

Title	エールリッヒ腹水癌細胞の核酸生合成に対するミトマイシンCの作用
Author(s)	紺谷, 日出雄
Citation	大阪大学, 1964, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28770
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	紺谷日出雄 ごん だに ひ で おお
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5 9 6 号
学位授与の日付	昭和 39 年 12 月 1 日
学位授与の要件	医学研究科病理系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	エールリッヒ腹水癌細胞の核酸合成に対する マイトマイシン C の作用
論文審査委員	(主査) 教授 藤野 恒三郎 (副査) 教授 川俣 順一 教授 芝 茂

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

芝・寺脇・田口・川俣は、抗腫瘍性抗生物質マイトマイシン C が、大腸菌 B 株の DNA 合成を極めて特異的に阻害することを報告したが、これはマイトマイシン C の作用機序に関する最初の研究である。しかし、マイトマイシン C 本来の対象である腫瘍細胞については、H. Kersten が、マウス腹水肉腫細胞 (1137) の DNA 量がマイトマイシン C によって減少することを報告し、また、A. J. Shatkin らが培養細胞 (L-929 mouse fibroblast および S-91 mouse melanoma) の DNA がマイトマイシン C によって破壊されることを報告しているのがみられるだけである。

そこで、著者は腫瘍細胞として、比較的性質の知られているエールリッヒ腹水癌を用いて、放射性標識化合物を応用し、生化学的および生物学的な面より、核酸代謝を中心として、マイトマイシン C の作用機序を追求しようとした。

〔方法ならびに成績〕

I 増殖しつつあるエールリッヒ腹水癌細胞の DNA 合成に対するマイトマイシン C の作用

エールリッヒ腹水癌移植 4～5 日目の ddO 雄マウスの腹腔内にマイトマイシン C を投与し、一定時間後に標識化合物を注射し、20 分後にマウスを殺し、直ちに冷却した生理食塩水を注入した後注射器を用いて腹水を取り出し、遠心沈澱して腫瘍細胞を分離した。核酸の抽出は Schneider 法により行ない、DNA は diphenyl amine 反応、RNA は orcinol 反応を用いて定量し、その放射能は gas flow counter を用いて測定した。

- (1) マイトマイシン C 50 μ g/mouse を 3 時間作用させた腫瘍細胞における、 H^3 -thymidine の DNA へのとり込みは、対照の約 38%、6 時間作用させた腫瘍細胞においては、13%にまで減少している。しかし、1 時間作用させた腫瘍細胞においては、このとり込みの減少はほとんどみら

れない。

(2) マイトマイシンC 50 μ g/mouse を3時間作用させた腫瘍細胞における、 H^3 -cytidine のRNA へのとり込みは、対照の85%に減少するにすぎない。

S^{35} -methionine の蛋白へのとり込みは、マイトマイシンCによって殆んど減少しない。

(3) エールリッヒ腹水癌細胞は、in vitro ではほとんど増殖しないが、なお或程度、前駆物質を核酸にとり込む能力をもっている。腹腔内でマイトマイシンCを作用させた細胞を試験管にとり、標識化合物を加えた場合、やはり、 H^3 -thymidine のDNAへのとり込みが減少していることが認められる。

II エールリッヒ腹水癌細胞の分裂周期に対するマイトマイシンCの影響

DNA 合成と細胞の分裂周期との関係、および、それらにおよぼす薬剤の作用をしらべるには、Autoradiography がもっとも適した方法である。

腹腔内でマイトマイシンC 50 μ g/mouse を3時間と6時間作用させた腫瘍細胞に、 H^3 -thymidine をとりこませた後、腹水を毛細管でとり出し、その塗抹標本について、autoradiography を行ない検討した。

(1) マイトマイシンCを作用させた細胞においては、核DNAにとり込まれた H^3 -thymidine に対応する銀粒子の数は、著しく減少している。その粒子数を算定した成績と、DNAを抽出しその放射能を測定した先の成績とはよく一致しており、 H^3 -thymidine のDNAへのとり込みが阻害されていることをあらわしている。

(2) しかし、銀粒子をもっている細胞、すなわちDNA合成を行ないつつある細胞の数をみると、マイトマイシンCを作用させたものと、対照との間には差違を認めない。したがってこのことは、DNA合成期にある細胞1個当りのDNA合成のrateが低下していることを示している。

(3) 腹水の塗抹標本をヘマトキシリン染色し、各2,000個の腫瘍細胞について、分裂細胞をかぞえて有糸分裂指数を算出した。

マイトマイシンC 50 μ g/mouse を腹腔に注射した3時間後には、腫瘍細胞のDNA合成はすでに著しく低下しているにもかかわらず、その有糸分裂指数は未だ低下していない。

X線による、エールリッヒ腹水癌細胞のDNA合成阻害は、有糸分裂障害の結果として、遅れて二次的にあらわれてくるものといわれているが、マイトマイシンCによるDNA合成阻害は、有糸分裂指数の低下よりも早期にあらわれる。

III エールリッヒ腹水癌細胞の cell-free DNA 合成系に対するマイトマイシンCの影響

エールリッヒ腹水癌細胞より抽出した cell-free DNA 合成系を用いた実験においては、マイトマイシンCは、この酵素系には作用せず、またDNAのPrimerとしての活性にも影響を与えなかった。

〔総括〕

マイトマイシンCは増殖しつつあるエールリッヒ腹水癌細胞のDNA合成を特異的に阻害する。その阻害の機構は、X線のそれとは異なるようであるが、cell-free DNA 合成系を用いて行なった実験の成績からは、その機構は説明できなかった。

論文の審査結果の要旨

抗生物質マイトマイシンCは1956年に、泰らによって、土壌菌 *Streptomyces Caesitosus* より産生されることが発見され、さらに1958年に、若木らによって、分離精製されて、これが強力な抗腫瘍性をもつことが報告された。その後、種々の試験が重ねられ、今日においては、マイトマイシンCは広く臨床に用いられ、かなりの効果をあげている。

一方、その作用機序については、1958年に、芝、寺脇、田口、川俣によって、大腸菌B株のDNA合成が、マイトマイシンCによって撰択的に阻害されることが明らかになった。(著者はこの研究の実験に終始参加協力した。)

この大腸菌のDNA合成に対する阻害作用がきわめて特異的なことより、広く各国学者の注目を浴び、細菌あるいはウイルスを用いてマイトマイシンCに関する多くの研究が行なわれるにいたった。

しかし、抗癌剤本来の対象である腫瘍細胞に対するマイトマイシンCの作用に関する従来の研究は、Screening testの域を出ず、その作用の機序については、Kerstenらが、マウス腹水肉腫細胞のDNA量がマイトマイシンCによって減少することを報告している他は、培養細胞を用いて行なわれた研究の報告をわずかにみるのみである。

そこで、著者は、マウスのエールリッヒ腹水癌を用いて、腫瘍細胞に対するマイトマイシンCの作用機序を追求し、マイトマイシンCが、増殖しつつあるエールリッヒ腹水癌細胞のDNA合成を阻害することを明らかにした。一方、RNA合成の阻害は比較的少なく、蛋白合成はほとんど阻害されないことを認め、また、エネルギー代謝もほとんど影響をうけないことよりマイトマイシンCはエールリッヒ腹水癌細胞のDNA合成を撰択的に阻害し、したがって、このことが、細胞に現われるすべての障害の基になる一次的な作用であろうと推論した。

DNAは遺伝子物質であり、細胞の有糸分裂に際して、DNAの2倍化は必須の要件である。したがって、これを強力に阻害するものこそ、腫瘍細胞の増殖を障害するのに、もっとも適確な効果を与えるものであろう。このような点から考えて、マイトマイシンCが分裂増殖を続ける腫瘍細胞の盛んなDNA合成を、強力かつ撰択的に阻害するということは、マイトマイシンCのもつ優れた抗腫瘍性の本態を説明するものといえよう。

このように、一つの薬剤の作用機序を明らかにすることは、臨床応用のために必要な基礎的根拠を与えると同時に、例えば、薬剤と放射線との併用、または、蛋白、核酸あるいはエネルギー生成など重要な代謝を阻害する薬剤同士の併用などのために、理論的な見とおしを開くものである。一方、このような、代謝の特異的な阻害の機序を深く追求することは、逆に正常な代謝を解明するための糸口ともなりうるものであろう。

ここで、著者はさらに研究を一步進めて、このDNA合成阻害の機構に立ち入って追求しようとした。すなわち、一方では生物学的な面より、細胞の分裂周期との関係において考察を行ない、他方では生化学的な面より、酵素のレベルで薬剤の作用を検討した。

分裂周期においては、DNA 合成期そのものが、直接マイトマイシンCの影響をうけ、有糸分裂の障害のみられるのは、むしろ DNA 合成阻害の結果ひきおこされるものであろうとし、これが、放射線の作用とはいささか趣を異にするものであると推論した。

酵素レベルでの研究においては、エールリッヒ腹水癌細胞より抽出した無細胞の DNA 合成系を用い、種々の面より検討しているが、これらの実験ではマイトマイシンCによる阻害効果は証明できなかった。

以上、本研究において、著者は、マイトマイシンCの臨床応用を念頭におきながら、方法的にはきわめて基礎的に、多面的かつ詳細な研究を行ない、その作用機序の一端を明らかにしえた。