

生物学的活性 Polypeptide "CORNIN" の 細胞分裂に及ぼす影響 (IV)

岡山大学 医学部 第一生理学教室

木本 克彦 藤田 興 小林 芳治
高橋誠一郎 藤井 義信 山田 俊典
智片 芳子 大月 恒 村上 哲英
西田 勇

〔昭和48年12月19日受稿〕

緒 言

我々は今迄に、ウシの角膜、家兎の骨格筋、イヌの小腸平滑筋などから抽出、精製した cornin が細胞分裂に対して抑制効果を持っていることを報告して来た¹⁻⁶⁾。組織培養細胞に関しては犬の小腸が SV40 の DNA により誘発されたハムスターの fibrosarcoma cell には濃度に平行して著明な細胞変性を起すが、同じハムスターの正常 fibroblast cell 及びヒトの正常 fibroblast cell に対しては、同一濃度であるにもかかわらず、細胞変性を起さないこと⁷⁾、さらに、家兎の骨格筋 cornin は、イヌ小腸平滑筋 cornin より少ない量で、受精ウニ卵の初期分裂を抑制し⁸⁾、ラットの再生肝の細胞分裂にも、抑制効果を示すことを知った⁹⁾。以上から、家兎の骨格筋 cornin の正常な細胞分裂に対する抑制効果は、イヌの小腸平滑筋 cornin よりも強く、また、腫瘍細胞への分裂抑制効果は、イヌの小腸平滑筋 cornin の方がより大である結果を得た⁹⁾。今回は、cornin の細胞分裂抑制効果の、その材料とする臓器による差違、特に抗腫瘍性に対する検討を行なった。すなわち、1) Ehrlich 腹水腫瘍の in vitro 及び in vivo の細胞を用いて、イヌ、ウシ、ブタの小腸平滑筋 cornin の影響、並びに 2) 組織培養下において、ラットの肝臓由来の正常細胞及び腫瘍細胞に対する影響を調べた。

材料及び実験方法

1. Cornin の抽出

イヌ、ウシ、ブタの各小腸平滑筋、呑竜系成熟ラットの肝臓を材料として cornin を抽出した。以下文中で、CIC はイヌの小腸平滑筋 cornin (canine in-

testine cornin)、BIC はウシの小腸平滑筋 cornin (bovine intestine cornin)、PIC はブタの小腸平滑筋 cornin (porcine intestine cornin) 及び RLC はラット肝臓 cornin (rat liver cornin) を示す。

小腸はそれぞれの動物を屠殺後直ちに摘出し、粘膜層を除去して deep freezer box (-15°C) に凍結保存し、又ラットは断頭脱血後速やかに肝臓を摘出し、この肝臓をやはり凍結保存しておき、必要に応じて cornin 抽出の材料として用いた。

抽出は、今迄と同様各組織の熱水抽出物の alcoholic fractionation によつた²⁾。

Cornin の透析は、3% cornin 水溶液を collodion bag (Sartorius Membranfilter) に入れ、吸引し、48 時間後 bag を透過したものを D-fraction (dialysable) とした。さらに bag 内に残つたものは cellophane tube (Visking Co.) に入れ 0°~4°C で脱イオン水に対して透析し、数回外液の交換を行ない tube 内に残つたものを U-fraction (undialysable) とした。それ等をただちに凍結乾燥を行ない desiccator に保存した。

2. 腫瘍細胞

1) JTC-11 及び培養方法

組織培養細胞は Ehrlich 腹水腫瘍由来の JTC-11¹⁰⁾ を用いた。これは岡大癌源研病理部において継代維持されていたもので、培養液の組成は、56°C で 30 分間非働化されたウシの血清を 20% 含む YLE であり、継代方法は pipetting によつた。増殖率の測定は、同型培養法によつた。即ち、pipetting により得た細胞浮遊液を均一に攪拌しながら、所定の短試験管に 1.5 ml ずつ分注し、37°C の孵卵器の中で 5 度の角度に静置し 48 時間後に 3 本の試験管について各細胞数を求め、この平均を全試験管について各 1 本

あたりの細胞数とみなした。同時に他の試験管の液交換を行ない、実験群にはそれぞれの濃度に cornin を含む培養液に更新し、再び48時間孵卵器内に静置後、各濃度について3本ずつの細胞数を測定、その平均を算定した。細胞数の測定はSanford-勝田の方法¹⁰⁾に従い核数計算法を用いた。同時に別の試験管内に cover glass を静置し表面に増殖した細胞について主に May-Giemsa 染色を行ない形態観察に供した。

2) Ehrlich 腹水腫瘍及び動物実験

JTC-11 として2,020日間、365代培養された細胞を動物腹腔に復元接種し、さらに ddN 系マウスで15代以上継代された腹水腫瘍を用いた。

実験に用いたマウスは生後6~7週間目のもので、体重20~24gの ddN 系(雄)を用いた。実験に用いた腹水腫瘍は継代移植後7日目のもので、マウス腹腔内に腫瘍細胞数にして 1×10^7 個を移植し、48時間後より4~9匹を一群として実験を行なった。実験群には、各投与量を含む cornin 生理的食塩水溶液1mlを、対照群には生理的食塩水のみを1ml、1日1回、7日間腹腔内に投与した。各群はそれぞれ別の金属ゲージに入れ、1ゲージあたり5匹以内とした。固型飼料(オリエンタル MF)及び水は自由に与えた。効果判定には接種後30日間毎日体重と生存をたしかめる double checking method を用いた。longevity increase effect の計算は次のように行なった。

$$L = \frac{lt - lc}{lc} \times 100$$

L : longevity increase (%)

lt : longevity of treated group

lc : that of the control group

L の判定は以下の如く行なった。

| | | |
|-------------------|------|---------------------|
| $L < 25\%$ | (-) | no effect |
| $25\% < L < 50\%$ | (±) | slight inhibition |
| $50\% < L < 75\%$ | (+) | moderate inhibition |
| $75\% < L$ | (++) | marked inhibition |

3. Cornin の免疫学的検索

Kabat¹¹⁾の方法に順じて得た家兎抗体血清と、タンニン処理ヒツジ血球との凝集反応を用いた。cornin 抗体血清は次の方法で得た。

1) 0.15% CIC 水溶液100mlに1% alum 5mlを加え0.1N NaOH で中和したものをを用いた。投与方法は家兎に初回1ml皮下に、次回より静脈内に、1mlを2回、1.5mlを3回、2mlを4回、5mlを2回、計12回を4週間にわたり投与した。cornin 投与総量は家兎一匹あたり、38.25mgである。投与終了

後1週間目に採血し血清を分離してこれを抗体血清とした。

2) 1.5% CIC 水溶液を用いた。1)と同様に alum を加え NaOH で中和したものを、家兎に初回は1ml皮下投与、次回より静脈内に1mlを2回、1.5mlを3回、2mlを4回、3mlを4回、5mlを2回、計16回、cornin 総量562.5mgを4週間にわたって投与した。最終投与から1週間後に採血、この血清を抗体血清とした。

Cornin 吸着血球の作製及び hemagglutination test は、2.5倍から1,280倍までの0.5mlずつの抗体血清の倍数希釈系列をつくり、それぞれに0.5mlの cornin 吸着血球浮游液、対照血球浮游液を加え室温に12時間放置後、hemagglutination の状態を観察した。

4. ラット肝細胞株と培養方法

1) 細胞系

呑竜系ラットの肝臓由来の3種類の細胞を用いた。

RLM-11¹²⁾: 新生児ラットの肝臓を細切して、17日間回転培養を行ない、増殖して来た細胞を静置培養に移し継代維持されているもので、100日以前のもので用いた。

RLN-10¹³⁾: RLM-1 と同じ方法により得られた細胞系であるが、培養下で2,053日以上経過した細胞である。1,160日目に同系ラットに移植すると腫瘍を形成する場合があります。試験管内で自然発癌したと考えられている株細胞である。

C 84-BT¹⁴⁾: DAB 腹水肝癌 C 84-B を培養して200日以上経過した細胞で、同系ラットに移植して確実に腫瘍を形成する。

2) 培養方法

3種類の細胞はすべて同じ培養液、同じ継代方法で行なった。56°Cで30分間、非働化したウシ血清を20%及び0.4% lactalbumin hydrolysate を含むD塩類溶液を使用した。継代は0.2% trypsin を用い、液更新は週2回とし静置培養法で維持されている。増殖率の算定はJTC-11の場合と同じように同型培養と核数計算法で行なったが、cornin 添加後、さらに48時間目に液を更新し96時間目の細胞数の算定も行なった。

実験成績

1. JTC-11 に対する cornin の影響

ここで用いた cornin はウシの小腸より抽出したもの、及びイヌの小腸より抽出したものである。増殖曲線に対する両物質の差は Fig. 1 に示す如くであ

る。即ち、BIC、CIC の両者とも抑制的に働いているが、CIC の増殖抑制効果の方がより大きい。細胞の变化はいずれにも認められ、主に核の膨化を伴つ

Fig. 1 Effects of intestine cornins on growth curves of JTC-11 cell line in vitro.

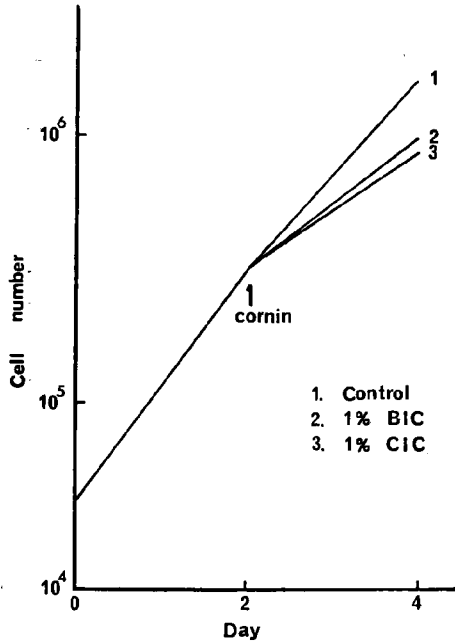
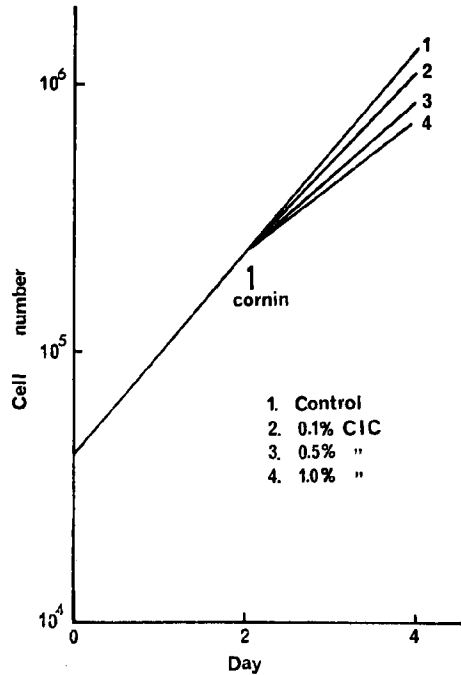


Fig. 2 Effects of CIC on growth curves of JTC-11 cell line in vitro.



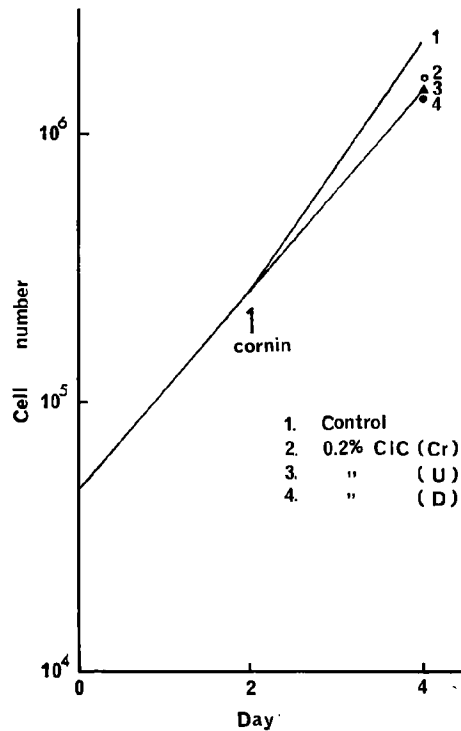
た細胞の肥大と、細胞質内の空胞形成とであつた。このような変化も、CICの方に著明であつた (Photo 1, 2).

次に CIC の濃度と増殖率との関係を示したのが Fig. 2 である。抑制効果は濃度の高いものほど著しく、0.1% に於いてもなお抑制効果は認められた。

Fig. 3 は CIC の crude (透析していないもの)、D-fraction 及び U-fraction の比較をそれぞれ同一の濃度 0.2% で行なつたものである。この結果からは、効果の特に認められた fraction はなく、各々同程度の抑制効果を示した。なお同じ 0.2% の濃度で PIC、及び BIC についても、D-fraction、U-fraction、crude の比較を行なつたが、ほぼ同じような傾向を示した。

以上から JTC-11 に対する抑制効果は CIC がより強く、濃度とはほぼ平行の関係がみとめられた。collodion 膜による透析法で得た D-fraction、U-fraction からは、特に抑制あるいは促進を示す fraction は見出せなかつた。

Fig. 3 Effects of fractionized cornin on growth curves of JTC-11 cell line in vitro.



2. 動物実験

1) Cornin の抗原性

Table 1 に示すように、CIC 38.25mg 投与例 Exp. I

Table 1 Hemagglutination test between anti-cornin serum of rabbit and tanned sheep erythrocytes precipitated with "CIC".

| | | serum | | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 |
|---------|---|-------|---|-----|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|------|
| Exp. I | A | Exp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Cont. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | B | Exp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Cont. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | C | Exp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Cont. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | serum | | 2.5 | 5 | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 | 320 | 640 | 1280 |
| Exp. II | D | Exp. | ± | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Cont. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | E | Exp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Cont. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | F | Exp. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | | Cont. | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

では A, B, C, いずれの実験でも, 対照群, 実験群, とともに全く凝集反応はみとめられなかつた。

CIC 562.5mg を投与した場合 (Exp. II) でも抗血清濃度 2.5 倍希釈で 3 実験例中一つのみが凝集反応 (±) と判定されただけである。

CIC をマウス腹腔内に投与しても動作の鈍化, うずくまり等は, きわめて軽微で特異的な変化はみとめられなかつた。

以上の結果より, CIC には抗体生成能は殆んどないと考えられる。また 100mg を一時にマウス腹腔内に投与しても死亡例をみとめなかつたことから, かなりの大量投与にもよく耐えるものと思われる。

2) Ehrlich 腹水腫瘍に対する cornin の影響

ここで用いた cornin は, JTC-11 に増殖抑制効果を示した CIC, BIC 及びその後抽出した PIC の 3 種類である。又腹水腫瘍は JTC-11 を動物腹腔に復元移植して得たものを用いた。

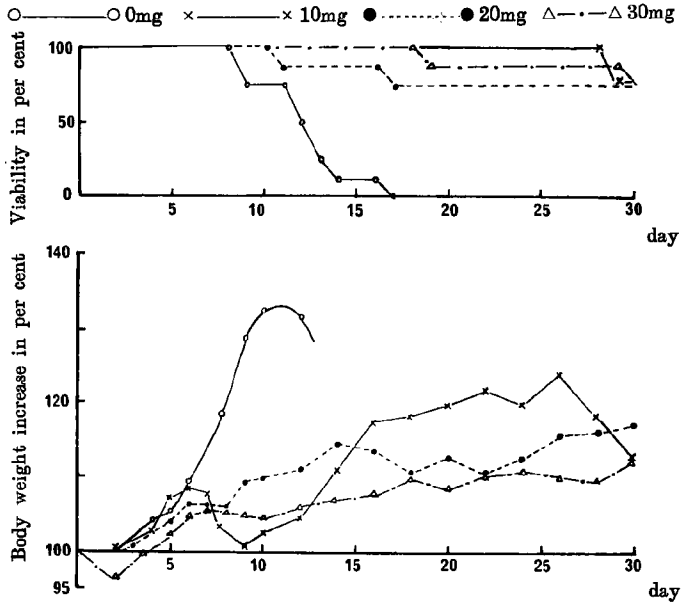
(1) イヌ小腸 cornin (CIC)

腫瘍細胞接種 30 日後の生存匹数では, 10mg 投与群は 8 匹中 6 匹, すなわち 75% の生存率を示し, 20mg 投与群は 8 匹中 7 匹, 30mg 投与群は 8 匹中 6 匹の生存例をみとめた。従つて各投与群とも longevity increase はすべて 75% 以上である。以上から CIC が Ehrlich 腹水腫瘍に対して抗腫瘍効果を持っていると判定した (Table 2, Fig. 4)。

Table 2 Effect of CIC, BIC and PIC on the Ehrlich ascites carcinoma by intraperitoneal administration.

| | | Death from disease and toxicity | Viability after 30 days | Mean-longevity after 30 days | Longevity increase effect after 30 days |
|-----|---------|---------------------------------|-------------------------|------------------------------|---|
| CIC | control | 0/8 | 0/8 | 12.4 days | ----- |
| | 10 mg×7 | 0/8 | 6/8 | 29.8 | ++ (140%) |
| | 20 mg×7 | 0/8 | 7/8 | 26.0 | ++ (110%) |
| | 30 mg×7 | 0/8 | 6/8 | 28.6 | ++ (131%) |
| BIC | control | 0/4 | 0/4 | 20.3 | ----- |
| | 20 mg×7 | 0/5 | 0/5 | 16.2 | - (-20.2%) |
| PIC | control | 0/9 | 0/9 | 13.1 | ----- |
| | 20 mg×7 | 1/9 | 2/8 | 18.5 | ± (41.2%) |
| | control | 0/7 | 0/7 | 15.9 | ----- |
| | 30 mg×7 | 0/9 | 0/9 | 15.4 | - (-3.1%) |

Fig. 4 Effect of CIC on the survival time and body weight increase of the mice transplanted with Ehrlich ascites carcinoma. Each mouse was injected intraperitoneally with 1 ml of saline containing following dose of CIC per day for a week.



(2) ウシ小腸 cornin (BIC)

平均生存日数は、対照群が20.3日であるのに比べ、20mg投与群では16.2日であり、むしろ投与群の方が短い。平均体重増加曲線でも対照群に比較

して、投与群の方が体重増加は著しい。以上の結果から BIC には Ehrlich 腹水腫瘍に対する抗腫瘍効果はないものと考えられる (Table 2, Fig. 5).

Fig. 5 Effect of BIC on the survival time and body weight increase of the mice transplanted with Ehrlich ascites carcinoma. Each mouse was injected intraperitoneally with 1 ml of saline containing following dose of BIC per day for a week.

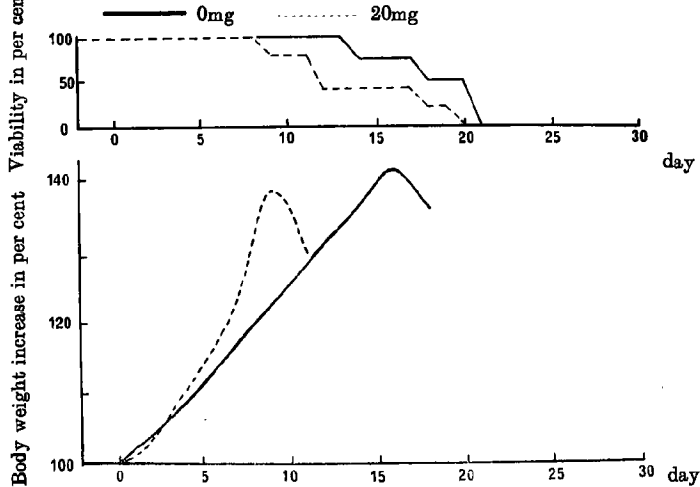


Fig. 6 Effect of PIC on the survival time and body weight increase of the mice transplanted with Ehrlich ascites carcinoma. Each mouse was injected intraperitoneally with 1 ml of saline containing following dose of PIC per day for a week.

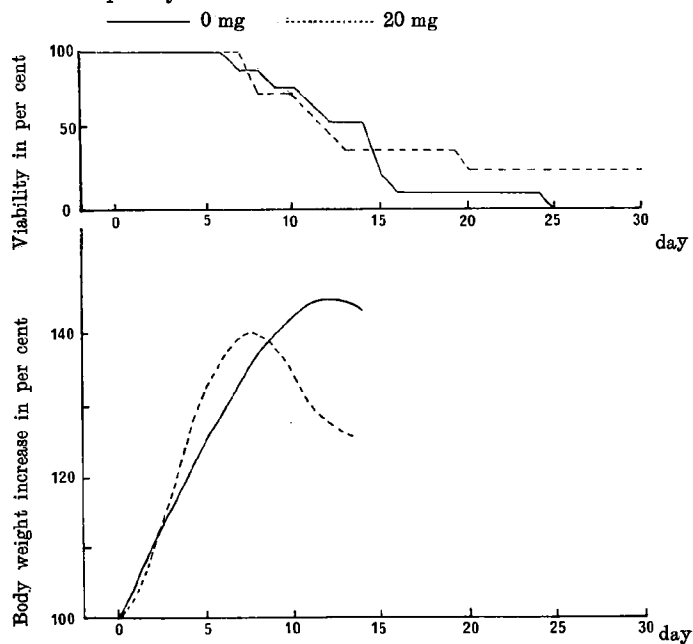
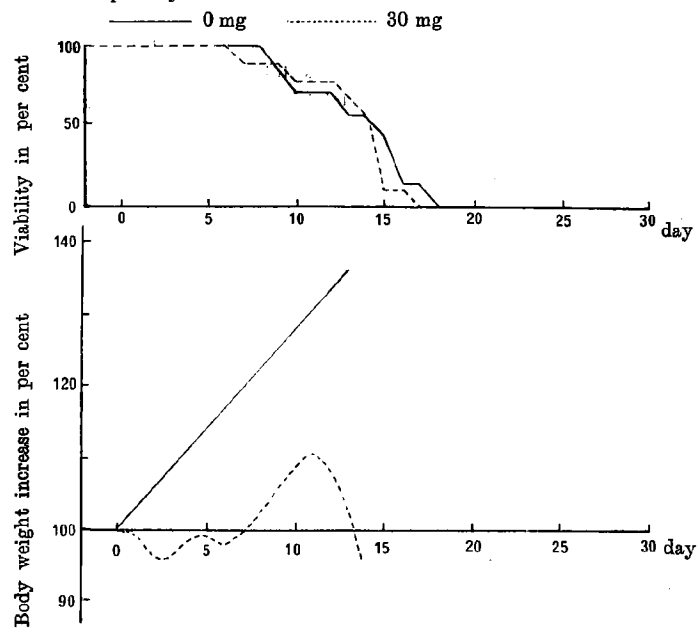


Fig. 7 Effect of PIC on the survival time and body weight increase of the mice transplanted with Ehrlich ascites carcinoma. Each mouse was injected intraperitoneally with 1 ml of saline containing following dose of PIC per day for a week.



(3) ブタ小腸 cornin (PIC)

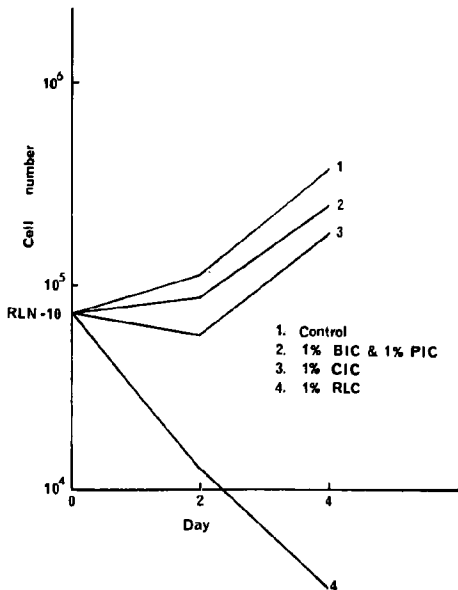
腫瘍細胞移植後30日目の生存例は、20mg 投与群では8匹中2匹、30mg 投与群では全例死亡した。平均生存日数では、30mg 投与群は対照群とほとんど差がないが、20mg 投与群はやや延長している。従つて longevity increase は、30mg 投与群で-3.1%、20mg 投与群で41.2%である。体重増加曲線は、20mg 投与群では対照に近いが、30mg 投与群では、cornin 投与期間中は減少し、投与を止めると増加している。以上から、30mg 投与群よりも20mg 投与群の方に抗腫瘍性がややみとめられる。(Fig. 6, Fig. 7, Table 2).

以上三種類の小腸平滑筋 cornin が Ehrlich 腹水腫瘍に対して示す抗腫瘍効果を比較すると、CIC が最も強く、PICがこれに次ぎ、BIC には抗腫瘍性はないといえよう。

3. 肝組織培養細胞系に対する cornin の影響

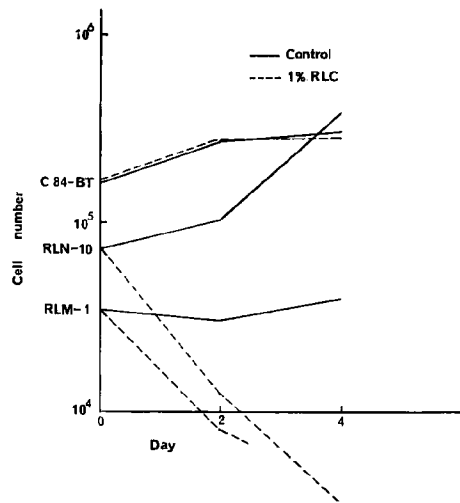
Fig. 8 に示す如く RLN-10 に対する各 cornin はいずれも抑制的に働く。特に RLC では核の濃染、収縮、細胞質の融解などを伴つて死滅した細胞が多くみとめられた。他の cornin を作用させた場合にも、核膜の濃染、核の肥大膨化、分裂像の減少などがみとめられた。以上の結果より更に、同系ラットの肝由来細胞系である RLM-1 と C 84-BT との増殖曲線に対する RLC の影響を RLN-10 と比較したのが Fig. 9 である。これによると、いまだ diploid range

Fig. 8 Effects of various cornins on growth curves of RLN-10 cell line in vitro.



にあり正常に近いと考えられる RLM-1 に対する細胞分裂抑制効果は、RLN-10 に対する効果より著明で、核はほとんど見つけ難く、同型培養の際の核数計算も不可能に近いほど減少した (Photo 3, 4). しかしながら、明らかに肝癌細胞と考えられる C 84-BT に対する抑制効果は、全くみとめられない。また、CIC に関してもこれら3種類の細胞系に対して、やはり同じ傾向を示し、RLM-1 及び RLN-10 に対する細胞分裂抑制効果は著しいが、C84-BT に対してはほとんど影響をみとめない。

Fig. 9 Effects of RLC on growth curves of various kinds of cell lines in culture.



考 按

生体の諸組織からの抽出物の内、細胞分裂に対して、促進あるいは抑制効果をもつものがあることは、古くから知られている。これに関連して生体組織の抽出物より制癌物質を分離して、制癌剤としての応用を試みた研究も数多く見られる。

Parsley¹⁶⁾ は trypsin 消化により、正常成熟動物の結合組織より細胞増殖抑制物質を抽出した。即ち、初代組織培養において、この物質は melanoma, hemangiopericytoma, xanthoma, thymoma などの増殖を抑制し、つづいて行なつた動物実験においても培養細胞にみとめた結果と相関を示し、毒性もみとめられなかつたと報告している。

Szent-Györgyi¹⁶⁻¹⁹⁾ は腫瘍細胞増殖抑制物質 retine と、増殖促進物質 promine とを生体より抽出し、retine はひろく体組織に分布しており、人尿、筋肉、臍、大血管、胸腺などより抽出可能であり、癌化類

度の少ない組織には, retine の活性が高いことを示した。さらに retine は C₃H 系マウスに発生した乳癌, 及び Sarcoma 180, Krebs-2 等の増殖を抑制したという。細菌, 受精ウニ卵, 種子などの分裂をも抑制する一方, 組織培養下において, 正常細胞が癌細胞よりその感受性は低いと報告している。その本態については methyl glyoxal の誘導体と考えられている。

Kidd²⁰⁻²¹⁾ 及び Herbut²²⁾ によつて示されたモルモット血清及びモルモット肝抽出物が持つ抗腫瘍効果は Broome²³⁾ により L-asparagin 合成酵素系を欠く腫瘍群にのみ見られるもので, その本態は L-asparaginase であろうと考えられている。なお, 本実験に用いられている JTC-11 に対しても, モルモット血清が増殖抑制効果を持つている事は, 智片等²⁴⁾ により報告された。その他 ribonuclease²⁵⁾ や, xantine-oxydase²⁶⁾ などの抗腫瘍作用を持つ酵素が報告されている。

さて諸臓器のうち, 肝臓には, ある種の細胞分裂抑制物質が存在することは, 多くの学者により報告されている。

Jakson²⁷⁾ は肝の alcohol ないし生理的食塩水浸出液が, 細胞増殖の inhibitor としての働きを持つこと, その物質が ethanol amine ではないかと報告している。

Druckrey²⁸⁾ は吉田肉腫に各動物の脾, 肝, 肺, 腎, 睪丸などからの抽出液が, かなりの制癌作用を有し, そのうちで homo であるラットの肝抽出液が hetero の動物肝抽出液とほぼ同じか, もしくはより強い作用のあることを報告している。

中原, 福岡等²⁹⁻³¹⁾ は Ehrlich 腹水腫瘍に対して, in vitro でウシ肝抽出液の遠心分画上清の alcoholic fraction に制癌作用のあること, さらに肝抽出物を分析するなかで hexose が肝抽出物と同じ抗腫瘍性を持つていることをたしかめた。

寺山, 大塚³⁵⁻³⁷⁾ によれば成熟動物体内の細胞分裂が各組織により, その度合がことなり, かつ無制限のものでないことに留意し, 個体の中に一種の homeostatic control を想定し, 癌細胞は個体内におけるこの control 制癌機構に不感受性が生じたものではないかと考えた。その生体内制癌機構のくわいを生化学的に把握することをめざして, 正常肝, 再生肝, 肝癌 (AH-414) を用いていくつかの実験を行なつている。正常肝 homogenate の可溶性上清分画が, ラットの腹水肝癌細胞の DNA 合成を著しく

阻害することをみとめた。この阻害物質は耐熱性をもたず, 長時間透析すれば失活し, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ などで活性化する蛋白結合体と考えた。寺山によればこの DNA 合成阻害物質の本態は arginase ではないかと考え, 一方大塚は, 磷酸化過程を直接的に阻害する物質の存在を考えている。

勝田等³²⁻³⁴⁾ はラット肝浸出液, ウシ肝浸出液, 鶏胚浸出液, さらに肝癌細胞自身の浸出液が, ラット腹水肝癌細胞の培養下の増殖には不効か, むしろ成長阻害的であることを報告している。これ等成長阻害物質を追究すると, それは高分子側にも低分子側にも存在するが, 低分子の阻害物質は, 耐熱, 耐酸, 耐アルカリ, エタノール可溶性, クロロホルム・メタノール (1:1) 可溶性の物質であるとしている。

これ等いくつかの生体組織からの抽出物質が示す特性は, 我々の抽出した cornin とは全く異なつている。しかし, 生体物質が持つこれ等の細胞分裂の制癌作用が制癌への糸口につながるものではなからうか。

Cornin の制癌効果に関しては, C₃H 系マウスの乳癌細胞を Zb 系マウスの皮下に移植し, 家兎骨格筋 cornin を腹腔に接種することにより, 腫瘍の発育がある程度抑制されること, ならびに Ehrlich 腹水腫瘍を移植した ddN 系マウスは家兎骨格筋 cornin を腹腔に投与することにより延命, さらに治癒も期待出来ることを知つた。同じ Ehrlich 腹水腫瘍に対してイヌの小腸平滑筋 cornin は家兎骨格筋 cornin の抑制効果よりも強いことが判つた。

Ehrlich 腹水腫瘍の組織培養株である JTC-11 に対しては, イヌ, ウシ, ブタの各小腸平滑筋 cornin の抑制効果はイヌのものが最もよく, これ等の結果は動物実験における結果ともかなりよく一致している。

癌培養細胞株に対する増殖抑制効果よりただちに生体での抗癌性を云々することは, かなりの危険をとまなう。Willmer³⁸⁾ は培養に際して起る「適応」の性質について, 細胞の生物学的特徴の変化による新しい環境への適応, 細胞の選択淘汰, 及び遺伝子の突然変異, の三つが起る可能性があるとしている。従つてこの実験の中で行なつたように, 組織培養及び動物腹腔と全く異なつた環境下で同じ細胞として扱うとき, それぞれの環境で長期にわたつて継代維持されていればいるほど, 細胞の性質の変化, 差違が大きくなると考えられる。それゆえ, 我々は

培養下における実験にひきつづいて動物実験を行なうさい、腹水腫瘍を培養細胞に求めた。即ち、JTC-11 として 2,020 日間、試験管内を通つた細胞を動物腹腔に復元接種し、体重増加、存命日数などが安定してから、その腹水腫瘍を実験に供した。このようにすることにより *in vivo*, *in vitro* の結果を類似のものとして考えることが出来よう。

組織培養下では、免疫機構の加わる余地はあまりないが、これ等異種の物質を動物体に投与する場合抗原性を考えなければならない。この実験では、凝集反応の内でも最も敏感と考えられている Kabat の方法を用いた。その結果、家兎骨格筋 cornin⁹⁾ にも又イヌ小腸平滑筋 cornin にも抗原性はみとめられなかつた。しかし、家兎骨格筋 cornin には、その生理学的作用と考えられる低血圧発作による、諸症状発現があることが判つている。イヌ小腸平滑筋 cornin のマウス腹腔内投与にさいしても、家兎骨格筋 cornin の場合と似た動作の鈍化、うずくまり等の症状が現われるが、はるかに軽微で回復も早い。なお、マウスに対しては、家兎骨格筋 cornin の LD₅₀ は 3,250mg/kg であり、イヌ小腸平滑筋 cornin では 9,000mg/kg の腹腔内同時投与においても死亡例はなかつた⁸⁾。

さて、我々は先の報告のなかで、イヌ小腸 cornin が培養下でハムスターの fibrosarcoma cell に対して現わす効果及びハムスターとヒトの embryonic cell に対して示す効果の差違より、cornin の正常細胞と腫瘍細胞との選択性といったものを考えていた⁷⁾。しかし、この実験に示したように、ラットの肝由来の三種類の細胞に対して示したイヌ小腸平滑筋 cornin 及び同じ系のラットの肝臓 cornin の影響は全く逆の結果であつた。即ち、RLM-1 は、*in vitro* で考え得る正常性をもつた細胞であり、RLN-10 は腫瘍への移行型であり、C84-BT は明らかに腫瘍細胞である。これ等の細胞に示したラットの肝臓 cornin の作用は、RLM-1, RLN-10 に対しては細胞を死滅させる程強力なものであつたが、C84-BT に対して全くといってよい程、影響はなかつた。この事実はイヌ小腸 cornin についても同様であつた。以上見

てきたように、cornin、主にイヌ小腸 cornin の腫瘍細胞に対する作用は、ハムスターの fibrosarcoma 及び Ehrlich 腹水腫瘍に対しては抑制的に働き、ラット DAB 腹水肝癌に対してはほとんど影響を与えない。したがって、ここでは cornin を得る材料としての動物の種類ならびに臓器の問題と合せて、腫瘍の側もこれ等を一元的にとり上げないで腫瘍細胞の多様性を考えに入れた癌スペクトラムを想定し cornin の効果の位置づけ、ひいては作用機序の解明をはからねばならないであろう。

結 論

1) JTC-11 に対する細胞分裂抑制効果は、ウシ、イヌ、ブタの小腸平滑筋より抽出した cornin のうちでは、イヌより得たものが最も強く、濃度とほぼ平行関係がみとめられた。

2) Collodion bag を用いた透析法で得た、各動物の小腸平滑筋 cornin の、透析分画及び非透析分画とともに、JTC-11 の細胞増殖に対する抑制効果は僅かであり、差もみとめられない。

3) 動物実験において Ehrlich 腹水腫瘍に対する制癌効果は、ウシ、イヌ、ブタの小腸平滑筋 cornin の内では、イヌより得たものが最も強く、治癒例もみとめた。

4) イヌ小腸平滑筋 cornin の抗原性は、タンニン酸処理ヒツジ血球を用いた凝集反応では無視できる。

5) ラット肝臓 cornin は *in vitro* において、ラットの肝臓由来の短期培養細胞及び長期培養細胞に対しては著明な細胞増殖抑制効果を示すが、DAB 腹水肝癌由来の細胞に対してはほとんど影響はみとめられなかつた。また、イヌ小腸平滑筋 cornin の影響も、これ等の細胞に対しては同じ傾向を示した。

稿を終るに当たり、組織培養に関して終始御教示、御援助を頂いた佐藤二郎教授をはじめ岡大癌研病理部の皆様に感謝いたします。

文

- 1) Nisida, I., Murakami, T. H.: Acta Med. Okayama, 19, 1, 1965.
- 2) Nisida, I., et al.: Symposia Cell. Chem., 14,

献

- 57, 1964. (in Japanese)
- 3) Nisida, I., et al.: Symposia Cell. Chem., 15, 225, 1965. (in Japanese)

- 4) Terasaka, T.: *Okayama-Igakkai-Zasshi*, 79, 733, 1967. (in Japanese)
- 5) Ohya, T.: *Acta Med. Okayama*, 21, 227, 1967.
- 6) Harada, H.: *Okayama-Igakkai-Zasshi*, 79, 89, 1967. (in Japanese)
- 7) Nisida, I., et al.: *Symposia Cell. Chem.*, 17, 207, 1966. (in Japanese)
- 8) unpublished data.
- 9) Hamasaki, M.: *Okayama-Igakkai-Zasshi*, 76, 1, 1964. (in Japanese)
- 10) Katsuta, H., et al.: *Japan. J. Exp. Med.*, 24, 125, 1954.
- 11) Kabat, E. A., Mayer, M. M.: *Experimental Immunochimistry*, 2nd Edition, Charles C. Thomas, Pub. Springfield, 1964.
- 12) Katsuta, H., Takaoka, T.: *Japan. J. Exp. Med.*, 33, 265, 1963.
- 13) Sato, J. et al.: *Japan. J. Exp. Med.*, 38, 105, 1968.
- 14) to be published.
- 15) Parshley, M. S.: *Cancer Res.*, 25, 387, 1965.
- 16) Szent-Györgyi, A. A. et al.: *Biochemistry*, 48, 1429, 1962.
- 17) Szent-Györgyi, A. A. et al.: *Science*, 142, 1571, 1963.
- 18) Szent-Györgyi, A. A. et al.: *Science*, 140, 1391, 1963.
- 19) Szent-Györgyi, A. A. et al.: *Biochemistry*, 55, 389, 1966.
- 20) Kidd, J. G.: *J. Exp. Med.*, 93, 565, 1953.
- 21) Kidd, J. G.: *J. Exp. Med.*, 98, 583, 1953.
- 22) Herbut, P. A., Kraemer, W. H.: *Am. J. Path.*, 36, 105, 1960.
- 23) Broome, J. D.: *J. Exp. Med.*, 121, 597, 1966.
- 24) Chikata, E., et al.: *Acta Med. Okayama*, 21, 109, 1967.
- 25) Ledoux, L.: *Nature*, 176, 36, 1955.
- 26) Haddow, A., et al.: *Nature*, 182, 1144, 1958.
- 27) Jakson, E. B., et al.: *J. Exp. Med.*, 72, 423, 1940.
- 28) Druckrey, H., et al.: *Z. Krebsforsch.*, 63, 28, 1959.
- 29) Nakahara, W., and Fukuoka, F.: *GANN*, 52, 197, 1961.
- 30) Hozumi, M., et al.: *GANN*, 54, 281, 1963.
- 31) Tsuda, M., et al.: *GANN*, 56, 69, 1965.
- 32) Hori, M., et al.: *J. Biochem.*, 51, 322, 1962.
- 33) Katsuta, H., and Takaoka, T.: *Symposia Cell Chem.*, 10, 91, 1960. (in Japanese)
- 34) Suzuki, S.: *Japan. J. Exp. Med.*, 29, 341, 1959.
- 35) Terayama, H., and Otsuka, H.: *Biochim. Biophys. Acta.*, 123, 274, 1966.
- 36) Terayama, H.: *Bulletin de la Societe Franco-Japonaise de Biologie*, 32, 9, 1966.
- 37) Otsuka, H.: *J. Jap. Biochem. Soc.*, 40, 431, 1968.
- 38) Willmer, E. N.: *Cells and Tissues in Culture*, Academic Press. London, 1965.

Legends

- Photo. 1: Monolayer cultured JTC-II cell strain. Control cells without cornin: 4 days after inoculation, (vid. Fig. 1 and 2).
- Photo. 2: Same cells in medium containing 1% of CIC from 2 days before fixation. (vid. Fig. 1 and 2).
- Photo. 3: Monolayer cultured RLM cell strain. 6 day old culture. Control cells without cornin. (vid. Fig. 9).
- Photo. 4: Experimental cells in medium containing 1% of RLC from 2 days before fixation. (vid. Fig. 9).

**Antimitotic Action of the Cornin, as a Biologically
Active Polypeptide (IV)**

By

Katsuhiko KIMOTO, Takashi FUJITA, Yoshiji KOBAYASHI
Seiichiro TAKAHASHI, Yoshinobu FUJII, Toshisuke YAMADA
Yoshiko CHIKATA, Hisashi OHTSUKI, Tetuhide H. MURAKAMI
and Isamu NISIDA

Department of Physiology, Okayama University Medical School, Okayama.

The difference of the effect of cornins extracted from various kinds of living tissues was examined by employing several cell lines *in vitro*. And the inhibitory effect on tumor growth of the cornins was tested on the mice transplanted with Ehrlich ascites carcinoma. The results are as follows:

1) The antimitotic effect of canine intestine cornin (CIC) was more effective on Ehrlich ascites carcinoma cells *in vitro* (JTC-11) than that of bovine intestine cornin (BIC) and that of porcine intestine cornin (PIC).

2) Dialysable fraction, undialysable fraction and crude of CIC showed similar activities on the JTC-11 cell line.

3) The antigenicity of CIC was not proved by the hemagglutination test and no mice injected intraperitoneally with large doses of CIC showed any intoxication and disturbance.

4) The inhibitory effect of CIC on tumor growth was the strongest in the three kinds of the intestine cornins with Ehrlich ascites carcinoma and some of tumor-bearing mice were cured completely by the intraperitoneal injections of CIC.

5) The cornin extracted from liver of normal rats (RLC) had marked inhibitory effect on the cell growth of the short-term cultured cell line (RLM-1) and the long-term cultured cell line (RLN-10) originated from normal rat liver, but no effect was observed on the cell line in culture which came from the DAB ascites hepatoma of the same line rat.

木本外9名論文附図

