

日本化学療法学会第8回総会

〔シンポジウム〕 抗癌剤の作用機構

昭和35年7月17日

(1) 腫瘍細胞に対する2, 3化学薬品の作用(形態学的研究)

牧野佐二郎

北大理学部動物学教室

私は医学者ではないので治療や臨床には一切ふれない。腫瘍を構成する主体は腫瘍細胞である。化学薬品を用いて腫瘍細胞を破壊し、或はその増殖を抑制し、腫瘍の治療ならびに再発の防止を目的とする化学療法の研究は、つきつめれば腫瘍細胞の分裂のメカニズムと直結した問題であつて、それと切り離しては考えられない。私共は薬物の腫瘍ならびに正常細胞に対する作用を、主として細胞形態学の立場から、細胞の破壊過程、作用の詳細なる機序、再発のしくみなどを研究している。研究材料にはシロネズミの各種腹水腫瘍、ハツカネズミの腫瘍型腫瘍などを用い、*in vivo* ならびに *in vitro* において実験している。また培養した人癌や人類正常細胞をも併せ用いている。研究は次の3方面より進めつつある。

i) 固定標本により薬物の細胞に及ぼす影響をしらべる。

ii) 薬物処理した材料を生体的に顕微鏡下に観察する。即ち、生きた状態において細胞の薬物に対する反応や破壊の過程を位相差顕微鏡によつて観察し、それを16ミリ映画に記録して細胞の現わす連続的变化を分析する。

iii) 以上の変化を細胞化学的方法により検討する。たとえば、或る薬物によつて仁が形態的に反応して変性を起した場合、それが細胞化学的には如何なる変化であるかをしらべる。

これらの3方法を平行的に進めて、薬物の作用機構を分析しようとしている。

薬物による腫瘍ならびに正常細胞の障害作用は大別すると、

i) 主として核物質を破壊するもの

a) 細胞の分裂過程(前期より終期)において染色体に特に sensitive に働くもの。

b) 休止期(resting stage)の細胞においてその核物質に働くもの。クロマチン質に作用するものと、仁に作用するもの。

ii) 主要作用が細胞質の障害にあるもの。

iii) 両者 i) と ii) にまたがるもの。

一般的にいえば、薬物の作用時間、濃度、用量によつて i) の場合も ii) の場合も、その作用は一様ではない。また、条件によつては作用が両者にまたがる(i と ii の両方に及ぼす)結果を示す。また、障害作用の強弱は癌の種類によつても同様ではない。同じ薬物でも癌の種類によつて作用の度合を異にするし、また作用機構も変わることがある。効果時間も薬物の種類によつてまちまちである。

私の研究室において、この数年間に行なわれたこの方面の研究結果を要約して表示する(表1)。

私共が現在までに得た結果のうちで、興味ある2, 3の点をあげる。

1) 現在の段階では癌を完全に治療する薬物は発見されていない。せまい範囲ではあるが私共が実験した薬物についてみると、どの薬物でも使用後ある時間が経過すると、必ずといつてよい位再発がおこる。薬物の効果時間は種類によつて一様ではないが、薬物処理が腫瘍の増殖は一時的に退行する。如何にはげしい破壊作用を示す薬物によつても腫瘍の退行は一時的で、有効時間がすぎると腫瘍細胞が増殖を初めて腫瘍はもとの状態に復する。この再発はどうして起るかを細胞学的に研究した結果、薬物処理によつて大部分の腫瘍細胞が破壊されるが、そのうちの少数のものが薬物の作用から逃れて生き残る。薬物の有効時間がすぎると、それらの生き残つた腫瘍細胞が再び増殖を始めて、ある時間後にまた腫瘍はもとの状態に復する。ちょうど原生動物にみるように、環境条件が悪くなると、ある腫瘍細胞(これは腫瘍の増殖の主体をなす stem-cells である)は自己保存の方法を講じて(恐らく細胞表層の変化のしくみによるもので透過性の変化であろう)、薬物の障害作用から逃れて生き残る。生き残る細胞は一般に小形になり一見収縮したような状態を呈する。

2) 同一の器官に発生した腫瘍でも必ずしもその本質的性質が同じではない。即ち、同一器官に発生した(胃なら胃、子宮なら子宮に発生した)腫瘍の本質的性質は患者個人によつて相異なる。このことは腫瘍細胞の染色体の研究結果から明らかになつた事実で、化学療法の実施に関係して重要な問題を含んでいる。たとえば同じ胃

表 1 腫瘍及び正常細胞に対する化学薬品、放射線並に抗血清の細胞学的影響の研究結果
 北大理学部放射野研究室における 1959-60 年の業績 (昭和 35 年 6 月未現在)

薬品名	投与量	材料	染色方法	結 果			生存日数その他
				核	仁	細胞質	
Sarkomycin (Meiji)	100 mg/cc } 2時間 25 " } 処理 5 " } 1 mg/cc } 1時間	MS シロネ シロネ	May-Grünwald Giemsa (MGG). Azur-B. Feulgen. Dahlia. Haema- toxylin	低濃度では変化せず高濃度では Pycnosis	染色性低下 RNA 減少 消失	blebbing RNA 異常分布	Residual cells の分裂を位相差顕微鏡により観察
				Chromatin の異常分布: 粒状,塊状及び DNA 異常化減少	染色性の不均一化 RNA 減少	糸状化, bead 状化 転座	control: 8.9days 10mcg/kg: 11.1" " 25 " : 12.4" " 50 " : 28.6" " 10mcg/kg × 3: 20.9" "
Carzinophilin (Kyowa)	10 mcg/kg 20 mcg/kg 50 mcg/kg 10 mcg/kg × 3	MTK-Sarcoma III	Acetic dahlia Acetic Orcein M. G. G. Feulgen	Chromatin の異常凝集, DNA の異常化	形態異常 染色性異常	変化少し 空胞化	糸状化, bead 状化 転座
				染色性異常化		糸状化, bead 状化, 転座, 4回の染色体断座	染色体断座 細胞の染色体変化なし, 高倍顕微鏡での観察
*Cortisone + Carzinophilin	Cortisone 50 mg/kg + Carzinophilin 2,500 u/kg (Cortisone 処理後 3 時間投与)	人胃癌 (46才女)	Acetic dahlia			空胞化 blebbing	再発後の染色体型は処理前と同じ 実験群: 8.4日 実験群: 15.8日
				染色性異常化		染色性低下, 仁物の細胞質に放出 RNA 減少	糸状化 断座 空胞化
Mitomycin-C (Kyowa)	5 mcg/cc } 1時間 10 " } 処理 25 " } 50 " } 100 " }	MS シロネ	M. G. G Feulgen	Chromatin の塊状化: 凝集, 核の fragmentation DNA 異常化	染色性低下, 仁物の細胞質に放出 RNA 減少	変化少し 空胞化	糸状化 断座 空胞化
				仁附随染色体数の増加, Chromatin の異常凝集 DNA の異常化	染色性低下 RNA 減少	転座 断座 糸状化	MTK-III 1,000 mcg/kg 80% 治癒 (半年以上生存)
Mitomycin-C + Carzinophilin (Kyowa)	50 mcg } 1時間 1 mcg } 処理	CBA 乳癌, Dan-ns, tailless シロネ	MGG Feulgen	Chromatin の異常分布: 塊状, 凝集 Pycnosis DNA の異常化	染色性著しく低下 断片化 RNA 減少, 異常化	染色性低下	6時間以後 分裂像みられず
				Chromatin の異常分布, 凝集 DNA の異常化	萎縮	blebbing 空胞化	単独投与よりも作用著しい, 巨大細胞, 分裂核多核細胞増加
Podophyllin	1 mg/cc 1時間	L株 cells (Mouse)	MGG Dahlia				

薬品名	投与量	材料	染色方法	結核			果		生存の他数
				核	仁	細胞質	染色体		
2,5-bis-ethyl-eniminohydroquinone (HE)	0.3 mg/kg	MTK-II	Acetic dahlia Neutral red プリリアント・ク レンシブル	Pycnosis, 膨潤, 染色性不均一 空胞化 核膜崩壊	膨潤不均一 染色性不均一 塊状変化	崩壊不均一 染色性不均一 空胞化 blebbing	粘着, 膨潤, 切塊状化, 転座, 断, 染色体橋, 連帯	プリリアント・クレンシブルによる超生体染色により細胞質顆粒は Rosett 状配列をせず散乱しているのが観察された。 Cell volume の増大 91% (19/21 III) 治癒	その他
	0.4 "								
	0.6 "								
Thio-TEPA	1 mg/kg	MTK-III EM-tumor	Acetic dahlia MGG Feulgen	Micronuclei の形成, Feulgen の染色性低下, Chromatin 凝集, 核膜不明瞭, DNA の減少と異常化	膨潤不均一 染色性不均一 塊状変化	膨潤不均一 染色性不均一 空胞化 blebbing	切断, 転座, 染色体橋, 連帯, 多極分裂	MTK-III: Control : 9.0日 1 mg/kg : 12.8 " 2 " : 18.0 " 5 " : 治癒 EM-tumor Control : 9.7日 2 mg/kg : 12.0 " 5 " : 10.0 " 1 mg/kg × 4 : 12.0 "	
	2 "								
	5 "								
	2 mg/kg								
* Actinomycin-C	0.5 mg/cc	CBA 乳癌 スズカネ ハツカネ ミ肺臓	MGG Feulgen	染色性低下 RNA の異常化	変化少し	変化少し blebbing	凝集, 切断, 転座, 染色体橋		
	0.1 "								
	0.05 "								
	0.01 mcg/cc								
	0.005 "								
* X 線	400 r	吉田肉腫	Acetic dahlia	Feulgen 染色性低下, DNA 減少, 形成異常, 分葉核形成, micronuclei 形成	膨潤不均一 染色性不均一 塊状変化	膨潤不均一 染色性不均一 空胞化 blebbing	凝集, 切断, 転座, 染色体橋		
	500 r								
	1,000 r								
	1,500 r								
	100 r								
Homologous antiserum	100 r	Ehrlich 腹水癌	Feulgen, Microspectrophotometry	処理後10~96hrs. において DNA 量増加120時間後には処理前の状態にもどる	膨潤不均一 染色性不均一 塊状変化	膨潤不均一 染色性不均一 空胞化 blebbing	細胞質顆粒の異常, 凝集, 膨潤, blebbing	DNA 量の増大する時期と細胞破壊の時期が一致する	
	250 r								
	500 r								
腫瘍免疫マウスの腹腔内毒薬	0.2 cc	吉田肉腫 MTK-II MTK-III	位相差法 エオジン (生体染色) MGG	核膜の不規則性	異常肥大	異常肥大	細胞質顆粒の異常, 凝集, 膨潤, blebbing	Control : 9 日 Total dose 6 ml : 6/15 治癒 100 日以上生存	
	With homologous complement								
腫瘍免疫マウスの腹腔内毒薬	1 cc/day × 7	吉田肉腫	Acetic dahlia Neotetrazolium (Method for dehydrogenase)	肥大	肥大	肥大	顆粒の異常凝集, 膨潤, RNA 減少, Dehydrogenase の活性度の異常化		
	0.2 cc With or without complement								

この表の資料は大部分発表済みである (* 未発表)。

癌だからといって同一な療法が必ずしも有効ではないことを暗示する事実であつて、それはその腫瘍そのものの本質的性質が患者によつて同一でないということに原因が存在しているのである。臨床上の結果は、事実においてそういう結論になつてゐるのではないかと思う。私共はこの事実をもつと深くつきとめるつもりで各種の癌において染色体の研究を進めつつある。

3) 薬物の性能や障害作用は薬物によつて特有な細胞学的特徴がある。薬物の腫瘍細胞に対する細胞学的作用を詳細にしらべ、その薬物の細胞障害作用や性能や時間的効果などの点をくわしくつきとめて、いろいろな点で相異なる2種類(あるいはそれ以上の)の薬物を、用量、濃度、投与時間などを適当に組合せて用いると、単独投与の場合よりも効果が著しく高い。これは放射線と組合せた場合にも同じである。この併用方法の計画の基礎となる資料は詳細なる細胞学的研究の結果である。

次に、2, 3薬物の細胞障害作用を生きた細胞において記録した16ミリ映画(約400呎)を供覧する。その内容は次の通りである。

Effects of some chemicals upon normal and malignant cells *in vivo* and *in vitro*

—A 16 mm motion picture—

Material :

Mouse lung, rat lung, human lung (HL-C strain), CBA mammary adenocarcinoma(mouse), HeLa cells, and MTK-sarcoma III.

Chemical used for experiments :

Carzinophilin (Kyowa), Mitomycin-C (Kyowa). Podophyllotoxin and Sarkomycin (Meiji).

Record .

Zeiss Mirko-Kino-Kamera, With objective 25× and oculars, 1×—8× (phase contrast). 4, 8, 15 and 30 frames per minute at a temperature of 37C.

Sequences :

- 1) Effects of Carzinophilin. (4, 9, 12, 24, 72 and 90 hrs. after application).

In vitro : HeLa cells.

In vivo : MSK-sarcoma III (rat).

- 2) Effects of Mitomycin-C. (20, 30 and 40 hrs. after application).

In vitro : Rat lung, mouse lung, CBA-tumor (mouse) and HeLa cells.

In vivo : MTK-sarcoma III (rat).

- 3) Effects of Podophyllotoxin.

In vitro : CBA-tumor (mouse).

- 4) Effects of Sarkomycin.

In vitro : HL-C strain.

- 5) Effects of Sarkomycin and Podophyllotoxin in combination.

In vitro : CBA-tumor (mouse).

- 6) Behavior of a residual cell following Podophyllotoxin-treatment.

In vitro : CBA-tumor (mouse).

(2) 種々制癌剤の腫瘍細胞エネルギー生成系に及ぼす影響

海老名敏明

東北大学抗酸菌病研究所

癌細胞はそれぞれの宿主の中にあつて無制限な増殖を続けるが、このために利用されるエネルギーは、現在のところでは恐らく正常細胞と同じく ATP の高エネルギー磷酸結合を介してまかなわれているものと考えられている。ただ癌細胞では WARBURG 以来周知の如く、解糖が極めて旺盛であることから、エネルギーを生成する反

表 1 組織の呼吸解糖

	QO ₂	QAO ₂	QAN ₂	MOQ	
Jensen sarcoma (rat)	9	17	34	5.6	
Jensen sarcoma (rat)	9	18	32	4.7	
癌組	Flexner-Jobling carcinoma (rat)	7	25	31	2.6
		8	20	29	4.3
Tar carcinoma (mouse)	20	15	25	1.5	
正常組織	Sarcoma 37 (mouse)	15	12	28	3.2
	Yale tumor I (mouse)	7	7	16	4.0
	Spontaneous tumor (mouse)	11	9	16	2.0
	Rouse sarcoma (chicken)	5	20	30	6.0
	Muscle (rat)	21	0	3	0.4
	Thyroid (rat)	13	0	2	0.4
	Liver (rat)	12	0.6	3	0.6
	Intestinal mucosa (rat)	12	1.6	4	1.0
	Spleen (rat)	12	2	8	1.5
	Testis (rat)	12	0	8	2.0
	Thymus (rat)	6	0.6	8	3.6
	Brain cortex (rat)	11	2.5	19	4.5
	Embryo (rat)	13	6	23	3.9
	Retina (rat)	31	45	88	4.2
	Placenta (rat)	7	10	14	1.7

QO₂ : 乾燥重量 1mg 当り 1 時間当りの酸素消費 cmm

QAN₂ : 嫌氣的に乾燥重量 1mg 当り 1 時間に生成した乳酸に相当する CO₂ 発生 cmm

QAO₂ : 同上好氣的

MOQ : Meyerhof oxidation quotient = $\left\{ \frac{3 Q_{AN_2} - Q_{AO_2}}{Q_{O_2}} \right\}$

応系に正常とは異つたものがあるかも知れない。

組織の呼吸並びに解糖に関しては数多くの報告があるが、ここには BURK がまとめた表の一部を引用してみる。この表から明らかなように癌組織では嫌気性並びに好気性解糖が著しい。一方正常組織でも増殖の旺盛な組織の中には解糖能の高いものもあるが好気性になると解糖は著しく低下する。これに反し癌組織では酸素の存在下でもなお高度の解糖が起る。一方呼吸能そのものはさほど低下しているとは言えない。

表 2 各種腹水癌細胞の呼吸並びに解糖能

No.	吉田肉腫			エールリッヒ癌			A. H. 130		
	Q _{O₂}	Q _{M^{O₂}}	Q _{M^{N₂}}	Q _{O₂}	Q _{M^{O₂}}	Q _{M^{N₂}}	Q _{O₂}	Q _{M^{O₂}}	Q _{M^{N₂}}
1	5.5		35.6	8.2		40.5	8.7		25.6
2	6.2		29.5	6.0	20.3	36.7	9.0	25.4	43.9
3	5.9		43.0	5.5	10.7	38.0	7.7	18.7	39.6
4	5.0		32.1	7.8	28.5	42.8	5.8	16.2	32.4
5	7.3		28.8	6.6	17.9	28.1	5.6	22.4	61.3
6	8.6		35.3	3.0	16.5	35.2	5.9	20.4	51.9
7	6.1	19.1	24.8	5.0	25.2	35.9	5.6	13.3	27.3
8	6.6	19.7	30.0	6.6	36.4	39.0	4.7	33.0	31.5
9	7.6	20.8	26.2	7.3		36.6	14.6		25.3
10	3.6	14.9	21.0	5.9		36.0	17.6		25.6
11	4.5	23.0	34.9	7.0		36.6	13.0		43.7
12	6.7		34.6	12.5		38.3	4.7		36.5
平均	6.1	19.5	31.3	6.8	23.4	37.0	8.6	21.0	37.0

ここにわれわれが WARBURG 検圧法によつて測定した吉田肉腫、エールリッヒ癌及び AH 130 細胞の呼吸並びに解糖能を示したが、この成績は前述のそれと同様である。

エールリッヒ腹水癌細胞の呼吸及び解糖は、*in vitro* に加えられた種々の制癌剤によつてどのように影響されるかを、癌発育抑制効果と対比して検討したのがこの表である。どの薬剤の場合でも *in vitro* で加えられた濃度に比例して抑制効果がみられるのは当然のことと思われるが、6-MP の場合はその制癌効果が比較的高度であるに拘らず呼吸解糖共に殆ど影響されず、又、ナイトロミン、E 39、エンドキサンの場合も低濃度では殆ど抑制はみられない。これは 1 時間と言う短かい反応時間のため、或はナイトロミン、エンドキサン等では、*in vitro* では活性基がマスクされた形であることにもよるかと思われる。水銀ヘマトポルフィリンは中等濃度以上では呼吸、解糖何れも極めて強く抑制する。ここで変つた効果を示したのがカルチノフィリンである。即ち呼吸に対してはかなりの高濃度でも殆ど影響しないにも拘らず、解糖に対しては強い抑制を示すことがわかる。

表 3 Ehrlich 腹水癌細胞の呼吸並びに解糖能に対する抑制率

	濃度 μg/ml	呼吸 %	解糖 %		腫瘍発育 抑制効果
			好気性	嫌気性	
ナイトロミン	1000	79.1	75.8	79.8	‡ (20mg/kg)
	100	46.6	56.7	51.4	
	10	5.2	3.0	10.0	
E-39	100	52.0	5.8	7.2	‡ (1 mg/kg)
	10	20.0	3.0	0	
	1	11.9	0	0	
B-518 (エンドキサン)	2000	50.0	43.2	48.4	‡ (20mg/kg)
	200	46.7	12.2	20.9	
	20	35.0	0	0	
水銀ヘマト ポルフィリン	1000	100.0	100.0	100.0	+ (5 mg/kg)
	100	83.0	92.1	90.0	
	10	10.	28.7	29.0	
6-MP	1000	1.0	-2.0	5.0	‡ (10mg/kg)
	100	-2.0	-7.0	-10.0	
	10	-5.0	-11.0	-10.0	
カルチノ フィリン	1000*	5.0	61.8	89.7	‡ (2,500 u/kg)
	100*	4.0	34.0	46.0	
	10*	5.0	2.0	0	
マイト マイシン	1000	30.0	69.6	57.0	‡ (500μg/kg)
	100	5.0	10.0	5.0	
	10	0	6.0	-3.0	
クロモ マイシン	1000	86.0	85.0	83.0	‡ (200 μg/kg)
	100	23.0	23.0	17.0	
	10	12.0	7.2	10.0	
アヤマイシン	1000	10.0	28.1	39.0	+ (5 mg/kg)
	100	3.0	24.3	34.0	
	10	-3.0	10.8	14.0	

(* μ/ml)

次の表は当研究所の遠藤教授が合成したアリル化合物の中、水溶性のもの 14 種を選んで同様に試験した結果である。これから言えることは呼吸・解糖の何れか、又はその両者を強く抑制する薬剤の中には、それ以外のものよりも強い発育抑制効果を示すものが多かつたが、必ずしも呼吸、解糖抑制と制癌効果とは parallel ではない。

次にエネルギーを利用して営まれると考えられる機能の 1 つとして、P³² の incorporation に就いての実験成績を示す。

先づエールリッヒ腹水癌細胞の *in vivo* での P³²-incorporation を調べてみた。移植後 7 日目で相当程度に腹

表 4 当研究所で合成した 14 種の Allyl 化合物の制癌効果

化 合 物	抑 制 率 (1,000 r/ml)		皮下腫瘍発育 抑 制 率
	Q _{O₂}	Q _M ^{N₂}	
Allylaminobenzene	42.1	8.8	50~70(200mg/kg)
p-Bis (allylamino) benzene	5.8	-10.4	25~50 (50 ")
β-Allylaminonaphthalene	70.5	70.0	50~70(400 ")
α-Allylaminonaphthalene	59.9	71.5	25~50(200 ")
4-Allylaminopyridine	57.6	-20.0	25~50 (25 ")
2-Allylaminopyridine	10.4	-5.0	>25 (100 ")
Allyliminothiadiazoline	48.1	32.2	90~100(100 ")
6-Allylaminoquinoline	64.6	49.5	65~75(100 ")
p-Allylaminobenzylcyanide	-5.8	-3.0	25~50 (50 ")
N-Allylthiourea	28.0	-6.0	25~50(200 ")
Acetyllallylamine	12.8	3.0	25~50(200 ")
4-Allylthiosemicarbazide	44.7	4.6	25~50 (10 ")
4-Allyl-1-formylthiosemicarbazide	-4.0	6.3	25~50(200 ")
Allylimino-C-methylthiadiazoline	32.8	2.6	25~50(200 ")

表 5 Ehrlich 腹水癌細胞の *in vivo* での P³²-incorporation に及ぼす影響

制 癌 剤	投 与 量 ($\mu\text{g}/\text{g}$)	抑 制 率			
		酸可溶性 性 燐 (cpm/ $\mu\text{g. tp}$)	燐脂質 (cpm/ mg drywt)	RNA-P (cpm/ μg RNA-P)	DNA-P (cpm/ μg DNA-P)
ナイトロミン	400	-15%	-23%	39%	22%
E 39	10	8	22	40	36
B 518 (エンドキサン)	100	-2	3	7	3
水銀ヘマトポ ルフィリン	100	39	51	45	40
カルチノ フィリン	50*	30	76	38	37
マイトマイシン	10	19	65	25	25
クロモマイシン	4	39	43	40	55
アヤマイシン	100	0	45	40	53

(* ; u/mouse)

水貯溜したところで、これら薬剤を腹腔内に注射し、18 時間後に P³² 10 $\mu\text{c}/\text{mouse}$ を同じく腹腔内に注入し、更に 6 時間後に腹水を採取し直ちに氷冷した生食水で十分に洗滌した後、過塩素酸で酸可溶性燐を、次いでアルコール及びアルコール・エーテル混液で燐脂質を、更に概ね SCHMIDT-THANHAUSER 法に従って RNA 及び DNA を分離し、この 4 つの fraction に就いてそれぞれの比放射能を求めて比較した。なお薬剤は阻止有効量と思われる量を投与した。この結果は水銀ヘマトポルフィリン、カルチノフィリン、クロモマイシンではどの fraction にもほぼ同程度の抑制がみられたが、それ以外の薬剤ではどちらかと言えば酸可溶性燐よりも RNA 及び

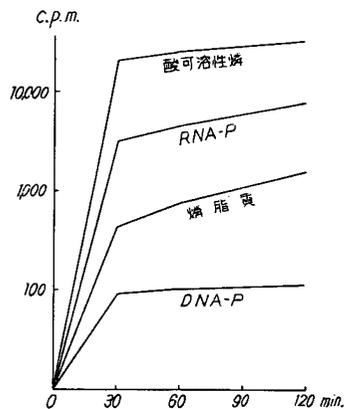
DNA への incorporation が強く抑えられるように思われた。

然しこうした *in vivo* の実験では、移植時の細胞数、移植後の日数、動物の体重等を出来るだけ均一にしても、なお且つ動物によつて腹水貯溜並びに腹水の性状には避けられない variation がある。従つて動物当りの dose を一定にしたつもりでも結果に相当のばらつきがあることは見逃せなかつた。それ故次にとり出した癌細胞に就いて *in vitro* で薬剤を作用させる方法で P³²-incorporation を時間的経過を追つて検討してみた。

WARBURG のフラスコ中に採取した腹水 (乾燥重量にして 10~20mg) を Krebs-Ringer に suspend して

入れ、P³² 100 μc を加えて 37°C で 2 時間反応させた。グラフは対数目盛で表わしてあるが、これからわかるこ

図 1 *In vitro* における P³² 転入の時間的経過



とは酸可溶性燐、RNA 及び燐脂質共に時間の経過と共に増加の傾向にあるが、DNA だけは殆ど伸びてないことである。このことは、この種の *in vitro* の条件では細胞の分裂・増殖機能は殆ど停止していると考えられるから、むしろ当然の結果と思われる。

次に同一条件の下で薬剤の影響をみた実験では表の如く、ナイトロミン、thio-TEPA 及びカルチノフィリンは殆ど影響なく、抑制のみられたのは水銀ヘマトポルフィリン、クロモマイシン及びアヤマイシンであつた。

以上制癌剤の効果に就いて、エネルギー生成反応としての呼吸・解糖と、これを利用しての反応の一端としての P³²-incorporation を *in vitro* 及び *in vivo* で検討

表 6 Ehrlich 腹水癌細胞の *in vitro* での P^{32} -incorporation に及ぼす影響

制 癌 剤	濃 度	抑 制 率			
		酸可溶性 性 燐 (cpm/ μ g tp)	燐脂質 (cpm/ mg dry wt)	RNA-P (cpm/ μ g RNA-P)	DNA-P (cpm/ μ g DNA-P)
ナイトロミン	100 μ g/ml	10%	-12%	-9%	11%
Thio-TEPA	10 ⁻⁴ M	0	-19	-10	-19
水 銀 ヘ マ ト ポ ル フ ィ リ ン	10 μ g/ml	-13	48	46	37
カルチノフィリン	100 μ /ml	11	-10	-21	-80
マイトマイシン	10 μ g/ml	3	-29	14	24
クロモマイシン	10 "	28	50	34	23
アヤマイシン	100 "	11	56	26	37

表 7 吉田肉腫細胞培養液組成

a) L. E. 溶液+牛血清 (1:1)		b) L. K. 溶液+牛血清 (1:1)	
但し L. E.; 0.4% Lactalubumin hydrolysate in Earl's Balanced Saline Solution.			
L. K.; 0.4% Lactalubumin hydrolysate in Krebs-Ringer Bicarbonate Solution			
(Earl's Balanced Saline)(Krebs-Ringer Bicarbonate)			
NaCl	6.80 g	6.92 g	
KCl	0.40	0.35	
CaCl ₂	0.20	0.28	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20	0.16	
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.14	0.29	
d-Glucose	3.00	2.31	
NaHCO ₃	1.90	2.10	
蒸留水	1,000 ml	1,000 ml	

して来たが、先に述べたようにこれらの方法では本当の意味での薬剤の効果を把握することには無理がある。そこでこれらの問題を幾らかでも解決しようという意図のもとに、われわれは生体外で増殖可能な吉田肉腫細胞を

用いて次の実験を試みた。

Krebs-Ringer bicarbonate solution にラクトアルブミン水解物 0.4% を加えたものと牛血清とを等量に混ぜた medium 中で吉田肉腫細胞の培養を試みた。その結果 Krebs-Ringer bicarbonate でも勝田博士らの使用されている Earl の溶液と殆ど同じ成績を得たので、以後の実験にはこの混液を用いることにした。

吉田肉腫細胞培養後 24 時間で 1,000 回転 5 分間遠心して細胞を集め WARBURG のフラスコ当り約 500 万個づつを分注する。フラスコ中の

medium としては、呼吸測定のためにラクトアルブミン水解物 0.4% を含む Krebs-Ringer phosphate buffer を、一方解糖測定のためには同じくラクトアルブミン水解物を含む Krebs-Ringer bicarbonate を何れも牛血清と等量に混合したものを用いた。そして同じくフラスコ内に P^{32} を 10 μ c/ml の割合に入れて 4 時間反応させ、この間の呼吸・解糖能はマノメーターのよみから求めた。

この間に medium 中の P^{32} は呼吸及び解糖の medium の中でそれぞれ酸可溶性燐、燐脂質、RNA 及び DNA へ図のようにとり込まれていることがわかる。このようにどの fraction に就いても解糖反応の medium での incorporation が呼吸の medium でのそれを凌ぎ、又時間経過による上昇も解糖反応時の方が著明であつた。

ともかくこの結果からみてもこのような条件下では先に述べた *in vitro* の実験条件と違って反応 4 時間後でも代謝活性は十分保たれているものと考えられる。以後はこの材料と方法を用いて制癌剤の作用を検討した。

図 2 培養液中での吉田肉腫の増殖状況

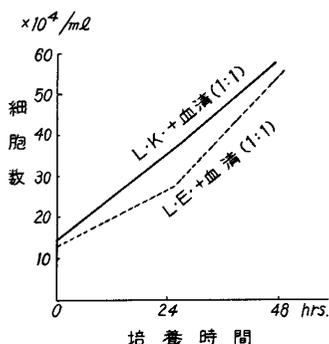


図 3 培養吉田肉腫細胞の呼吸並に糖質性解糖

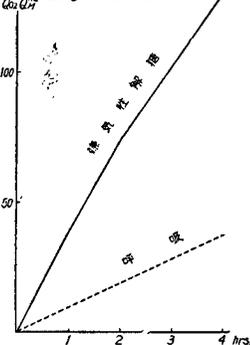


図 4 培養した吉田肉腫細胞による P^{32} のとりこみ

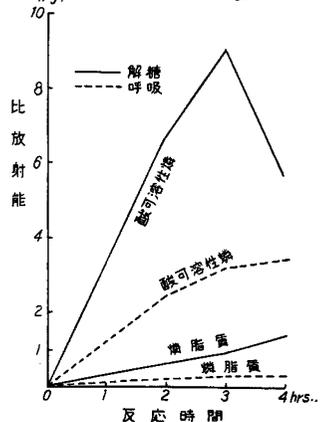


図5 培養した吉田肉腫細胞による呼吸並びに解糖時に於ける P^{32} のとりこみ

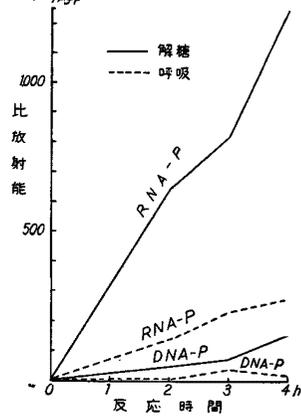


図7 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} -incorporationに及ぼす影響

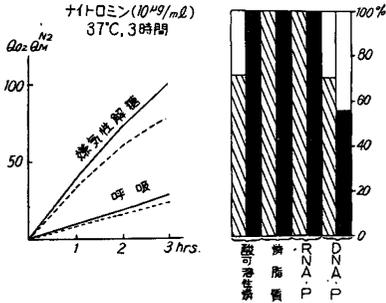


図9 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} incorporationに及ぼす影響

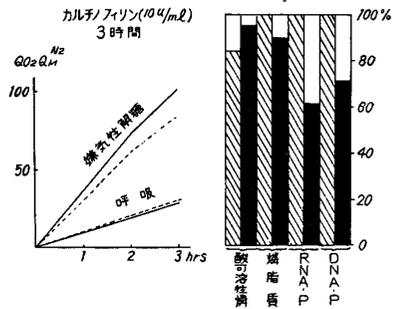


図11 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} incorporationに及ぼす影響

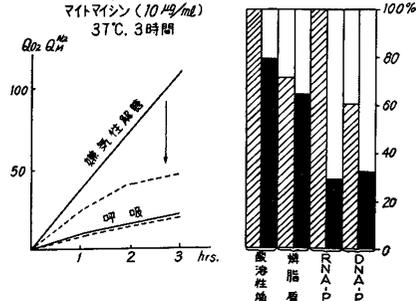


図6 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} -incorporationに及ぼす影響

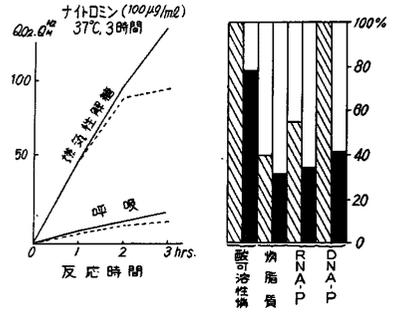


図8 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} incorporationに及ぼす影響

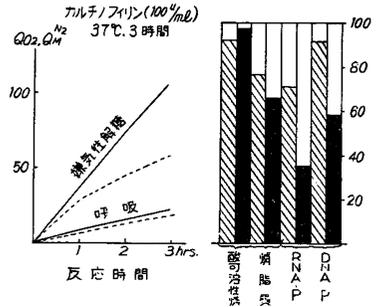


図10 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} incorporationに及ぼす影響

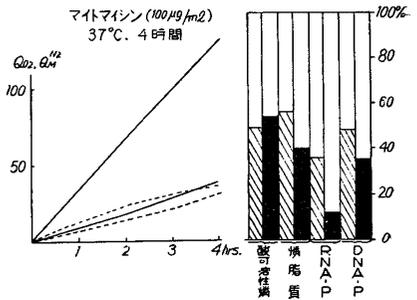
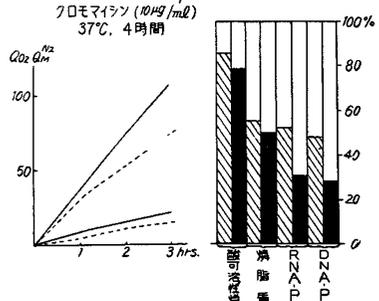


図12 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P^{32} incorporationに及ぼす影響



先づナイトロミン 100 μ g/ml を加えた medium 中では呼吸・解糖は共に多少抑制されている。この間 medium 中の P³² の incorporation はそれぞれの fraction について可成りの程度に抑制されており、特に解糖反応時の抑制が強いことがわかる。然しこのような高濃度では非特異的な影響が現われてくると思われるので、この 1/10 の濃度で同様に試験した。この場合にも呼吸・解糖はほぼ同程度に抑制されるが、P³² の incorporation は DNA へのそれだけが抑制された。

次にカルチノフィリン 100 u/ml であるが、この場合は解糖だけが極めて強く抑制される。この間の P³² の incorporation は RNA へのそれが最も強く抑えられるようであり、次いで DNA 及び磷脂質へのそれも相当程度に抑えられている。又カルチノフィリン 10 u/ml の濃度でも解糖はなお相当程度に抑制されており、この間呼吸時の P³²-incorporation は殆ど影響されないにも拘らず解糖時のそれは RNA 及び DNA でそれぞれ 40% 及び 30% 程度抑制されていることがわかる。

次にマイトマイシン 100 μ g/ml では呼吸への影響を除いては全体的にかなり抑制が強いが、これを 1/10 の濃度でみると解糖阻害は極めて強く、この間の P³² の incorporation はすべての場合抑制されるが、特に RNA 及び DNA で強く、それも解糖時に於いて著明であることがわかる。

クロモマイシン 10 μ g/ml では呼吸 解糖共にかなり

強く抑制されており、P³² の incorporation もどの fraction でも相当強く抑えられている。

次にアヤマイシン 100 μ g/ml では、全体として相当強い抑制がみられるが、10 μ g/ml でも呼吸時に於いても P³² の incorporation が抑制されている。

以上培養した吉田肉腫細胞を用いた実験では比較的低濃度でナイトロミン、カルチノフィリン、マイトマイシン、アヤマイシンは何れも嫌気性解糖を抑制し、特に後の二者で著しい。又 P³² の酸可溶性磷、磷脂質、RNA、及び DNA への incorporation は各薬剤に就いてかなりの相違はあるが、全体を通じて解糖反応時に於いて呼吸反応時に於けるそれを凌ぐ傾向にある事実は特に興味深く思われ、この点に関しては今後更に究明したい。

以上種々制癌剤の腫瘍細胞の代謝面に及ぼす影響を述べたが、これらと形態に及ぼす変化特に電子顕微鏡上の所見との間に如何なる関係があるかを調べてみた。

吉田肉腫をラット腹腔内に移植後 4 日目に薬剤を注射し、24 時間後に採取した腹水の電頭像を示す。



無処置の吉田肉腫細胞でその表面には pseudovilli がかなりよく見られる。細胞質内部には mitochondria, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus などが見られる。核内部は比較的均一で、細胞質とほぼ同程度の density を有している。

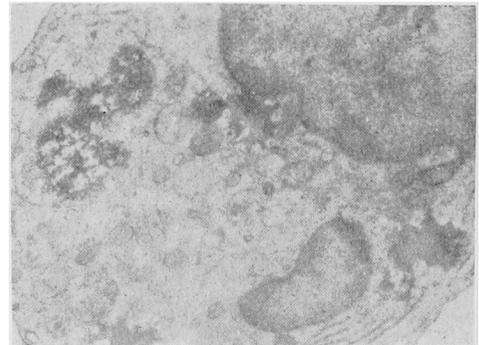


図13 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P³²-incorporation に及ぼす影響
アヤマイシン(100 μ g/ml)
37°C, 3時間

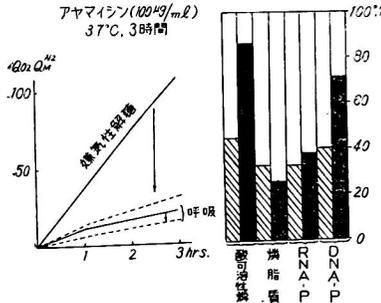
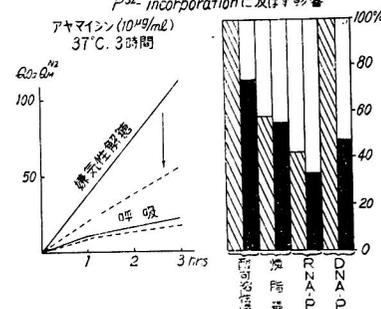
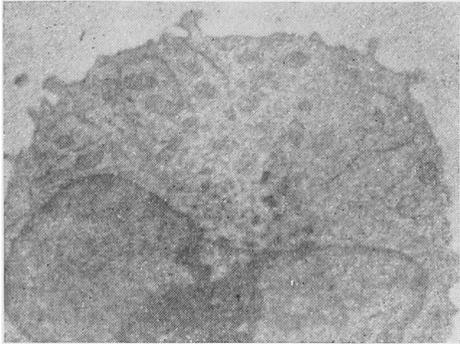


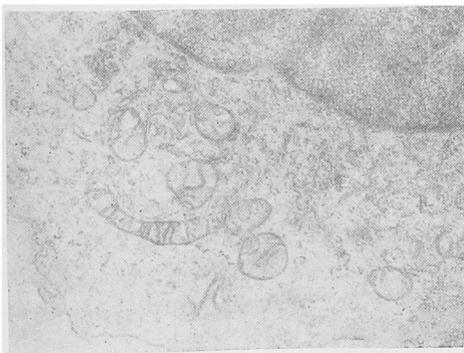
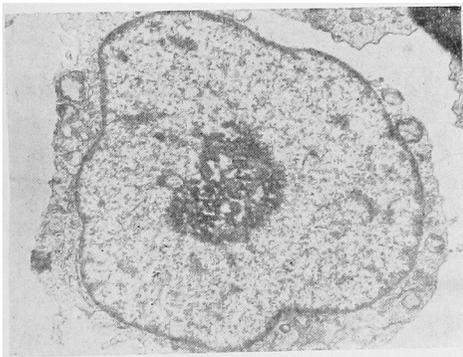
図14 培養した吉田肉腫細胞の呼吸・解糖並びに P³²-incorporation に及ぼす影響
アヤマイシン(10 μ g/ml)
37°C, 3時間



カルチノフィリン 500u 作用の場合であるが、この像では核には著明な変化がみられないが細胞質に可成りの変化が認められる。即ち脂肪顆粒が増加し、時には不明の inclusion が出現することがある。Mitochondria, endoplasmic reticulum などは比較的正常の像を保っている。

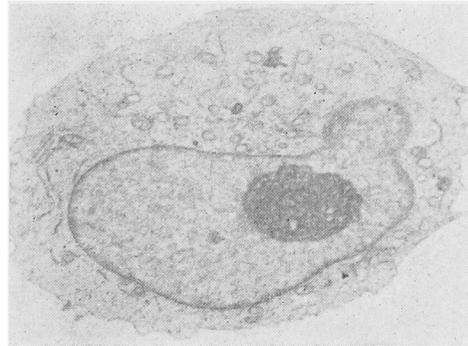


ナイトロミン 5 mg/kg 作用時の像である。時として核に軽度の density の変化が認められるが、余り著明ではない。Mitochondria には変化なく endoplasmic reticulum は細胞質周辺で伸長した像がかなり多く観察される。



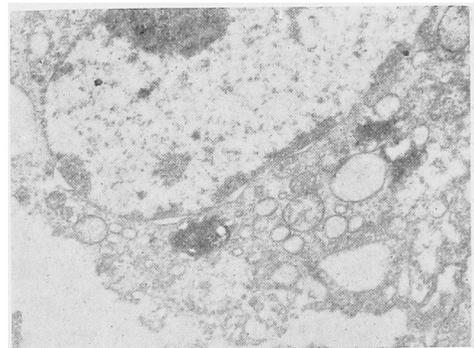
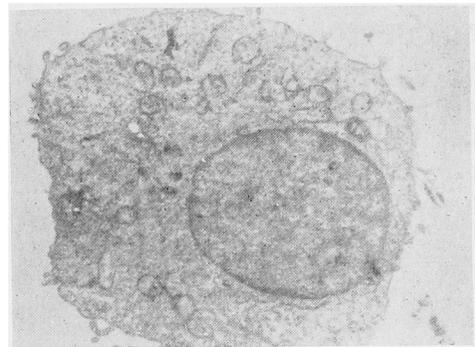
次にマイトマイシン 1 mg/kg 作用時の像である。核の density に変化をみる場合もあるが余り著明ではない。Mitochondria は不変、伸長した endoplasmic reticulum が認められる。

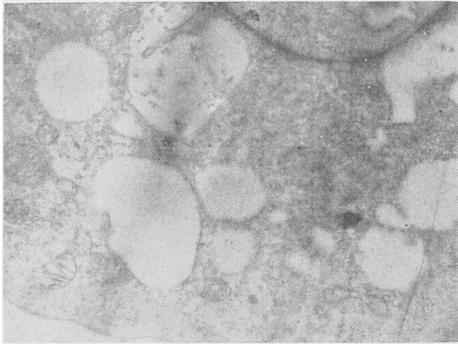
エンドキササン 10 mg/kg 作用時の像で、核の density が低下して核縁が dense となる像がかなり多く観察される。又 endoplasmic reticulum は時にかなり伸長した像を示す。



次はアヤマイシン 10 mg/kg 作用時の像であるが、短棒状を呈する mitochondria が数多く存在する程度で著しい変化は観察されない。

これは Sarcoma 180 の無処置のもので cristae mi-





tochondriales の明瞭な mitochondria が認められる。

これにクロモマイシン 200 μ g/kg を作用させると、先づ核の density に著明な変化を来とし、核膜と細胞質との間に空隙をみるようになる。次いで細胞質内に著明な空胞を認めるに至る。

以上の所見の如く、各種の Cytostatica を作用させた場合でも腫瘍細胞の微細構造には常に著明な変化を来たすわけではないが、カルチノフィリン、クロモマイシン等では著明な形態変化を来たす傾向が観察された。然しこれらがそれぞれの薬剤に特有な変化か否かは未だ断言致しかねる。

現在の Cytostatica の作用機序に関しては以上述べたことから明らかなように、私共の未だ貧弱な材料と乏しい経験からは期待したことが何1つ得られなかつたことを残念に思う。これは私共の未熟さ且つ不勉強によることは勿論であるが、未だ本当に癌に効く薬が無いためでもあろう。今後 *in vitro* で癌細胞を培養しながら研究を重ねて何らかの成果を挙げたいと考えているが、本当に癌に効く薬の1日も早く出現することを祈つて止まない。

(3) 癌組織の組織化学的变化

佐藤雄次郎

慶大外科

制癌剤の作用機序という問題について、組織化学的变化を担当するが、組織化学そのものも、まだ異論の入る余地の多いものである。

組織化学が重視されて来た理由の1つは、従来からの病理形態学的変化というものは、生体に於いて形成された病変の、一定時期に於ける終着状態であつて、その時期の決定的な変化であるが、あくまで帰着した病変であり、この変化に基づいて、それまでの生体内に於ける変化の推移を、臨床検査成績を中心にして、想像し得るに止るだけであるのに反して、組織化学は形の上に現われ

ない、それ以前の変化、即ち代謝の過程をも認め得るのではないか、という期待によるものと思われる。

1つの酵素系の活性度を例にとつてみて、その増強或いは減少が、染色過程の上に現われた場合、その反応系に於ける場で、どのような変化が生じたかということ、認めてよいのではないかと考えるわけである。そこで、実験腫瘍並びに臨床例に於ける、腫瘍組織に現われた成績を中心、検討した結果を報告する。

制癌剤使用により、実験腫瘍に現われた組織化学的变化。

始めに吉田肉腫及びエールリッヒ腹水肝癌に対し、CZP を使用した成績を述べる。

CZP は 250 u~2,000 u/kg を腹腔内、皮下、静注により投与し、肉眼的に腫瘍縮小等が認められたものにおける変化を、主として検討した。

アルカリフォスファターゼについて。

対照例では殆んど陰性であるのに対し、使用例では著明に陽性となる。形態学的には一見正常とみえるところでも、この場合は陽性である。次は肝細胞中の転移巣で、中央部が腫瘍、周囲が肝細胞である。使用例では逆に中央の腫瘍細胞に陽性となつている。

酸フォスファターゼについて。CZP 使用前は陰性のものが、使用後陽性である。

ペプチダーゼについて。使用後に陽性となつたところである。

RNA について。吉田肉腫の対照例で、原形質中に RNA が赤く染つている。CZP 250 u/kg 局所皮下使用により、細胞はやや鬆疎となり、RNA の赤色も減少している。500 u/kg 使用すると、更に細胞が破壊され、同時に RNA も減少する。腹水肝癌では中央部の腫瘍細胞の方がやや濃く、周囲の肝細胞が淡いが、CZP 2,000 u/kg 腹腔内投与後は、その逆となる。

脂肪について。腫瘍細胞は増殖しつつある間も、変性壊死に陥るときは、脂肪滴の出現をみるが、吉田肉腫に CZP を 1,000 u/kg と大量投与すると、脂肪変性に陥る細胞が多くなり、2,000 u/kg でも同様である。次は腹水肝癌で高度に脂肪化の認められた所である。

脱水素酵素について。通常増殖盛んな腫瘍組織に多く証明されるが、これは腹水肝癌に CZP を使用して減少した所である。病理組織学的にあまり変化のない様ところでも、かなり減少している。

リパーゼについて。吉田肉腫も腹水肝癌も、対照例では陰性であるが、CZP 使用后、腫瘍細胞が変化を受けると出現する。吉田肉腫で原形質中黒褐色にみられるのがリパーゼである。

以上の成績を一括すると、一般に腫瘍組織には陰性又

は少ないものが多く、CZP 使用により中心壊死が生じると、その周辺の変性に陥った所では、既に酵素系の活性度が高くなる。増殖中に陽性の RNA や脱水素酵素等は CZP の使用により却つて減少する。このように CZP を使用して、腫瘍組織が壊死又はその前段階である変性に陥る時は、酵素系その他の組織化学的所見に、殆んどすべて変動がみられるようである。CZP のように主として解糖反応を阻害するとみられる薬剤に於いて、かなり広範囲の変化がみられることは、単に CZP に特有の変化であるか、又は他の制癌剤使用の場合にも、同じような組織化学的変化として現われるかを、吉田肉腫を使用して検討した。使用薬剤は、週 2 回腹腔内注射で Prokilo で CZP 3,000 u, MC 1,500 mcg, NMO 30 mg, RC-4 10 mg である。ここに使用した各制癌剤は固形腫瘍が肉眼的に明らかに縮小し、又は消失するまでの有効量を使用することによつて、腫瘍細胞が影響を受けた場合の組織化学的変化であつて、各制癌剤の効果の差ではない。これで見ると各制癌剤の間に特異な差は認められない。制癌剤非使用の対照と較べると明らかな違いはみられるが、各制癌剤については、CZP と他の薬剤との間に、変化の量的差異がみられる程度であり、どの薬剤に使用しても、ここで検索した組織化学的変化の質には差異を認めなかつた。

病理組織学的変化としても、CZP では一般に壊死化を生ずる傾向があり、他のアルキル化剤と似て、核酸代謝を阻害するという MC に、壊死傾向がみられないという程度の違いがあるとしても、その前段階としての、組織化学的変化を生ずるような時期に於いては、そこに現われた変化は、略々一定の傾向が同じように認められるということである。

臨床例に於ける組織化学的変化

現在癌の化学療法が期待をもつて注目されながら、制癌剤が癌の治療を更に大きく前進せしめ得ない理由は、実験腫瘍ほど人癌に対して有効と思われる症例に当ることが少ないことである。今臨床例に於いて、少なくとも腫瘍の縮小、壊死形成等の所見により、制癌剤が有効であつたと思われる症例について、組織化学的に検討した成績を供覧する。制癌剤は大部分が CZP によるものである。

アルカリフォスファターゼについて。これは軟骨肉腫に於ける使用前所見及び使用後著明に増量したところである。

酸フォスファターゼについて。細網肉腫例で、使用前から活性度高く、使用後僅かに増加している程度であるが、次の細網肉腫例では、使用前に殆んど陰性で、使用後増加が認められたものである。次は軟骨肉腫例で、増殖しているところは鬆疎であるが弱く、変性に陥つてく

ると著明に増加している。線維肉腫例に於ける使用前の増殖著明な部では少く、使用後増加が認められた。扁平上皮癌では、癌巣中薄黄色くみえる程度のものが、使用後かなり陽性となつている。

ペプチダーゼについて。軟骨肉腫で使用前軽度陽性のものが、変性に陥ると著明に増強している。

RNA について。扁平上皮癌で使用前高度にみられたが、使用後癌巣の縮小と共に減少した。次の例では使用前、使用後の差が殆んどみられない。細網肉腫例に於いて、紡錘形に近い細胞に多く、使用後鬆疎となり、円形となつた細胞では減少している。次の細網肉腫例では、使用前と使用後の差が殆んどみられない。線維肉腫で経過観察出来たものを供覧すると、使用前の紡錘形の細胞は多量であるが、使用後は鬆疎となり次第に減少する。更に細胞が小さく萎縮すると、核のみが点在するようみえる。それが再発すると増殖した細胞では再び陽性であるが、更に制癌剤が効果を示して縮小した時は、又少なくなつている。

脂肪について。一般に使用前は陰性か又は軽度にみられるが、使用後増量することが多い。扁平上皮癌の使用前陰性のものが、使用後核周囲に赤い顆粒として現われ、軟骨肉腫では使用前僅かであつたものが、やや多くなり、高度変性に陥ると多量に出現する。細網肉腫の 1 例は使用後も全く陰性で、線維肉腫例では陰性の部と陽性の部が混在した。

これらの臨床例が示した組織化学的変化は、少なくとも臨床的に腫瘍の縮小及び肉眼的に壊死形成等を認めた組織の腫瘍細胞にみられた所見であつて、前に示した実験腫瘍とよく似た傾向を示していることである。しかしながら制癌剤を使用しても、無効のもの及び効果の判定が不可能なものが多いことは、制癌剤を使用してしばしば経験することで、上述のように同じ制癌剤を使用しても、組織化学的変化の動く場合と動かない場合とあり、又あらゆる腫瘍組織に、必ずしもこの様な組織化学的変化が現われるものでないであろうことは想像に難くない。その為には悪性腫瘍に於ける組織化学的変化をよく把握することが必要である。一般に悪性腫瘍に特有な組織化学的変化として、RNA 及び DNA の増加、グリコゲン及び粘液多糖類の減少、フォスファターゼの減少ないし消失、チロジン、トリプトファンの減少傾向、フォスファミダーゼ及び脱水素酵素の増加、塩基性アミノ酸類の増加等が挙げられている。この様な傾向は、前に述べた実験腫瘍にもみられるところで、制癌剤が有効な場合には、何れもこれらの変化が反対の方向に向つて行つて行くのが認められる。人の腫瘍に於いても、前述の様な有効であつた症例にみられる変化は、略々同様である。

しかしながら臨床的に人の腫瘍に制癌剤を使用する場合に於いて、動物に於けると同様な効果をささない場合が多いのは何故であろうか。制癌剤の副作用のために、有効量の投与が不可能のこともあり得ると考えられるが、人の腫瘍組織が動物腫瘍の性状と、必ずしも同一でないことも考えられる。制癌剤を使用しない、或いは、制癌剤使用前の癌腫又は肉腫について、調べた成績をみると次の通りである。

腺様癌について。これは胃癌である。アルカリフォスファターゼは細胞体原形質には殆んど陰性で、内腔に向つた腔縁では陽性である。次の直腸癌に於いても、同様のことと言える。

その次の直腸癌例では内腔縁でも殆んど陰性に近く、この例の癌細胞は前例よりも、未分化のようである。肺癌の例でも、これは腔縁に陽性で、原形質にも僅かに認められる。酸フォスファターゼをみると、直腸癌では原形質及び腔縁ともに軽度陽性であるが、胃癌では陽性的なもの、この例のように、やや未分化と考えられる症例では陰性的なものもある。

単純癌について。単純癌では一般に変化が多様であるが、胃癌でアルカリフォスファターゼ陽性をみるものは、硬性癌のように癌細胞が少数で、単細胞性に浸潤するものにみられ、大きな胞巣を示しているものは陰性である。同様に次は酸フォスファターゼ陽性を示す単細胞性の胃癌である。

扁平上皮癌について。アルカリフォスファターゼをみると、肺癌例では軽度陽性、頸部癌では陽性、胃噴門癌では殆んど陰性である。これは、この例の頸部癌の様に、分化度の高いもの程、陽性度が高いようである。酸フォスファターゼをみると、肺癌例で軽度陽性、胃癌でも略々同様である。尚リパーゼは各種瘍組織一般に軽度陽性で、これは胃腺様癌の内腔に向つた原形質中に、灰黒色に認められるものである。

肉腫について。前に示した有効な臨床例の大部分は肉腫であつて、各制癌剤が効果を示した症例も、実際に肉腫例で多く経験した。肉腫は体表面から近く、標本採取も癌組織よりは容易なことが多い点もあるが、肉腫は一般に制癌剤を使用しない組織に於ける、組織化学的所見として、前に述べた悪性腫瘍の一般的特性を示しているようであり、実験腫瘍の性状にも似ている点が多いようでもある。しかし、次に示す症例は、制癌剤を使用しないのに、第1回目の切除標本と、第2回目の再発組織の所見とが全く相反していた。これが1回目の普通染色所見、次が第2回目の普通染色所見で、やや組織が前回より鬆疎である。アルカリフォスファターゼは第1回目陽性の部と、僅かに陽性の部がみられるが、再発部では陰

性である。酸フォスファターゼも第1回目強陽性の部と軽度陽性の部があり、再発部では陰性である。尚リパーゼのみは前後共に陰性であつた。

これらの所見から、悪性腫瘍そのものが制癌剤使用前からすでに、組織化学的に多様性を示すことを認めたが、この点について、特に胃癌細胞の粘液多糖類を検索した成績を述べる。癌細胞、殊に胃癌に於いては、一般に粘液多糖類が減少することが認められているが、私が検索した限りでは、粘液多糖類は胃癌細胞すべてに同じではない。多糖類の多少によつて、胃癌細胞を分けてみると、先づ多糖類が全く陰性で、大きな胞巣を形成するものがある。次は腺様癌で、内腔に近く陽性である。通常硬性癌に属するものの中で、癌細胞が数個づつ索状に並ぶ索状浸潤癌では、陽性度が高い。癌細胞が1個づつ遊離して、単細胞性となり、固有筋層の周囲に浸潤している様なものは、多糖類も高度で、印環細胞の形成もみられる。膠様癌は一般に粘液変性に陥つた胃癌細胞を主とするように考えられているが、細胞体には粘液は殆んどなく、大部分が細胞体外にあることがわかる。このように胃癌だけを例にとつて粘液多糖類のみをみても、その性状は多様であり、同じ胃の単純癌でも、それぞれ異つた性状を有するものがあること等によつて、すべての悪性腫瘍を同じものとして取扱うと、その治療成績にも差が出てくることは当然である。この様に生体の腫瘍細胞の側に於ける組織化学的態度にも、すでに異つた性状を有するもののあることから、制癌剤を使用して現われた組織化学的变化のみを指標として、制癌剤の作用機序を推定することは困難である。少くとも組織化学の1つ1つが、生化学的検索方法に於ける程純粋なものではなく、間接的証明法であり、理論上と反対の方向に動くこともある。この様に考えてくると組織化学そのものに、尚研究の余地があり、腫瘍組織自体に於ける変化を更に追及し、特に臨床的に制癌剤を使用する時は、上述の様な治療を受ける側に組織の性状の多様性が存在することによつて、まづこのことから解決して行かないときは、癌の化学療法というものが、無選択に治療を行なうという結果になると思われる。この点特に癌腫とリンパ系統の肉腫にそのことが強く感じられた。

(4) 抗癌剤の動物各酵素系に及ぼす影響

佐藤 八郎
鹿児島大学

現今、癌の治療面に於いて抗癌剤に対する臨床家の信頼は可成り薄いものであることは疑いもない事実であ

る。その原因は癌に真に特異的な代謝経路が見出されていないことや、癌化学療法の見点から特に癌は複雑な様相を呈する事等に存するものと思われる。例えば抗癌剤の選択、効果判定についても内的および外的因子が多角的に作用してその評価は仲々困難である。癌化学療法の確立のためには癌と担癌生体との関係、すなわち Tumor-Host Relation に於いて抗癌剤は論ぜられ、且つ研究されなければならない。この問題は抗癌剤の研究にとつて常に中心をなすものであるが、そのためには癌生化学的研究の推進とともに抗癌剤についての詳細な研究成果の集積が是非共必要である。POTTER は metabolite の直面する alternative metabolic pathways に対する態度及びそれに関する enzyme の歪曲が癌に於ける 1 次的変化であるという画期的 speculation を提唱したが、抗癌剤と enzyme との関係を論ずることは極めて意義あるものというべきである。本研究に用いた抗癌剤は alkylating agent として Nitrogen Mustard-N-Oxide (Nitromin), Alanine-Nitrogen Mustard, Purine antagonist として 8-Azaguanine (Azan), Antibiotics として Actinomycin-J, Carzinophilin, Mitomycin-C 等及びヘマトポルフィリン水銀錯塩等である。

まず基質に TCA-cycle に関与するコハク酸、クエン酸、フマル酸、マロン酸、リンゴ酸等を使用し抗癌剤の脱水素反応系に及ぼす影響を検討した。

吉田肉腫ラットの腹腔内に Alanine-NM (50 μ g/kg), 8-Azaguanine (500 μ g/kg), Actinomycin-J (100 μ g/kg), Carzinophilin (500 u/kg) をそれぞれ注入し、組織化学的に脱水素反応を追求した。Alanine-NM ではクエン酸、マロン酸、リンゴ酸の脱水素が 1 時間後より著明に阻害され、Carzinophilin ではクエン酸、マロン酸の脱水素が阻害され、Azan, Actinomycin-J ではすべての基質の脱水素が略々同程度に阻害された。さらに *in vitro* において EHRlich 腹水癌細胞の脱水素反応に及ぼす抗癌剤の影響を検した。即ち、腹水に各種濃度の抗癌剤一定量を混じり 37°C 30 分 incubate した後脱水素反応を実施した。結果は Nitromin では低濃度でコハク酸以外の基質の脱水素を阻害し、Alanine-NM はリンゴ酸以外の基質の脱水素を阻害する傾向を示した。Actinomycin-J は低濃度でもクエン酸、マロン酸の脱水素を阻害し、Azan はコハク酸以外の基質を略々同程度に阻害し、Carzinophilin はクエン酸、リンゴ酸等を強く阻害した。以上の如く癌細胞の相違はあるが、*in vivo* と *in vitro* とでは多少の相違が認められた。

次に EHRlich 腹水癌マウスの肝脱水素反応活性をみるに健常マウス肝の活性を 100% とし、「基質なし」は

41%、コハク酸は 44%、クエン酸は 23%、フマル酸は 37%、マロン酸は 22%、リンゴ酸は 11% に減少した。次に EHRlich 腹水癌マウスに抗癌剤の一定量を 3 回注射して肝の脱水素反応をみるに、先づ Nitromin では全基質の脱水素が略々同程度に更に阻害された。Alanine-NM ではフマル酸及びリンゴ酸を基質とする脱水素活性に軽度の上昇がみられた。

Azan では全基質の脱水素活性が著明に阻害されたが、Actinomycin-J ではクエン酸、フマル酸、マロン酸、リンゴ酸の脱水素が EHRlich 腹水癌肝に比し同等か或いは却つて上昇することが認められた。以上の如く、EHRlich 腹水癌細胞及び肝に於ける脱水素反応系は抗癌剤によつて阻害されるが、中には活性の上昇を来すものもあり、その作用様式は各抗癌剤によつて特長的である。電子伝達系の阻害はとりもなおさず生活細胞の呼吸障害を意味するものであるが、抗癌剤の種類及び癌細胞のおかれた環境によりその程度は区々であつて、その間に一定の系統をつけることは困難であつた。

担癌体の各組織に於いて β -グルクロニダーゼ活性の上昇を来すことは既に周知の通りであるが、次に各抗癌剤の EHRlich 腹水癌の腹水 β -グルクロニダーゼに及ぼす影響を述べる。先づ Nitromin についてみると、細胞数の減少と共に腹水の β -グルクロニダーゼ活性も著明に減少した。Alanine-NM では細胞数の減少は更に顕著であり、腹水 β -グルクロニダーゼの減少も著明であつたが後徐々に回復する傾向が認められた。Actinomycin-J では細胞数はやや緩徐に減少の一途を辿つた。一方 β -グルクロニダーゼ活性は注射後 6 時間後まで比較的急激に減少し、その後は漸次上昇して 24 時間後にほぼ注射前値に回復した。以上の如く β -グルクロニダーゼ活性に対して Nitromin 及び Alanine-NM の両者は細胞数に対する影響とはほぼ同様に短時間のうちに著明の減少が occuri、以後は漸次回復した。Carzinophilin では時間と共に次第に減少の傾向を辿り、細胞数の経過と平行した。

次に抗癌剤の EHRlich 腹水癌肝 β -グルクロニダーゼに及ぼす影響をみるに各種抗癌剤共注射後 6 時間までは減少増加まちまちであるが、12 時間後には全て注射前値に比し減少ないし正常化の傾向を来し、その後 24 時間まではその状態を維持するもの、或いは徐々に増加の傾向を来すものがあるが、依然として全て注射前値より明らかに低下している。

臨床例についての血清 β -グルクロニダーゼ活性は治療によつて明らかな低下を来しているが、これは制癌による癌細胞の破壊、発育抑制が本酵素活性に影響を及ぼ

すものと考えられる。

癌に於ける特徴的代謝の1つは“one-way passage”による“nitrogen trap”である。そこでこの特徴的窒素代謝に関連してアルギニン代謝、アルギナーゼ活性の面について検討した。まず抗癌剤1回注射のEHRlich腹水癌肝アルギナーゼに及ぼす影響について述べる。Nitrominでは注射後3時間でやや減少したが24時間後ではほぼ対照値に回復した。Azanでは3時間後でやや上昇したが後減少更に除々に増加の傾向を示した。Actinomycin-J, Carzinophilinでは前と同様3~6時間後で軽度の変動を示したが、後次第に正常値に復帰した。

次に抗癌剤連続注射のEHRlich腹水癌肝アルギナーゼに及ぼす影響をみると、先づ、健常マウスに対してNitromin, Carzinophilinでは3日注射群、5日注射群共ほぼ同程度の軽度の減少を来した。これとは全く逆にEHRlich腹水癌肝アルギナーゼに対しては、Nitromin, Carzinophilin共著明な上昇作用を示したが、5日注射群は3日注射群に較べ上昇度は更に顕著であつた。

癌に於けるアルギナーゼの減少は癌特長の変化であり、且つこの変化が癌組織より分泌される癌腫毒に依つて起る事を我々は認めているが、癌腫毒とNitrominを同時に投与した所アルギナーゼ活性が正常域に回復する事を認めた。Nitrominの作用の一面を示して興味ある事実であると考えられる。先きに述べた如く担癌体に於いて肝窒素源の蓄積が起る事が知られているが次に抗癌剤のこの代謝異常に及ぼす作用をEHRlich腹水癌肝のアルギニン、アミノ-Nの面から観察した。Nitrominではアルギニンは対照に比し著明に減少し、アミノ-Nは一時急激に減少した後再び対照値に復帰した。Azanもアルギニン・アミノ-N共同様の傾向を示した。Actinomycin-Jでもアルギニン・アミノ-N共顕著に減少した。Carzinophilinではアルギニンのみ増加を示したが対照よりは減少した。以上の如く総ての抗癌剤によつて癌移植に依るアルギニン、アミノ-Nの肝に於ける蓄積は阻害されるという興味ある処見を得る事が出来た。

次に抗癌剤の核酸代謝に及ぼす影響に就いて述べる。EHRlich腹水癌の腹水各成分の核酸に就いて抗癌剤注射後12, 24, 36時間の3回に互つて観察した。先づNitrominでは細胞成分のDNA, RNA共軽度に減少せしめた。AzanではDNA, RNA共中等度に減少せしめたが、DNAは注射後36時間で僅かに増加した。Actinomycin-JではDNA, RNA共減少せしめた。以上の如く腹水細胞核酸に対しては何れの抗癌剤もDNA, RNA共同様に減少せしめた。次にEHRlich腹水癌マウスの

肝核酸代謝に及ぼす影響に就いて述べる。抗癌剤は何れも1日1回3日に互つて注射した。Nitromin, Alanine-NM共DNA及びRNAを減少せしめた。又Azan, Actinomycin-J共DNA及びRNAを減少せしめた。以上の如く各種抗癌剤は何れも癌細胞及び担癌体の肝のDNA及びRNAを減少せしめた。次にEHRlich腹水癌細胞のDNA, RNAに対する P^{32} のincorporationに就いて見ると、Nitrominでは始めRNAへの P^{32} のincorporationは増加し後減少した。DNAへのincorporationは最初から急激な減少を示した。Actinomycin-Jではこれと全く反対に始めDNAへのincorporationは増加し、後減少、RNAへのincorporationは最初急激に減少した。即ち、Nitromin及びActinomycin-Jは共にDNA及びRNAを減少せしめるのであるが、Pのincorporationの面から観察すると全く反対である事が分つた。

次にEHRlich腹水癌マウスにNitromin, Carzinophilin, Actinomycin-J等を連続3日間腹腔内に注入し、血清の蛋白結合多糖類、脂質等の変化を追究した。血清蛋白分割ではAlbは対照及び担癌体に比しやや増加し、 α -Globは対照より増加するが移植後10日目のものは大差を認めなかつた。 β -GlobはActinomycin-J群のみが減少し、 γ -Globは3群とも著明な減少を示した。

結合多糖類はAlb位では3群とも増加し、 α -Glob位では3群とも増減一定しないが、 β -Glob位では担癌体よりも増加し、 γ -Glob位では著明な減少を示した。

結合脂質はAlb位ではNitromin, Actinomycin-J群共著明に増加し α_2 -Glob位ではActinomycin-J群のみが増加し β -Glob位では2群とも殆んど不変であつたが、 γ -Glob位では2群共著しい減少を示した。以上の成績に依り各抗癌剤は何れもAlb位の各分割を増加せしめ γ -Glob位の各分割を減少せしめる事が分つた。

次にムコ蛋白代謝に及ぼす抗癌剤の影響を見ると、先づ増加した吉田肉腫の血清ムコ蛋白は抗癌剤の投与に依り減少し、尿ムコ蛋白も同様に減少した。臨床例に就て見ると血清ムコ蛋白はNitromin7日間連続投与に依り減少する事を認め、又尿ムコ蛋白も減少する事を認めた。

次に私共はNitrominにパントテン酸-Caを併用すれば基の制癌効果が著しく増強される事を観察した。即ち、EHRlich腹水癌マウスの50%生存日数は17日であるが移植24時間後より連続7日間Nitromin 200 μ gを腹腔内に注入すれば22日に延長してくる。この際パントテン酸-Ca 2mgを併用すれば50%生存日数48日

と言う著明な延命効果が現われた。この際の細胞数及び全糸状分裂細胞数は併用群で最も著明に減少し、分裂期に関しては前期中期及び末期とも減少した。肝カタラーゼについてみると、EHRlich 腹水癌を移植して減少した肝カタラーゼは Nitromin 投与で恢復しないが、これにパントテン酸 -Ca を併用すれば正常域に近く活性が上昇することを認めた。併用による制癌効果の上昇及び酵素活性の変動の本態は現在検討中であるが、パントテン酸は代謝面に於いて極めて重要な位置を占め、且つ Nitromin の副作用軽減にも役立つものと考えられ、Nitromin-, パントテン酸 -Ca の併用は極めて有意義な制癌手段であると考えられる。

従来私共は、癌とポルフィリン体代謝、特に癌に於けるヘモ蛋白体の減少機構について研究を続けているが、癌では金属ポルフィリンのポルフィリンへの移行がみられ、これが酸化酵素系の減少、貧血を始めとする種々の癌系統的・特異的変化の根本原因をなす可能性について提唱してきた。癌細胞に対する直接の制癌作用の面からではなく細胞機能賦活、新陳代謝向上という全く新しい見地から生れた金属ポルフィリンとしての Hematoporphyrin-Hg についてその作用機序を主としてポルフィリン体代謝の面から追究した。これをラットに投与すると体重は増加し、血清蛋白は増加し、ヘモグロビンも増加したが、赤血球内のプロトポルフィリンは殆んど不変であった。尿中のコプロポルフィリンは増加しウロ「ポ」も増加した。又肝のコプロ「ポ」は増加し、プロト「ポ」も増加した。又、d-アミノ酸化酵素は増加し、カタラーゼも増加した。即ち Hematoporphyrin-Hg はプロト「ポ」を経てヘモグロビン及びカタラーゼに合成されることがわかった。Hematoporphyrin-Hg の作用機序は即ち Hematoporphyrin は癌組織に親和性を有し、Hg を担ったまま癌組織に到達する。Hg は癌組織のリボスクレアーゼを阻害する。一方 Hematoporphyrin はウロ、コプロ、プロト「ポ」を経てカタラーゼ、ヘモグロビン等ヘモ蛋白体へ合成されるものと考えられる。以上の実験成績は Hematoporphyrin による細胞機能の賦活、ひいては新陳代謝亢進のあらわれともみるべく、その変化の各々は少くとも反癌的意義をもつものと考えられる。更に Hematoporphyrin-Hg はラット肝の β -グルクロニダーゼをも顕著に増加せしめ、ラット肝の DNA を増加せしめるが RNA には殆んど変化を与えないことがわかった。

次に Mitomycin-C について述べる。先づ肝カタラーゼに及ぼす影響であるが Mitomycin-C は健常マウス及

びラット肝のカタラーゼに対して殆んど影響を与えないか或いはむしろ軽度増加せしめる事がわかった。次に Rhodamine 肉腫ラット肝についてみるに、Rhodamine 肉腫移植後 20 日目のラットに Mitomycin-C を投与すれば投与前著しく減少していた肝カタラーゼは増加し殆んど正常域に達することを認めた。次に肝 β -グルクロニダーゼに及ぼす影響であるが Mitomycin-C は健常マウス及びラット肝の β -グルクロニダーゼを著しく増加せしめることを観察した。Rhodamine 肉腫ラットについてみると、Rhodamine 肉腫移植後 20 日目のラットに Mitomycin-C を投与すれば投与前増加していた肝 β -グルクロニダーゼは更に増加を示すことがわかった。次に肝アルギナーゼに及ぼす影響を見ると、Mitomycin-C は健常ラットの肝アルギナーゼをやや減少せしめたがその程度は軽度であった。Rhodamine 肉腫ラット肝についてみると、Rhodamine 肉腫移植後 20 日目のラットに Mitomycin-C を投与すれば投与前減少していた肝アルギナーゼは投与後 8 日目迄は増加し正常値付近に達したが後減少の傾向を示した。次に肝核酸に及ぼす影響について述べる。健常マウス肝核酸の DNA 及び RNA に対しては殆んど無影響である事がわかった。健常ラット肝核酸の DNA はやや増加の傾向を示したが RNA は殆んど一定の値を保ち変動を示さなかつた。

次に Rhodamine 肉腫ラットの核酸に及ぼす影響をみると、先づ肝では担癌ラットで DNA は著しく増加し RNA はやや減少を示したがこれに Mitomycin-C を投与すれば明らかに DNA は減少したが RNA は殆んど変動を示さなかつた。又 Rhodamine 肉腫組織では同様に Mitomycin-C は DNA を減少せしめ RNA には殆んど無影響であった。

以上総合するに、Nitromin, Alanine-NM 等の Alkylating agent, Azan の Purine antagonist, Actinomycin-J, Carzinophilin 等の Antibiotics 等は担癌体に対しては勿論の事健常動物に対しても強い作用を示すのであるが Mitomycin-C, Hematoporphyrin-Hg 等は健常動物に対しては殆んど影響を与えないか、むしろ機能賦活的に作用していることがわかった。これは癌化学療法に於て極めて意義ある事である。各抗癌剤は全て生化学的にみて制癌的に作用することは認めたが、その機序は区々で系統的に分類することは困難である。先きにも述べた如く癌は Tumor-Host Relation の観点から追究されるべきであり且つ tumor potential, tumor trophic factor, tumor retarding factor 等の複雑な函数として考えられなければならない。この他担癌生体のもつ host defence, homeostasis 等の問題も考慮され