

皮下移植吉田腫瘍細胞の DNA 量及び Mitotic phase

に対する OX 物質の影響について

岡山大学医学部放射線医学教室 (主任: 武田俊光教授)

専攻生 井口与志子

〔昭和 35 年 4 月 26 日受稿〕

緒 論

X-線生物学的作用は直接作用と間接作用があり前者の最も大きい作用としては染色体の切断作用が挙げられ後者のそれは水の電離作用にともなう物質の酸化並に種々酵素系の活性阻害或は activation¹⁾, SH 酸化²⁾ にともなう Spindle 形成阻害, 又核酸代謝に与える影響³⁾ が挙げられている。このような過去の研究結果に加えて教室の山本等は一連の研究として放射線照射により発生する細胞毒について多くの業績を挙げつつある⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾。即ち X-線生物作用の内最も大きな要因と考えられる間接作用は X-線照射により発生した細胞毒によるものであろうとの見解の下に行なわれた種々の実験からその細胞毒の主なものリゾレシチンと不飽和脂肪酸が重要な因子なる事が明らかにされた。即ち X-線照射により示される溶血作用の主体はリゾレシチンでありそれは X-線照射により活性化されたレシチナーゼ A がレシチンを分解しリゾレシチンと不飽和脂肪酸を産生することにより説明された。更に亦この不飽和脂肪酸 (以下 OX と略す) は細胞分裂の旺盛な細胞に対して特異的に作用する事が明らかにされ、間接作用で最もよく知られている細胞分裂阻止作用と一致することを見出している⁴⁾。これ等のことから溶血因子と考えられるリゾレシチンを取除き OX 物質のみを作用せしめれば貧血等の副作用を少なくして細胞分裂阻害が出来るのではないかと考え、すでに当研究室では Ehrlich 腹水癌⁷⁾, 吉田腹水腫瘍細胞⁴⁾, 組織培養細胞癌, HeLa⁶⁾ に対する OX 物質の作用が追求され DNA 合成の阻害作用, Mitotic apparatus の形成阻害, 呼吸酵素活性⁸⁾ の変動等が観察されている。著者はその実験の一端として皮下に移植された吉田腫瘍細胞が果してこの OX 物質により作用をうけるか否かを究明するため雑系ラットの皮下に作られた吉田腫瘍中に OX 物質を注射し時間的にその組織の形態, 細胞当りの DNA 量, Mitotic

phase の変動を観察し得られた結果について茲に報告する。

材料及び実験方法

雑系ラット大腿部皮下に移植した吉田腫瘍細胞の移植後 10 日目に 2% の OX 物質及び生食 0.2 cc を腫瘍中に注射し 0 hr, 3 hr, 9 hr, 12 hr, 24 hr 後の各時間に腫瘍塊を切り出し醋酸アルコール (1:3) で 24 時間固定及び 10% ホルマリンで 3 日間固定し各々をパラフィン切片とし組織像の観察, DNA 量の測定及び Mitotic phase の測定に供した。細胞当りの DNA 量の測定には醋酸アルコール固定した物を細胞の核の切断をさける目的で厚さ 10 μ 切片とし柴谷の方法により pH 2.28 にて Feulgen 反応を行いオリンパス製の顕微分光測光器で 560 m μ の光を用い直良の方法によつて測定した。亦組織像の観察にはホルマリン固定を行つた組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色し, 各 Mitotic phase の測定は醋酸アルコール後 Feulgen 反応を行つたもの及びホルマリン固定後ヘマトキシリン染色を行つたものについて行つた。

実験結果

1. 先づ組織所見についてこの観察結果について見るに全体を通じて動物の固体差が著しくて OX 物質を注射した群に於ける傾向としては大体次のような事が云える。

- 第一に壊死部が対照群に比して大きいこと。
- 第二に核の染色度がわずかに低下していること。
- 第三に細胞境界がやや対照群に比して不鮮明であること。
- 第四に OX 注射群ではしばしば巨細胞が見られること。

の 4 つについてでありこの傾向は 12 時間値で最も著しく 24 時間値では一部回復の傾向を示ものが見られ

る。然し対照，実験両群に於て壊死中心より遠距離にある非常に旺盛な増殖を示す部分は上記各時間では前記4事項の如き傾向は全く示されない。

2. 次に Mitotic phase の変動について見れば表1, 2, 図1, 2の如くである。この測定は壊死部からはなれた比較的活潑に増殖している部分について測定したものであり、亦 Prophase はその鑑別が非常に困難なために測定誤差をまねくことから Metaphase, Anaphase, Telophase についてのみの測定結果を示した。その結果2000個の測定細胞中 Metaphase は大体対照群では35~42位あるのに対し OX 注射群では注射後ややその数を減じる傾向を示すが Anaphase, Telophase では両者の間に大差を認めなかつた。

次に Mitotic phase の測定を行つたとほぼ同一の部分に於ける細胞当りの DNA 量の変動について観

表1 皮下に移殖された吉田腫瘍に生食を注射した時に示される細胞の各分裂期の時間的経過ともなる変化

hr.	Meta.	Ana.	Telo.
0	42	2	5
3	38	2	6
6	35	2	6
9	28	3	5
12	32	2	4
24	36	3	7

表2 皮下に移殖された吉田腫瘍に OX 物質を注射した時に示される細胞の各分裂期の時間的経過ともなる変化

hr No	phase			
	Meta.	Ana.	Telo.	
0	1	33	4	6
	2	50	1	7
3	1	21	1	3
	2	30	2	6
6	1	28	1	7
	2	24	1	6
9	1	29	1	5
	2	24	2	8
12	1	9	1	5
	2	30	1	6
24	1	22	1	4
	2	29	3	3

図1A 対照群 Metaphase を示す

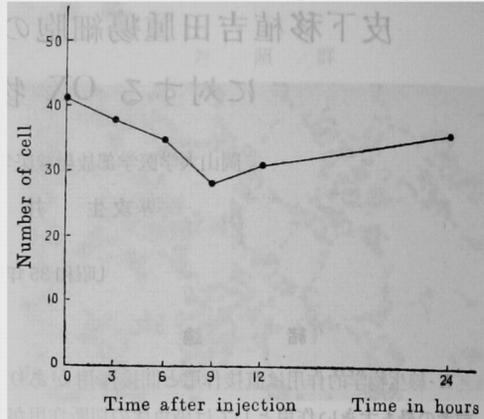


図1B Telophase, Anaphase を示す

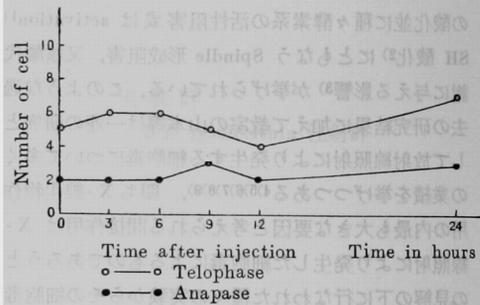


図2A 実験群 Metaphase

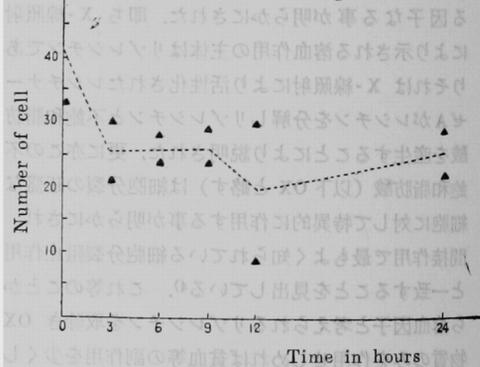


図2B 実験群 ●...Anaphase ▲...Telophase

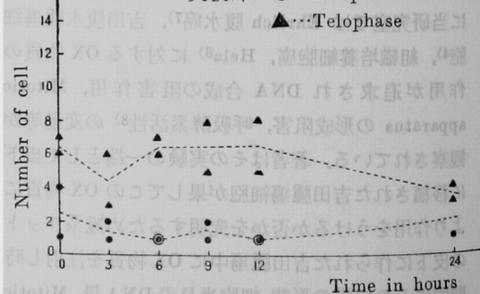


図3 吉田腫瘍(皮下移植)中に生食を注射した時に示される細胞当りの DNA 量の分布の時間的变化

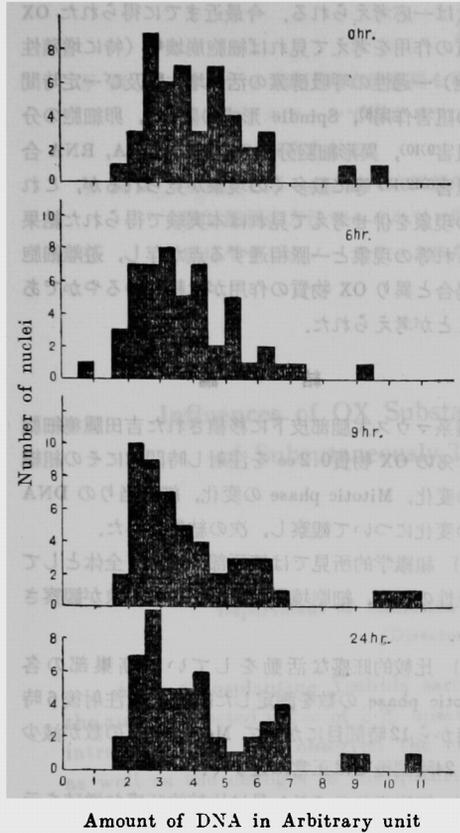
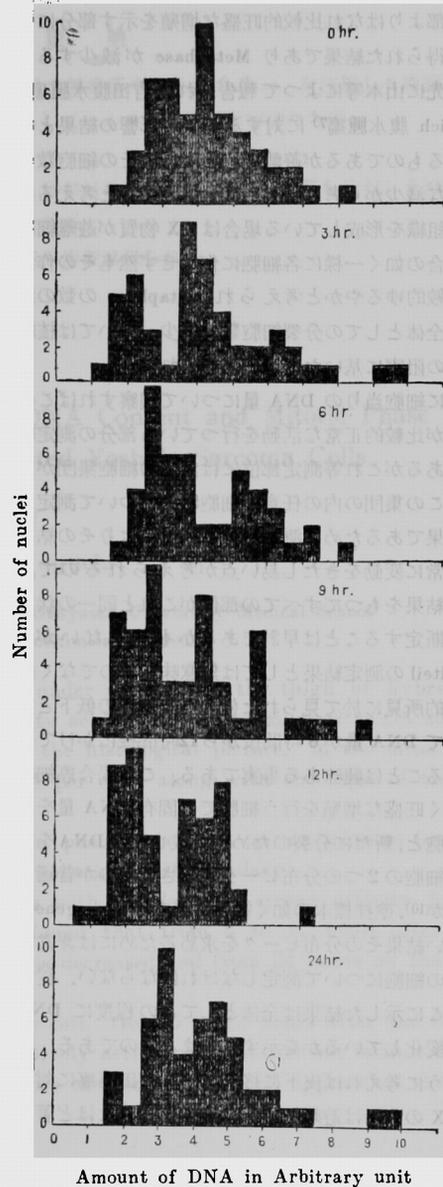


図4 皮下移植の吉田腫瘍に OX 物質を注射した時に示される腫瘍細胞の細胞当り DNA 量分布の時間的変動



察するに図3, 4の如くであり対照群に於てはその DNA 量の分布曲線は時間的経過に於てはほぼ同様である。勿論測定される細胞が切断されていないと考えられるものについてのみの値であるがこれ等の分布範囲は非常に広く、癌細胞がもつ1つの特性を示したものと考えられる。然しこの実験に供した標本に於ては塗抹標本と異り測光時に完全な核と見られた細胞も一部切断されていると推定される。即ち塗抹標本で示された吉田腫瘍細胞の DNA 量分布曲線よりその範囲が広がるのは切断された細胞が示した値に原因するものと考てられる。これに対して OX 注射群に於てはその分布度が不規則となり分布範囲が一定でなく更に注射後9時間, 12時間のものに於ては DNA 量の少い細胞が著しく増加し, 亦 DNA 量の多い細胞が減少している。24時間後に於てはこの傾向は再び消失し, 注射前の状態に近くなっている。

考 察

以上の実験結果について一応ここに考察を加えて見ると先づ組織所見について見れば癌巢の壊死部の増大, 細胞境界の不鮮明化, 染色性の僅かな低下, 巨細胞の出現等であるが, このような現象は無処置の癌巢に於ても見られる現象であり OX 物質による

特異的な所見とはいえないかも知れないがこの現象は OX 注射群に強く見られる点は何等かの影響を与えた事と考えられる。又 Mitosis の各 Phase は壊死部よりはなれ比較的旺盛な増殖を示す部分について得られた結果であり Metaphase が減少することは先に山本等によつて報告された吉田腹水腫瘍⁴⁾、Ehrlich 腹水腫瘍⁷⁾ に対する OX の影響の結果と相反するものであるが遊離細胞の場合はその細胞数の著明な減少から考えて細胞の崩壊が起ると考えるに反し組織を形成している場合は OX 物質が遊離細胞の場合の如く一様に各細胞に作用せず然もその作用は比較的ゆるやかと考えられ Metaphase の数の減少は全体としての分裂細胞数の減少、ひいては核酸合成の阻害に基いたものと考えられる。

次に細胞当りの DNA 量について観察すればこの結果が比較的正常な活動を行つている部分の測定結果があるがこれ等測定部位には無数の細胞集団があり、この集団内の任意の細胞50個について測定した結果であるために測定部位の選択によりその結果は非常に変動をきたし易い点が考えられるので、この結果をもつてすべての部位がこれと同一の状態だと断定することは早計であるかも知れないが、Herdteil の測定結果としては無意味なものでなく組織学的所見に於て見られた僅かな染色性の低下と一致して DNA 量が6時間後から12時間後にかけて低下することは興味ある事実である。この場合癌細胞の如く旺盛な増殖を行う細胞では固有 DNA 量をもつ細胞と、新たに分裂のために合成された DNA を有する細胞の2つの分布ピークが示されるのが普通であるが¹⁰⁾、塗抹標本の如く細胞の分布が Homogenous でない結果その分布ピークを求めるためには非常に多数の細胞について測定しなければならない。従つてここに示した結果は全体としてどの程度に DNA 量が変化しているかを示すに止まるものである。このように考えれば皮下に移植された吉田腫瘍に対する OX の作用は遊離細胞の場合に見られたほど著し

い形態的な変化をもたらさないようであるが、これは組織内の細胞への OX 物質の細胞膜透過性、並びに組織液による影響を受けたためかもしれないと云うことは一応考えられる。今最近までに得られた OX 物質の作用を考えて見れば細胞崩壊⁴⁾ (特に増殖性細胞) 一過性の呼吸酵素の活性増大⁶⁾ 及び一定時間後の阻害作用⁸⁾、Spindle 形成の阻害⁷⁾、卵細胞の分裂阻害⁹⁾¹⁰⁾、異形細胞分裂の誘起⁴⁾、DNA、RNA 合成阻害⁶⁾¹²⁾¹³⁾ 等に数多くの現象が見られるが、これ等の現象を併せて考えて見れば本実験で得られた結果もこれ等の現象と一脈相通ずる点が存し、遊離細胞の場合と異り OX 物質の作用が比較的ゆるやかであることが考えられた。

結 論

雑系マウス大腿部皮下に移植された吉田腫瘍細胞に2%の OX 物質0.2 cc を注射し時間的にその組織像の変化、Mitotic phase の変化、細胞当りの DNA 量の変化について観察し、次の結果を得た。

- (1) 組織学的所見では壊死部の増大、全体として染色性の低下、細胞境界の不明化等の現象が観察される。
- (2) 比較的旺盛な活動をしている癌巣部の各 Mitotic phase の数を測定した結果では注射後6時間目から12時間目にかけて Metaphase の数が減少し、24時間後では正常に近づく。
- (3) 細胞当りの DNA 量は比較的旺盛な増殖を示す部分に於て注射後6時間目から12時間目にかけてその量を減少した細胞が増加するか24時間後には正常値に近くなる。

稿を終るにあたり終始御懇切な御指導を受けた恩師武田教授並びに山本助教授に感謝の意を表し実験に当り御援助を受けた癌研内海助教並びに教室員の皆様に感謝の意を表す。

献

- 1) 波多野博行：細胞化学シンポジウム，9，21，1959.
- 2) Mazia, D., and Dan, K.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 28, 826, 1952.
- 3) Pelc, S. R., How and, A.: Brit. Med. Bull, 8, 132, 1952.
- 4) 山本道夫：細胞化学シンポジウム，9，141，1959.
- 5) Yamamoto, M. 他：Acta Med Okayama 投稿中。
- 6) Yamamoto, M. 他：Acta Med Okayama 投稿中。
- 7) 伊丹：岡山医学会雑誌，投稿中。
- 8) 塩飽録：岡山医学会雑誌，投稿中。
- 9) 妹尾, 山本, 内海 外：岡山医学会雑誌，投稿中。

- 10) Utsumi, K.: *Acta Med. Okayama* 14, 1, 1959. 12) 金政: 癌シンポジウム発表.
11) 妹尾, 山本, 内海: 岡山医学会雑誌, 投稿中. 13) 山本道夫: 岡山医学雑誌, 投稿中.

写 真 説 明

- 写真 1. 推系ラット皮下に吉田腫瘍を移植し 10日目に腫瘍部に生食 0.2c. c. を注射し 6 時間後に殺し醋酸アルコールで固定パラフィン切片としてホイルゲン反応を行つたもの。
分裂像が観察される。
- 写真 2. 写真 1 と同一の方法で吉田腫瘍を移植し, 10日目に 0.2c. c. の OX 物質を注射し 6 時間目に殺し同様の方法でホイルゲン反応を行つたもの。
核はややビクノーテックになっているが分裂像は見られる。

Influences of OX Substance of DNA Content and Mitotic Phase
of Subcutaneously-Transplanted Yoshida Sarcoma Cells

By

Yoshiko Iguchi

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Toshimitsu Takeda)

After transplanting Yoshida sarcoma cells under the skin of the thigh of hybrid mice, the author injected 0.2cc of 2% unsaturated fatty acid fraction (denominated as OX substance) intramuscularly and observed the changes in the histological picture, in the mitotic phase as well as the changes in the quantity of DNA per cell, along with the lapse of time, and obtained the following results.

1. The histological pictures revealed the phenomena such as an increase in necrotic foci, a general diminution in stainability and indistinct cell boundary.
 2. In counting the number of those cells with a relatively strong activity in cancer foci at various mitotic phases, it has been found that from 6 to 12 hours after the OX injection the number of the cells in metaphase is decreased and from 24 hours on the number of such cells approaches the normal.
 3. In the estimation of DNA content per cell, from 6 to 12 hours after the OX injection the number of the cells undergoing a relatively active proliferation but with a decreased DNA content tends to increase but after 24 hours the content per cell approaches the normal level.
-

井口論文附圖

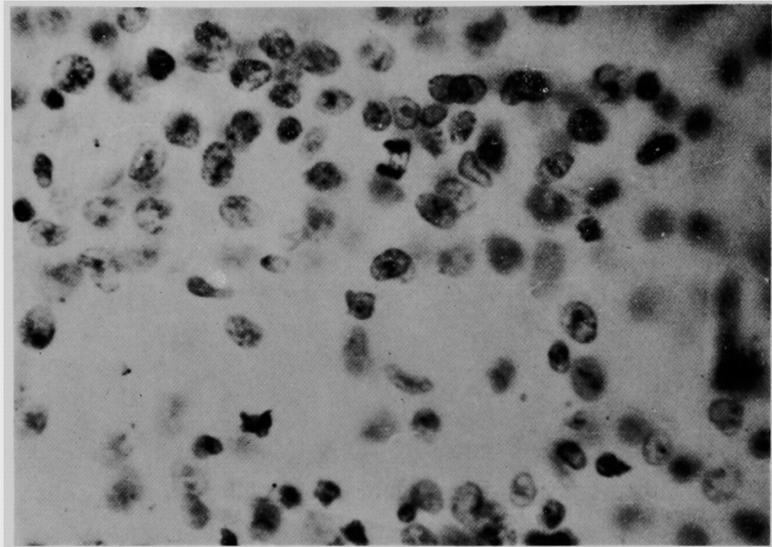


写真 1

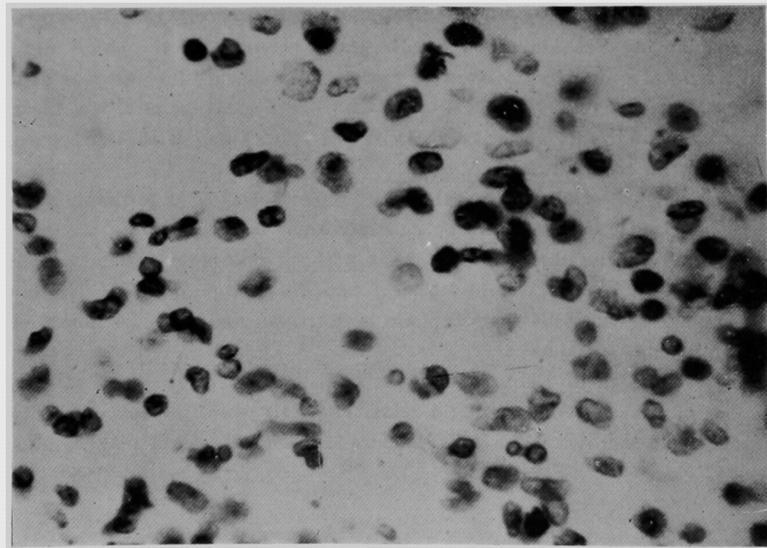


写真 2