The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	放射線照射家兎肝より得た不飽和脂肪酸分画物質(OX物質)のBrown-Pearce腹水細胞に及ぼす影響について
Author(s)	信木, 茂生
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1964, 23(10), p. 1136-1144
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/20763
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

放射線照射家兎肝より得た不飽和脂肪酸分画物質（OX 物質）の Brown-Pearce 腹水細胞に及ぼす影響について

岡山大学医学部放射線医学教室（主任 武田俊光教授）
信 木 茂 生

（昭和38年11月4日受付）

The Effect of Unsatuated Fatty Acid Fraction (OX Substance) from the Liver of X-Ray irradiated Rabbits on Brown-Pearce Ascites Cells

By

Shigeo Nobuki

Department of Radiology, School of Medicine Okayama University, Okayama, Japan
(Director: Prof. Toshimitu Takeda)

Tissue culture was practised to ascites cells obtained from rabbits which Brown-Pearce tumors were transplanted.

OX_0 and OX_1 graduated from OX substance by low temperature separated method, were arranged to treat on these cultured cells, by changing the method of solution and concentration.

The results were as follows:

1) In OX_0, disturbance has been found to be more powerful than in OX_1.

2) The higher the concentration rose the shorter the time of cell-destruction.

3) Littel defference could be seen on cells when changing the method of solution.

4) Both OX_0 and OX_1 was found to be capable of causing changes in nuclei acid metabolism and nuclei acid synthesis.

5) The destruction of cells were found to appear in OX_0 and OX_1. As related, OX_0 and OX_1 graduated from OX subsutance by low temperature separated method, possess the characters of anticancerous action.

緒 言

癌に対する外科的治療はそれが局所に限局せる時換言すれば局所的疾患と考えられる早期癌のみに企てられるもので遠隔転移を起した末期癌にはその根治療法はできない放射線治療も今日の所広範な転移を惹起したものには僅かに対症的療法を行うに過ぎない．そこで近年は全身的疾患たる癌腫に対し化学療法が抬頭してきた．

1946年 Rhoads[1]が nitrogen mastard が白血病に有効であり，癌患者にも効力があると発表して以来，数十種以上に及ぶ抗癌剤が発表された．之からみても現代医術が如何に抗癌剤を欲しているかがわかり又未だその完璧なるものの出来ていない事がしられる．

これらの薬剤の副作用は癌に対して有効なもの程強いという事が治療上に大きな障碍となっている.

我々の教室では放射線障碍の本態を追求し[2~7]ている間に催貧血物質と考えられる燐脂質と睾丸細胞，腫瘍細胞のみに撰択的に作用する特異の二重結合を有する不飽和脂肪酸分画物質（以下略してOXと云う）を見出した.

燐脂質については教室の山本，赤木[8~10]が家兎を用い血液毒であり，骨髄にも変化を与える事を証明している，不飽和脂肪酸分画については実験的腫瘍を用いその抗腫瘍性に就いては幾多の実験がなされている[11)12)]．之が現在迄の抗癌剤と異なる所は抗腫瘍性を有するが骨髄機能には何等障碍を及ぼさないという特長が明らかされれている，之はその分画過程に於いて血液毒である燐脂質を容易に除き得るためである.

第一編では粗製のOXを低温分離したものについて，吉田肉腫腹水細胞を用い細胞数の減少，分裂期の変動，DNA合成阻害等を時間的に追求したが，今回はこれを培養せるBrown-Pearce腫瘍腹水細胞に作用させ形態的変化を観察することにした.

実験方法

1） 実験に供した腫瘍細胞は，我々の教室で数代にわたつて移植を続けて来たBrown-Pearce腫瘍で移植家兎に腹水の貯溜をきたし，この腹水中に腫瘍細胞を多数に認められるようになつてきた．この腹水を採取し，他の健康家兎の耳側静脈に注入すると全身に血行性広範の病巣を作り，腹腔内に注入すれば癌性腹膜炎と同様となり，又睾丸に注入すれば後腹膜リンパ節，腎臓，肝臓次いで全身に病巣を形成し大網等の転移巣を作り再び腹水の貯溜をきたすのである．この腹水は採集後は速かに凝集し細胞は分離しにくくなるので少量のヘパリンを入れた注射筒で採取し，馬血清，チヨコラB鉄を含むYLE液を入れたTD-15培養管に入れ培養し，数代を経たものである.

2） 放射線全身照射家兎の肝ホモジネートからアルコール・アセトン・石油エーテル・酢酸鉛等を用い，妹尾・山本[13)]の方法に従い，不飽和脂肪酸分画を採取し，更にこれを低温分離法にて分離を行ない−60°Cにて油状部分をOX_0結晶部分をOX_1と仮称した．その各々についてイ）Na基をつけ溶解し易くした鹸化法とロ）Tween 80を用い，ホモゲナイザーを使用しコロイド状にした二つの異なった溶解法を用いこれを培地中に添加混和し細胞に接触させた.

3） 観察方法

オリンパス製倒立顕微鏡を用い，載物台は保温出来るようプラスチック製のケース中に装置しサーモスタット付き保温器を使用し長時間の観察に耐えるようにした．TD管内での変化は35mm，ASA 100のFuji Neopan ssを用い経時的に位相差写真で，他方では30秒に1駒づつ送りが出来る様に考案されたBollex 16mm撮影機で，連続的に観察出来るように撮影し，この写真をもとに形態的変化をみることにした.

実験結果

1） OX_0 鹸化液　稀釈度　×2000

実験液投入前の細胞は四方に足を延ばした明瞭なものであるが，接触後1時間で細胞は崩壊されbubblingが見られ細胞は球形・不整形となり空泡の明瞭に見える部，blista形成のみられる部があり細胞の崩壊が著明である.

2） OX_0 鹸化液　稀釈度　×3000

投入後1時間細胞は稍短縮丸味を帯びてくる．3時間後，空泡が細胞質内に見られるものあり，その後次第に脂肪顆粒の増加が見られてくる．11時間，12時間では空泡の増加が著明で核をとりまいて細胞質のみえないものもある．脂肪顆粒も益々増加し，一部の細胞にはbubblingが見られるがblistaの形成にまでは至らない.

3） OX_0 コロイド液，稀釈度，×2000

接触後20分で，既に細胞の短縮bubbling.blista形成が見られ，核は明瞭に見られるが脂肪顆粒の著明な増加は見られない．1時間後にはblista形成も著明，細胞核は浮かび出たように明瞭となつている．一部の核膜は凹凸不整になつてみられる，2時間30分後にはblistaが見られた部で完全な細胞崩壊が見られ，他の部分でも顆粒空泡の増加が見られ特に細胞核の明瞭化が目立つてい

る．

4）OX_0 コロイド液，稀釈度　×3000

1時間後既に脂肪顆粒が増加している．3時間後細胞は全体に円味を帯びており bubbling と一部には blista が見られ，核膜が明瞭になってきた．4時間後には blista が殆んど全細胞に見られる，核膜は益々明瞭に見られる，7時間を経ると空泡形成，脂肪顆粒が目立つて増し blista も見られ細胞の崩壊も著るしい．

5）OX_1 鹸化液，稀釈度　×2000

1時間後，細胞の辺縁の不整が見られbubblingが少しづつ見られるようになる．90分後大小の顆粒が著明に増加し，2時間後この顆粒がなくなると同時に核膜が明瞭となり blista の形成が見られてくる．細胞は全体円く脂肪顆粒も多い．3時間後全細胞に blista が出現し，核が浮び上つた如く見られ細胞の崩壊が見られる，6時間後には崩壊は更に進み，8時間後には細胞質を伴わない核のみの集合の如く一塊となつてみられる．

6）OX_1 鹸化液　稀釈度　×3000

1時間後細胞は多少円味を帯びる，2時間後には更に短かい短紡錘形となつて脂肪顆粒の増加が見られる．3時間後更に円くなつておりbubblingも見られる，細胞は膨化した如く見られ，核膜の明瞭化は見られず核はどちらかと云えば不鮮明である，一部にblistaが見られる．5時間後blistaが全視野に見られ脂肪顆粒が増し，原形質は大きな顆粒状となり細胞は縞模様を呈し崩壊している．

7）OX_1 コロイド液稀釈度×2000

1時間後細胞は短くなり全体に円味を帯びてくる，一部の細胞はblista を形成し崩壊に迄すすんでいる．核膜の明瞭化も目立ち90分後には blista 形成がみられ細胞の崩壊を伴い之等は凝集してくる感じである．2時間後には全く細胞は崩壊し凝集し一塊となつてしまつたが，全過程中には脂肪顆粒の増加とか空泡形成は見られなかった．

8）OX_1 コロイド液，稀釈度　×3000

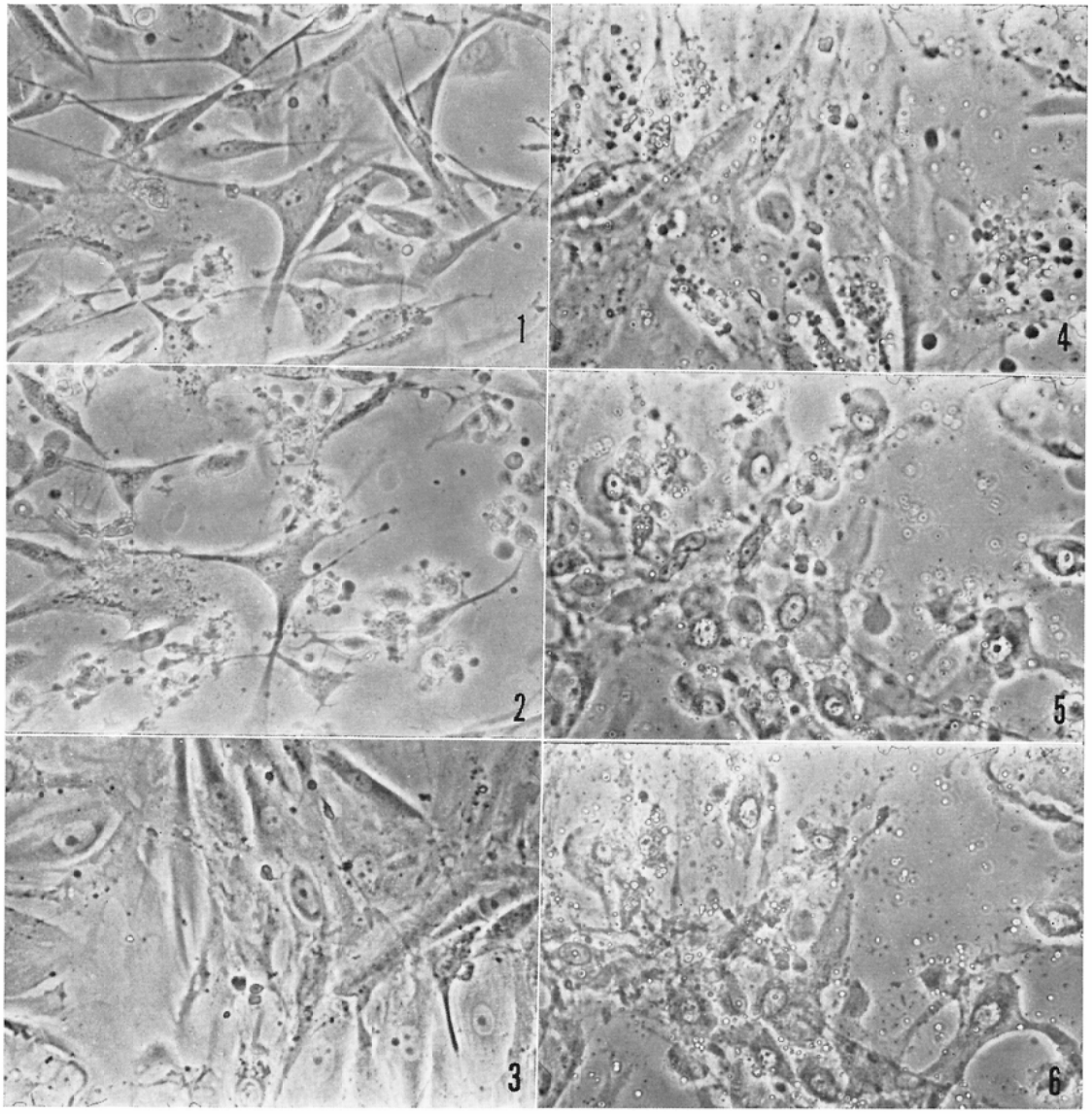
1時間後四方に伸びていた細胞は短かくなつてくる，脂肪顆粒の増加空泡形成が見られる．2時間後細胞は更に短かくなってくる，核膜も明瞭となつてくる．3時間後空泡と顆粒の形成が見られる，一部にbubblingが見られ，4時間後にはblistaが形成され，大きな空泡を持つた細胞が原形と全然異なった球形となってみられる，5時間後blistaの形成が強く4時間後には細胞の動きが全くとまり死亡崩壊せるものと考えられる．

考　察

制癌剤の screening test について 昭和32年吉

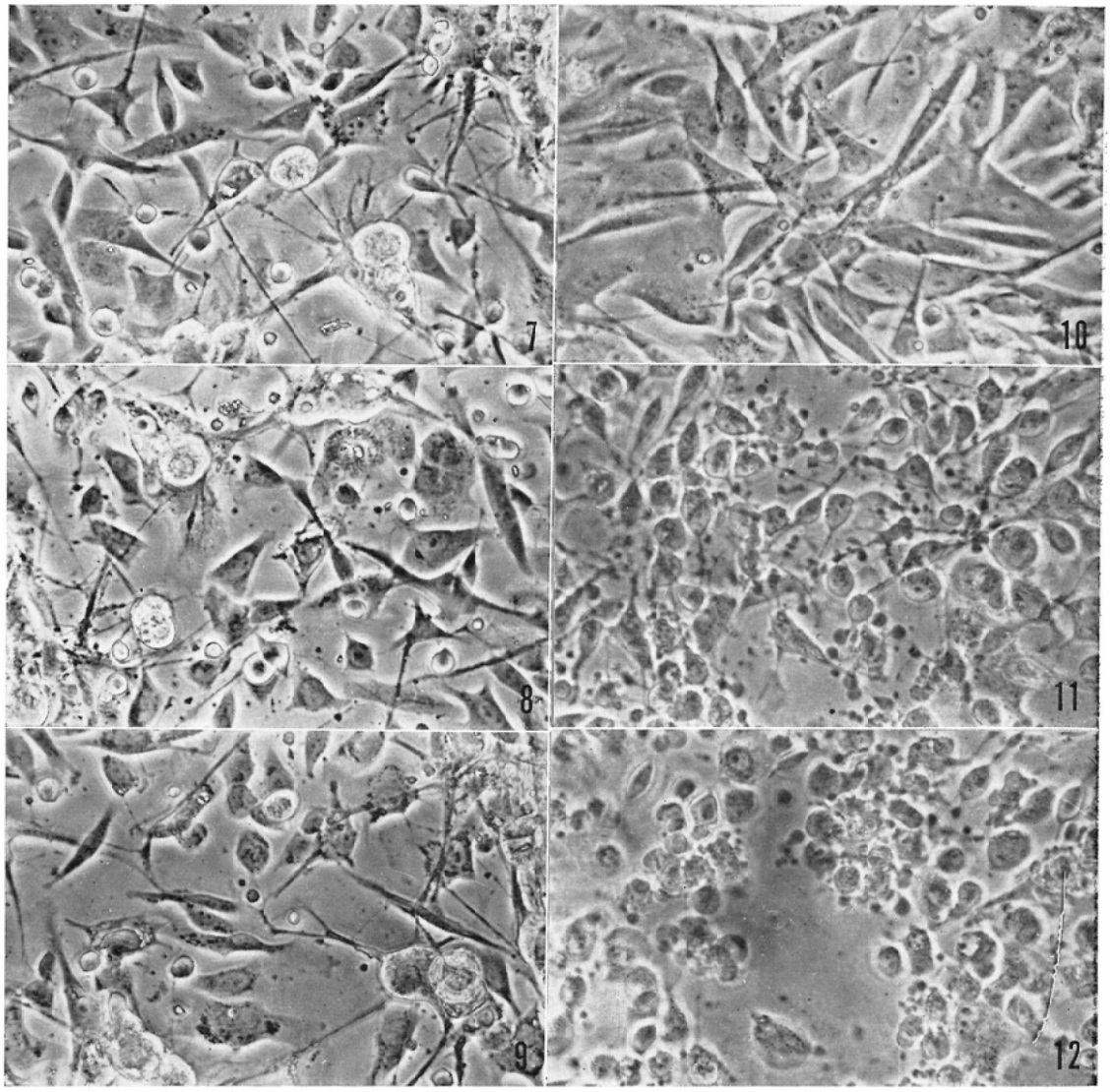
附図1　OXの類，溶種解法と細胞変化出現に要する時間の関係

濃度・溶解方法	細胞・核の変化 / OXの種類	空泡　形成	脂肪　顆粒	bubbling	blista 形成	核の変化
鹸化液	OX_0	1 hr (＋) ～		1 hr (卌) ～	1 hr (卌) ～	核崩壊 1 hr～
×2000	OX_1	8 hr (－)	8 hr (－)	2 hr (＋) ～	2 hr (＋) 3 hr (卌)	核色質融合像 2 hr (＋) ～　3 hr (卄)
鹸化液	OX_0	6 hr (＋) ～	3 hr (＋) ～12hr (卄)	3 hr (±) ～12hr (卄)	12hr (－) ～	核壁核色質増多 1 hr (±) 核質融出　1 hr (±)
×3000	OX_1	5 hr (＋) ～	3 hr (＋) ～	3 hr (卄) ～	3 hr (＋)	核壁核色質増多 5 hr (＋) 核崩壊像　5 hr (＋)
コロイド液	OX_0	2 hr (＋) ～$2^1/_2$hr(卄)	$2^1/_2$hr (－)	$^1/_3$hr (卄) ～	$^1/_3$hr (卄) ～	核膜・核仁の明瞭化$^1/_3$hr(＋) 核色質融合像 1 hr (＋)
×2000	OX_1	1 hr (±) ～	$2^1/_2$hr (－)	1 hr (＋) ～	1 hr (＋) $1^1/_2$hr (卌)	核膨化・核崩壊・核破片 $1^1/_2$hr (＋)
コロイド液	OX_0	4 hr (±) ～7 hr (＋)	1 hr (＋) ～	1 hr (＋) ～3 hr (卄)	3 hr (卄) ～4 hr (卌)	核色質融合像 3 hr (＋) 核仁明瞭化 3 hr (＋) 核質融出 7 hr (＋)
×3000	OX_1	1 hr (±) ～3 hr (卄)	1 hr (±) 3 hr (＋)	2 hr (＋) ～	3 hr (＋) ～4 hr (卄)	核壁核色質増多 2 hr (＋) ～3 hr (卄)



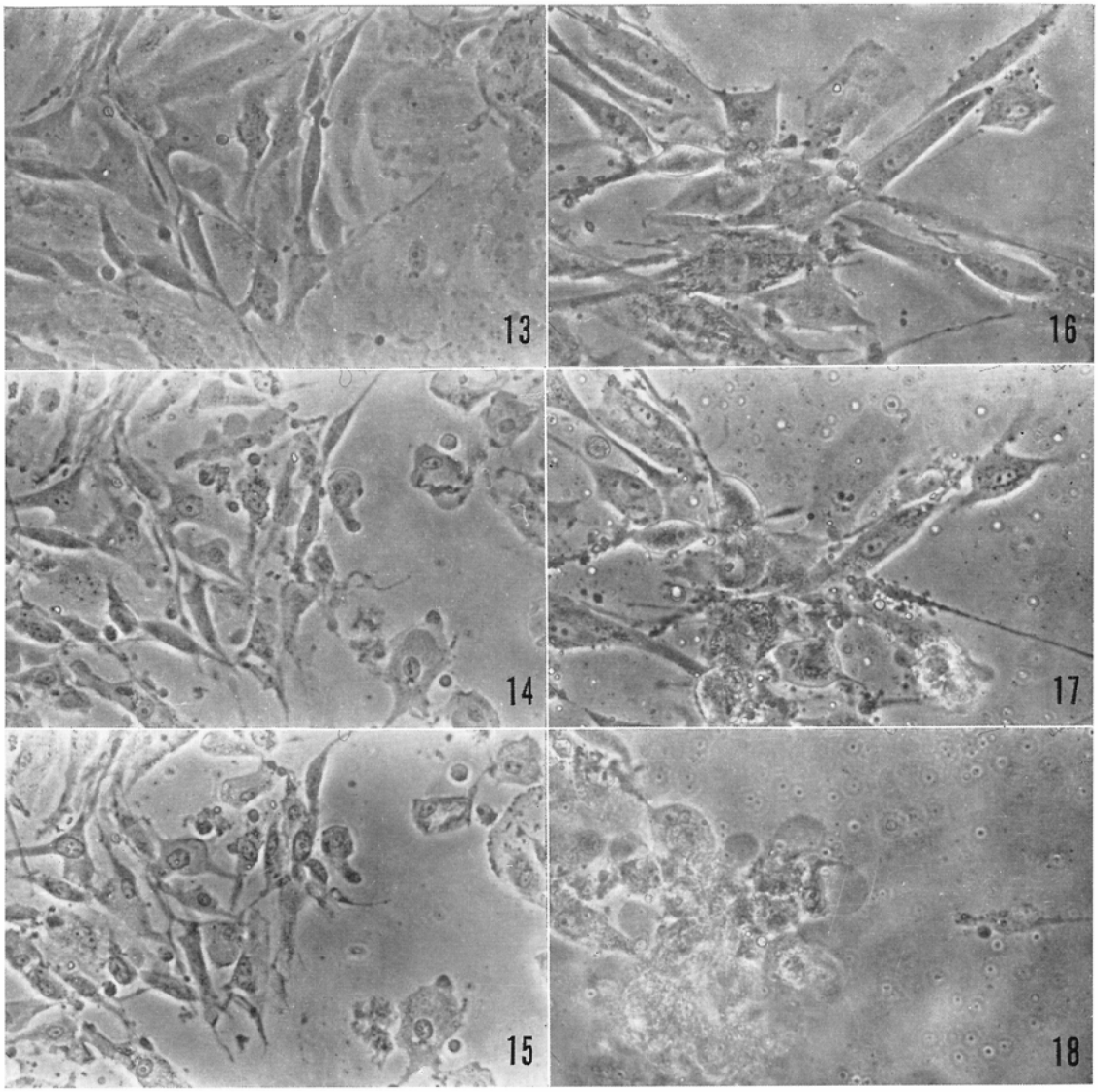
附　図　2

Fig. 1. OX_0 鹸化液×2000 作用前
Fig. 2. 〃 〃 作用後1時間
Fig. 3. OX_1 鹸化液×2000 作用前
Fig. 4. 〃 〃 作用後1時間半
Fig. 5. 〃 〃 〃 3時間
Fig. 6. 〃 〃 〃 8時間



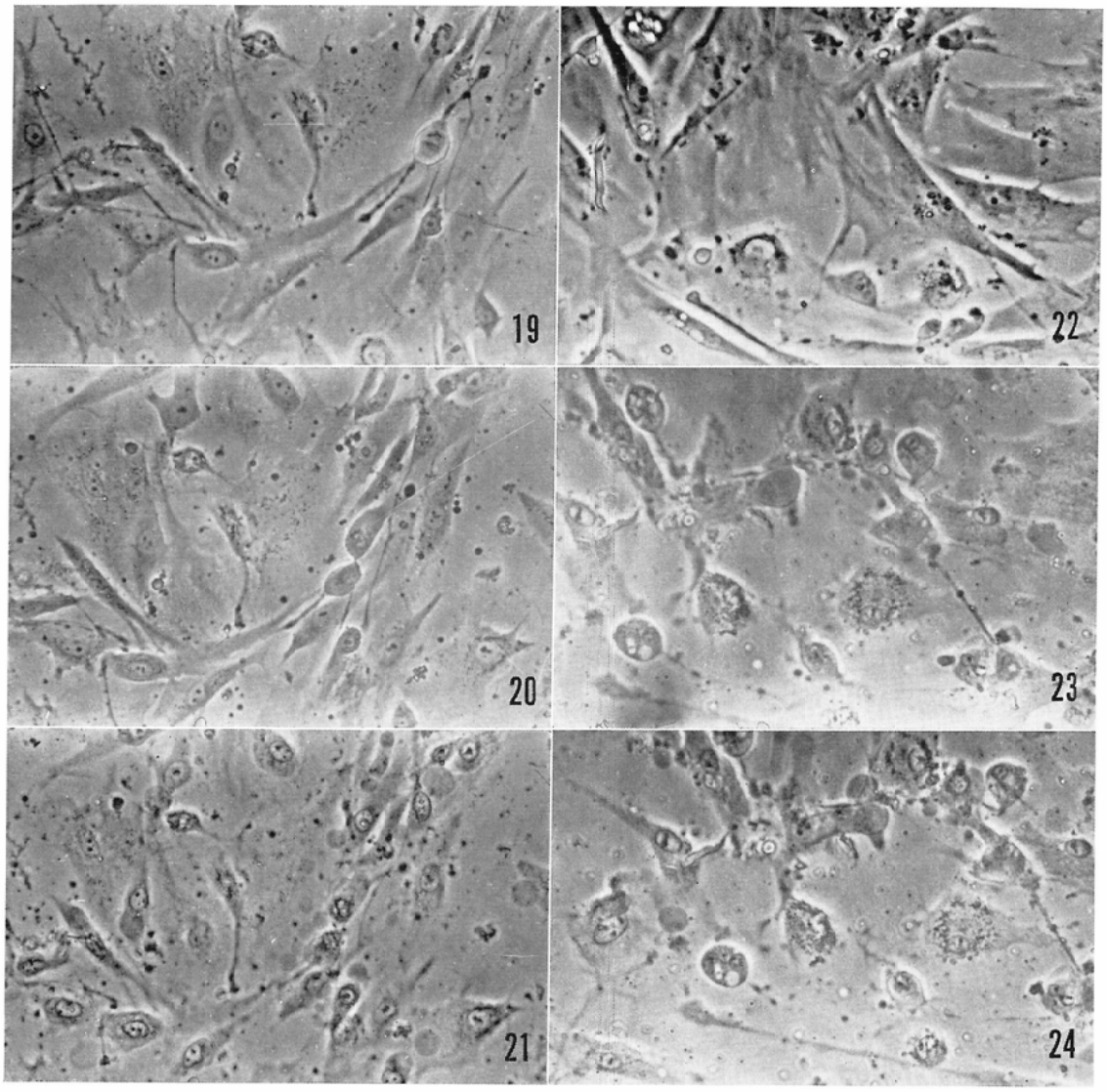
附　図　3

Fig. 7.　OX_0 鹸化液×3000　作用前
Fig. 8.　〃　〃　作用後1時間
Fig. 9.　〃　〃　作用後12時間
Fig. 10.　OX_1 鹸化液×3000　作用前
Fig. 11.　〃　〃　作用後3時間半
Fig. 12.　〃　〃　作用後7時間



附　図　4

Fig. 13. OX_0 コロイド液×2000 作用前
Fig. 14. 〃 〃 作用後20分
Fig. 15. 〃 〃 作用後2時間半
Fig. 16. OX_1 コロイド液×2000 作用前
Fig. 17. 〃 〃 作用後1時間
Fig. 18. 〃 〃 作用後2時間半



附　図　5

Fig. 19.　OX_0 コロイド液×3000　作用前
Fig. 20.　〃　〃　作用後1時間
Fig. 21.　〃　〃　作用後6時間
Fig. 22.　OX_1 コロイド液×3000　作用前
Fig. 23.　〃　〃　作用後3時間
Fig. 24.　〃　〃　作用後4時間

田[14]は1) screening test の結果或る物質を有効だと判定するためには少くとも或る一つの腫瘍について確実な特殊な細胞効果が認められねばならない2)適当量与えれば，その腫瘍を持つ動物の治癒又は生命の延長の効果を伴なわなければならない．3)投与方法を変更し，又腫瘍の形をかえて効果を確認しさらに該物質の一般毒性の検討を行う．と screening testに就いて総括しており，今日迄この線に従って種々の薬品は試験されてきたがOX物質も腫瘍に対する効果を見出した1958年以来種々の検査が行なわれており，上記吉田のかかげる条件に適応することが次々に見出されている教室の谷本[15][16]は吉田肉腫腹水細胞を用いて細胞数の減少・核分裂期の変動を調べ，更にBrown-Pearce 腫瘍移植家兎について延命効果と腫瘍の発育抑制を見ている．伊丹[17]は Ehrlich癌腹水細胞を用いて DNA合成阻害・細胞数減少・核分裂阻止の現象をみている．井口[18][19]は吉田肉腫を大腿に移植し，腫瘤を作り局所的作用を見，コハク酸脱水素酵素活性の低下，DNA の変化を見ている．人癌細胞由来の Hela 細胞を用い癌研稲葉[20]は細胞の増殖阻害を見，それを生化学的に追求し酸化的リン酸化障害だと報告しており，形態的変化を見ると分裂増殖は阻止され作用後核周辺に脂肪顆粒が増加し blista を形成し細胞機能を停止するという．又ウニ卵に就いて[21]実験しており分裂中期に特に強く作用し分裂を阻止する．NF肉腫を用いての発育抑制率実験では50%以上を，肉腫 180については50%を示めしたという．これらの実験より制癌性に就いては OX 物質は有効なものであると考える．更にEagle[22]は移植腫瘍および臨床的に効果ある薬品は組織培養によつても効果を示すといつている．前記の Hela 細胞による報告更に今回私の行なつた実験で有効なものであると考える．即ち私の使用したOX_0. OX_1 はその溶解方法濃度を変えても実験に供された Brown-Pearce腹水細胞に種々の変化を起し得た．又その作用は濃度の上昇で強くなり細胞の破壊に要する時間も短縮された．

その変化を大別してみると．

1) 高濃度では急激な bubbling を見，核は裸出した如く明瞭となり blitsa を急激に短時間に形成する．

2) 細胞質中に顆粒が急増し目立つてくると同時に bubbling を起し，顆粒が核周囲に集合すると同時に blista形成が見られ細胞は崩壊する．

3) 低濃度では細胞質中に大小の顆粒が増加し，核の周囲に集まり，核膜は明瞭に見られるようになり，核仁も浮上つた如く見られる，その後次第に空泡が増し bubbling, blista 形成えと移行している．

4) 核仁にまず変化が明瞭に見られる．次いで大小顆粒が細胞質中に著明に見られ，それが blista 形成と同時に見られなくなる．

以上の如き種々の変化をしめすが，いずれにしても blista 形成をし細胞機能が停止する．これらの変化はコロイド液と鹼化液とで差は殆んどない，又OX_0 が OX_1 より多少強く作用するようであり特徴の有る崩壊像は示さないで濃度による差が一番大きい．

培養した細胞に与える変化に就いて他の薬品との差を調べてみたが mitomycin C を用いた牧野[23]の報告を見ると仁及び仁附近の染色質にまず変化が起り，次いで核の変性，崩壊が続き，その崩壊物が細胞質中に流れ，その後多数の空泡が細胞中にでき，大小の顆粒が散在性に見られbubblingが起り細胞全体の崩壊が認められると云う．OX 物質では核の崩壊迄はみられないが核に変化が興えられる事は間違いなく核の様子はOX 物質作用後から著明に変つてくる事でもしられる．その後の空泡の増加顆粒の増加 bubbling blista 形成といつた過程には大差はないようであるがこれを生化学的に調べた諸家[24]~[27]の実験でみると下記の如く大差のあるのに気がつく．mitomycim C に就いてみると Ehrlicn 癌腹水細胞の解糖作用を抑制阻害し，乳酸産生を抑制するという，大腸菌にて DNA合成の阻害をみており，蛋白合成阻害はなくコハク酸脱水素酵素活性にも影響を与えないといわれ，癌細胞の核酸代謝を抑え，DNA 生合成阻害が癌細胞の分裂能を抑えると考えられている．OX物質では癌細胞の呼吸阻害がある．しかしこれも Lehninger[28] Weinhouse[29] が炭素鎖の短い脂

肪酸が癌の酸化能を低下させるのは癌の細胞膜の透過性が亢進し，これらの濃度が高くなりすぎて呼吸阻害を起すからだと云うが，そのような簡単な機構でOX物質の作用は説明されないように思われる．又解糖に就いては好気的嫌気的何れの条件下でも上昇せしめる．コハク酸脱水素酵素活性の低下，DNA 生合成 RNA 合成 ATP 合成阻害等癌細胞の分裂能を抑える作用機能は大いに興味のあるところである．尚 OX_0 コロイド液稀釈度×3000の写真では丁度分裂期に入つた細胞が見られるが核酸・核蛋白合成に影響が存する如く出来た二つの細胞の核は泡を持つたような不整形のもので核とは云い得ないようなものであり生活力もなくすぐ崩壊している像がみられる．之等のことからも核代謝に作用する事がうかがわれる．

結　論

Brown-Pearce 腫瘍移植家兎より得た腹水細胞を継代培養し，この細胞に粗製 OX 物質を低温分離法によつて得た OX_0 OX_1 を溶解法及び濃度を変えて作用せしめ，次の結果を得た．

1) OX_0 が OX_1 に比して多少作用が強いようである．
2) 濃度が上昇する程，細胞崩壊に要する時間は短縮される．
3) 溶解法の差は細胞に対して余り著明ではない．
4) 細胞分裂時に作用し，不完全な核を有する細胞が現われ，核酸合成等核代謝に作用するものと考えられる．
5) OX_0. OX_1 のいずれも細胞の崩壊を起し得る．

以上の如く粗製 OX 物質より低温分離された OX_0 OX_1 は更に強い抗腫瘍性を有するものと考える．

（稿を終るに当り御指導御校閲を頂いた恩師武田教授に深甚の謝意を表すると共に多大の御鞭撻御教示を頂いた癌研山本教授・内海助教授に深甚の謝意を表す．）

文　献

1) Rhoads. C.P.: J. Am. Med. Ass. 131, 656, 1946. —2) 山本他：38回日本法医学会総会，昭和29年5月. —3) 山本他：岡山医学雑誌，69, 103, 1957. —4) 西下：日本医放会誌，18, 1178, 1958. —5) 西下：日本医放会誌，19, 1193, 1958. —6) 橋上：日本医放会誌，18 47, 1958. —7) 橋上：日本医放会誌，19, 1, 1959. —8) M. Yamamoto et al.: Acta Med. Okayama 14, 45, 1960. —9) 赤木：岡山医学雑誌，72, 1261, 1960. —10) 赤木：岡山医学雑誌，72, 1561, 1960. —11) M. Yamamoto et al.: Acta Med. Okayama 14, 68, 1960. —12) M. Yamamoto et al.: Acta. Med. Okayama. 14, 55, 1960. —13) 妹尾：細胞化学シンポジウム，1, 1953. —14) 吉田：癌の化学療法，昭和32年. —15) 谷本：日本医放会誌，20, 33, 1960. —16) 谷本：日本医放会誌，19, 1628, 1959. —17) 伊丹：岡山医学雑誌，72, 951, 1960. —18) 井口：岡山医学雑誌，72, 1269, 1960. —19) 井口：岡山医学雑誌，72, 1555, 1960. —20) 稲葉：日本医放会誌，22, 68, 1962. —21) 上乃：岡山医学雑誌，72, 1, 1960. —22) Eagle: Proc. Am. Assoc. Cancer Research 2, 107, 1956. —23) 牧野：第30回日本医師会設立記念医学大会発表 (1957). —24) 田口：Chemotherapy 5, 223, 1957. —25) 芝他：Chemotherapy 5, 322, 1957. —26) 田口他：癌，Vol. 48, No. 4, 420, 1957. —27) 芝他：Chemotherapy 6 (4)：212, 1958. —28) Lehninger, A.L.: J.Biol. Chem. 161：437, 1945. —29) Weinhouse, S., Allen, A. and Millington, R.H.: Cancer Res., 13：367, 1952.