

# X線照射家兎肝より抽出せる不飽和脂肪酸分画 (OX) の筋肉内移植吉田肉腫細胞のコハク酸 脱水素活性に及ぼす影響について

岡山大学医学部放射線医学教室 (指導主任: 武田俊光教授)

専攻生 井口与志子

〔昭和35年7月11日受稿〕

X線生物作用に関する一連の研究から、山本<sup>1)~4)</sup>はX線の制癌的作用の本体がX線照射動物の不飽和脂肪酸であることを明らかにした。先に著者はその不飽和脂肪酸分画 (OX と仮称) を皮下移植した吉田肉腫内に注射し、吉田肉腫細胞の分裂 Phase、核酸量の測定、組織形態学的観察から、OX が明らかに肉腫細胞に影響を与え、壊死部の増大、核酸代謝の異常を示す事を報告したが<sup>5)</sup>、本実験ではさらに生体代謝活性が比較的容易に測定出来る点と、X線障害時に最も問題とされるミトコンドリアの活性変化が観察出来る点で筋肉内移植された吉田肉腫細胞の呼吸酵素系の中で特にコハク酸酸化酵素系の活性<sup>6)~10)</sup>に与える OX の影響を観察し得られた結果について報告する。

## 材料及び方法

実験材料としては雑系白鼠の大腿部筋肉内に吉田肉腫細胞 0.2cc (約200万/cc) を移植し、移植後9日乃至は11日のラットを使用した。この時期に於てはすでに癌巣は大きく生長し、平均 2.5cm の長径、2.0cm の短径を有する。このような肉腫塊を有するラットの肉腫内及び反対側大腿部筋中に 2.5% の OX 0.2cc を注射するものと、同様なラットの静脈内に 0.25% の OX 0.2cc を注射するものの2群に分けて実験し、その各々の群において注射前及び注射後30分、1時間、4時間、8時間、20時間、32時間、46時間の各時期に断頭し、注射前及び後の腫瘍組織及び筋肉組織のコハク酸脱水素酵素活性の測定をした。酵素活性の測定方法は小田等の方法に従った<sup>6)7)8)9)</sup>、これら腫瘍塊全体の平均を測定するものと、腫瘍塊の中心部、中間部、外層部の3部分を別々に測定するもの及び対照として筋肉組織を測定するが、これ等の組織を各々 0.1M phosphate buffer (pH 7.6) にて 10mg/0.2cc の homogenate にな

るように homogenize しその 1cc と 0.2M sodium succinate 1cc と 0.2% Neotetrazolium chloride 1cc を混合し、37°C で1時間反応せしめ、10%ホルマリン 1cc で反応を停止させ、アセトン・エーテル当量混合液にて反応生成物である diformazan を抽出し、抽出液量は 10cc (V) にし島津ベックマン分光光度計にて 520m $\mu$  の波長で吸光度 (E) を求め、コハク酸酸化酵素活性は  $V \times E$  にて現わした。さらにまたこのような実験と平行し切開し、切出された腫瘍塊の半分を homogenate する事なしに 37°C にあたためられた前記反応液

0.1M phosphate buffer (pH 7.6)	1cc	} の液に
0.2M sodium succinate	1cc	
0.2% Neotetrazolium chloride	1cc	

没け1時間反応せしめ macroscopic なコハク酸脱水素酵素活性の観察を行った。又これ等の組織は Formalin 固定を行いパラフィン切片とし、組織学的観察も行った。

## 実験結果

1. 先ず intratumoral に OX を注射した吉田肉腫細胞のコハク酸脱水素酵素系の活性を時間的に観察すれば図1、2の如くである。即ち図1は腫瘍塊全体の homogenate の活性を示すものであり、これでは30分後に顕著な活性低下が示され1時間値、4時間値、8時間と時間の経過と共に次第にその活性は恢復して来るが、元の活性までは恢復し得ない。これ等の組織を写真1、2、3、4の如く中心部、中間部、外層部の3部分に分けて活性測定を行つて見れば図2の如くである。この実験系列は吉田肉腫移植11日目のものであり中心性壊死が見られている。ために中心部の活性は非常に低く、中間部がそれに次ぎ、外層部では極めて高い活性が示され、筋肉組織のそれよりはるかに高値を示す、このような腫瘍塊

中に OX を注射した時、注射後4時間で各部とも顕著な活性低下が示され、若干の起伏を示しながら32時間頃から外層部で再び高い活性が示されるようになる。然しこのような場合 macroscopic なコハク酸脱水素酵素系活性を観察すれば、中間部の bionecrosis

の部分は極めて増大し、外層部の旺盛増殖を示す部分は深い層になる傾向にある。今その状態のスケッチ図を示せば図3の如くであり、注射後次第に necrosis の増大と bionecrosis の増大があり、増殖性細胞層は次第に薄層になる。即ちこれ等全体を homogenate としたものでは

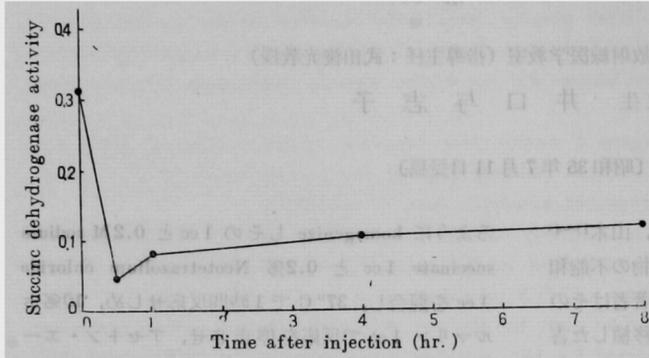


Fig. 1. Effect of OX on the succinic dehydrogenase activity of Yoshida tumor cells (injected 0.2cc of 2.5% OX)

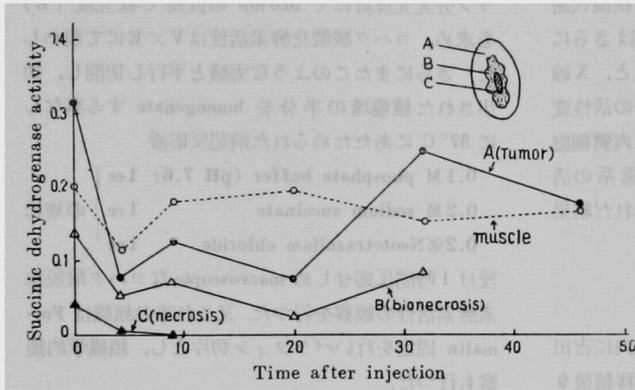


Fig. 2. Effect of OX on the succinic dehydrogenase activity of muscle and Yoshida tumor cells (injected intratumoral and intramuscular, 0.2cc of 2.5% OX)

体を homogenate としたものでは図1に示す活性低下となつて現われるものと思われる。またパラフィン切片の組織像について観察すれば写真5, 6, 7の如く、注射前のもに比較し OX 注射群では細胞変性が大きく、その中には何を示すものであるか不明であるがヘマトキシリン好染の顆粒が多数観察される。又対照群には理想的には吉田肉腫と起源を同じくする細胞を用うべきであり、ここに使用した筋肉組織はよい材料とはいえないが、そのもののコハク酸脱水素酵素系活性の OX 注射による変動を示せば図2 (muscle) の如くであり、注射後一時活性低下が示されるが比較的早期に恢復されるのが観察される。

2. 静脈内に OX を注射した時に見られる吉田肉腫細胞のコハク酸脱水素酵素系活性の変動を示せば図4の如くである。即ちOX注射により吉田肉腫細胞の本酵素活性は上昇しわずかの起伏を示す。この中で外層部の増殖性細胞の多い所では一過性に活性増加が示され、後は比較的変動がゆるやかである。これに対し中間

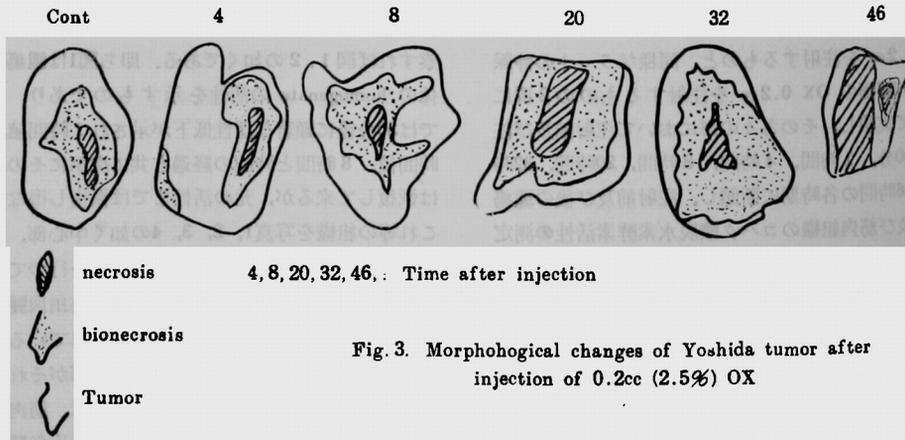


Fig. 3. Morphological changes of Yoshida tumor after injection of 0.2cc (2.5%) OX

部、中心部と内部に向うに従い、OX 注射後の時間と平行して酵素活性の増大が顕著になる傾向を示す。然も中心部の活性値が高められた部分では、それと接近してすぐそばに完全に酵素活性を消失している壊死部が存在する。これに対し筋肉組織では本酵素活性は注射後わずかに低下するのみで、その後は恢復しつつほとんど大した変動を示さない。

### 考 察

一般に細胞の機能障害を観察するにはミトコンドリアに局在する呼吸酵素系の活性を測定或いは組織化学的反応により観察するのが便利である。勿論嫌気解糖に依存してエネルギーを得る細胞についてはこの方法で細胞の機能障害を観察するのはよくないかも知れないが、逆にこの方法で興味ある現象を掴む可能性もある。

先ず直接 intratumoral に OX を注射した時、顕著なコハク酸脱水素酵素活性の低下が示されたが、その場合は組織量に比較すれば極めて高濃度であり、すでに塩飽<sup>16)17)</sup> が Ehrlich 腹水腫瘍細胞に対する OX の同酵素系活性に与える影響を観察し、高濃度では OX 処理直後から高い活性阻害のあることを示し、それがミトコンドリアの膜構造に与える影響によるものと解しているが、それ等の結果と一致するものと考えられる。然も部分的には酵素活性の恢復が見られるが、全体としては壊死部の増大、bionecrosis の増大により活性は著しい低値を示す。而して注射部位より遠隔部の外層に於ては活性の恢復が示され、特に筋肉中に注射した物では比較的長期にわたり局部に存在しているのが見られ、治療面に於ては充分の注意が必要と考えられた。次に静脈内注射群に見られたコハク酸脱水素酵素系活性の変動は一過性の活性増加があり、それに続いて再び次第に本酵素活性の増加が示される。その時その活性増大量と比列して次に来る活性阻害が顕著であるのが観察される。即ち結果的に見れば本酵素活性の増大は次に来る細胞壊死の前段階と考える事が出来る。この現象に対して著者は次の如き考察を行った。即ち最近の研究で不飽和脂肪酸を有する物質がバクテリアの嫌氣的

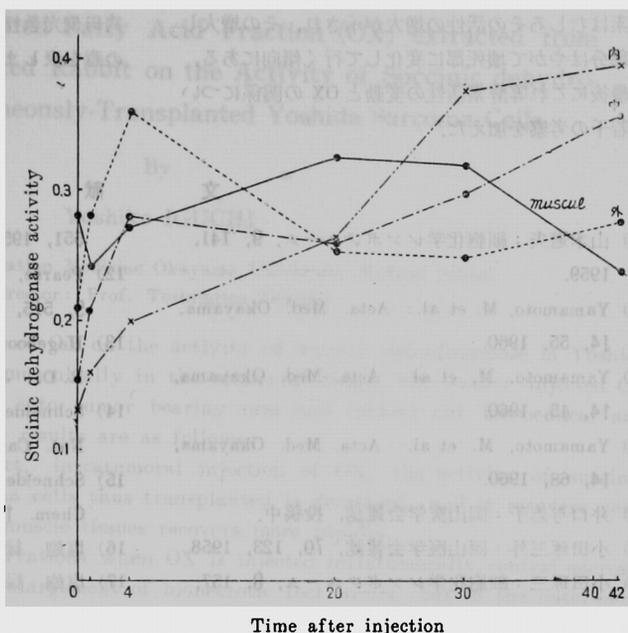


Fig. 4. Effect of OX on the succinic dehydrogenase activity of intramuscularly transplanted Yoshida sarcoma cells by the intravenous injection

生長を促進することが報告<sup>18)19)20)</sup>されたが、OX がこのような不飽和脂肪酸の antagonistic inhibitor として作用し、嫌氣的呼吸が阻害され、癌細胞では一般に低いとされているバスターール効果が現われたものかも知れない。

次に対称実験に筋肉組織を使用したのは現想的でないが、この場合早期の恢復があるに対して腫瘍細胞では恢復がゆるやかで腫瘍治療にとつて有利な点といえる。

### 結 論

白鼠大腿部筋肉内移植吉田肉腫細胞のコハク酸脱水素酵素系活性に与える OX の影響を intratumoral 及び担瘤ラットの intravenous に OX を注射し、生化学的、組織化学的に観察した結果を得た。

1) 白鼠大腿部皮下移植吉田肉腫のコハク酸脱水素酵素系は直接 intratumoral に OX を注射した時、その活性を低下し極めてゆるやかに恢復するが正常筋肉組織では早期に恢復する。

2) 組織化学的観察で intratumoral に OX を注射すれば中心性壊死部を増大せしめ、bionecrosis の部分の顕著な増大を認めるも最外層には増殖性細胞の集団を認める。

3) 担癌ラットの静脈注射によつて腫瘍組織は本酵素はむしろその活性の増大が示され、その増大した部分はやがて壊死部に変化して行く傾向にある。

最後にこれ等酵素活性の変動とOXの関係について若干の考察を加えた。

稿を終るにあたり終始御指導御援助下さつた恩師武田俊光教授並びに癌研山本教授内海助教授に深謝の意を表します。

#### 文 献

- |   |  |
|---|--|
| 1) 山本道夫：細胞化学シンポジウム，9，141，1959.                            | 551，1955.  |
| 2) Yamamoto, M. et al.: Acta. Med. Okayama, 14, 55, 1960. | 12) Pearse, A. G. E.: J. Histochem. Cytochem. 5, 515, 1957.                          |
| 3) Yamamoto, M. et al.: Acta. Med. Okayama, 14, 45, 1960. | 13) Hogeboom, G. H., Ciaude, A. and Hotchkiss, R. D.: J. Biol. Chem. 177, 893, 1949. |
| 4) Yamamoto, M. et al.: Acta. Med. Okayama, 14, 68, 1960. | 14) Schneider, W. C., and Hogeboom, G. H.: J. Nat. Cancer Inst. 10, 969, 1950.       |
| 5) 井口与志子：岡山医学会雑誌，投稿中.                                     | 15) Schneider, W. C. and Potter, V. R.: J. Biol. Chem. 177, 893, 1949.               |
| 6) 小田琢三外：岡山医学会雑誌，70，123，1958.                             | 16) 塩飽 緑：岡山医学会雑誌，投稿中.  |
| 7) 小田琢三：細胞化学シンポジウム，8，157，1958.                            | 17) 塩飽 緑：岡山医学会雑誌，投稿中.  |
| 8) 小田琢三：細胞化学シンポジウム，8，173，1958.                            | 18) Windisch, F. et al.: Zeit. Krebsforschung. 62, 423, 1958.                        |
| 9) 小田琢三外：岡山医学会雑誌，70，101，1958.                             | 19) Windisch, F. et al.: Ber. dtsh. Akad. Wiss. Berlin. 315, 134, 1959.              |
| 10) Green, D. E.: 生化学，29，65，1957.                         | 20) Windisch, F. et al.: Ber. dtsh. Akad. Wiss. Berlin. 317, 224, 1959.              |
| 11) Green, D. E. et al.: J. Biol. Chem. 217,              |  |

#### 写 真 説 明

1. 2. 3. 4. 5. は対照群で吉田肉腫皮下移植後11日目のパラフィン切片の顕微鏡像で、1) は壊死部(中心部)、2) はbionecrosisの部分、(中間部)、3) 4) は外層の比較的旺盛な増殖を示す部分であり、5) はbionecrosisの弱拡大像である。6) 7) はOX注射後10時間の吉田肉腫組織でbionecrosisの部分(対照5)に比して核破片が多く又7) はヘマトキシリン好染の不明な顆粒の出現したのを示す。

**Influences of Unsaturated Fatty Acid Fraction (OX) extracted from the Liver of X-Irradiated Rabbit on the Activity of Succinic dehydrogenase in Subcutaneously-Transplanted Yoshida Sarcoma Cells**

By

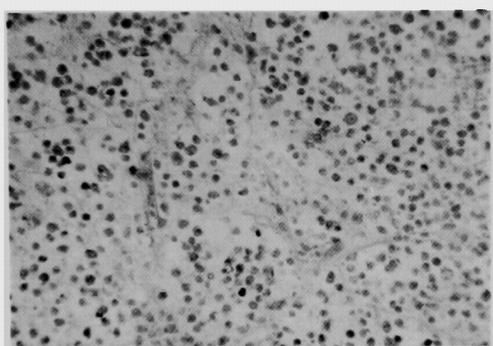
**Yoshiko IGUCHI**

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

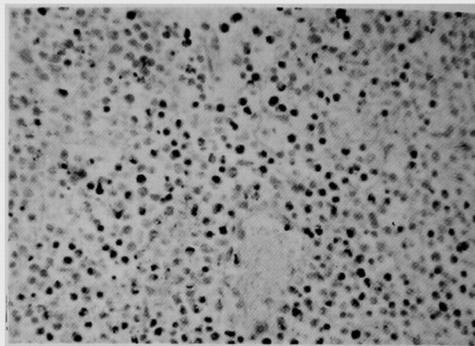
In order to study influences of OX on the activity of succinic dehydrogenase in Yoshida sarcoma cells transplanted intramuscularly in the albino-rat thigh, the author injected OX intra-tumorally or intravenously into tumor bearing rats and carried out biochemical and histochemical investigations. The results are as follows:

1. In the cases given direct, intratumoral injection of OX, the activity of succinic dehydrogenase in Yoshida sarcoma cells thus transplanted is decreased, and it recovers very slowly but the same activity in muscle tissues recovers more rapidly.
  2. In the histochemical observations when OX is injected intratumorally, central necrosis is increased and also a marked enlargement of bionecrotic foci occurs, but in the outer-most layer colonies of proliferative cells can be recognized.
  3. When OX is injected intravenously into tumor bearing rats, the activity of the dehydrogenase is rather increased in tumor tissue, and the part where such increase occurred ultimately tends to become necrotic. In addition, the author discussed briefly about the relation between these changes in the activity of dehydrogenase and OX.
-

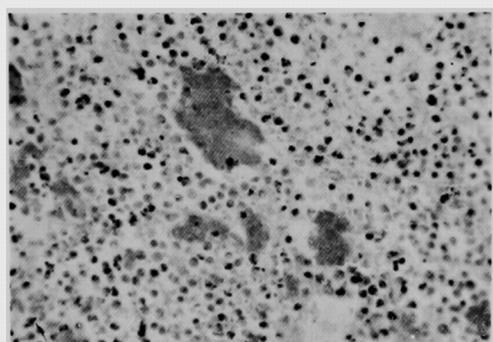
井口論文附図



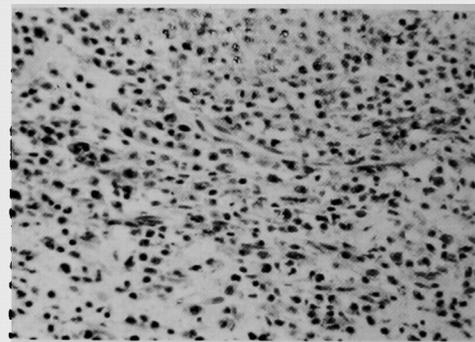
1



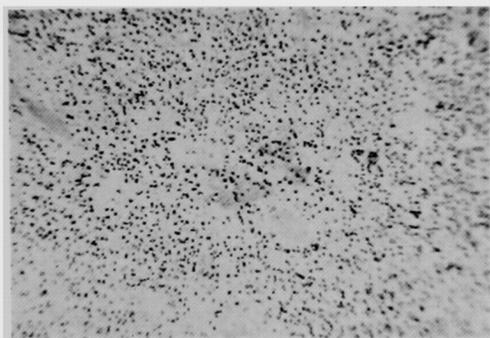
2



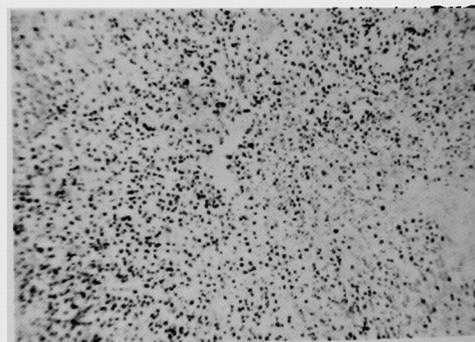
3



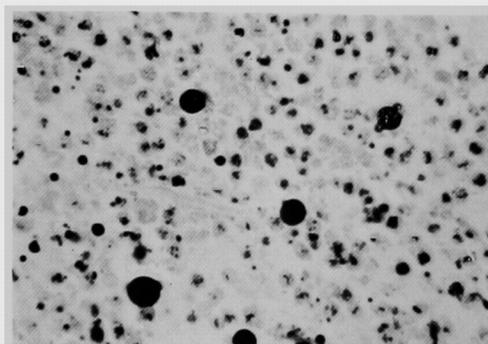
4



5



6



7