな変化を認めないが，24時間後には，DNA 含有量の著明な変動は認めないが，

OA と同じような3峰型に類似したピークを示し，且つ8倍体のピークはやや減少するようである．然し直ちに分裂能の減少を示すほどの変化ではない．

5) TA 投与の場合（第9図）

第9図　遊離癌細胞 DNA におよぼす TA の影響



対照群に比し，24時間後でも有意の差を認められない．

6) MC と OA 併用の場合（第10図）

12時間後にすでに，著明な DNA 減少細胞の増加，8倍体あたりの DNA を有する細胞の分布ピークの減少がみられる．24時間後には，更にこの傾向が強くなる．然し MC 単独投与に比して，有意の差はみられない．

7) MC と GA 併用の場合（第11図）

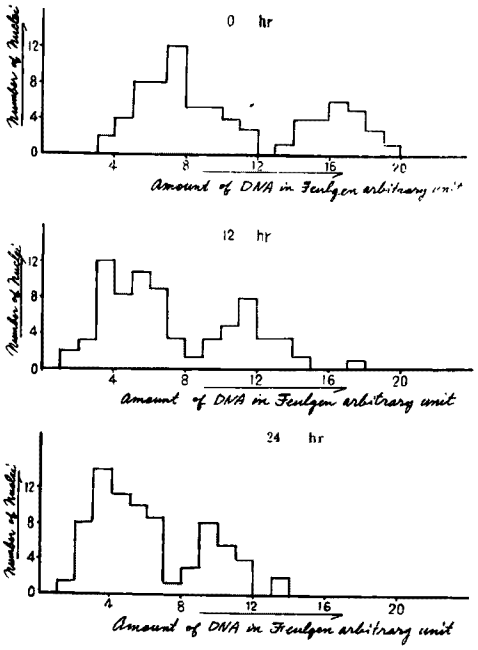
12時間後に，すでに MC 単独群に比し，顕著な DNA 合成阻害効果がみられるが，24時間後には有意の差を示さなくなる．

即ち癌細胞 DNA 合成に及ぼす効果の面からみると，強力な MC の DNA 合成阻害作用の陰にかくれて，制癌強化剤の影響は殆んど現われないものと考えられる．

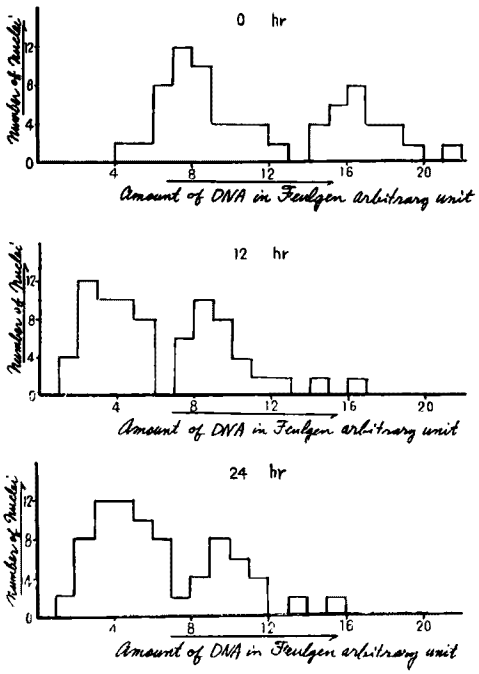
第5項　核酸代謝と癌細胞分裂像との相関について

腹水癌細胞1000個中の正常分裂（第12，13図），

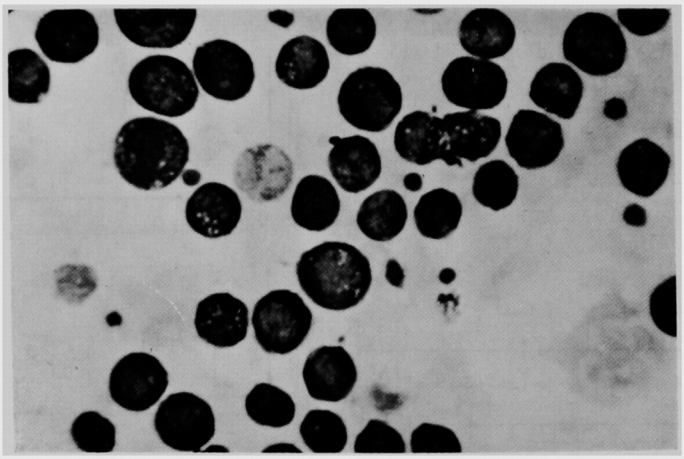
第10図　遊離癌細胞 DNA におよぼす（MC＋OA）の影響



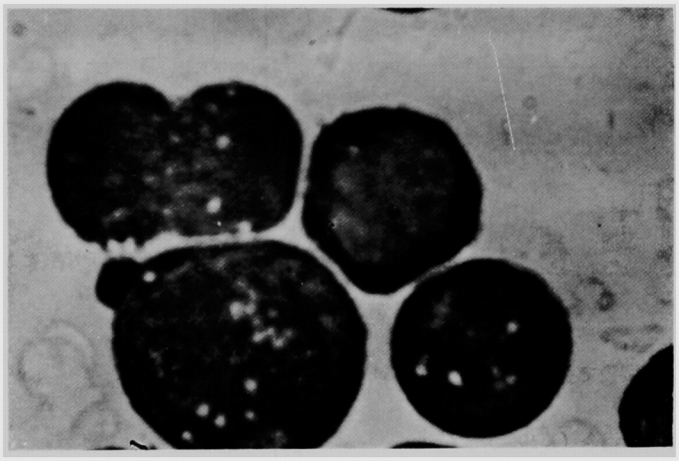
第11図　遊離癌細胞 DNA におよぼす（MC＋GA）の影響



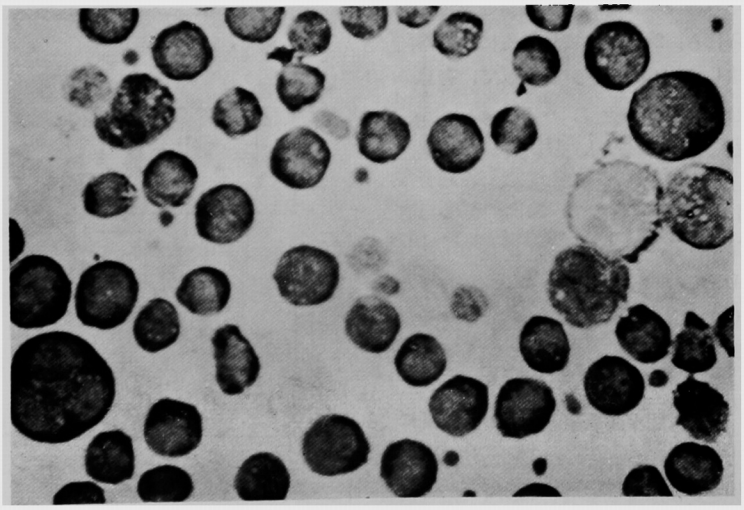
第12図 正 常 分 裂



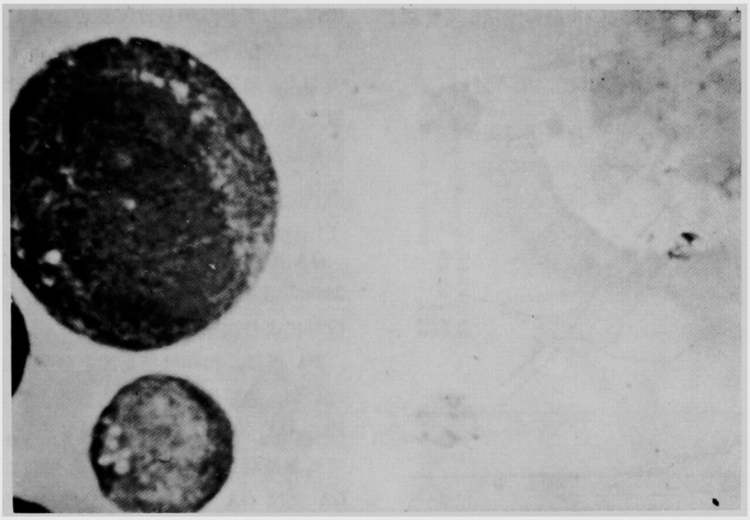
第13図 正常分裂と異常分裂（3極分裂）



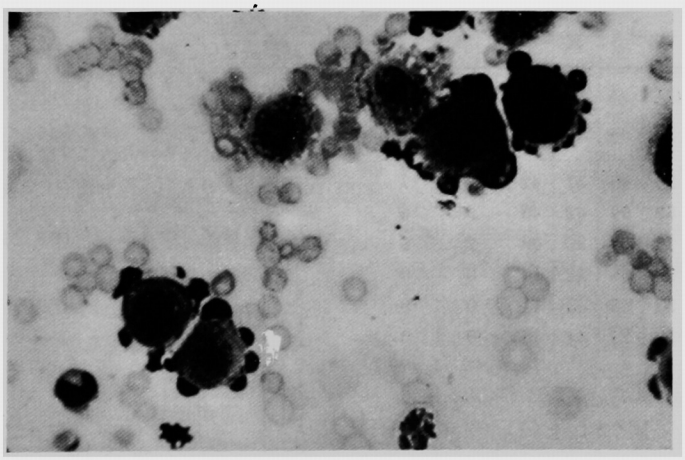
第14図 異常分裂（3極分裂）と破壊細胞



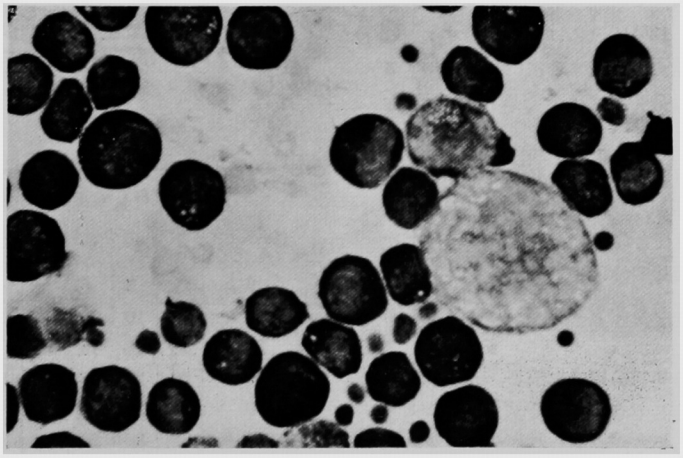
第15図 巨　細　胞



第16図　破壊細胞と異常分裂



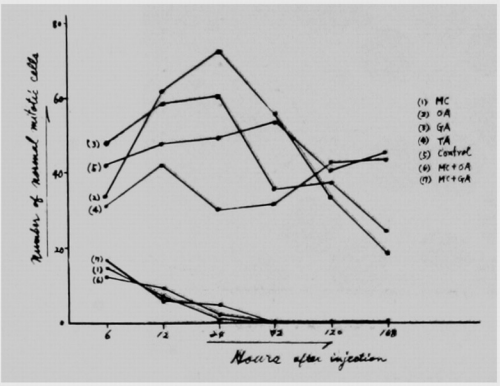
第17図　破壊細胞（核の融解，細胞の膨化）



異常分裂（第13，14，16図），巨細胞（第15図），破壊細胞（第14，16，17図）の4型に分類して算定した．

1）正常分裂像への影響（第18図，第3表）

第18図 腹水癌細胞正常分裂像の変化



第 3 表

hours \ agents	MC 0.5 mg/kg	OA 40	GA 40	TA 4	Control	MC0.5 + OA 40	MC0.5 + GA 40
6	15	34	48	31	42	12	17
12	7	62	59	42	48	9	6
24	1	73	61	30	50	2	5
72	0	56	36	32	54	0	0
120	0	33	38	43	41	0	0
168	0	19	25	44	46	0	0

対照無処置群では，正常分裂像は約50個を数え，ほぼ平行したカーブを画くが，後半はやや減少傾向をとる．

MC 群では，注射後6時間で既に正常な有糸分裂像は著明に減少し，12時間後には対照群の 1/7 となり，24時間後には殆んど消失するにいたる．注射3日以後では，正常な分裂細胞は全く存在しなくなる．

OA 群では，注射後早期には，対照群に比し正常分裂細胞数はやや増加の傾向をとる．即ち24時間後には対照群の約1.5倍となるが，これを境として次第に減少し，その後連日注射により，次第に減少して後期では対照群よりも多少減少し，7日後には1/2以下となる．

この事は後述する異常分裂像の消長，および核酸，酵素代謝などと関連して考えて興味ある問題である．即ち OA は MC の如く，癌細胞分裂に直接著明な阻害作用を示すものではなく，むしろその極く初期には，わずかながら分裂能を亢進するようである．然し連続投与により，肝を中心とする担癌体の抵抗力増大，癌細胞核酸代謝における DNA 合成過程の異常等により，増大した分裂能の中，正常な有糸分裂能は次第に減少して，反対に異常な分裂能がたかまり，次第に変性崩壊過程をたどるものと考えられる．

GA 群も，OA 群とほ同様の傾向をたどる．即ち24時間頃まで，かなりの分裂能亢進を示すが，連続投与により次第に減少する．

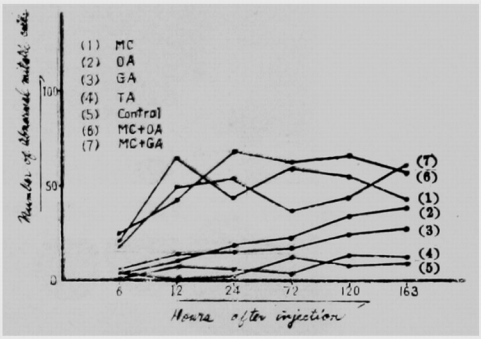
TA 群は，初期はほとんど分裂能の亢進はみられないが，連続注射により次第に上昇する傾向がある．即ち OA，GA とは逆の傾向を示しており，7日までに対照群よりやや増加する傾向がある．MC と OA 又は GA との併用群では，MC 単独群との間に有意の差を認めなかつた．

2）異常分裂像への影響（第19図，第4表）

対照群では，24時間後までに，ほとんど異常分裂像はみられず，7日後にも数個を数えるにすぎない．

MC 群では，6時間後にすでに腫瘍細胞核の粗造化，染色体の断裂，原形質周辺の瘤状突起，細胞質

第19図 腹水癌細胞異常分裂像の変化



第 4 表

Hrs. \ agents	MC 0.5 mg/kg	OA 40	GA 40	TA 4	Control	MC0.5 + OA 40	MC0.5 + GA 40
6	20	2	6	0	3	24	18
12	65	10	14	8	0	42	50
24	43	18	16	5	2	67	55
72	60	22	17	3	13	62	37
120	55	34	25	13	8	65	42
168	42	38	28	12	9	58	60

の不均等分裂および多極分裂および多極分裂，などの異常分裂像が増加し，24時間後にはさらに増加し，3日後にはピークに達し約60個となる．即ち MC では早期より著明な異常分裂像がみられるのが特長であり，連続注射により益々増加するが，後半は次第に減少傾向をとる．これは後述する破壊細胞の増加によるものと思われる．

OA 群は，注射後6時間までは，ほとんど異常分裂像を認めないが，連続投与により次第に増加し，1週後には約38個を数え，対照群に比し，約4倍の増加を示す．然し MC 群の初期にみられるような劇的増加はみられない．

即ち OA は MC の如く直接細胞核分裂能を阻害するものでなく，既述せる如く細胞核 DNA 合成過程に異常をおこし，癌細胞の通常の変性過程を促進するものと考えられる．又細胞質への傷害作用，多極分裂像が認められた．

GA 投与群は，ほぼ OA 群と同じ増加曲線を画く．GA でも染色体の散乱や異常凝集などを認めたが，特に細胞原形質周辺の多数の瘤状突起など細胞質への傷害作用が多く認められた．

TA は異常分裂像への影響は最も少なく，対照群との間に有意の差を認めなかつた．

MC と OA の併用群では，24時間後では明らかに異常分裂が MC 単独群よりも増加するが，その後の増減は大体 MC 群と同じ経過をとる．

MC と GA の併用群では，初期に増加し24時間後に55となるが，その後減少し1週後に再び増加して60となつた．

3）巨細胞像への影響（第20図，第5表）

多倍数性腫瘍細胞と思われる巨大細胞の出現は，対照無処置群では殆んど認められない．

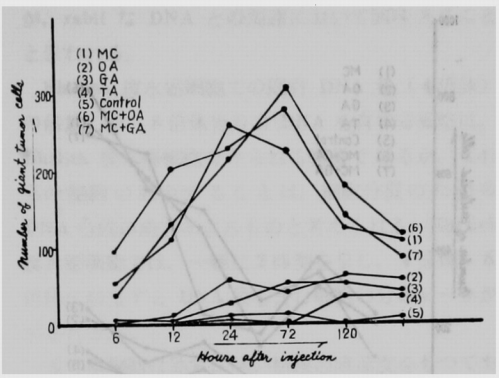
MC 群では，6時間後すでに51となり，12時間後ではさらに増加し，24時間後にピークに達し約260個となり，その後は連続注射により次第に減少する．これは異常分裂と同様次第に破壊細胞におきかえられるためと思われる．

OA 群では，12時間にはじめて少数みられ，MC とは反対にわずかながら次第に増加の傾向をとり，7日後には対照群の約6倍となる．

GA 群では，6時間後にすでにわずかながら巨細胞出現をみるが，その後の増加曲線はほぼ OA 群と同じ傾向である．

TA 群では，対照群とほぼ同じ傾向をとる．MC と OA の併用群では，MC 単独群との間に有意の差を認めなかつた．

第20図　腹水癌細胞における巨細胞像の変化



第　5　表

agents / Hrs.	MC 0.5 mg/kg	OA 40	GA 40	TA 4	Control	MC0.5 + OA 40	MC0.5 + GA 40
6	51	0	5	0	0	38	98
12	110	10	5	0	0	130	205
24	260	58	28	6	10	215	230
72	225	40	54	0	12	310	280
120	125	62	52	35	0	180	140
168	105	58	44	35	9	115	85

MC と GA の併用では初期著明な増加がみられ3日後には280となるが，その後は MC と同様なカーブを画いて下降する．

以上の各投与群の巨細胞出現を前述せる異常分裂像と比較すると，巨細胞出現は多少おくれて出現する傾向にある．又巨細胞は制癌剤では後半急激に減少するが制癌強化剤ではその後の増減曲線は，互によく似た傾向を示している．

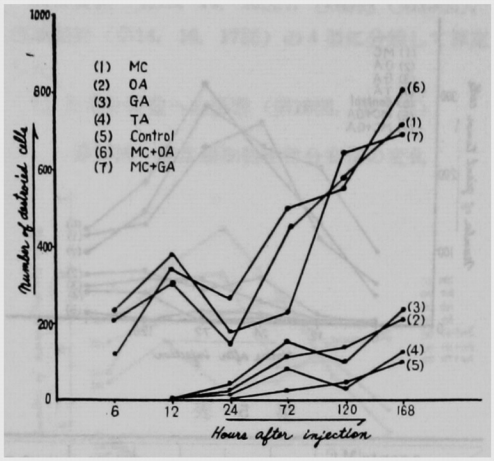
4）破壊細胞像への影響（第21図，第6表）

対照群では，3日後に始めて少数出現するが，7日後でも約98個にすぎない．

MC 群では，6時間後にすでに出現し，以後急激に増加し，72時間後には全細胞の約 1/2 を占める．1週後には約70%以上の癌細胞が破壊されている．これに異常分裂，巨細胞などを加えると，ほとんど全腫瘍細胞が破壊，ないし破壊する運命にあるものと思われる．

OA 群では，24時間後に約24個の破壊細胞が出現するが，その後連続注射により漸次増加し，7日後には約210個となり，対照群の約2.2倍の破壊像を示す．

第21図 腹水癌細胞における破壊細胞像の変化



第 6 表

agents / Hrs.	MC 0.5 mg/kg	OA 40	GA 40	TA 4	Control	MC0.5 + OA 40	MC0.5 + GA 40
6	205	0	0	0	0	117	230
12	310	0	0	0	0	384	380
24	140	24	36	20	0	260	175
72	450	110	150	76	26	500	230
120	580	135	98	35	45	550	645
168	720	210	233	130	98	810	690

GA 群では，24時間後では OA とほぼ同じであるが，その後の増加は OA よりも多く，7日後には約233個の破壊像を示した．

TA 群では，対照群の約1.4倍の増加率である．

MC と OA の併用群では，前半は MC と同様の増加曲線をとるが，後半では，わずかながら破壊効果を示している．

MC と GA では，前半に多少の破壊効果を認めるが，後半には，MC と有意の差を認めない．

第4章 総括並びに考按

1. 肝および腫瘍組織の核酸代謝

緒言でも述べた如く悪性腫瘍の特異的性質に対して，蛋白とともに核酸が重要なる役割を演じていることは論をまたない．

癌細胞では，核酸および蛋白質の合成が盛んであるが，これは癌に限つた現象ではなく，分裂能旺盛な細胞では癌でなくても認められるものである．

即ち旺盛な核酸代謝の亢進は何も癌に特異的反応ではない．

癌組織の核酸代謝に関しては，いまだ不明の点が多い．Le Page[8] はエールリッヒ癌で，正常肝よりはるかに早く Glycine-2-^{14}C をとりこむ事を報告している．Zamecnik[9] も DAB 肝癌で Glycine-1-^{14}C が正常肝の7倍も早くとりこまれるとのべている．然しこれらは，いずれも In vitro の成績であるが，In vivo では Anderson その他により，担癌生体の肝に入る速度と，癌に入る速度は殆んど同じで変らないとの報告[10][11][12] も多い．

Griffin 等[23] も，Glycine-2-^{14}C の DAB 肝癌へのとりこみは12時間で最高となるが，正常肝ではすでに2時間で極大となり，正常肝の方が早いと報告している．

担癌生体でも，Winnick[11] は移植腫瘍をもつたラッテの組織の Tyrosine-^{14}C のとりこみは，対照より少ないと報告しているが，一方 Norberg[24] 等は腫瘍をもつたマウスの組織での Glycine-^{14}C のとりこみは，対照よりはるかに高い事を示している．

さらに[25][26] Parson 等は，正常マウスに Nucleotide を注射すると，担癌マウスと同じ各組織の系統的変化をみたと報告している．また Albaum[27] 等は，担癌動物で腫瘍の増大と共に，血中の nucleotide 量が増加すると報告している．

かくて担癌動物における腫瘍の宿主に及ぼす影響は，核酸によるとの説もある．しかし，核酸には Toxohormone 作用[28] なく，又核酸を含まない Toxohormone で担癌生体の肝カタラーゼ低下をおこすので[29]，前述の核酸説は否定すべきと考えられている．

核酸前駆物質の腫瘍へのとりこみについても，正常組織よりも腫瘍組織に強く入るとの報告も多いが[2][4]，一方 Heidelberger[30] 等は，ピリミジン前駆物質の核酸へのとりこみが，腫瘍組織よりも正常組織でその活性が高いと報告している．又 Balis[31] は，多量の guanine を投与すると，腫瘍と正常両組織に同程度に入る事を報告している．

文献的に考察しても以上の如く，担癌体の核酸代謝に関しては未だ明確なる結論を得るにいたつていない．特に In vitro と In vivo での成績が，非常に異なつているのは注目すべき事と思われる．

Ehrlich 皮下腫瘍組織核酸量に対する影響は，著者の測定では制癌剤 MC は，著明な DNA 代謝阻害作用が認められるが，一方制癌強化剤特に OA は，RNA でわずかであるが代謝亢進が認められたが，DNA はほとんど変化がなくむしろわずかであ

るが減少している.

正常肝では，RNA 代謝が DNA 代謝の約2.6倍であるが，担癌動物肝では，DNA 代謝が極めて著明に亢進し，正常肝 DNA の約2.5倍となるが，RNA はほとんど変化をみない.

MC 群では腫瘍組織と同様に，担癌体肝組織 DNA 合成を著明に阻害するが，一方 OA 群では，DNA はほとんど変化せず，反対に RNA は著しい代謝の亢進がみられる.

即ち担癌体肝では，OA 群は RNA 代謝をたかめ，蛋白合成を旺盛とし，癌への抵抗力を増大するものと考えられ，これは後述する血清蛋白像などと共に極めて興味深いことである.

然しながら，OA 群では前述せる如く，腫瘍 DNA 量の高低が顕著であり不定であるので，単独使用より MC との併用療法が効果的と考えられる.

2. 遊離癌細胞核酸代謝について

DNA は細胞核における遺伝的情報の担い手と考えられている[32]. 癌細胞の自律的な増殖能力が正常な体細胞の遺伝的要素の脱落，或いは変化によりおこる[33][34] と考えれば，DNA はその決定的因子として関与するものと思われる.

さて M. S. P (Microspectro Photometer) は，1936 年 Caspersson[35] によりつくられた. これにより，細胞あるいはその形態学的構成要素などの非常に微少な部位について，その光学的透過率を求め，これからその中に含まれている物質の質と量とを物理的に測定しうるのである.

M. S. P によつて担癌動物腹腔内遊離癌細胞内核酸代謝の変動を検討すると，MC 群では明らかに，DNA 量減少細胞の増加，8倍体細胞の減少が現われる. DNA 量減少細胞の増加は，破壊細胞などの増加を示すものであり，又8倍体細胞の減少は，細胞分裂のための DNA の生合成が阻害されている事を示すものであり，何れも MC の強力な癌細胞への破壊および分裂阻止作用を示すものと考えられる.

この固有 DNA 含有量減少細胞数の増加は，細胞にはその固有の DNA 量が存在するという多くの報告[36][37] と一致しないが，一方薬剤処理により細胞内 DNA 量が変化するとの説[38][39] もある.

これについて著者は，遺伝的性格を維持するに必要な DNA 量と，一部 rabil な DNA が存在するものと考えている.

Caspersson[40] らは，癌細胞には分裂能の盛んなA細胞と分裂活性の低いB細胞とがあると考えているが，rabil な DNA との関連において興味あることと思われる.

Ehrlich 腹水癌細胞での固有 DNA 量（4倍体）の倍量，即ち8倍体当りの DNA を有する細胞は，Ehrlich 腹水癌細胞でみられる特徴であるが，これらの細胞の減少することは，細胞分裂のための DNA 合成の阻害によるものと考えられる，Ehrlich 腹水癌細胞では，一般に2峰型を呈し，4倍体，8倍体に相当する DNA 量を含む細胞の分布ピークが示される.

さて癌細胞は異常に速い核酸合成速度をもつており，その核は正常細胞に比べて変調状態にあるので，あらゆる刺戟に対して感受性が極めて高いわけである. 故に癌細胞の核酸代謝はX線，薬剤などで攻撃をうけ易いわけである.

OA 群および GA 群では，3峰型を有する細胞の分布ピークが認められたが，これは DNA 合成の量でなく，スピードがゆがめられ，結局合成過程の変調がおこり，異常分裂，変形細胞の出現を示さするものではないかと考えられる. しかし第2，第3の分布ピークを総括して8倍体ピークと考えれば，いぜんとして分裂能は大と考えねばならず，これらの点より考えて，OA および GA では，MC の如く癌細胞の DNA 合成を直接阻害するものではなくて，むしろ分裂能はやや高まる場合もあるが，その DNA 合成過程の歯車にくるいを生ぜしめ，異常分裂，変型細胞などが出現し，間接的に癌細胞発育を抑制するものと考えられる.

これは前述の如く，癌細胞の核酸代謝は変調状態にあるので，外的刺戟に対して極めて攻撃をうけ易いことや，後述せる癌細胞分裂像との相関より考えても，充分に考えられることである.

3. 核酸代謝と癌細胞分裂像との相関について

制癌剤 MC の抗腫瘍性作用機転は，形態学的には有糸分裂の阻害を主とし，又静止核細胞障害性を従として現われるものと思われる. 即ち MC は腫瘍細胞に直接作用し，その核および原型質の著明な膨化，崩壊をおこし，核は破片状となり，原形質は多数の瘤状突起を生じて離断し，遂に核質の原形質外流出が認められ，大部分の腫瘍細胞は破壊されて，核破片および離断原形質片として残る.

前述せる如く1週後には，MC 群では殆んど全腫瘍細胞が破壊，ないし破壊への運命にある.

このように MC 群では，早期より正常分裂細胞

の減少，破壊細胞，異常分裂細胞などの大量出現がみられ，特に後期には破潰細胞が全癌細胞の大半を占めるのが特長であるが，このことは MSP による DNA 合成阻害作用と全く一致するものである．

さて形態学的にみる時，対照群でも，死亡数日前の腹水中には，腫瘍細胞核分裂数は極期の 1/2 以下に減少するが，同時に少数ながら異常分裂や巨細胞なども出現し，その程度の差はあるが，制癌剤 MC を投与した場合と同様の崩壊過程をとる細胞が散見される．

一方制癌強化剤では，その形態学的変化から，MC の如く直接的に癌細胞の正常な有糸分裂を阻害して，腫瘍細胞自体に破潰的に作用するのではなくて，間接的に前述せる腫瘍細胞の通常の変性過程を促進するものと思われる．

即ち Ehrlich 癌細胞分裂像では，少数ながら異常分裂，変型細胞，破壊細胞などが出現するが，この通常の変性過程が，制癌強化剤により強化され，促進される傾向が認められた．

従つて制癌強化剤では，正常分裂像減少作用は何れもみられず，むしろ OA，GA，群などでは初期にはわずかであるが，対照群より増加の傾向にあるのは興味あることである．

このことは DNA 合成過程における態度と全く一致するものである．

第5章 結 語

担癌生体において，腫瘍組織および肝組織の核酸代謝の動態を追求し，さらに腹腔内遊離癌細胞 DNA 代謝を MSP で測定し，癌細胞分裂像との相関関係について検討を加えた．

又，制癌剤および制癌強化剤のこれらにおよぼす影響についても考察を加え次の結論を得た．

1) 正常マウス肝では RNA が DNA の約2.6倍であるが，担癌マウス肝では，DNA 代謝が極めて顕著に亢進し，正常肝 DNA の約2.5倍となる．

2) 制癌剤 MC は Ehrlich 皮下腫瘍 DNA 代謝を著明に阻害するが，同時に顕著な担癌宿主肝 DNA 合成阻害作用も認められた．

3) 制癌強化剤特に OA では，腫瘍組織 DNA 代謝は殆んど変化せず，RNA 代謝はわずかであるが亢進する傾向が認められた．

4) 制癌剤と制癌強化剤の併用群では MC 単独群に比し，かなりの腫瘍組織 DNA 阻害作用がみられ，一方担癌宿主肝の蛋白代謝を高め，癌への抵抗力増加が認められた．

5) 制癌強化剤特に OA，GA は腫瘍核酸代謝に対して，やや不安定な影響を及ぼす傾向もあるので制癌剤との併用療法が望ましい．

6) 癌細胞内核酸代謝に対して，MC では著明な DNA 量減少細胞の増加，8 倍体細胞の減少が認められた．

7) 制癌強化剤 OA，GA では，3 峰型を有する細胞分布ピークが認められたが，これは DNA 合成過程の変調を現わし，間接的な癌細胞発育抑制作用と考えられる．

8) 癌細胞分裂像は，MC では早期より著明に正常な有糸分裂阻害作用を認め，多数の異常分裂，破壊細胞の出現が特長である．

9) 制癌強化剤では，正常な有糸分裂阻害作用は認められず，むしろ早期には多少増加の傾向にある．一方腫瘍細胞の通常の変性過程が促進され，間接的に崩壊への道を強めるものと考えられる．

本論文の要旨は，第19回日本癌学会総会および第35回中国外科整形外科学会に於いて発表した．

稿を終るに臨み，常に御懇切なる御指導と御鞭撻を賜り，且つ御校閲の労を賜つた恩師砂田教授に謹みて満腔の謝意を捧げます．

また常に御教示を頂いた稲田助教授，御援助を頂いた佐野講師，赤木博士，木山博士，浜松学士に深甚の謝意を表します．尚御指導御助言を頂いた中央検浜崎助教授，癌源研内海助教授，妹尾病理粟井講師，理学部速水助教授に深謝いたします．

参 考 文 献

1) Chargaff, E. & Davidson, J. N.: The Nucleic Acids Academic Press, New York., 1955.

2) Bennett, L. L., Skipper, H. E., Stock, C. C. & Rhoads, C. P.: Cancer Research., 15 : 1955.

3) Graff, S., Engelman, M., Gillespie, H. B. & Graff, A. M.: Cancer Research., 11 : 388, 1951.

4) Balis, M. E., Van Praag, D. & Brown, G. B.: Cancer Resarch., 15 : 678, 1955.

5) Bennett, L. L., Skipqer, H. E., Toolan, H. W.

& Rhoads, C. P.: Cancer Research., 16 : 262, 1956.

6) Balis, M. E., Van Praag, D. & Brown, G. B.: Cancer Resarch., 16 : 628, 1956.

7) Maudel, H. G. & Carls, P. E.: J. Biol. Chem., 201 : 335. 1953.

8) Le Page, G. A.: Cancer Research., 13 : 178, 1953.

9) Zamecnik, P. C. & Frantz, I. D.: Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 14 : 199, 199, 1950.

10) Reid, J. C. & Jones, H. B.: J. Biol. Chem., 174 : 427, 1948.

11) Winnick, T., Friedberg, F. & Gramberg, D. M.: J. Biol. Chem', 173 : 189, 1948.

12) Ogur, M. & Rosen, G.: Arch, Biochem., 25 : 262, 1950.

13) Allen, R. J. L.: Biochem. J, London., 34 : 858, 1940.

14) 高橋：生化学, 26 : 690, 1955.

15) Di Stefano, H. S.: Proc. Nat. Acad. Scie., 34 : 75, 1948.

16) Shibatani, A. & Naora, H.: Biochem. et Biophys. Acta., 12 : 515, 1953.

17) Feulgen, R. & Rossenbeck, H.: Hoppe-Seyler's Ztschr., 135 : 203, 1924.

18) Kasten, F. H.: J. Histochem. Cytochem., 4 : 462, 1956.

19) Leuchtenberger, C.: Science., 120 : 1022, 1954.

20) Naora, H.: Exptl. Cell Res.: 8 : 259, 1953.

21) Utsumi, K.: Acta Medicinal Okayama., 13 : 49, 1959.

22) Nghan, W. L., Anderson, D. C', Rosenfeld, S. & Busch, H.: Cancer Res., 2 : 236, 1957.

23) Griffin, C., Bloom, S. & Cunningham, L.: Cancer., 3 : 316, 1950.

24) Norberg, E. & Greenberg, D. M.: Cancer., 4 : 383, 1951.

25) Parson, L. D., Gulland, J. M. & Barker, G. R.: Symposia Soc. Exptl. Biol., 1 : 179, 1947.

26) Barakan, T. H., Barker, G. R., Gulland, J. M. & Parson, L. D.: J. Path. Bacteriol., 60 : 441, 1948.

27) Albaum, H. G. & Zahl, P. A.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 82 : 337, 1953.

28) Endo, H.: Gann, 45 : 124, 1954.

29) Ono, T., Sugimura, T. & Umeda, M.: Gann, 46 : 617, 1955.

30) Heidelberger, C., Leibmann, K. C., Harbers, E. & Bhagava, P. M.: Cancer Res, 17 : 399, 1957.

31) Balis, M. E.: Cancer Res., 19 : 297, 1959.

32) Hotchkiss, R. D.: The Nucleic Acids., 2 : 435, 1955.

33) Northdurft, H.: Zeit. f Krebsforsch., 56 : 234, 1948.

34) Butenandt, A.: Verha. deutsch. Ges. inn. med., 55 : 342, 1949.

35) Caspersson, T.: Cell Growth and Cell Function, New York. Norton., 1950.

36) Brachet, J.: The Nucleic Acids., 2 : 476, 1955.

37) Dunn, C. E., Bass, A. D. & Mc Ardle, H.: Exptl. Cell Res., 14 : 23, 1958.

38) Distefano, H. S. & Dismeier, H. F.: J. Histochem. Cyochem., 7 : 83, 1959.

39) Caspersson, T. & Santesson, L.: Acta Radiol. Suppl., 46, 1942.

Study on Anticancer Chemotherapy
Especially on the effect of anticancer agents and anticancer supporting substances on the metabolism of cancer bearing mice

PART II
The effect of anticancer agents and their supporting substances on nucleic acid metabolism of malignant tumor and on cancer cell proliferation

By

Umeharu MATSUURA

Department of the 2nd. Surgery, Okayama University Medical School
(Director: Prof. T. Sunada)

Nucleic acid metabolism of tumor itself and liver in cancer bearing mice, DNA matabolism of intraperitoneal free cancer cells were measured by microspectrophotometer (MSP) and their correlation with cancer cell proliferation were analyzed under administrations of anticancer agents and their supporting substances. The results obtained are as follows:

1) The ratio of RNA to DNA is approximately 2.6 in liver of normal mice. DNA was considerably increased in cancer bearing group, and was about 2.5 times greater than that of normal group.

2) Mitomycin inhibited DNA metabolism of tumor, also inhibited DNA assimilation in liver of tumor bearing mice. Anticancer supporting substances, especially orotic acid, in contrast, could hardly cause any change in DNA metabolism of tumor, but slightly increased RNA metabolism.

3) With regard to nucleic acid metabolism in cancer cells, DNA inhibited cell counts were increased and octoploid cell counts were decreased in case of mitomycin administration. On the other hand, three peak type of cellular arrangement was obtained in case of the administration of supporting substances, showing disturbance of DNA assimilation process.

4) Mitomycin caused disturbance of cell proliferation in early stage of administration course, and also abnormal proliferation and cell destruction. The supporting substances, on the other hand, did not cause any disturbance in process of normal proliferation but accelerated the original degeneration process of tumor ecells as if to drive tumor cells to the final stage of necrosis.