

種々抗癌剤のウニ卵卵割に与える作用

岡山大学医学部附属癌源研究所

山 本 道 夫
内 海 耕 慥
大 原 幸 子
山 本 剛 喜

岡山大学医学部病理学教室

妹 尾 左 知 丸
上 乃 寿 子

岡山大学医学部陣内外科教室

小 林 淳 一

【昭和35年10月10日受稿】

先に著者の1人、山本はX線被照射家兎の肝より抽出した不飽和脂肪酸分画(OXと仮称)に抗腫瘍性を発見した¹⁾。その後本物質がウニの精子の運動阻害をなす事、卵に対しては助精時に受精膜形成を遅延せしめる事、又卵割の遅延或いは阻止を来す事が明らかにされ²⁾、このような現象は mitotic apparatus の形成阻害により分裂が metaphase で停止する事に起因する事が明らかにされた。我々はOX物質がウニ卵に対して示すこのような作用が他の抗腫瘍剤にも認められ得るか、又認められるとすればOXの場合と比較してどのような差異を示すかを検討するために一連の実験を行い、2、3の知見を得たので報告する。

実験材料及び実験方法

材料には主として岡山県久松郡明海岸及び岡山県玉野市洪川海岸にて採集したバフンウニ、ムラサキウニ卵を使用した。又各種抗癌剤は Alkylating agent として Nitrogen mustard N-oxyd (Nitromin), Thio TEPA (Tespamin) を、Antimetabolite として 8-Azoguanine を、制癌性抗生物質として Sarcomycin-Na, Carzinophilin, mytomycin C, chromomycin (トヨマイシン) Sanamycin を使用した。

方法は先に著者等³⁾が報告したバフンウニ卵の場合と同様な方法で各種抗癌剤を海水にて人体許容量の50倍に稀釈して基準液となし、それを更に海水にて稀釈してその 20, 40, 60, 80, 100%液を作りその

中にウニ未受精卵を30分間浸し洗滌後正常海水にうつし正常精子を助精した。助精後3分で正常バフンウニ卵は98%の受精膜形成が示される事から3分後にブアン氏液にて固定し受精膜形成率を観察、さらに同様に処理した卵を95%の卵割のされる100分後にブアン氏液にて固定し観察した。

又感受性試験 (sensitivity test) として正常ウニ卵と正常精子を助精せしめ、助精後20分, 40分, 60分, 80分, 90分の各時間後に10分間づつ各種抗癌剤の基準液を2倍に稀釈した液で処理し処理後は3回正常海水で洗滌し助精後110分後にブアン氏液で固定した。又ムラキウニ卵については各種抗癌剤を海水にて稀釈してそれぞれ人体許容量の10倍液を作り、その液にて正常卵を30分間処理した後正常精子を助精して、助精後160分, 180分後に固定したもの及び正常精子を8分間処理し正常卵と助精して助精後160分に固定したものについて観察した。観察は各例についてそれぞれ500個の卵について行い受精膜形成率、卵割率を百分率で表わした。

実験結果

30分間各種抗癌剤で処理されたバフンウニ卵に於ける受精膜形成率は図1に示す如くである。即ち助精3分後の受精膜形成率は抗癌剤の濃度の上昇につれて低下し、その作用の強さの度合は Carzinophilin, Tespamin, Nitromin, Mytomycin, Sarcomycin, Toyomycin, Sanamycin の順で弱くなる。然し助精

図1 バフソウニ未受精卵を種々の抗癌剤で30分間処理し正常精子を助精して3分後に固定し、受精膜の形成率を百分率で表わしたもの (濃度1.0は人体許容量の50倍希釈液)

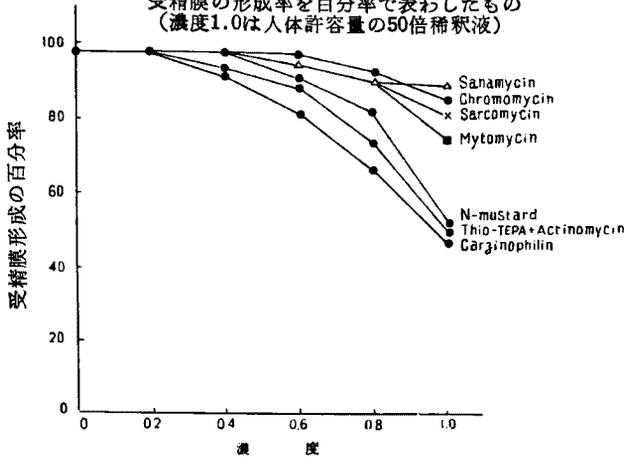
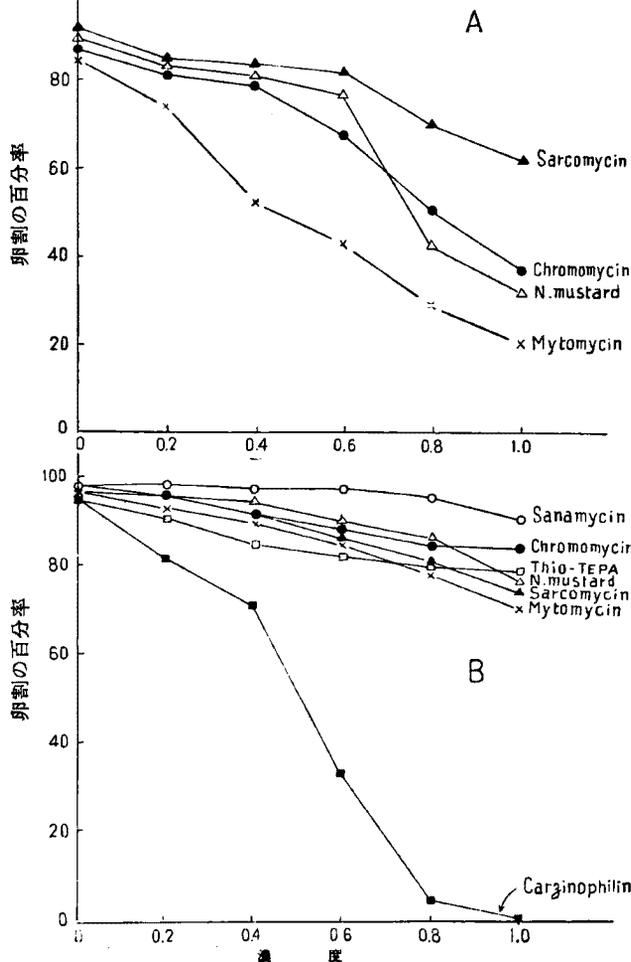


図2 バフソウニ未受精卵を種々抗癌剤で30分間処理し、正常精子を助精して100分後(A) 110分後(B)に固定し、卵割の割合を百分率で示したもの (濃度1.0は人体許容量の50倍希釈液)



10分後には何れの場合にも対照の無処理卵との間に差を認めない。以上と同様に30分間処理した卵の卵割の割合は図2に示す如くであり、受精膜形成率に於いて示されたと同様な順位で卵割率は低下している。ここで特に強い作用を示すものは Carzinophilin で基準液の20%液に於いてすでに卵割阻害効果が示されている。然し何れの場合に於いても助精後の時間的経過と共に卵割率は上昇し対照との間に差を認めなくなる (図2 A, B)。次に同様な実験をムラサキウニについて行つてみると表1の如くである。即ち何れも対照に比して卵割率は低下しているが各種抗癌剤間に於いては大差は認められず強いて云えば Toyomycin がやや強い阻害を示している。又精子に対しては殆んど作用を示さない。

次に分裂 cycle に於ける感受性試験について述べると図3に示す如く卵割に与える感受性の高い時期が2ヶ所あることがわかる。即ち助精後の雄雌核の融合の起る時期と、分裂中期の2点である。然も多くの場合種々の抗癌剤はそのどちらかに作用し何れにも強い影響を与えるというものはなく雄雌核融合期に対して作用するものは Carzinophilin, Mytomycin であり分裂中期に作用するものは Toyomycin, Sarcosomycin Nitromin である。この様な作用は勿論他の実験で示されたと同様一時的な卵割遅延作用のみで時間的経過に従つて各時期で阻害された卵割は恢復する。以上の実験はすべて厳密に時間を限定して作用せしめた場合であるが、これ等種々の抗癌剤をその人体許容量の20倍に希釈した液の中に助精後10分の卵を入れ放置した場合もすべて卵割は遅延するが、卵割の完全阻害は見られない。然し高濃度(2倍希釈)の場合は卵の形態が著明な変化を示し卵割は完全に阻害される

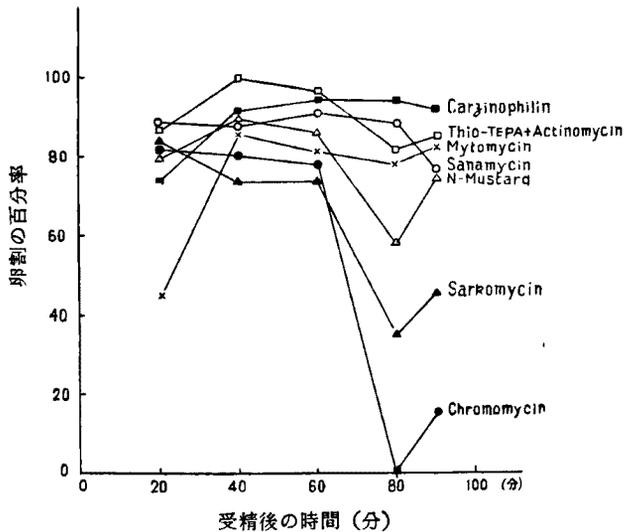
表1 バフソウニ受精卵の種々抗癌剤処理による卵割阻害。(処理液中に入れ、そのままにして3時間後観察)

	+ 卵割		- 卵割阻害	
	人体許容量 50倍稀釈液	人体許容量 2倍稀釈液	人体許容量 50倍稀釈液	人体許容量 2倍稀釈液
Control	+	+	+	+
N-mustard	+	-	-	-
Thio-TEPA	+	-	-	-
8-Azaguanin	+	+	+	+
Sarcomycin Na	+	-	-	-
Actinomycin	+	-	-	-
Mytomycin	±	-	-	-
Chromomycin	±	-	-	-
Carzinophilin	+	-	-	-
OX	-	-	-	-

表2 種々抗癌剤のムラサキウニ卵及び精子に与影響(表中の%は卵割百分率を示す)

	人体許容量 に対する 稀釈度	卵を30分 処理後助 精	卵を30分 処理後助 精	精子を8 分間処理 後助精
		160分後 固定	180分後 固定	160分後 固定
Control	×10	70%	60%	51%
N-mustard	×10	39%	39%	46%
Thio-TEPA	×10	41%	42%	35%
8-Azaguanine	×10	38%	40%	45%
Sarcomycin Na	×10	36%	41%	47%
Mitomycin C	×10	46%	45%	40%
Chromomycin	×10	30%	25%	48%
Actinomycin	×10	38%	35%	52%

図3 正常バフソウニ卵を正常精子と助精し、助精後20分、40分、60分、80分、90分の各時期に種々抗癌剤の人体許容量の50倍稀釈液で10分間ずつ作用せしめ、110分後に固定し卵割の度合を百分率で示したもの



(表2)ここに表2の中で Azan が作用を示さないのは海水に不溶なためである。

考 察

ウニ卵卵割阻害のための要因には次の4つのものが考えられる。即ち第1に受精後雄雌核の融合を阻害する事、第2にDNA合成の阻害、第3に mitotic apparatus の形成或いは機能の阻害、第4に farrow formation の阻害である。勿論この外に受精のための要因や、亦分裂時に上昇する呼吸の阻害等もあげ

られるが直接的に作用する大きな要因はさきにあげた4つであろう。この様に考えればここに使用した種々の抗癌剤が主として受精直後と分裂 metaphase で強い分裂阻害を示す事は一応雄雌核融合、mitotic apparatus の形成阻害を考えられる。

この様な2点に作用する事を今その化学構造式或いは Alkylating agent, Antimetabolite, 制癌性抗生物質等に分類して考えてみる時その作用機序には何等共通性が示されていない。又ここに使用した 8-Azaguanine は海水に不溶で実験の材料にならな

いがウニ卵細胞質中には多量の低分子 DNA⁵⁾⁻⁹⁾ が存在し DNA 合成の作用は他の細胞と同一に考える事が出来ない。従つて多くの薬品処理に於いても DNA 合成は他の細胞の DNA 合成より比較的容易に行なわれる事が考えられる。例外的に村上¹⁰⁾ が行つている高水圧によるウニ卵卵割阻害に於いては DNA 合成が阻害されていないにもかかわらず休止期の核から chromosome の形成が行なわれず 4 倍体以上の DNA 合成が行なわれる事もあり、この問題は今後なお細胞核内 DNA 量と核の形態について観察する必要がある。ここでは山本により発見された抗癌剤 OX 物質との比較実験として行つたのが本実験の目的であり OX 物質で示された実験結果と比較してみる。OX 物質によるウニ卵卵割阻害は人体許容量の1000倍稀釈液に於いてもなおよく卵割阻害を示ししかもその場合、ここに使用した各種抗癌剤の 50~100 倍稀釈液で示された以上によく卵割阻害を示す。又 OX 物質では人体許容量の500倍稀釈液に於いて10分間精子を処理する時完全に運動能力を喪失し受精能力を失活する³⁾ に対して種々の抗癌剤は人体許容量の10倍稀釈液に於いても殆んど影響を示さない。又 OX 物質による感受性テストに於いては雄雌核の融合期と分裂中期がともに強く阻害されるが他の多くの抗癌剤はそれ等のうちの何れか一方にのみ作用する傾向を示している⁴⁾。この様に考えれば OX 物質は少なくともウニ精子、卵子に対しては他の種々の抗癌剤より強力に作用し卵割の阻害度も強いものと考えられる。

文

- 1) 山本道夫：細胞化学シンポジウム 9, 141, 1959.
- 2) 山本道夫：岡山医学会雑誌投稿中
- 3) 妹尾, 山本, 内海 他：岡山医学会雑誌 72, 1197, 1960.
- 4) 妹尾, 山本, 内海 他：岡山医学会雑誌 72, 1307, 1960.
- 5) Marshak, A. and C. Marshak : Exptl. Cell Res. 5, 288, 1955.

結 論

種々の抗癌剤 (Alkylating agent として Nitrogen mustard N-Oxyd. Thio TEPA を, Antimetabolite として 8-Azoguanine を, 制癌性抗生物質として Sarcomycin-Na, Carzinophilin, Mitomycin C, chromomycin, Actinomycin (Sanamycin) のウニ精子及び卵子に対する作用をその受精膜形成率, 卵割率から観察し次の結果を得た。

1) 各種抗癌剤の人体許容量の10倍稀釈液に10分間処理により、ここに於いてムラサキウニ精子は殆んど作用を受けない。

2) 各種抗癌剤にてウニ卵を30分間種々の濃度で処理した場合、濃度の上昇でその正常精子の助精による受精膜形成率、並びに卵割率は減少し人体許容量の50倍稀釈液中では Carzinophilin > Thio TEPA. > Nitrogen mustard, > mytomycin, > Sarcomycin, > chromomycin. > Actinomycin の順に阻害作用は大である。

3) ウニ卵受精後20分, 40分, 60分, 80分, 90分の各時期に人体許容量の50倍液で10分間づつ作用せしめた時, mytomycin, Carzinophilin は雄雌核融合期を, Chromomycin, Sarcomycin, Nitrogen mustard は分裂中期を強く阻害し Chromomycin のそれは特に強力である。

4) OX 物質とその作用, 作用濃度について比較しウニ卵及び精子に対しては種々抗癌剤が OX 物質の作用より弱い事を明らかにした。

献

- 6) Marshak, A. and C. Marshak : Exptl. Cell Res. 10, 246, 1955.
- 7) 杉野, 岡崎, : 蛋白質, 核酸, 酵素 2, 20, 1957.
- 8) Sugino, Y. et al. : Biochim. Biophys. Acta. 26, 453, 1957.
- 9) Sugino, Y. : J. Am. Chem. Soc. 79, 5074, 1957.
- 10) 村上哲英：細胞化学シンポジウム 10. 投稿中.

Action of Various Anti-Carcinogenic Agents on the Egg Division in Sea-Urchin Egg

Michio Yamamoto
Kozo Utsumi
Sachiko Ohara
and
Goki Yamamoto

Cancer Institute, Okayama University Medical School

Satimaru Seno
Hisako Ueno

Department of Pathology, Okayama University Medical School

Junichi Kobayashi

Department of Surgery, Okayama University Medical School

Author's Abstract

Using various anti-carcinogenic agents (nitrogen mustard N-oxyd as an alkylating agent, 8-azaguanine as an anti-metabolite, and sarcomycin-Na, carzinophilin, mitomycin C, chromomycin, actinomycin and sanamycin as inhibitory anti-carcinogenic agents) the authors studied the actions of these agents on the spermatozoa and eggs of sea-urchin by observing the rates of the membrane formation at insemination and egg division and obtained the following results.

1. When treated with the solution of various anti carcinogenic agents diluted ten-fold the optimal quantity for the human body for ten minutes, the spermatozoa of sea-urchin (*Heliocidaris crassistina*) are hardly affected by these agents.

2. In the cases where sea-urchin eggs (*Hemicentrotus Pulcherrimus*) are treated for 30 minutes with different anti-carcinogenic agents at various concentrations, the higher the concentration, the greater is the decrease in the rates of the membrane formation and egg division at insemination of normal spermatozoa, and in the case treated with the solution diluted 50-fold of the optimal quantity for the human body the inhibitory action of the agents increases in the ascending order of: carzinophilin > Thio TEPA > Nitrogen mustard > mytomycin > Sanamycin > chromomycin > actinomycin.

3. When treated with the 50-fold solution these agents as compared with the proximal concentration for the human body, at the intervals of 20, 40, 60, 80, and 90 minutes after the fertilization, mytomycin and carzinophilin markedly inhibit the fusion of male and female nuclei while chromomycin, sarcomycin and nitrogen mustard suppress the cell division at metaphase, and chromomycin has especially strong inhibitory action on the cell.

4. When the effects of these agents are compared with those of OX-substance with respect to their concentration, it has been clarified that the action of these agents on sea-urchin eggs and spermatozoa are weaker than that of OX substance.
