

原 著

吉田肉腫腹水細胞に対する抗癌剤の影響

—とくに腹水細胞内ライソゾーム酵素活性の消長を中心として—

井 上 義 純

信州大学医学部第一外科学教室 (主任: 林 四郎教授)

ON THE INFLUENCES OF ANTICANCER AGENTS
AGAINST YOSHIDA ASCITES SARCOMA CELLS—CHANGES OF LYSOSOMAL ENZYME ACTIVITIES OF YOSHIDA
ASCITES SARCOMA CELLS INDUCED BY THE ADMINISTRATION
OF ANTICANCER AGENTS —

Yoshizumi INOUE

Department of Surgery, Faculty of Medicine,
Shinshu University (Director: Prof. S. Hayashi)Key words: 吉田肉腫腹水細胞 (Yoshida ascites sarcoma cells), 抗癌剤 (anticancer agents),
ライソゾーム酵素 (lysosomal enzymes)

I 緒 言

ライソゾームの研究は C. de Duve らの業績(1) (1955) にはじまり急速に展開されてきた。現在ライソゾーム酵素といわれるものは20数種におよび(2), ライソゾームのもつ生理学的, 病理学的機能も次第に明らかにされつゝあるが, まだ満足できる段階には達していない。ライソゾームの概念が臨床医学の分野にも導入されて以来, ライソゾーム酵素と炎症の機序との関連性については多くの研究者により論じられてきたが, 悪性腫瘍に対する化学療法の下で, ライソゾーム酵素が如何なる役割を演じているか, これらの酵素の消長などについてはまだ不明な点が多い。

最近では, 悪性腫瘍に対する手術療法に際して抗癌剤の併用を行なう場合が少なくないが, 手術と抗癌剤との併用療法の妥当性を知るために, このような抗癌剤投与が生体組織あるいは腫瘍細胞の代謝にどのような影響を与えるかを検討する必要に迫られている。そこで筆者はその基礎となるデータを得るために, この種の実験の目的に適切と考えられる吉田肉腫腹水細胞を実験材料に選び, 抗癌剤 (Mitomycin C, 5-Fluorouracil, Endoxan, Toyomycin) を作用させた腹水細胞内のライソゾーム酵素 (acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNase) の活性 (全活性) の消長を検討し,

併せて腹水細胞の形態的变化, 吉田肉腫腹水細胞移植ラットの生存日数の観察を行なってこれらの成績を対比させた。

II 実験材料および方法

A 実験材料

塩野義製薬研究所 (大阪) において継代移植されている吉田肉腫腹水細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個を体重 120~150 g の雌性呑竜ラット (日本ラット浦和, 日本クレア C E - 2 固型飼料で飼育) の腹腔内へ移植し, 移植後 5 日目にその生着を確認した実験例について実験を行なった。

B 実験方法

1 実験群

実験に使用する抗癌剤はすべて生理的食塩水

表 1 使用薬剤の内容

実験群	抗 癌 剤 mg/体重kg				
	生食水	MMC	5-FU	Endoxan	Toyomycin
対照	1 ml				
I	1 ml	0.4mg			
II	1 ml	2 mg			
III	1 ml	0.4mg	100mg	40mg	0.1mg
IV	1 ml		100mg	40mg	0.1mg

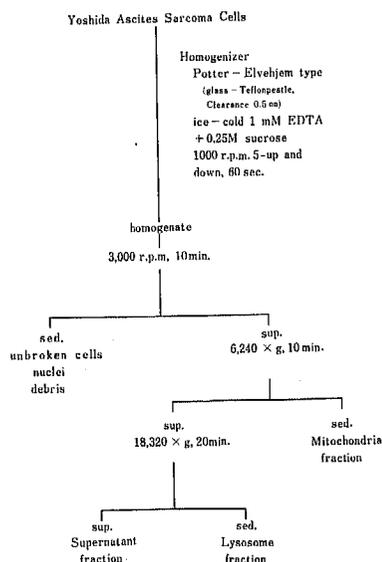
(以下生食水と略す)に溶解し、使用容量を1mlとした。

表1に示すように、対照群：生食水1ml腹腔内注入、I群：Mitomycin C (以下MMCと略す) 0.4mg/kg腹腔内注入、II群：MMC 2mg/kg 腹腔内注入、III群：MMC 0.4mg/kg, 5-Fluorouracil (以下5-FUと略す) 100mg/kg, Endoxan 40mg/kg, Toyomycin 0.1mg/kgの4剤を混合、腹腔内注入、IV群：III群よりMMCを除いた3剤を混合、腹腔内注入、以上対照群を含めた5実験群を設定し、抗癌剤1回腹腔内投与を行ない、吉田内腫腹水細胞に対する影響を(I) 3種のライソゾーム酵素 (acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNase) の活性の変化、(II) 腹水細胞の形態的变化、担癌ラットの生存日数の3つの面から検討した。なお薬剤の腹腔内注入はツベルクリン用皮下針を使用して行ない、注射針抜去後たちちにアロンアルファで注射部位を被覆して、腹水の流出を防止した。

2 酵素活性の検討

吉田肉腫腹水細胞移植5日目、ラット腹腔内へ生食水1mlまたは抗癌剤(生食水にとかして1mlとした)注入を行ない、注入後2, 8, 16時間目に軽いエーテル麻酔下で開腹し、速やかに腹水を採取した。たお腹水を5ml以上採取し得た実験例のみをその後の検索に使用した。なお各実験群の各時間においては原則として6匹以上のラットを使用した。

表2 Cell Fractionation
Yoshida Ascites Sarcoma Cells



a 細胞分画および粗酵素液の調整

以下に述べる細胞分画および粗酵素液の調製操作はすべて -4°C ~ $+4^{\circ}\text{C}$ の条件下で行なった。ラット腹腔内より採取した5~8mlの腹水を氷冷0.25M蔗糖液(約10ml)に混ぜ、3000r.p.m.で10分間遠沈して、腹水細胞を分離し、この操作を2回くり返して腹水細胞を洗い、さらに表2に示す方法により細胞分画を行なった。すなわち分離した細胞沈渣に1mM EDTAを含む氷冷0.25M蔗糖液を加えて全量を10mlとし、20ml用 Potter-Elvehjem型 homogenizer (glass-Teflon pestle, clearance 0.5mm) で1000r.p.m., 60秒間にhomogenizerの上下運動を5回行ない、細胞を磨砕した。つぎに3000r.p.m., 10分間遠沈により未磨砕細胞、核、細胞残渣などを除いた上清部分について、6,240 x g, 10分間遠沈を行ない、上清部分を除き、こゝで得られた沈渣をミトコンドリア分画とした。この操作で得られた上清部分についてさらに18,320 x g, 20分間遠沈操作を行ない、上清分画と沈渣にわけ、この沈渣をライソゾーム分画とした。なお上清分画、ライソゾーム分画、ミトコンドリア分画を分離するための操作には遠心機、富永 Na90UV, Roter No.2 を使用した。以上のようにして分画したミトコンドリア分画およびライソゾーム分画に1mM EDTAを含む氷冷0.25M蔗糖液7~8mlを加え、10ml用 Potter型 homogenizer (glass-Teflon pestle) を使用して手動操作(ゆっくりと5回上下運動を行なう)により懸濁させた。この懸濁液を2分し、その半分をふたたび6,240 x g, 10分間または18,320 x g, 20分間遠沈を行ない、各々の上清部分の酵素活性値を遊離活性値 (free activity) とし、ミトコンドリア分画およびライソゾーム分画の懸濁液の残りの半分と上清分画の3つの分画についてそれぞれ超音波処理(音波発生装置UR-150P, 富永製作所, 東京, 20K%, 60秒間操作, 検体容量3.5~4ml)を行ない、この操作によって得られた粗酵素液の活性値を全活性値 (total activity) とした。なお各分画の酵素活性の測定は粗酵素液調整後、1時間以内(-4°C ~ $+4^{\circ}\text{C}$)に行なった。

b 酵素測定法

(1) Acid phosphatase 活性の測定

(Kind-King法の簡易法(3))

『酸性ホスファターゼ測定用試液S』ヤトロン、東京を用いた。

酸性ホスファターゼ試液Sの内容:

基質液: フェニル磷酸2ナトリウム

4-アミノアンチピリン
クエン酸ナトリウム

緩衝液：クエン酸溶液 pH 5.0

呈色液：フェリシアン化カリウム

操作：基質液と緩衝液を等量に混合したのち、その1mlと蒸留水1mlを37℃、5分間恒温槽で保温し、被験液0.1mlを加えて37℃、30分間加温した後、呈色液2mlを加えて反応を停止、発色させ、室温に10分間放置したのち、日立139型分光光度計を使い、波長500mμで吸光度を測定し、あらかじめ作成しておいた標準曲線から phenol 量 (μg) を求めた。

(2) β-glucuronidase 活性の測定
(p-nitrophenol 法(4)(5))

基質液：0.1M p-nitrophenol glucuronide
(中外製薬)

緩衝液：0.1M酢酸一酢酸ソーダー, pH 4.0

呈色液：0.1N NaOH

操作：有栓試験管に緩衝液0.8ml, 基質液0.1mlをとり、恒温槽で37℃、10分間保温したのち、被験液0.1mlを添加し、37℃、30分間保温する。0.1N NaOH 1.0mlを加え、反応を停止・発色させ、さらに蒸留水4.0mlを加えて全量を6mlとする。波長400mμ (日立139型分光光度計) で吸光度測定を行ない、あらかじめ作成しておいた標準曲線から遊離 p-nitrophenol 量 (μg) を求めた。

(3) Acid DNase 活性の測定
(酸可溶性分画測定法(6)(7))

基質液：仔ウシ胸腺線-DNA 2mg/ml (Sigma, U.S.A.)

緩衝液：0.2M酢酸一酢酸ナトリウム

反応停止：60%過塩素酸 (特級)

操作：基質液1mlに緩衝液1mlを加え、恒温槽で37℃、5分間加温したのち、被験液1mlを加えてpH 5.0とし、37℃30分間保温したのち、水冷60%過塩素酸0.8mlを加える。30~60分間4℃に放置したのち、3000r.p.m., 15分間の遠沈を行ない、上清部分 (酸可溶性分画) を分離し、この上清部分について総燐量を測定した。

燐の測定 (Allen の方法(8))

試薬：(I) H₂O₂
(II) 8.3%モリブデン酸アンモニウム
(III) 60%過塩素酸
(IV) Amidol 試薬 (Amidol 2g, Sodium bisulphate 40gを蒸留水で200mlとする)

操作：有機燐を無機化するため、検体を90~100℃

で長時間加熱し、検体が褐色~黒色を呈した時点で、いったん冷却させたのち、数滴のH₂O₂を加えて、ふたたび加熱する。検体が完全に透明になったところで加熱操作を中止する。そののち、検体に60%過塩素酸0.8ml, Amidol 試薬0.8ml, モリブデン酸アンモニウム液0.4mlを順次加え、青色に呈せしめ、蒸留水で全量を10mlとする。波長660mμ (日立139型分光光度計) で吸光度測定を行ない、あらかじめ無機燐を使用して作製した標準曲線から無機燐量 (μg) を求めた。

(4) 蛋白量測定法 (Lowry 法(9))

試薬：(I) 2%Na₂CO₃/0.1N NaOH
(II) 0.5%CuSO₄/1%酒石酸ナトリウム
(III) (I)液50ml+(II)液1ml(使用時に調整)
(IV) フェノール試薬 (和光純薬) の2倍稀釈液 (1N)

操作：被験液0.1mlに(II)液4mlを加え、室温で10分間放置した後、フェノール2倍稀釈液0.4mlをすみやかに加え、30分後に波長500mμ (日立139型分光光度計) で吸光度を測定し、あらかじめ血清アルブミンを使用して作製した標準曲線より蛋白量 (mg) を求めた。

この3種の酸性水解酵素の活性はすべて比活性値 (蛋白量1mgあたりの酵素活性) で表わし、抗癌剤注入後の経過時間ごとに得た値の平均値と95%信頼区間を求め、対照群の値との差の有無を検討した。

3 吉田肉腫腹水細胞の形態的变化

B1の項で述べた5つの実験群のうち、対照群、II群およびIII群の3つの実験群と未処置の群についてそれぞれB2の項で述べた方法により採取した腹水細胞の塗沫標本作製し、(I) Giemsa 染色、(II) Hematoxylin-Eosin 染色、(III) Papanicolaou 染色を行ない、光学顕微鏡下で腹水細胞の形態的变化を観察した。すなわちラット1匹から9枚の塗沫標本作製し、3枚ずつにわたって上述した3種の染色を行ない、塗沫および染色の比較的良好な標本を3種の染色標本より1枚ずつ選びだした。3種の染色標本を通じて、さまざまな形態を呈する個々の細胞について細胞構成上の位置づけを行ない、Giemsa 染色標本で200個の細胞について分類を行なった。各実験群の各時間観察にはそれぞれ6匹のラットを使用した。

4 担癌ラットの生存日数

120~150gの雌性呑竜ラットの腹腔内へ吉田肉腫腹水細胞10⁵~10⁶個を移植し、5日目にB1の項で述べた対照群、I群、II群およびIII群の4つの実

験群について移植日より死亡迄の日数を調べた。

なお各実験群における平均生存日数と標準偏差値はWeibull 確率紙により算定した。

III 実験成績

A ライソゾーム酵素に関する基礎的実験

ラット腹腔内に移植後5日目の吉田肉腫腹水細胞内のライソゾーム酵素 acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNase について行なった基礎的実験の成績は次のようである。

1 至適pH

Acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNaseの至適 pHについて4回の検討を行なった結

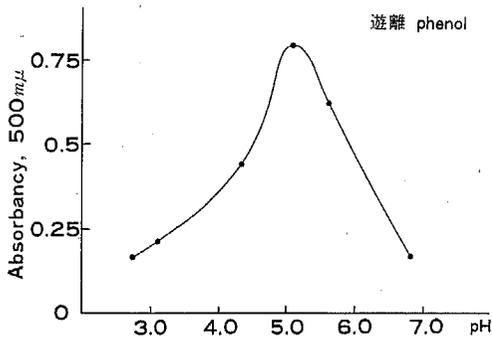


図1 Acid phosphatase 活性とpHとの関係 (37°C, 30分間保温)

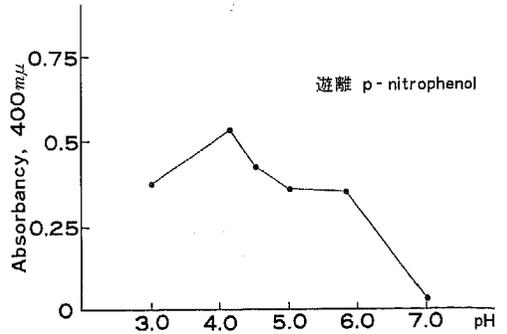


図2 β -glucuronidase 活性とpHとの関係 (37°C, 30分間保温)

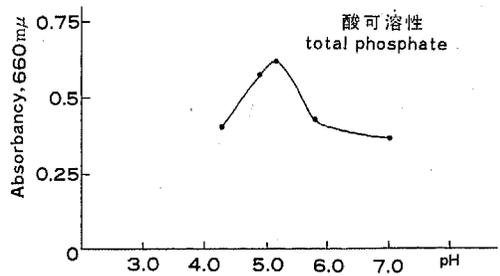


図3 Acid DNase 活性とpHとの関係 (37°C, 30分間保温)

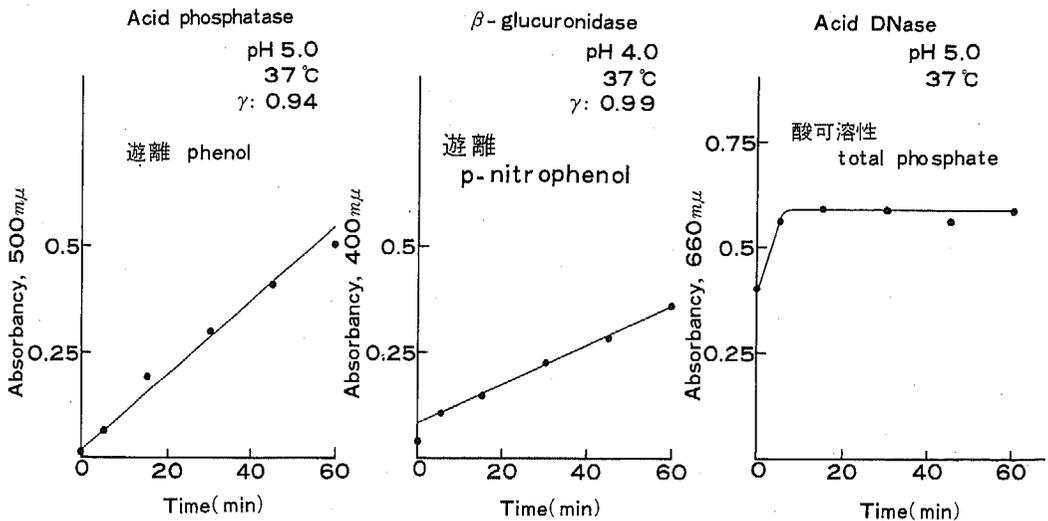


図4 酵素活性と保温時間との関係

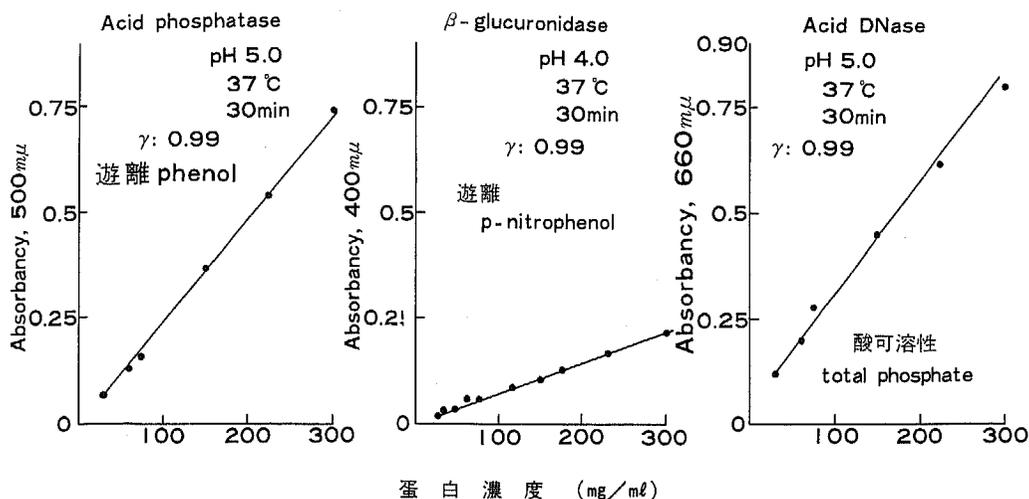


図5 酵素活性値と粗酵素液蛋白濃度 (mg/ml) との関係

表3-1 超音波処理による酵素活性の変化

Z = (超音波処理後活性値) - (無処置活性値)

果はそれぞれ5.1, 4.1, 5.0の附近であり, その代表例を図1, 2, 3に示した。

2 酵素活性値と保温時間との関係

Acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNaseの各々について, 37°Cで0, 5, 15, 30, 45, 60分間保温して, 酵素活性と保温時間との関係を検討した(図4)。acid phosphatase (pH 5.0, 37°C) および β -glucuronidase (pH 4.0, 37°C) においては保温時間が長くなるとともに活性値が増加し, その相関関係は一回帰と判定できた (P < 0.01)。他方 acid DNase (pH 5.0, 37°C) においては0~5分の間では活性値は増加するが, 5分以後では保温時間を延長しても活性値はほぼ一定であった。

3 酵素活性値と粗酵素液内の蛋白濃度との関係

粗酵素液の蛋白濃度が300mg/ml以下の場合には3種のライソゾーム酵素はいずれも蛋白濃度の増加と平行して増加し, 図5に示すようにその相関関係は一回帰と判定できた (P < 0.01)。

4 超音波処理の効果

3種のライソゾーム酵素を指標として, ライソゾーム顆粒が超音波処理(20K%, 操作時間60秒, 検体容量3.5~4.0ml)によって破壊されるか否かを検討した。すなわち実験方法C1の項で述べた方法

	測定条件 単位	実験例	無処置	超音波 処理後
Acid phosphatase	37°C, 30分 pH 5.0 吸光度 500m μ	1	0.255	0.440
		2	0.330	0.670
		3	0.180	0.325
		4	0.135	0.200
		5	0.065	0.155
Zの平均値 ±95%信頼区間			0.165±0.134	
β -glucuronidase	37°C, 30分 pH 4.0 吸光度 400m μ	1	0.122	0.160
		2	0.046	0.075
		3	0.075	0.142
		4	0.100	0.157
Zの平均値 ±95%信頼区間			0.048±0.027	
Acid DNase	37°C, 30分 pH 5.0 吸光度 660m μ	1	0.300	0.420
		2	0.300	0.450
		3	0.350	0.840
		4	0.250	0.850
		5	0.280	0.480
Zの平均値 ±95%信頼区間			0.312±0.270	

表 3-2 凍結融解処理による酵素活性の変化

$$Z = (\text{凍結融解処理後活性値}) - (\text{無処置活性値})$$

	測定条件 単位	実験例	無処置	凍結融解処理後		
				1回	3回	5回
Acid phosphatase	37°C, 30分 pH 5.0 吸光度 500m μ	1	0.255	0.230	0.260	0.155
		2	0.330	0.360	0.405	0.245
		3	0.180	0.220	0.230	0.130
		4	0.135	0.160	0.140	0.092
		5	0.065	0.060	0.090	0.072
Zの平均値 ±95%信頼区間				0.013±0.014	0.033±0.037	-0.054±0.052
β -glucuronidase	37°C, 30分 pH 4.0 吸光度 400m μ	1	0.122		0.116	0.080
		2	0.046		0.060	0.005
		3	0.075		0.055	0.020
		4	0.100		0.085	0.085
Zの平均値 ±95%信頼区間				-0.007±0.030	-0.039±0.027	
Acid DNase	37°C, 30分 pH 5.0 吸光度 660m μ	1	0.300		0.400	0.370
		2	0.300		0.350	0.370
		3	0.350		0.520	0.400
		4	0.250		0.250	0.320
		5	0.280		0.300	0.370
Zの平均値 ±95%信頼区間				0.068±0.085	0.070±0.018	

表 4 ライソゾーム酵素の比活性と細胞内分布

N: 未磨砕細胞, 核, 細胞残渣
M: ミトコンドリア分画
L: ライソゾーム分画
Sup: 上清分画

測定値: 平均値±標準偏差
実験ラット数: 13

分画	蛋白質%	Acid phosphatase (遊離phenol $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白質)	β -glucuronidase (遊離p-nitrophenol $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白質)	Acid DNase (酸可溶性総燐 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白質)
N	71.7±15.8	1.54 ± 0.26	1.29 ± 0.15	0.13 ± 0.05
M	5.7± 2.4	3.08 ± 0.41	0.82 ± 0.44	0.39 ± 0.07
L	2.2± 0.9	2.95 ± 0.47	0.84 ± 0.30	0.83 ± 0.34
Sup	20.4± 9.8	0.88 ± 0.36	0.06 ± 0.04	0.24 ± 0.12

に従って得られたライソゾーム分画について、無処置、凍結融解1, 3, 5回および超音波処理を行なったそれぞれの結果について酵素活性値を比較した(表3-1, 3-2)。その結果では、 $Z = (\text{超音波処理後活性値}) - (\text{処理前活性値})$ とすると、 Z の平均値±95%信頼区間はそれぞれ、acid phosphatase 0.165±0.134, β -glucuronidase 0.048 ± 0.027, acid DNase 0.312±0.270となり、処理前の活性値と比較して超音波処理の場合には活性値が上昇しているが、凍結融解による処理では、acid phosphatase, β -glucuronidaseの活性値に有意な上昇が認められなかった。

細胞内ライソゾーム酵素acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNaseの全活性値を測定し、各時間群ごとに対照群の活性値と比較した。

1 Acid phosphataseの比活性値の消長 (表5)

a ミトコンドリア分画: acid phosphataseの全活性値は、I群(MMC 0.4mg/kg)およびII群(MMC 2 mg/kg)のいずれにおいても、抗癌剤投与後2時間、8時間目では対照とくらべて変化を示さなかったが、投与後16時間目ではI, II群ともに活性の減少が認められた。

b ライソゾーム分画: ライソゾーム分画に

5 各酵素の細胞内分布および潜在性

表4のように acid phosphataseの比活性値はミトコンドリア分画とライソゾーム分画で高く、acid DNaseの比活性値はライソゾーム分画で高く、 β -glucuronidaseの比活性値は核、未磨砕細胞および細胞残渣を含む分画で最も高い値を示した。

またこの3種のライソゾーム酵素の潜在性を遊離酵素活性値の全酵素活性値に対する百分比で表わすと、acid DNaseにおいて潜在性ももっとも低く(80±16%, 平均値±標準偏差), acid phosphatase (7±1%, 平均値±標準偏差), および β -glucuronidase (13±10%, 平均値±標準偏差)の潜在性は高い(図6)。

B 抗癌剤作用下のライソゾーム酵素活性の消長
抗癌剤投与前, 投与後2, 8, 16時間目の各時期に、吉田肉腫腹水細胞

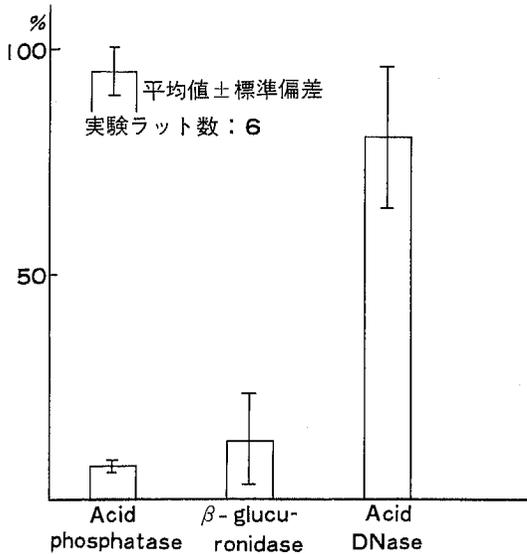


図6 全酵素活性値に対する遊離酵素活性値の比 (%)

における acid phosphatase の全活性値は II 群において抗癌剤投与後 8 時間目に、また III 群 (4 剤併用) および IV 群 (3 剤併用) においては投与後 16 時間目に活性の減少が認められた。

表5 Acid phosphatase 比活性 (全活性値) の消長 ()

M: ミトコンドリア分画 () 内の数字: ラット数
 L: ライソゾーム分画 * : 対照に対して減少
 Sup: 上清分画

活性値: 平均値 (遊離 phenol 量 μg/mg 蛋白) ± 95% 信頼区間

薬剤投与後の時間	対 照 群			I 群			II 群			III 群		IV 群	
	M	L	Sup	M	L	Sup	M	L	Sup	L	Sup	L	Sup
前	2.88±0.18 (25)	2.94±0.19 (25)	0.84±0.13 (25)										
2 時間	3.04±0.72 (6)	2.91±0.42 (9)	1.10±0.22 (12)	2.63±0.37 (8)	2.46±0.35 (8)	1.15±0.12 (8)	3.30±0.57 (6)	3.03±0.17 (9)	1.11±0.17 (9)	2.99±0.52 (9)	1.21±0.25 (9)		
8 時間	3.08±0.59 (6)	2.80±0.23 (6)	0.95±0.17 (6)	2.60±0.41 (6)	2.12±0.48 (8)	0.94±0.18 (8)	2.90±0.58 (6)	1.72±0.49 [*] (9)	0.76±0.10 (9)	2.46±0.35 (9)	0.61±0.17 [*] (9)		
16 時間	3.23±0.71 (6)	3.04±0.58 (10)	1.26±0.18 (10)	2.18±0.28 [*] (6)	2.79±0.37 (9)	1.18±0.14 (9)	1.59±0.51 [*] (6)	2.62±0.46 (9)	1.14±0.25 (9)	1.79±0.30 [*] (9)	1.05±0.13 (9)	1.46±0.67 [*] (10)	0.60±0.21 [*] (10)

c 上清分画: 上清分画 acid phosphatase の比活性値は III 群 (4 剤併用) では投与後 8 時間目に、IV 群 (3 剤併用) では 16 時間目に減少した。

2 β-glucuronidase 比活性の消長 (表 6)

β-glucuronidase 全活性値は、ミトコンドリア分画、ライソゾーム分画、上清分画のいずれにおいても、またいずれの実験群でも、対照と比較して有意の差が認められなかった。

3 Acid DNase 比活性の消長 (表 7)

a ミトコンドリア分画: ミトコンドリア分画における acid DNase 全活性値は、I 群 (MMC 0.4mg/kg) および II 群 (MMC 2 mg/kg) のいずれの実験群においても、対照群の全活性値とくらべて有意の差を示さなかった。

b ライソゾーム分画: II 群および III 群 (4 剤併用) では抗癌剤投与後 2 時間目に、III 群および IV 群 (3 剤併用) では投与後 16 時間目に、acid DNase の比活性値の増加が認められた。

c 上清分画: 上清分画における acid DNase 全活性値は、III 群 (4 剤併用) で投与後 2 時間目に対照群とくらべて増加した。

C 抗癌剤作用下の吉田肉腫腹水細胞の形態的变化 (図 8, 9, 10)

移植 5 日目の吉田肉腫細胞を観察するとき、何ら処置を行なわなかった実験例では約 6~10% に変性型細胞が含まれており (図 7, 図 8), このよう

表6 β -glucuronidase 比活性 (全活性値) の消長

M: ミトコンドリア分画

L: ライソゾーム分画

Sup: 上清分画

() 内の数字: ラット数

活性値: 平均値 (遊離 p-nitrophenol 量 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白) $\pm 95\%$ 信頼区間

薬剤投与後の時間	対 照 群			I 群			II 群			III 群		IV 群	
	M	L	Sup	M	L	Sup	M	L	Sup	L	Sup	L	Sup
前	0.78 \pm 0.16 (25)	0.81 \pm 0.11 (25)	0.05 \pm 0.01 (25)										
2時間	0.92 \pm 0.25 (6)	0.97 \pm 0.33 (6)	0.05 \pm 0.03 (6)	0.79 \pm 0.23 (8)	1.02 \pm 0.25 (8)	0.05 \pm 0.02 (8)	1.03 \pm 0.56 (5)	0.89 \pm 0.18 (9)	0.03 \pm 0.01 (9)	0.72 \pm 0.14 (9)	0.04 \pm 0.02 (9)		
8時間	0.69 \pm 0.21 (6)	0.85 \pm 0.25 (6)	0.04 \pm 0.02 (6)	0.83 \pm 0.29 (8)	0.61 \pm 0.16 (8)	0.04 \pm 0.02 (8)	0.79 \pm 0.28 (6)	0.60 \pm 0.12 (9)	0.03 \pm 0.01 (9)	0.66 \pm 0.27 (9)	0.05 \pm 0.02 (9)		
16時間	0.82 \pm 0.27 (6)	0.87 \pm 0.27 (10)	0.05 \pm 0.03 (10)	0.86 \pm 0.23 (6)	0.92 \pm 0.25 (9)	0.07 \pm 0.01 (9)	1.05 \pm 0.31 (6)	0.79 \pm 0.22 (9)	0.06 \pm 0.02 (9)	0.92 \pm 0.10 (9)	0.02 \pm 0.01 (9)	1.18 \pm 0.46 (10)	0.01 \pm 0.01 (10)

表7 Acid DNase 比活性 (全活性値) の消長

M: ミトコンドリア分画

L: ライソゾーム分画

Sup: 上清分画

() 内の数字: ラット数

*: 対照に対して増加

活性値: 平均値 (酸可溶性分画総燐量 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白) $\pm 95\%$ 信頼区間

薬剤投与後の時間	対 照 群			I 群			II 群			III 群		IV 群	
	M	L	Sup	M	L	Sup	M	L	Sup	L	Sup	L	Sup
前	0.32 \pm 0.08 (25)	0.88 \pm 0.14 (25)	0.28 \pm 0.14 (25)										
2時間	0.40 \pm 0.13 (6)	1.34 \pm 0.34 (9)	0.36 \pm 0.06 (8)	0.32 \pm 0.09 (8)	1.15 \pm 0.23 (8)	0.32 \pm 0.08 (8)	0.57 \pm 0.17 (5)	2.08 \pm 0.43 ^{**} (9)	0.43 \pm 0.06 (14)	1.94 \pm 0.46 ^{**} (9)	0.64 \pm 0.11 ^{**} (9)		
8時間	0.37 \pm 0.09 (6)	1.21 \pm 0.32 (6)	0.37 \pm 0.09 (8)	0.36 \pm 0.04 (8)	1.06 \pm 0.22 (8)	0.39 \pm 0.07 (8)	0.36 \pm 0.10 (6)	1.48 \pm 0.26 (9)	0.38 \pm 0.07 (15)	1.48 \pm 0.26 (9)	0.39 \pm 0.14 (9)		
16時間	0.25 \pm 0.02 (6)	1.18 \pm 0.23 (10)	0.35 \pm 0.12 (10)	0.28 \pm 0.03 (6)	1.08 \pm 0.34 (9)	0.29 \pm 0.07 (9)	0.30 \pm 0.05 (6)	1.34 \pm 0.14 (9)	0.41 \pm 0.10 (9)	1.82 \pm 0.34 ^{**} (9)	0.36 \pm 0.10 (9)	1.71 \pm 0.27 ^{**} (10)	0.38 \pm 0.14 (10)

な状況で抗癌剤が投与されたものと考えられる。

1 対照群 (生食水 1 ml 注入) における形態的变化

投与後 2 時間目では, 1 例に Go 期と考えられる小型細胞が 30% 前後に増加し, 核分裂像の消失が認められたが, 他の 5 例では未処置群とくらべて著しい変化を認めなかった。

投与後 8 時間目, 16 時間目では変性型細胞の増加, および膨化変性細胞のわずかな増加を示した例, Go 期細胞が 10~20% に出現している例がみられたが, 全例を通じてとくに強い変化は認められなかった。核分裂像は 8 時間以後では $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ に減少をみたが, 染色体の形態, 配列, 分離等の異常は認められなかった。以上のように, 対照群においては明らか

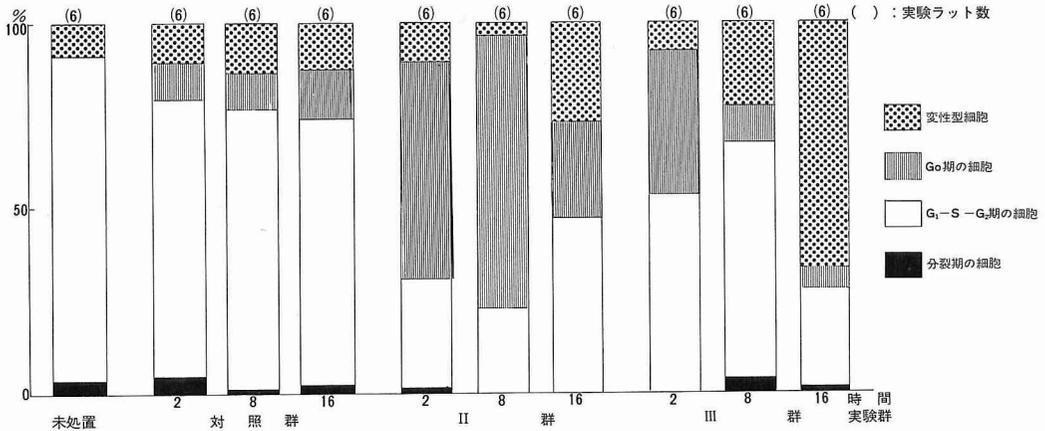


図7 抗癌剤投与による吉田肉腫細胞の変化 (増殖サイクルステージ別百分比)

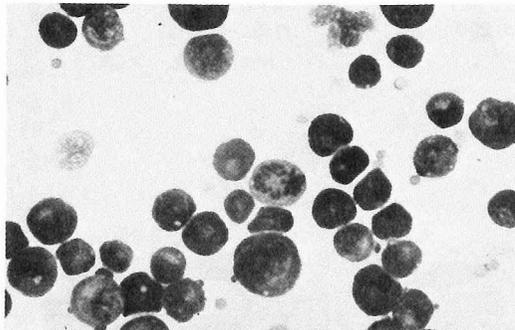


図8 吉田肉腫細胞像, 抗癌剤投与前
核分裂も認められるが, 一方大型の胞体をもつ変性型細胞が一部に混在している。
(Giemsa 染色, ×400)

癌剤投与後8時間目になると変性細胞は認められなくなり; G₀期細胞が増加し, 核分裂像はまったく認められなくなった。このことはS期より先への回転の進行が抑制されている像と理解され, 核酸合成の抑制がその原因となっているものと考えられる。抗癌剤投与後16時間目になると細胞数は減少し, しかも細胞像が多彩となり, 変性細胞に由来したと考えられる遊離核細胞が多数散在して認められた。G₀期の細胞および増殖型細胞が著るしく減少するとともに, 変性型細胞が増加し, この中には細胞の直径が40~50 μ , 核の直径が30 μ をこえるものも認められた。しかしクロマチンの不整凝集, 核液の透明化核小体の巨大化などは認められなかった。増加した変性型細胞は未処置例の末期腹水細胞にみられる変性型細胞の像に類似し, S期への移行を抑制されたため, G₀期より変性型へと進行, 変性の過程が強くとられたものと思われる。しかし変性核片を含む別の型の変性細胞がみられる点で, 抗癌剤の濃度の低下に伴ってS期よりM期を経て変性崩壊に至った細胞もあるものと考えられた。

な細胞障害像は認められなかった (図7)。

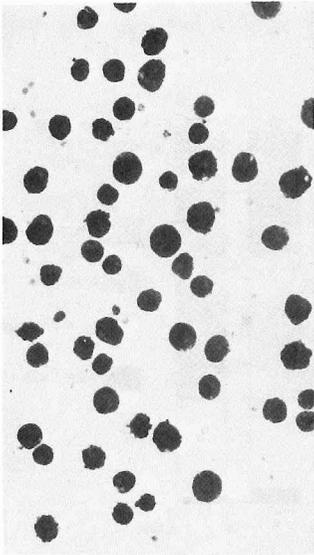
2 II群 (MMC 2 mg/kg 注入) における形態的变化 (図7, 図9)

投与後2時間目で, ほとんど全部の細胞が小型化しており, そのうち60%前後の細胞において胞体が強い好塩基性を示していた。また極めてわずかではあるが, 裸核に近い所見を示した細胞も認められた。これらの細胞は G₀期の細胞と考えられた。このほか, 細片化したり, 高度の膨化変性を示した細胞も散在していた。核分裂像は各標本で数個を認められるにとどまり, 核分裂像の減少が著るしい。抗

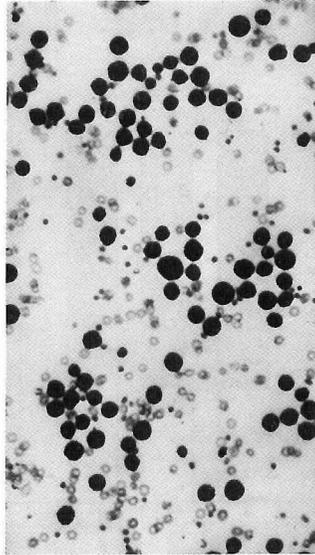
3 III群 (4 剤併用) における形態的变化

(図7, 図10)

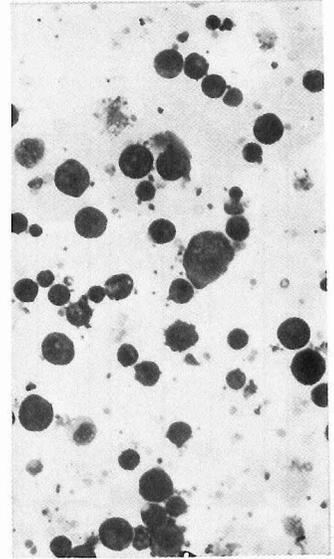
抗癌剤投与後2時間目では, 変性型細胞が増加し, これらの変性型細胞には膨化変性を示す傾向が認められた。また細胞分裂像も殆んど消失していた。G₀期細胞が40%前後にみられ, G₁期と思われる細



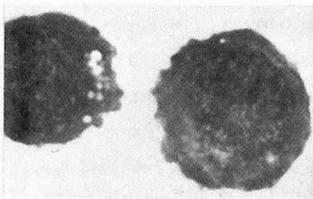
A 投与後2時間
ほとんどの細胞は小型化し
ており、核分裂はみられない。
Giemsa 染色, ×200



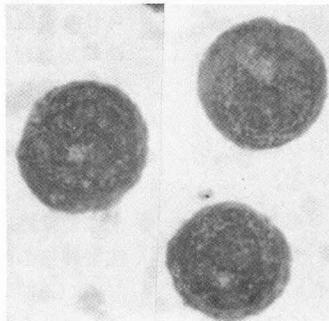
C 投与後8時間
小型化した細胞が多く、核
分裂像はみられない。
Giemsa 染色, ×200



E 投与後16時間
細胞数は減少しており遊離
核細胞、変性型細胞がみら
れる。
Giemsa 染色, ×200



B 胞体の乏しい小円型細胞
(Go期)。
(投与後2時間)
Giemsa 染色, ×1000



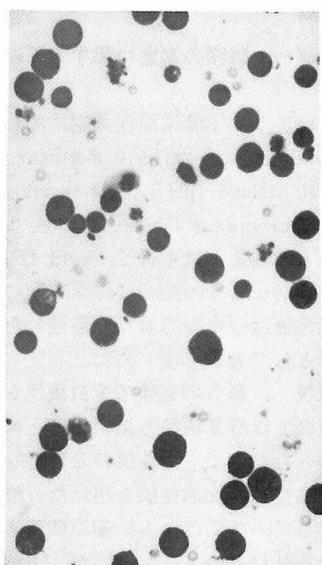
D 胞体の乏しい小円型細胞
(Go期)。
(投与後8時間)
Giemsa 染色, ×1000



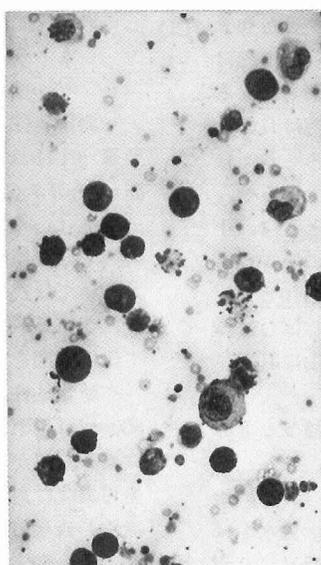
F 変性型細胞。
(投与後16時間)
Giemsa 染色, ×1000

図9 抗癌剤投与後の吉田肉腫細胞像

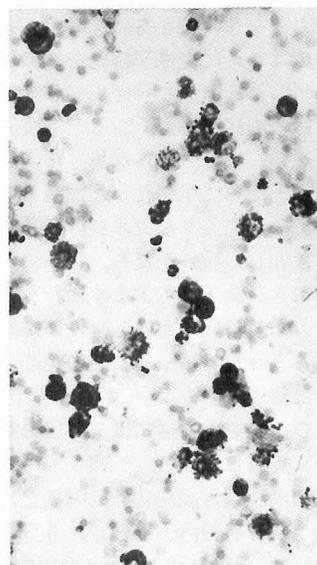
群



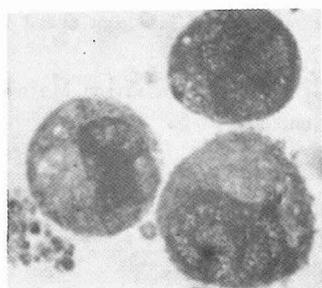
H 投与後2時間
核分裂像は消失し、小円型で胞体の乏しい細胞とG₁期と思われる細胞が多い。
Giemsa 染色, ×200



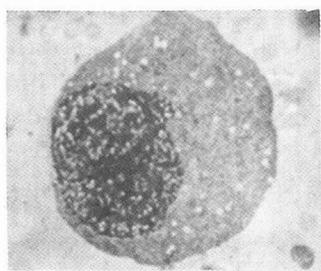
G 投与後8時間
変性型細胞の増加が認められる。
Giemsa 染色, ×200



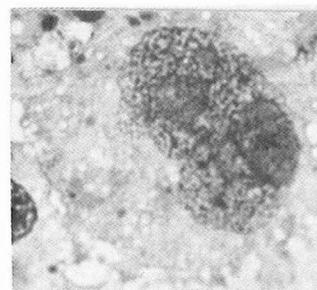
L 投与後16時間
変性型細胞の増加がいちぢるしい。
Giemsa 染色, ×200



I 上方の細胞はG₀期。
下方の2個の細胞はG₁期の細胞と思われる。
(投与後2時間)
Gimesa 染色, ×1000



K 変性型細胞
(投与後8時間)
Giemsa 染色, ×1000



M 変性型細胞。胞体の崩壊がいちぢるしい。
(投与後16時間)
Giemsa 染色, ×1000

図10 抗癌剤投与後の吉田肉腫細胞像

III

群

胞もなおかなりの量を占めていた。抗癌剤投与後8時間目ではさらに変性型細胞が増加し、Go期細胞は減少していた(図7)。抗癌剤投与後16時間目となるとさらにこの傾向が強くなるが、変性細胞はII群のそれと違い、核質の強い凝集、粗網化がみられ、核液は淡明となって粗網化した核網を浮き上がらせ、胞体は膨化して大きなゴルジ野を示すとともに、小空胞が散在し、核のかたち、胞体の外形のいずれも不整な彎入・突出を示すようになった(図10)。

なお未処置例における変性型細胞でしばしば指摘されるようなアズール顆粒の発達、増加はII群、III群では著るしく少ない。

D 抗癌剤投与による吉田肉腫移植ラットの生存日数

吉田肉腫腹水細胞 $10^5 \sim 10^6$ 個を120~150gの雌性呑竜ラット腹腔内へ移植し、5日目に生食水1ml(対照群)、MMC0.4mg/kg(I群)、MMC2mg/kg(II群)、4剤併用(III群)を腹腔内へ注入した後、死亡する迄の生存日数を求めた。その成績をワイプ確率紙により計算した(13)結果を表8に示した。対照群と比較してII群(MMC2mg/kg)では生存日数が延長しているのに対し、I群(MMC0.4mg/kg)では生存日数は延長せず、さらに4剤併用のIII群では、投与後24時間以内に大部分のラットが死亡した。

表8 担癌ラットの生存日数と抗癌剤投与の影響

	対 照	I 群	II 群	III 群
実験ラット数	79	17	15	21
平均生存日数	8.6	12.6	26.8	6.7
標準偏差	2.4	7.2	16.7	4.7

IV 考 案

ライソゾーム酵素のうち、これまでに比較的研究されてきたacid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNaseの3つの酵素をとりあげ、吉田肉腫腹水細胞内酵素の活性測定条件などのほかに、抗癌剤投与による酵素活性の変化ならびに腹水細胞の形態的变化、担癌ラットの生存日数の延長効果を検討したが、これらの成績とこれまでの報告と対比、総括

して考察をすすめたい。

A ライソゾーム酵素の測定に関する基礎的検討

測定条件について：(1)酵素活性測定に際して、至適pHはacid phosphatase pH5.0, β -glucuronidase pH4.0, acid DNase pH5.0であり、(2)acid phosphatase, β -glucuronidaseについては60分までの間では保温時間と活性値とは平行し、acid DNaseについては15分以後60分までの間では保温時間の長短にかかわらず活性値は一定しており、前述したpHで保温時間を30分として実験をすゝめた。

酵素活性の表現：筆者の実験で蛋白濃度が300mg/ml以下の範囲では酵素活性と蛋白濃度との間に直線関係が認められたので、活性値の表現として蛋白濃度に対する活性値、比活性値を用いた。酵素活性の表現方法として、このほか1)細胞個数あたり、2)窒素量あたりなどの方法があるが、1)については測定に際して腹水細胞が塊状を呈する性質があり、また崩壊傾向のある細胞のうち、算定しなければならぬ細胞の取捨選択の基準の設定が困難であるし、2)については操作が比較的煩瑣であるなどの理由から、本実験においては酵素活性を蛋白濃度に対する比活性値であらわすことにした。

ライソゾーム顆粒膜の破壊法：ライソゾーム顆粒膜を破壊する方法として、従来次に示す方法が行われている。

- (ア) 凍結融解(14)(15)
- (イ) Waring blender(16), Vir-Tis high speed homogenizer(17)(18)
- (ウ) Radiation(Ultra violet irradiation, Mercury-arc irradiation)(15)(19)
- (エ) 低張液： H_2O (20)
- (オ) 酵素液処理：proteinase, phospholipase
- (カ) 表面活性剤：Triton X-100(21), Triton WR 1339
- (キ) 超音波処理

以上の方法のうち、比較的簡単に行なうことができるものは凍結融解であり、多くの研究者がこの方法を使っている。筆者は凍結融解(3回、5回)と超音波処理の効果を比較検討したが、この3種の酸性水解酵素を指標とするかぎり、超音波処理による方法がより効果的であった。なお超音波処理の操作時間については筆者の検討した結果、1~3分の場合もっとも高い活性値が得られ、5分以上ではむしろ不活化する傾向が得られた。凍結融解の場合、無処置に比べて酵素活性は必ずしも高くならなかつ

たが、このことは顆粒膜破壊の効果が十分でないのか、あるいは酵素活性に対する不活化作用に原因するものなのか、2つの可能性が考えられるが、筆者が得た成績では超音波処理のあと、凍結融解を行なうと著しく酵素活性が低下することが認められた。この事実と考えあわせると凍結融解の操作にさいしては酵素活性の不活化の可能性を考慮しなければならぬように思われる。凍結融解と同様、しばしば行われているのは表面活性剤の使用であるが、Koldovsky (20)はラットの腎、肝の細胞内の β -glucuronidase, β -galactosidaseについて検討した結果、Triton X-100による処理ではこれらの酵素活性が変化せず、水による低張液浸透の方法が効果的であったと報告している。このように全活性値を得る方法としては、簡便かつ短時間の操作で、顆粒膜に対する効果が確実で、多くのライソゾーム酵素に対する不活化作用の少ないこと、などの条件を満たす方法が望ましいのであるが、現在のところまだ決定的な方法がなく、その効果についても各研究者の間で成績が一致していない現状であり、今後の検討にまたねばならない。

腹水細胞の磨砕法：吉田肉腫腹水細胞を磨砕する際、細胞内顆粒の損傷を少なくするため、筆者の実験において間隙の大きいhomogenizer (clearance 0.5mm)を使用した。そのため、より小さな間隙をもつhomogenizerを使用した従来の報告とは次の2点で異なった結果が得られた。第1は全homogenateに対する“N分画”(未磨砕細胞、核、細胞残渣などを含む分画)の占める蛋白量の割合(%)が高いことである。従来の報告によれば、研究材料の種類により多少の違いが認められるが、細胞全体に対するN分画の占める蛋白量%はおおよそ20~40%前後であるのに対して、筆者の成績では70%に達した。これはhomogenizerのちがいにともなう細胞磨砕の程度によるものと考えられる。第2は β -glucuronidaseのN分画における比活性値が他のいずれの分画よりも高く、acid phosphataseはミトコンドリア分画(M分画)およびライソゾーム分画(L分画)、acid DNaseはライソゾーム分画(L分画)にそれぞれ高い比活性値が認められた点である。ライソゾーム顆粒として一括されているもののうち、その形態的多様性についてはすでに指摘されているところであるが(22)、顆粒内の酵素分布の面でも、ライソゾーム顆粒の間に多様性が存在することが考えられよう。Rahmanら(23)はラット肝の細胞内顆粒のzonal centrifugationを行なった結果、

acid phosphataseとCathepsin D, acid RNaseとCathepsin C, と2つのグループにわかれることを示した。BeckおよびTappelら(15)はラットの肝、腎のライソゾーム酵素の分布をSephadex-G200 column, DEAE-cellulose column, CM-cellulose columnにより検討し、ラット肝では1) β -glucuronidase, 2) acid phosphatase, 3) phosphoprotein phosphatase, acid pyrophosphatase, Cathepsinの3つのグループにわけられ、ラット腎では肝とはや、趣を異にした結果を報告した。他方acid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNaseの活性が共通してライソゾーム分画に特異的に高いという報告もある。すなわち、鈴木および仁井谷ら(25)は筆者の実験と同様、吉田肉腫腹水細胞について、青島、楼井ら(26)はラット腹腔内の吉田肉腫腫瘍について、ライソゾーム分画におけるこれらの酵素の比活性値が高いことを報告している。これらの報告は筆者の実験成績と一致しないものであるが、細胞磨砕の方法、細胞分画および酵素活性の測定の方法が違うことが実験結果の相違をきたした原因であろうと考えたい。

現在ライソゾーム酵素のもつ共通の性質として(1)至適pHが酸性側にある水解酵素であり、(2)ライソゾーム分画に酵素活性が特異的に高い、(3)潜在性の酵素活性が高いことなどが指摘されているが筆者の実験成績ではacid DNaseは潜在性が低く、このことはacid phosphataseおよび β -glucuronidaseにくらべsolubleな性質があるものと考えられる。また β -glucuronidaseは(2)の条件に該当しない可能性もある。細胞を磨砕する条件などによりかなり違った結果が得られることが十分に考えられるので、今後この点についても十分な検討を必要とする。

B 抗癌剤作用下のライソゾーム酵素活性の変化

本実験においてはDNA合成阻害剤であるmitomycin C (MMC)のほか、Pyrimidine代謝拮抗剤5-Fluorouracil (5-FU)、アルキル化剤Endoxan、RNA合成阻害作用をもつToyomycin (Chromomycin A₃)を使用してラットに移植した吉田肉腫腹水細胞内のライソゾーム酵素活性の変化を検討した。

寺脇ら(27)、紺谷(28)はエールリッヒ腹水癌細胞にMMCを作用させ³H-thymidineのDNAへのとりこみを観察して、RNA合成、蛋白合成を抑制しない程度のMMCの濃度において、MMC投与後3時間目にDNA合成が抑制されることを報告している。またKerstenら(29)(30)はE. coliを使って、またLfrmanら(31)は腫瘍細胞にMMCを作用させてDNA合成の

抑制のみならず、蛋白およびDNA合成が抑制されることを報告しており、現在ではMMCによるDNA合成阻害作用は投与後早い時間で現われることが認められている。さらにKersten(30)はMMC作用下のE. coli B株において、DNA量が減少するとともにアルカリ性DNase活性が増加することを報告し、つづいてStudzinsky(32)(33)らはMMCがHeLa細胞のacid DNase活性を増加させることを明らかにした。MMC投与後にDNase活性が増加する機序として、この酵素蛋白の生合成の増加、この酵素のアロステリック効果による活性化、この酵素のdegradationの抑制などが考えられる。DNase活性の増加とDNA合成阻害との関係については、Kersten(29)はDNA degradationについてDNase活性増加によるものではないかと推測したが、Constantopoulos(34)はdamaged DNAの回復期にDNase活性の増加が起り得るのではないかと述べ、その後の研究によりDNA合成とDNase活性との関係は直接的なものではなく、もっと複雑なものであらうと考えられるにいたった。すなわち、Brody(35)によるとヒト胎盤の増殖過程においてDNA量が一定であるにもかかわらず、acid DNase活性が増加する時期が認められたし、Sungら(36)はラットの脳小脳において、DNA合成の少ない部分およびDNA合成の少ない時期にDNase活性が増加することを報告している。しかし一方ではラットの脳小脳においてはDNA合成のさかんな時期にDNase活性が増加するという報告(37)もあり、現在のところDNAの障害、ひいてはDNA量の減少とacid DNase活性の増加との間に因果関係があるか否かについてはまだ十分には明らかにされていない。筆者の実験において、III群(4剤併用)およびIV群(3剤併用)では、投与後16時間目にacid DNase活性の増加が認められたが、このような比較的遅い時間にacid DNase活性が増加することはいわゆる薬剤の“transport form”より“active form”への転換に一定の時間を要することを示しているのではないかと考えた。

またacid phosphataseの活性が減少する機序として、enzyme degradationの増加、酵素の生合成の減少、substrate regulation, product inhibition(38)などのほかに、酵素の細胞外への流出も考えられる。たとえばBernardiら(39)、Laskowski(40)はnucleotideの脱磷酸過程にacid phosphataseが関与することを示唆し、また安澄、杉岡ら(41)はマルタニシの精巢の成熟過程において、acid phosphatase活性の減少と核酸の消失との間にはある種の関係がありう

ることを述べているし、今泉、近藤ら(42)は抗癌剤感受性に関する研究においてacid phosphataseの細胞外への漏出を示唆する報告を行なっている。このような研究成果を参考にすると、本実験において認められたacid DNase活性の増加およびacid phosphatase活性減少を一応核酸合成阻害と関連させるものとする。筆者の得た成績とこれまでに報告された成績との間にはいくつかの点で相違が認められる。たとえば、仁井谷ら(43)は吉田肉腫腹水細胞で、また青島、橋井ら(42)はラット腹腔内吉田肉腫腫瘍で、それぞれ抗癌剤によるacid phosphatase, β -glucuronidase, acid DNase活性が増加することを報告しており、薬剤の使用量、投与方法、観察時間、細胞磨砕の方法、細胞分画の方法など、筆者の方法と違った点が多いため、直ちに筆者の成績と対比させることは難しいが、今後この相違点について検討を加える必要がある。

C 抗癌剤投与による吉田肉腫細胞の形態的变化

これまでも抗癌剤投与による吉田肉腫細胞ほかの腹水癌の形態的变化についての記載は多いが、こゝでは前述したライソゾーム酵素の消長を基盤にして、とくに細胞の動態について考えてみる。

一般に細胞を増殖に関与する細胞(増殖型細胞)と増殖能を欠き機能分化を示す細胞とに区別することができる。吉田肉腫細胞はラット腹腔内に移植された後、ある時間を経過して細胞数の増加がある限界をこえるとき、分裂能の低下・消失した細胞が次第にみられるようになり、増殖型細胞に対し変性型細胞と呼ばれている(10)。増殖型細胞の増殖サイクルの回転はG₁期、S期(核酸合成期)、G₂期、M期(分裂期)の4つの時期にわけられ、G₁期は不定であるがS期、G₂期、M期の各々は比較的一定した時間経過をとり、またサイクルを1回転する時間は吉田肉腫細胞ではおよそ20~25時間と報告されている(11)(12)。G₁期は核酸合成期に至る準備期と解しうるが、この期はさまざまな環境因子の影響により延長する。核酸合成は胞体内の蛋白合成機能に依存しているが、高度に延長されたG₁期にある細胞のうち胞体の乏しい細胞はS期への移行が全くとまった状態にあるものと考えられ、とくにこの状態をGo期と呼んでいる(44)(45)。Go期にある細胞は環境因子の影響が消失したのち再びG₁期へ移行することが考えられている。筆者が行なった観察の範囲では分裂像を示すM期以外を形態的に区別することはむずかしいが、松沢(46)の述べるところに従えば本実験において、II群およ

びIII群でしばしば認められた胞体の著しく乏しい小型円型細胞はGo期とみなされ、代謝的にはきわめて不活発な細胞と考えられている。なお筆者が得た実験成績をもとにして、抗癌剤投与による吉田肉腫細胞の推移を模型的に画いてみると(図11)、抗癌剤投与後2時間目にGo期細胞の増加、分裂像の消失が認められ、これは核酸合成の抑制に起因するものとする。このことは、acid DNaseの活性が抗癌剤投与後2時間目に増加していることと一致するものであり、acid DNaseの活性増加とDNA合成の抑制との間に因果関係があるものと考えられる。

II群(MMC 2mg/kg)とIII群(4剤併用)を比較すると、II群ではGo期細胞がいちじるしく増加し、投与後8時間目でピークに達した後漸減し、投与後16時間目ではGo期細胞由来の変性型細胞が出現したものと推測される。他方III群では変性型細胞が時間の経過とともに増加するのに対し、2時間目で増加しているGo期細胞がその後減少傾向をたどるが、このように2つの実験群の間で差があることは使用薬剤の作用に差異があることを示すものと考え

えられる。なおIII群のラットの大部分が抗癌剤投与後24時間以内に死亡し、対照群にくらべて何ら延命効果が得られなかった事実と考えあわせるとき、本実験に使用した4剤混合薬剤の細胞および生体および傷害が激しいことを知ることができる。acid phosphataseの活性減少は細胞障害が進行した8時間目以後にみられ、とくにGo期の細胞、変性型細胞の増加と関係があるように考える。

D 抗癌剤投与による吉田肉腫移植ラットの生存日数

各実験群について吉田肉腫移植ラットの生存日数を観察した結果では、大量のMMCを投与したII群(MMC 2mg/kg注入)においては延命効果が認められたのに対し、I群(MMC 0.4mg/kg注入)では生存日数の延長が認められなかった。さらに4剤併用のIII群では投与後24時間以内に大部分のラットが死亡しており、薬剤の使用量が多すぎたため、吉田肉腫移植ラットに対する中毒作用によるものと考えたい。

以上の諸点を総括するとライソゾーム酵素の活

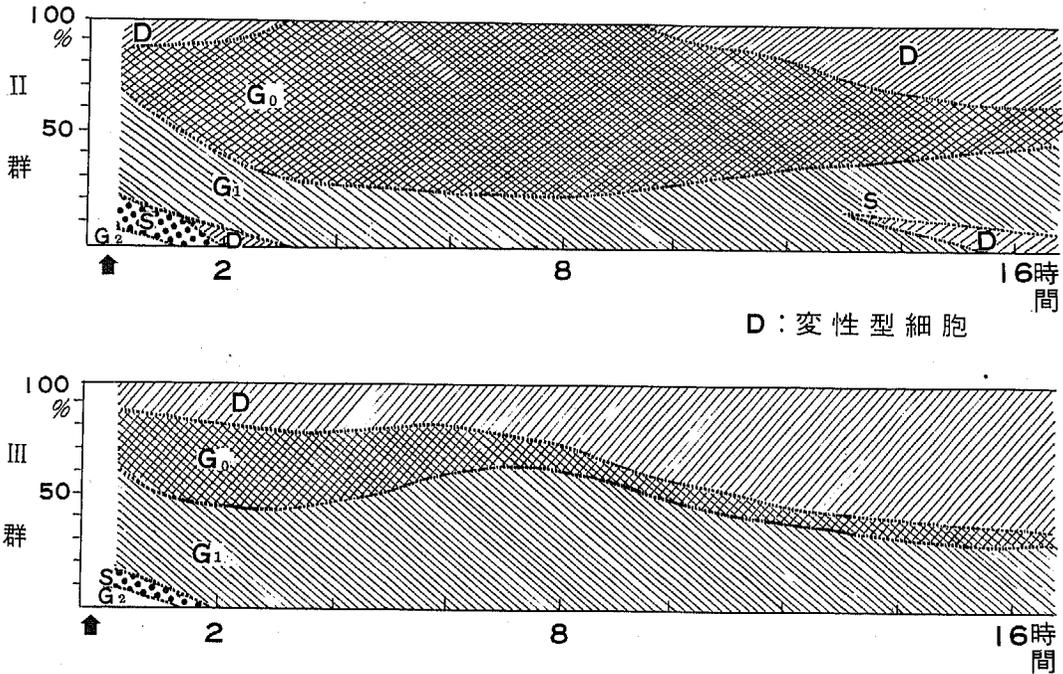


図11 抗癌剤投与による吉田肉腫細胞の増殖サイクルステージ別百分比の変化

性について検討した抗癌剤投与後16時間までの時期では、各実験群の間で薬剤による細胞の反応にはかなりの差があることが認められた。

増殖のさかんな腫瘍細胞内における酵素代謝は正常細胞のそれとはもちろんことなつたものであろうが、ある種の平衡のとれた生成代謝が行われているものと考えたい。しかし抗癌剤投与によってひきおこされた細胞内顆粒(ライソゾーム)の酵素活性の変化が単に細胞内の酵素代謝の調節の乱れを示すものであるのか、細胞崩壊に積極的に関与していることを示すものなのかをこの実験で得た成績から断定することは困難であり、今後の検討にまたねばならない。

V 結 語

雌性呑竜ラット腹腔内へ移植した吉田肉腫腹水細胞に対して抗癌剤を作用させ、腹水細胞内ライソゾーム酵素活性の消長を検討するとともに、吉田肉腫腹水細胞の形態的変化および移植ラットの生存日数の延長効果を観察した。

比較的均一にライソゾームが存在すると思われる分画(6,240×g, 10分~18,320×g, 20分によって分画されたライソゾーム分画)については、

(1) Acid phosphatase: II群(MMC単独, 2mg/kg)では抗癌剤投与後8時間目に、III群(4剤併用)およびIV群(3剤併用)では16時間目に、それぞれ acid phosphatase の比活性が減少した。

(2) β -glucuronidase: いずれの実験群についても抗癌剤投与後2, 8, 16時間目の β -glucuronidase比活性は変化しなかった。

(3) Acid DNase: II群(MMC 2mg/kg)およびIII群(4剤併用)では投与後2時間目に、III群(4剤併用)およびIV群(3剤併用)では投与後16時間目に、acid DNase の比活性が増加した。すなわち抗癌剤によるこの3種のライソゾーム酵素比活性の反応はそれぞれの酵素で特異的であった。

(4) 抗癌剤投与による吉田肉腫細胞の形態的変化: II群(MMC 2mg/kg)においては投与後2時間目にGo期細胞が増加し、核分裂像がいちぢるしく減少した。8時間目では変性細胞が認められなくなり、Go期細胞がさらに増加した。16時間目では細胞数が減少し、変性細胞由来の細胞および変性型細胞が増加し、Go期細胞は減少した。III群(4剤併用)では投与後2時間目に変性型細胞とGo期細胞が増加し、細胞分裂像は消失した。8時間目では変性型細胞が増加し、Go期細胞が減少した。16時間目では

さらにこの傾向が顕著となった。

(5) 抗癌剤による吉田肉腫移植ラットの生存日数の変化: 対照にくらべII群(MMC 2mg/kg)では延命効果が認められたのに対して、I群(MMC 0.4mg/kg)では延命効果は認められず、さらにIII群(4剤併用)では大部分のラットが24時間以内に死亡した。

(本論文の要旨は第8回術後代謝研究会において発表した)。

稿を終るにあたり、酵素活性の検討に関して本学薬理学教室中西顕央助教授、細胞の形態的変化の検討に際しては中央検査部病理丸山雄造講師のご指導をいただき、さらに順応医学研究施設生化学部門武富保教授、内貴正治助手、衛生学教室広沢毅一講師、病理学教室吉田安雄技官の諸氏より御教示、御助言をいただいたことに対して、深く感謝したい。

文 献

- 1) De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Tissue fractionation studies, 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue, *Biochem. J.*, 60: 604-617, 1955
- 2) Weissmann, G.: The role of lysosomes in inflammation and disease, *Ann. Rev. Med.*, 18: 97-112, 1967
- 3) 金井泉, 金井正光編: 臨床検査法提要(25版), pp. VII章77-79, 金原出版, 東京, 1969
- 4) 梶屋富一, 延永正: β -グルクロニダーゼ, 赤堀四郎編, 酵素研究法IV, pp. 760-769, 朝倉書店, 東京, 1963
- 5) 梶屋富一, 加藤盛一: β -glucuronidase, 赤堀四郎, 沖中重雄監修, 臨床酵素学, pp. 395-404, 朝倉書店, 東京, 1964
- 6) 柴谷篤弘, 木原弘二: Nucleases, 赤堀四郎編, 酵素研究法II, pp. 172-181, 朝倉書店, 1963
- 7) 関口豊三: Deoxyribonucleases, 赤堀四郎, 沖中重雄監修, 臨床酵素学, pp. 366-376, 朝倉書店, 東京, 1964
- 8) 高橋泰常, 高垣玄吉郎: 酸溶性磷酸化合物の化学的定量法, 吉川春寿, 高橋泰常編著, 磷酸代謝実験法(1), pp. 11-23, 広川書店, 東京, 1958
- 9) 石井信一: 蛋白質の定量法, 赤堀四郎, 水島三

- 一郎編, 蛋白質化学 2 卷, pp. 120-121, 共立出版, 東京, 1958
- 10) 吉田富三: 吉田肉腫, pp. 83-104, 寧楽書房, 東京, 1959
 - 11) 土屋純, 前川正, 佐川尚夫, 佐藤貞夫, 大和建昭: 腫瘍細胞の細胞回転に関する研究, 第3報, 吉田肉腫細胞の増殖サイクルにおよぼす Prednisolone の影響について, 日血会誌, 31: 519, 1968
 - 12) 甲斐沼正, 弘中武, 木村英之, 中川雅夫, 垣内孟, 芦原司, 竹岡成, 藤田哲也: ^3H -Thymidine autoradiography による吉田肉腫の ascitic form と solid form における細胞増殖の比較, 核医学, 6: 65, 1969
 - 13) 真壁肇: ワイブル確率紙の使い方, 日本規格協会, 東京, 1966
 - 14) Rosen, S., Coughlan, M. and Barry, K.G.: Renal acid deoxyribonuclease: Observations on distribution and cell relationship(31883), Proc. Soc. exp. Biol., 124: 909-912, 1967
 - 15) Beck, C., Mahadevan, S., Brightwell, R., Dillard, C.J. and Tappel, A.L.: Chromatography of lysosomal enzymes, Arch. Biochem., 128: 369-377, 1968
 - 16) Appelmans, F. and De Duve, C.: Tissue fractionation studies, 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat liver particles, Biochem. J., 59: 426-433, 1955
 - 17) 仁井谷久暢, 下山正徳, 谷口猛, 木村禰代二: Lysosome と化学療法, 1. 吉田肉腫細胞の lysosomal enzyme, 医学のあゆみ, 62: 130-134, 1967
 - 18) Shamberger, R.J.: Lysosomal enzyme changes in growing and regressing mammary tumours, Biochem. J., 111: 375-383, 1969
 - 19) Weissmann, G. and Thomas, L.: Studies on lysosomes, 1. The effects of endotoxin, endotoxin tolerance, and cortisone on the release of acid hydrolases from a granular fraction of rabbit liver, J. exp. Med., 116: 433-450, 1962
 - 20) Koldovsky, O.: Developmental changes of β -galactosidase and β -glucuronidase in the rat liver and kidney, Arch. Biochem., 142: 378-381, 1971
 - 21) Anderson, J.: The effect of anti-inflammatory drugs on the enzymic activity of a rat liver granular fraction which increases vascular permeability, Biochem. Pharm., 17: 2253-2264, 1968
 - 22) 小川和朗, 斉藤多久馬, 馬屋原宏: ライソゾームの微細構造, 細胞, 2(4): 2-13, 1970
 - 23) Rahman, Y.E., Howe, J.F., Nance, S.L. and Thomson, J.F.: Studies on rat liver ribonucleases, 2. Zonal centrifugation of acid ribonuclease: Implications for the heterogeneity of lysosomes, Biochim. Biophys. Acta, 146: 484-492, 1967
 - 24) Rahman, Y.E. and Cerny, E.A.: Studies on rat liver ribonucleases, 3. Further studies on heterogeneity of liver lysosomes intracellular localization of acid ribonuclease and acid phosphatase in rats of various ages, Biochim. Biophys. Acta, 178: 61-67, 1969
 - 25) Suzuki, A., Niitani, H., Shimoyama, M. and Kimura, K.: The role of lysosomes in cancer chemotherapy, 1. A study on lysosomal enzymes in Yoshida ascites sarcoma cells, GANN, 57: 185-192, 1966
 - 26) Aoshima, M., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.: Biochemical changes in tumor cells caused by antitumor agents, 3. Further studies on the effects of antitumor agent on NADase and a few lysosomal enzymes of Yoshida sarcoma cells, GANN, 58: 75-84, 1967
 - 27) 寺脇朝治, 紺谷日出雄, 土肥淳二, 田口鉄男: エールリッヒ腹水癌細胞の核酸代謝におよぼす mitomycin C の影響, 阪大医誌, 12: 837-839, 1960
 - 28) Kontani, H.: Effect of mitomycin C on nucleic acid biosynthesis in Ehrlich ascites tumor cells, Biken J., 7: 9-20, 1964
 - 29) Kersten, H.: Action of mitomycin C on nucleic acid metabolism in tumor and bacterial cells, Biochem. Biophys. Acta., 55: 558-560, 1962
 - 30) Kersten, H., Kersten, W., Leopold, G. and Schnieders, B.: Effect of mitomycin C on DNAase and RNA in Escherichia coli., Biochim. Biophys. Acta, 80: 521-523, 1964
 - 31) Lfrman, m.I., Benyumovich, M.S.: Effect of

- mitomycin C on protein synthesis in human neoplastic cell lines, *Nature*, 206: 1231-1232, 1965
- 32) Studzinsky, G.P. and Cohen, L.S.: Mitomycin C induced increases in the activities of the deoxyribonucleases of HeLa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23: 506-512, 1966
- 33) Studzinsky, G.P. and Cohen, L.S.: Elevation of deoxyribonuclease activities in HeLa cells treated with selective inhibitors of DNA synthesis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 25: 313-318, 1966
- 34) Constantopoulos, G. and Tehen, T.T.: Enhancement of mitomycin C induced breakdown of DNA by inhibitors of protein synthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, 80: 456-462, 1964
- 35) Brody, S.: Studies on ribonuclease and deoxyribonuclease activities in homogenates from human placenta, *Acta Chemica scand.*, 7: 721-734, 1953
- 36) Sung, S.-C.: Deoxyribonucleases from rat brain, *J. Neurochemistry*, 15: 477-481, 1968
- 37) Lehman, I.R.: Deoxyribonucleases: Their relationship to deoxyribonucleic acid synthesis, *Ann. Rev. Biochem.*, 36: 654-668, 1967
- 38) 市原明, 勝沼信彦編, 坪井昭三: 代謝調節, pp. 59-73, 朝倉書店, 東京, 1968
- 39) Carrarat, M. and Bernardi, G.: Studies on acid deoxyribonuclease, 5. The oligonucleotides obtained from deoxyribonucleic acid and their 3'-phosphate termini, *Biochemistry*, 7(3): 1121-1131, 1968
- 40) Laskowski, M.: Deoxyribonucleases, in *The Enzymes*, vol. 5. edited by Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrbäck, K., 2nd Ed., pp. 123-147, Academic Press, New York and London, 1961
- 41) Yasuzumi, G., Tsubo, I., Yasuda, M., Sugioka, T., Sakamoto, H. and Yasuzumi, F.: Electron microscope studies on atypical spermatozoa of pond snail *Cipangopaludina malleata* reeve, under consideration of conversion of DNA into polysaccharide, *Comparative spermatology*, Proceedings of the 1st International Symposium (Rome - Siena), 401-413, 1969
- 42) 今泉宗久, 近藤達平, 市橋秀仁, 今村達雄, 星川信: 制癌剤適応判定法に関する研究(その八)(殊にAPD法に関する検討), 日本癌治療学会総会(第8回)抄録集, 60, 1970
- 43) Niitani, H., Suzuki, A., Shimoyama, M. and Kimura, K.: The role of lysosomes in cancer chemotherapy, 2. Effect of mitomycin-C injection on lysosomal enzymic activities of Yoshida ascites sarcoma cells, *GANN*, 57: 193-200, 1966
- 44) 藤田哲也: 動物細胞の分化, 小川和朗, 小田琢三, 黒住一昌, 杉野幸夫編, 細胞学大系, 5, pp. 197-223, 朝倉書店, 東京, 1971
- 45) 藤原美定, 哺乳動物細胞におけるDNA複製, 生物物理, 11: 120-129, 1971
- 46) 松沢大樹, 奥村寛, 鈴木茂, 坪内進: 細胞周期外のいわゆる休止腫瘍細胞(Resting Tumor Cell)について, 第28回日本癌学会総会記事, 159, 1969

(1971. 10. 25 受稿)