

制癌物質に関する研究

第2編 Lithospermum の抗腫瘍作用並びに 抗菌作用について

昭和41年11月30日 受付

(特別掲載)

信州大学医学部産科婦人科学教室

(主任: 岩井正二教授)

大学院学生 飯 沼 博 朗

Studies on Antitumor-substances

Part 2. Studies on Antitumoral and Antibacterial Effect of Lithospermum

Hiroo Iinuma

Departments of Obstetrics and Gynecology,

Faculty of Medicine, Shinshu University

(Director: Prof. S. Iwai)

緒 言

ムラサキ科植物 Lithospermum は、初め経口避妊薬として、その後 Cranston 等により実験的に性周期抑制作用のあることで注目を集め、わが教室にても、この方面に関し福沢、伊藤、三浦、松浦等の相次ぐ業績がある。殊に蛋白性ホルモンである Gonadotropin を不活化する物質が Lithospermum エキス中のキノン体によるものであることが明らかにされている。最近となつて抗腫瘍剤開発の研究が盛んになるにつれて、数多くの生薬のうち「ムラサキ」及び「レンギョウ」のエキスに抗腫瘍作用があることが、国立ガンセンター田中等によつて発表された。これはキノ

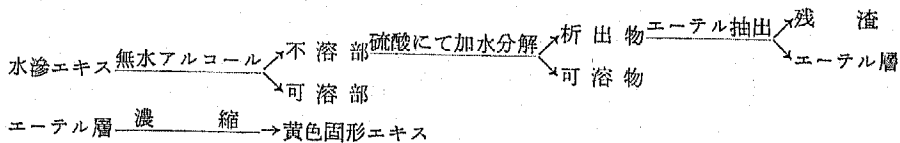
ン体との関連において甚だ興味深く思われる。そこで著者は教室における Lithospermum に関する研究の一環として、また今回の制癌物質に関する研究の一部として、これの抗腫瘍作用と、併せて抗菌作用につき実験的研究を行つたのでその成績を報告する。

成 績

1. Lithospermum エキスの抽出

原料の乾燥 Lithospermum 560g を温湯 3ℓ, 2ℓ, 2ℓ で夫々浸出し、その滲液を合せてこれを減圧下濃縮し第1図の如く処理して先ず黄色の固形エキス(収量約1g)を得る。

第1図 抽出方法



この黄色固形エキスを昇華し、これを Lithospermum エキスとして使用した。

なお本エキスの化学的性質は第1表の如くこれまでも Shikonin の誘導体または分解産物で一種のナフトキノン誘導体を含むと推定されている。

2. HeLa 細胞を用いての組織培養

(1) 実験材料

第1表 Lithospermum エキスの化学的性状

	反 応
水 溶 液	暗褐色, 酸性
水溶液 + アルカリ	暗赤褐色
Fe Cl ₃ { 水溶液	(-)
{ アルコール溶液	暗緑色
ニトロプルシッド Na	(+) 赤色

HeLa 細胞は本学細菌学教室から分与されたものを使用し、その培地は Y L H 培地 (Yeastextract-Lactoalbumin-Hanks medium) に 20% の牛血清を加えたものを用いた。

Y L H 培地は次の組成を有する。

Hanks 液	100ml
Yeastextract	1.0g
Lactoalbumin hydrolysate	5.0g
蒸溜水	900ml

Hanks 液は、A 液 (Glucose 10.0g, NaCl 80.0g, KCl 4.0g, MgSO₄ · 7H₂O 2.0g, KH₂PO₄ 0.6g, Na₂HPO₄ · 2H₂O 0.6g, 蒸溜水 800ml) と B 液 (0.2% Phenol red 100ml) とを混じ、これに C 液 (CaCl₂ 4g, 蒸溜水 100ml) を加え、クロロフォルム 3~4 ml を添加して 4°C に保存しておき、用に臨んで蒸溜水で 10 倍に稀釈し、10 ポンド 10 分間滅菌後 1.4% NaHCO₃ 液にて pH を 7.4~7.6 の弱アルカリ性に調整する。

牛血清には予めペニシリン 1000u/ml 及びストレプトマイシン 1000r/ml を加え、これを 20% に上記培地に添加した。

また培地をいれる培養瓶は三陽の 15×15×40mm 短柵瓶を用いた。

(2) 実験方法

i. 発育曲線を求める実験

Lithospermum エキスが HeLa 細胞の発育に与える影響を観察するため本実験を行った。

HeLa 細胞が単層培養されている角型培養瓶の培地を捨て、これに 0.05% Trypsin 溶液を加え、30 分間 37°C 孵巢中においた後、Trypsin 溶液を捨て、GKN 液で 2~3 回洗い、実験に使用する培地を瓶中に入れて HeLa 細胞をガラス壁から落し、細胞数を 10⁴/ml 位になるように培地の量を加減し、その 2.0ml ずつを短柵瓶に分注、培養する。培養 2 日目にそれぞれまで培養してきた培地を捨て、一定濃度に Lithospermum エキスを含まぬ培地と交換し、以後培養 3 日、5 日、7 日及び 9 日目に細胞の数を算定して発育の状態を観察した。なお対照には Lithospermum エキスを含まないもの及びヨモギの同様の抽出法によつて得たエキスを同一濃度に加えたものを用いた。

上記の Trypsin 溶液及び GKN 液の作り方は次の如くである。

Trypsin 溶液：

- (i) Trypsin 2g をビーカーに入れ、GKN 液を加えて泥状にする。
- (ii) これに 900ml の GKN 液を加え

(iii) さらに 1.4% NaHCO₃ 60ml を加える。

(iv) よく振盪して GKN 液を加え、総量 1000ml とし、濾過する。

(v) この液に 1:4 の割に GKN 液を加えて Trypsin 溶液 (0.05%) を得る。

GKN 液：

NaCl	80g
KCl	4g
Glucose	10g

蒸溜水 1000ml これにクロロフォルム 3~4 ml を加え 4°C に保存する。用に臨み、蒸溜水にて 10 倍に稀釈後 120°C, 15 分間滅菌する。

なお培養液の pH は組織液と同様に pH 7.4~7.6 となるように調整した。pH 指示薬としては、Phenol red を用い、培養液が上記 pH の示す色調を示すようにした。

また細胞数の算定は次の方法によつた。即ち、培養短柵瓶を孵巢中から取り出し、培養液を捨て、これと同量の 0.05% Trypsin 溶液を入れ、再び孵巢中に 30 分間おいて細胞を瓶壁から剝しやすくする。更に取り出し、駒込ピペットにて細胞を壁から落し、これに 2ml のクリスタル紫溶液を入れ 30 分間放置して核を染色して Thoma 氏血球計算板にて算定、同一濃度に 2~3 本の培養瓶を使い、1 本につき 10 視野を数えて集計し、その平均値をとつた。

なおクリスタル紫溶液は、クリスタル紫 1.0g, クエン酸 0.05M, 蒸溜水 500ml を加え、これに局方フォルマリン原液 5 滴を加えたものを使用した。

ii. 形態学的変化の観察

Lithospermum 添加培地中の HeLa 細胞の形態学的変化を観察するため顕微鏡用カバー・ガラスを半切したものを短柵瓶の中に入れ、そのガラス面上に HeLa 細胞が増殖するようにした。即ち、前記の発育曲線を求める実験の場合と同様に培養 2 日目の培地を捨て、エキスを含有培地と交換し、培養 3 日、5 日、7 日及び 9 日目に中のカバー・ガラスを取り出し、そのまま染色し、スライド・ガラスに貼付し鏡検した。培養瓶は同一濃度に 2~3 本を用い、同一濃度のカバー・ガラス半切のものを同一スライド・ガラスに貼付し、観察に便ならしめた。染色は Wright-Giemsa 染色を行い、まず Wright 液で 10 分間固定して水洗し、次いで Giemsa 液で 30 分間染色した。

なお上記の発育及び形態についての実験は HeLa 細胞のほか L 細胞 (マウス線維芽細胞由来の固定細胞株) 及び McCoy 細胞 (ヒト関節囊由来の固定細胞株) についても行つた。

(3) 実験成績

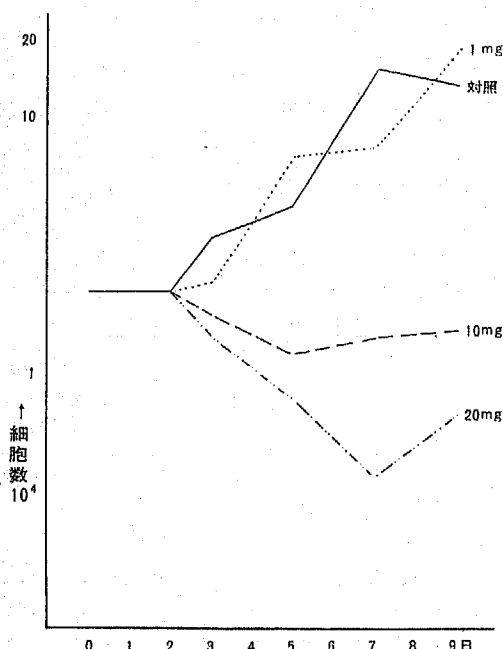
i. Lithospermum エキスの HeLa 細胞発育への影響

Lithospermum エキスを培地 1ml中に20mg, 10mg, 1mg添加し, 添加前と添加後, 培養1日, 3日, 5日及び7日の細胞数(単位 10^4)を測定した第1回実験, 及びエキス添加量を10mg, 2mg, 1mgとして同様に測定した第2回実験の成績は第2表の如くであり, 夫々をグラフに示すと第2図及び第3図の如くである。

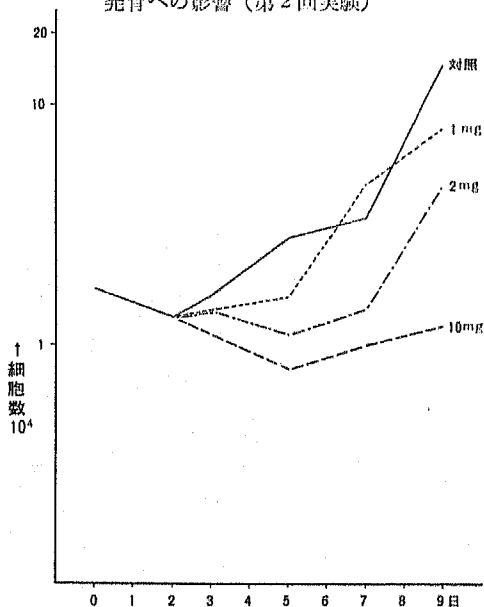
第2表 Lithospermum エキスの HeLa 細胞発育への影響 (細胞数 10^4)

実験	エキス添加量 (1 ml)	添加前	添加後培養日数			
			1日	3日	5日	7日
第一回実験	20mg	2.1	1.4	0.8	0.4	0.7
	10mg	2.1	1.7	1.2	1.4	1.5
	1mg	2.1	2.3	7.1	7.9	18.7
	0 (対照)	2.1	3.4	4.6	15.7	13.9
第二回実験	10mg	1.3	1.1	0.8	1.0	1.2
	2mg	1.3	1.4	1.1	1.4	4.7
	1mg	1.3	1.4	1.6	4.7	8.0
	0 (対照)	1.3	1.6	2.8	3.4	14.6

第2図 Lithospermum エキスの HeLa 細胞発育への影響 (第1回実験)



第3図 Lithospermum エキスの HeLa 細胞発育への影響 (第2回実験)



即ち1mg添加では HeLa 細胞の発育は対照のそれとほとんど変わらないが, 2mgでは発育を抑制する傾向がみられ, 10mg及び20mgを添加した場合には, その後の培養中の細胞数はエキス添加前より少く, 殊に20mg添加では細胞数は急激に減少の経過をたどる。要するに培地 1 ml 中に Lithospermum エキス 10mg を加えた場合に HeLa 細胞の発育は著しく阻害されるとみることが出来る。

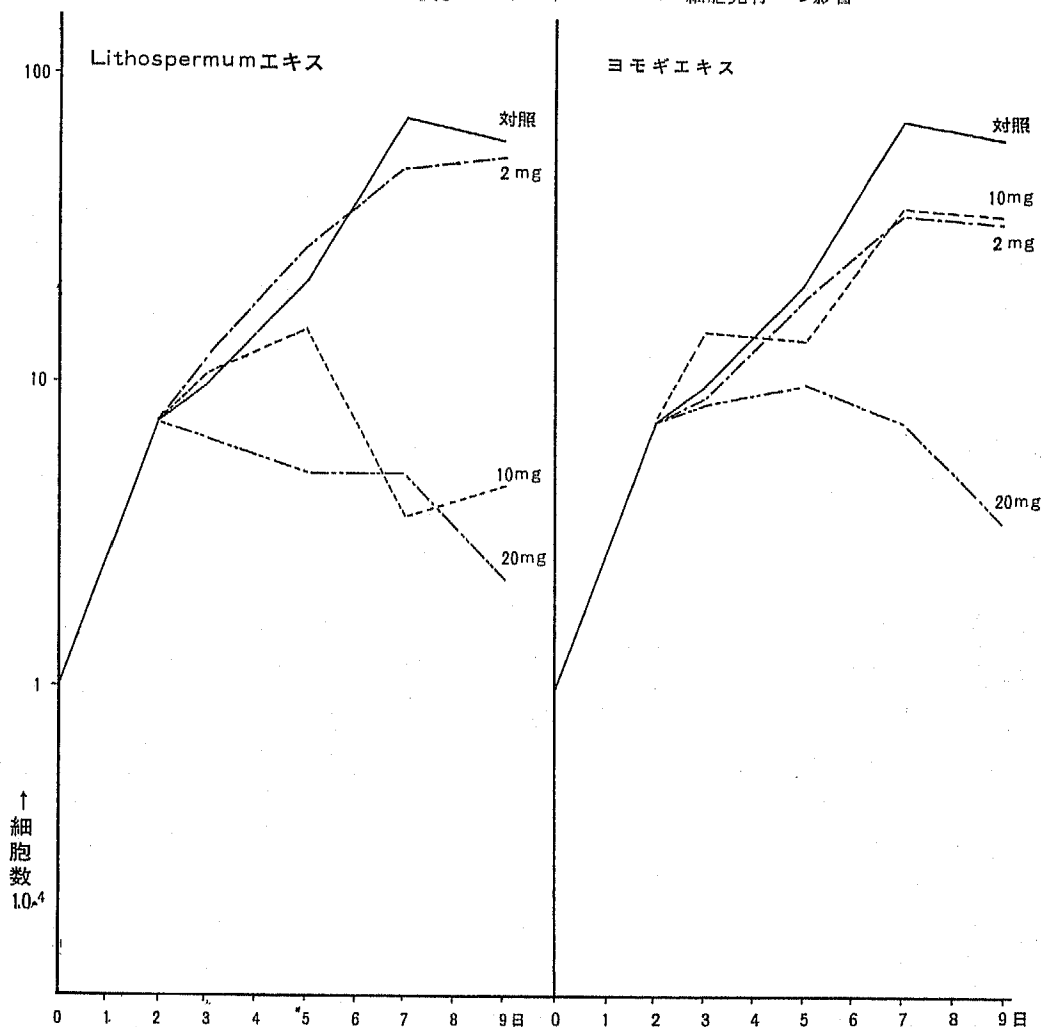
ii. ヨモギエキスの HeLa 細胞発育への影響 (Lithospermum エキスとの比較)

前実験における Lithospermum エキスの HeLa 細胞発育抑制効果が Lithospermum に特異的であるか否かをみるため, Lithospermum 同様, エキス中に有機物質を多量に含むと思われるヨモギエキスを Lithospermum エキスと同じ化学処理で作成して, これが HeLa 細胞発育への影響につき前実験と同様の方法で実験し, 同時に行つた Lithospermum エキスのそれと比較観察した。

なおヨモギエキスの化学的性状は, やや淡褐色, 酸性で, 水溶液に NaOH を加えてアルカリ性とするとき黄褐色を呈し, FeCl₃ により暗緑色となる。またニトロプルシッド Na による Legal の反応は陰性である。即ちフェノールを含み, キノンの如きカルボキシル基を含まない点が Lithospermum エキスと異なる。

成績は第4図の如く, Lithospermum エキスでは10mgにて発育抑制効果を示すが, ヨモギエキスではこの量にて発育抑制効果なく20mgにて僅かに発育に対す

第4図 Lithospermum エキス及びヨモギエキスの HeLa 細胞発育への影響



る悪影響がみられる程度である。

iii. Lithospermum エキスの L 細胞及び McCoy 細胞発育への影響

Lithospermum エキスが真に人癌由来の HeLa 細胞の発育に影響を与えるか否かを知るためには更に非腫瘍性の細胞についても発育の状態を調べて両者を対比する必要があるので、著者はこの目的にマウス線維芽細胞由来の L 細胞及び人関節囊由来の McCoy 細胞を選んで実験を行った。

実験材料並びに実験方法

L 細胞と McCoy 細胞の両者とも本学細菌学教室より分与をうけた固定細胞株を用いた。

培地は、L 細胞は HeLa 細胞の培養に使用したと同じ培地であるが、McCoy 細胞には次の組成を有す

る培地を用いた。

McCoy 細胞培地の組成：

0.5% LH 溶液*	160ml
TC medium 199	18ml
牛血清	20ml
8% NaHCO ₃	2ml

(* LH はラクトアルブミンの水解物)

L 細胞も McCoy 細胞も、予め単層培養した角型培養瓶の培地を各種濃度に Lithospermum エキスを含めた培地と交換し、細胞を瓶壁から剥脱せしめて 1 ml 中約 10⁴ 個の細胞数になるように培地の量を加減して短冊瓶に 2 ml ずつ分注、37°C に培養した。培養経過中の細胞数の算定は前実験の場合と同様である。

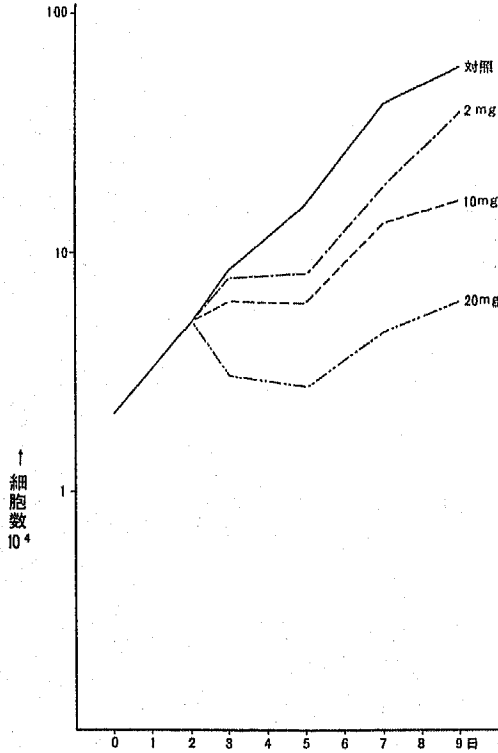
実験成績

Lithospermum エキスの L 細胞発育への影響は第3表及び第5図に、また McCoy 細胞発育への影響は第4表及び第6図に示す如くである。

第3表 Lithospermum エキスの L 細胞発育への影響 (細胞数 10^4)

エキス添加量 (1 ml)	添加前	添加後培養日数			
		1日	3日	5日	7日
20mg	5.1	3.0	2.7	4.6	6.2
10mg	5.1	6.2	6.1	13.1	16.4
2mg	5.1	7.8	8.1	18.9	38.5
0 (対照)	5.1	8.4	15.6	42.0	59.8

第5図 Lithospermum エキスの L 細胞発育への影響

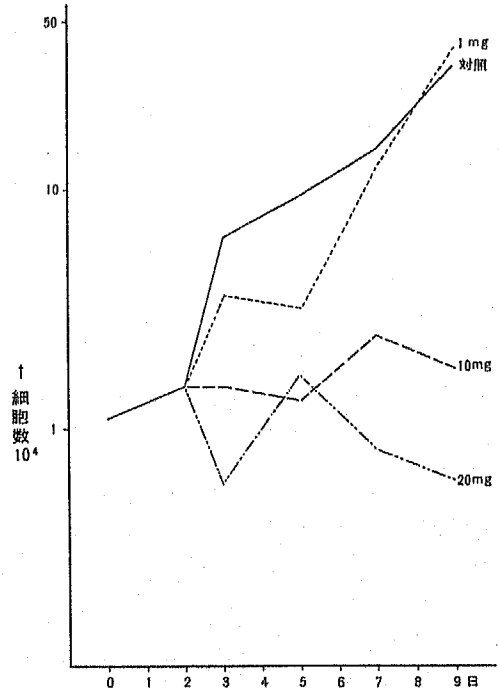


即ち、L 細胞においては、培地中に Lithospermum エキスを添加した場合、10mg、20mg、ともに発育抑制の程度は軽微であり、何れも培養7日目には添加前の細胞数を上回る細胞数となつている。また McCoy 細胞においては L 細胞より発育への影響は大きく、20mgにて発育抑止傾向がみられる。しかし両者とも Lithospermum エキスによる発育阻止作用は HeLa 細胞より軽度であり、HeLa 細胞への特異的作

第4表 Lithospermum エキスの McCoy 細胞発育への影響 (細胞数 10^4)

エキス添加量 (1 ml)	添加前	添加後培養日数			
		1日	3日	5日	7日
20mg	1.5	0.6	1.7	0.8	0.6
10mg	1.5	1.5	1.3	2.4	1.8
1mg	1.5	3.6	3.2	12.1	38.4
0 (対照)	1.5	6.3	9.4	14.4	33.0

第6図 Lithospermum エキスの McCoy 細胞発育への影響



用の一端を、うかがい知ることができる。

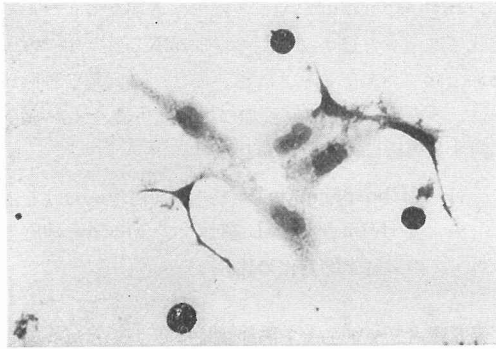
これを確かめるため、HeLa 細胞と L 細胞とを同一培地に混合培養し、これに Lithospermum エキス 20mg/ml を添加して、その後の二種細胞の消長を追求した結果、第7、8図の如く、培養日数の経過とともに HeLa 細胞対 L 細胞の出現比が減少するのを認めることができた。

iv. Lithospermum エキス添加培地における培養 HeLa 細胞の形態学的変化

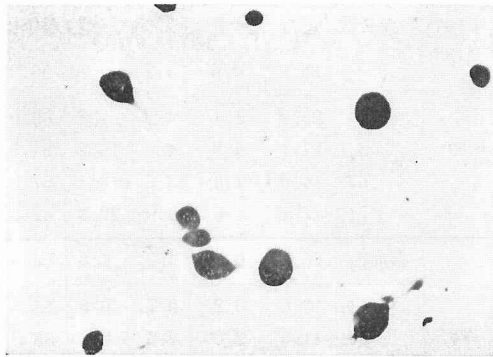
実験方法

HeLa 細胞の形態学的変化を観察するに当つては、野嶽の分類に従つた。野嶽は、細胞を(1)膨化・巨細胞 (2)核数別多核細胞 (3)矮小型細胞 (4)正常並びに異常

第7図 HeLa・L 両細胞混合培養5日目所見



第8図 HeLa・L 両細胞混合培養7日目所見



分体像を示す細胞とに区分して鑑別したが、著者は(1)正常分裂細胞 (2)異常分裂細胞 (3)膨化・巨細胞 (4)矮小型細胞 (5)静止原形細胞の5種に分け、夫々の比率を算定して形態学的変化を求めた。

なお、原形細胞の大きさを基準として2~6倍までを膨化細胞、7倍以上を巨細胞としてこれらを一括して膨化・巨細胞とし、原形細胞に比較して明らかに小形で円形または種々の怪奇の形態を有し、しかも濃縮、萎縮、崩壊状を呈するものを矮小型細胞とした。比率の算定には原則として細胞数1000個計算によつたが、瓶壁からの細胞剥脱が著しく多いときは500~100個計算によつた。

実験成績

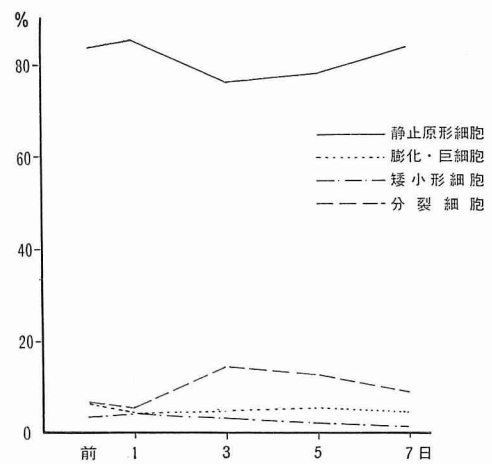
成績は第5表及び第9~12図の如く、HeLa細胞の発育に影響する10mg及び20mg添加の場合は、対照及び1mg添加の場合にくらべて静止原形細胞比率は1~3日目から急激に減少し、これに反して矮小型細胞比率は著増し、膨化、巨細胞比率にもまた増加がみられ、これらから、Lithospermum エキスのHeLa細胞に対する質的障害をうかがい知ることができる。

v. ヨモギエキス添加培地におけるHeLa細胞の

第5表 Lithospermum エキス添加培地における培養HeLa細胞の形態学的変化(各種細胞の出現率)

Lエキス添加量(1ml)	添加後培養日数	分裂細胞		膨化巨細胞	矮小型細胞	静止原形細胞
		正常	異常			
20mg	添加前	4.9	1.1	6.3	3.9	83.8
	添 1日	3.8	0.6	14.9	30.7	50.0
	加 3日	2.2	0.2	7.2	64.5	25.9
	後 5日	4.8	0	9.2	71.0	15.0
	後 7日	2.7	0.3	15.5	63.5	18.0
10mg	添加前	4.9	1.1	6.3	3.9	83.8
	添 1日	4.9	2.4	5.5	9.0	78.2
	加 3日	2.5	2.0	21.8	51.5	22.2
	後 5日	0.5	0	26.0	68.0	5.5
	後 7日	3.3	0	5.2	79.8	11.7
1mg	添加前	4.9	1.1	6.3	3.9	83.8
	添 1日	3.4	2.7	4.9	2.6	86.4
	加 3日	7.0	4.5	6.7	3.1	78.7
	後 5日	8.6	4.4	2.9	3.4	80.7
	後 7日	5.4	3.0	6.4	3.4	81.8
0(対照)	添加前	4.9	1.1	6.3	3.9	83.8
	添 1日	4.3	1.2	4.6	4.5	85.4
	加 3日	10.8	3.8	5.0	3.8	76.6
	後 5日	8.9	4.0	5.7	2.5	78.9
	後 7日	5.4	3.6	4.7	1.9	84.4

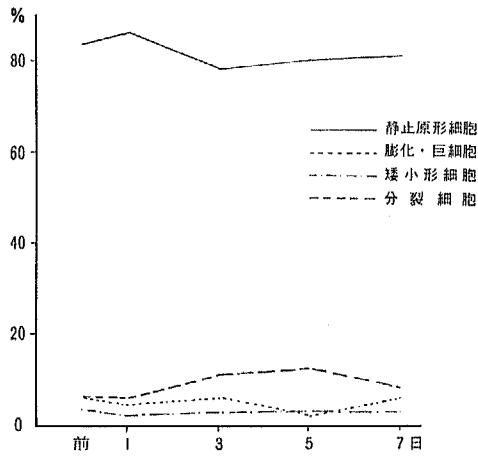
第9図 各種細胞の出現率(Lエキス非添加)



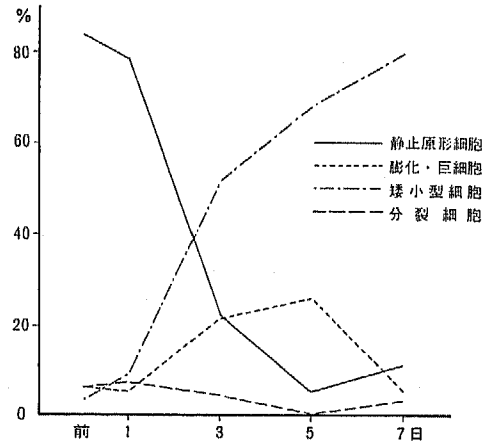
形態学的変化

ヨモギエキスの10mg及び2mgを添加し、前実験におけるLithospermumエキスと同様HeLa細胞の形

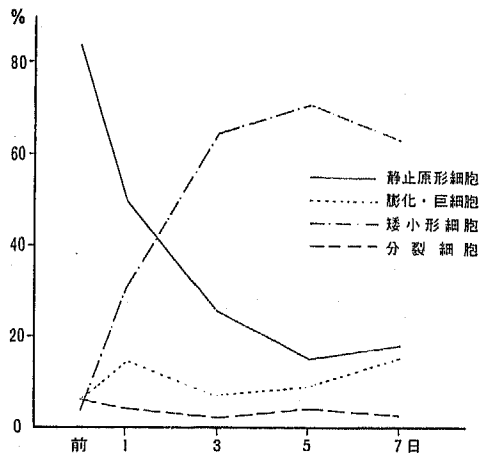
第10図 各種細胞の出現率 (Lエキス1mg/ml添加)



第11図 各種細胞の出現率 (Lエキス10mg/ml添加)



第12図 各種細胞の出現率 (Lエキス20mg/ml添加)



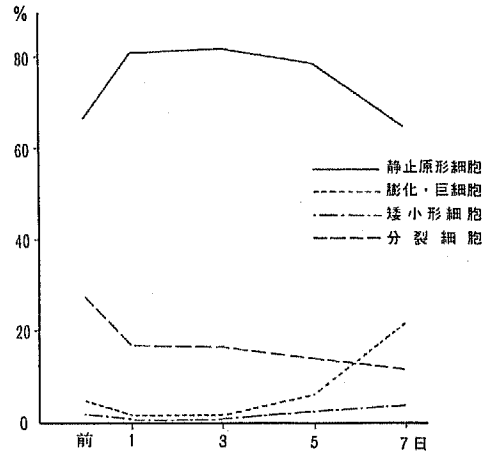
態学的変化をみた成績は第6表及び第13～15図の如く、Lithospermum エキスには著明な静止原形細胞比率の減少と矮小型細胞の増加がみられた10 mg/ml添加では、ヨモギエキスにおいては、これらの細胞比率は、対照及び2 mg/ml添加の場合と大差なく、細胞に対する傷害は殆ど認められない。

vi. Lithospermum エキス添加培地における培養 HeLa 細胞と L 細胞及び McCoy 細胞との形態学的変化の比較

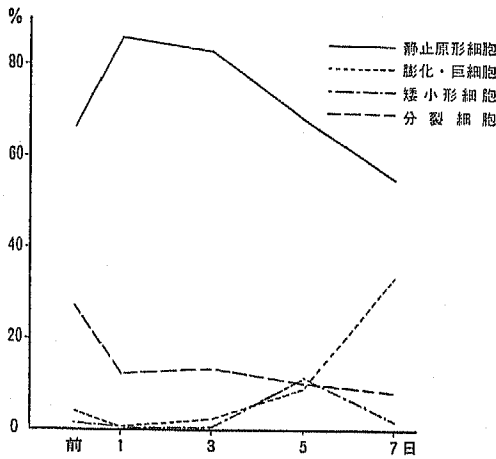
第6表 ヨモギエキス添加培地における HeLa 細胞の形態学的変化 (各種細胞の出現率)

ヨモギエキス添加量 (1ml)	添加後 培養日数	分裂細胞		膨化巨細胞	矮小型細胞	静止原形細胞
		正常	異常			
10mg	添加前	26.8	0.9	4.2	1.8	66.3
	添加後 1日	26.9	1.1	4.2	7.8	60.0
	3日	21.1	4.8	4.0	15.2	54.9
	5日	14.6	1.5	13.5	13.4	57.0
	7日	7.4	0	28.0	22.3	42.3
2mg	添加前	26.8	0.9	4.2	1.8	66.3
	添加後 1日	12.6	0.2	0.7	0.8	85.7
	3日	11.6	2.0	2.5	0.7	83.2
	5日	9.4	1.1	9.2	11.6	68.7
	7日	8.2	0.6	34.0	2.0	55.2
0 (対照)	添加前	26.8	0.9	4.2	1.8	66.3
	添加後 1日	16.3	0.5	1.6	0.8	80.8
	3日	14.4	1.8	1.4	0.7	81.7
	5日	12.1	1.4	6.0	2.5	78.0
	7日	10.4	0.7	21.4	3.3	64.2

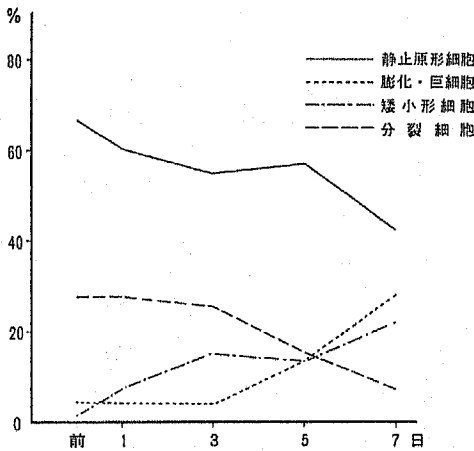
第13図 各種細胞の出現率 (ヨモギエキス非添加)



第14図 各種細胞の出現率 (ヨ・エキス 2mg/ml 添加)



第15図 各種細胞の出現率 (ヨ・エキス 10mg/ml 添加)



Lithospermum エキス 20mg/ml 添加培地における L 細胞及び McCoy 細胞の培養 1, 3, 5, 7 日目の各種細胞の出現頻度 (細胞1000に対する頻度) は、第7表の如くである。また夫々対照を 100 とした場合の比率を以て、HeLa 細胞のそれと比較すると第8表及び第16図の如くである。培養経過を見るに静止原形細胞及び分裂細胞は全般に対照より少く、HeLa 細胞、L 細胞、McCoy 細胞の各細胞とも日数とともに減少度は、ほぼ同様であるが、矮小型細胞は全般的に対照より多く、L 細胞及び McCoy 細胞では日数とともにやはり減少するが、HeLa 細胞は漸次増加の傾向を示し、膨化、巨細胞にても同様、HeLa 細胞のみ増加する傾向が認められる。即ち、L 細胞、McCoy 細胞では Lithospermum エキス添加により出現頻度は各

第7表 L エキス 20mg/ml 添加による各種細胞出現率

種類	添加後 培養 日数	分裂細胞		膨化	矮小型	静止原		
		正常	異常	巨細胞	細胞	形細胞		
L 細胞	対照	1日	12.2	1.0	6.2	8.2	72.4	
		3日	15.8	2.0	4.8	9.4	68.0	
		5日	14.0	6.0	9.0	17.0	54.0	
		7日	4.0	3.5	0	44.5	48.0	
	添加	1日	5.3	5.0	2.5	72.5	19.2	
		3日	1.8	0	1.3	72.2	24.9	
		5日	1.0	0	2.3	86.5	10.2	
		7日	0	0	8.0	96.2	3.0	
	McCoy 細胞	対照	1日	11.0	0	8.5	16.0	64.5
			3日	7.5	2.0	13.0	25.0	52.5
			5日	3.5	8.0	5.0	51.0	44.2
			7日	1.0	5.0	5.0	62.5	31.0
		添加	1日	5.0	0	13.0	82.5	4.0
			3日	0	5.0	21.0	64.5	14.0
5日			0	0	3.5	95.5	1.0	
7日			0	0	2.0	87.0	11.0	

第8表 L エキス 20mg/ml 添加による対照を100とした場合の各種細胞比率

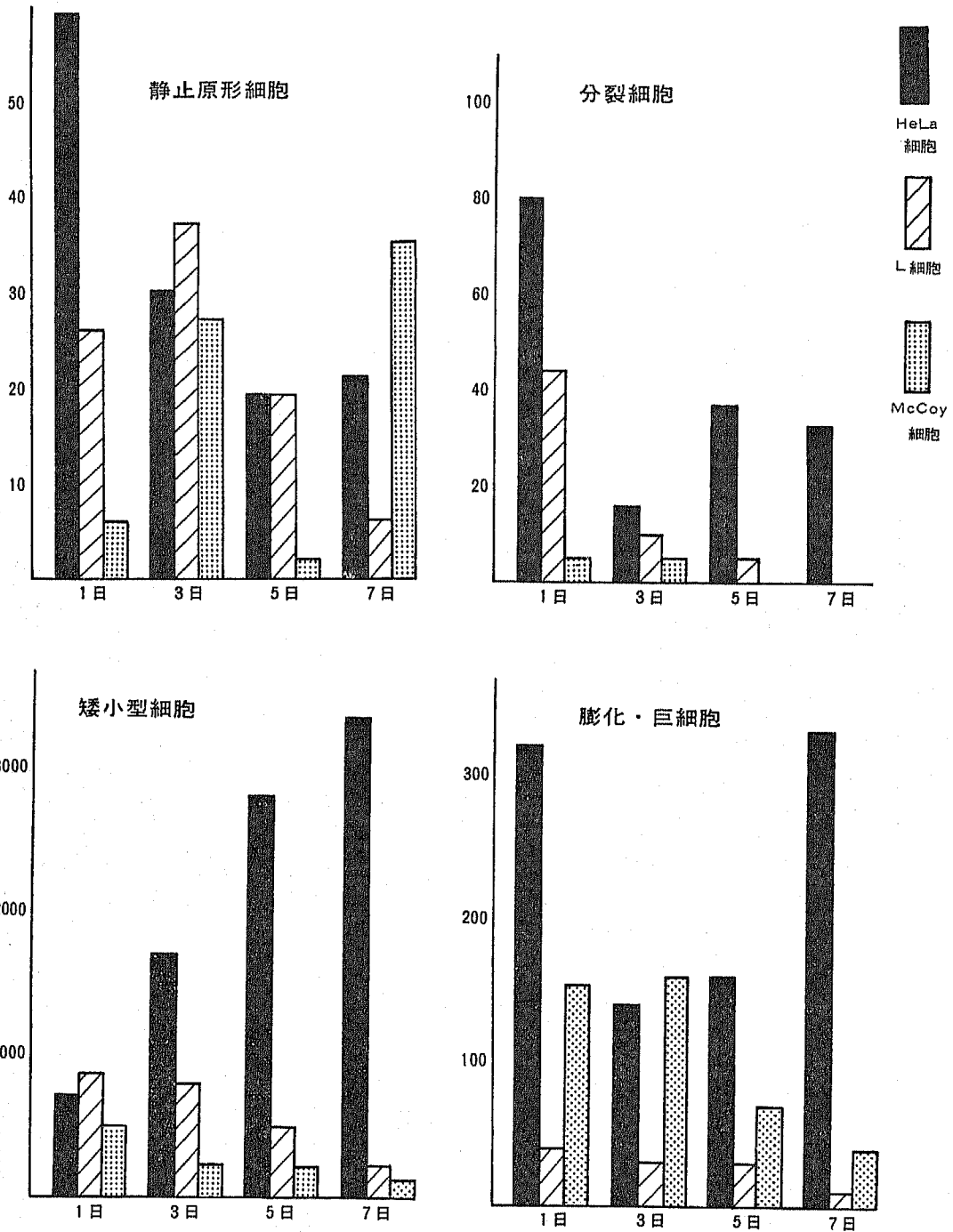
種類	添加後 培養 日数	分裂細胞	膨化 巨細胞	矮小型 細胞	静止原 形細胞
HeLa 細胞	対照	100	100	100	100
	1日	80	324	682	59
	3日	16	144	1697	30
	5日	37	161	2840	19
	7日	33	330	3342	21
	L 細胞	対照	100	100	100
1日		44	40	884	26
3日		10	27	768	37
5日		5	26	509	19
7日		0	8	216	6
McCoy 細胞		対照	100	100	100
	1日	5	153	516	6
	3日	5	162	258	27
	5日	0	70	187	2
	7日	0	40	139	35

種細胞とも漸減するが、HeLa 細胞のみは矮小型細胞、膨化、巨細胞に漸増傾向を認め得る。

(4) 小 括

i. 培地に 10mg/ml 以上の濃度に Lithospermum

第16図 L エキス 20mg/ml 添加による対照を 100 とした場合の各種細胞比率の経過 (HeLa 細胞, L 細胞, McCoy 細胞についての比較)



エキスを加えることにより、培地中の HeLa 細胞の発育は著しく阻害されるが、Lithospermum エキスと同じ方法で抽出したヨモギエキスでは、10mg/ml の濃度にも発育への影響は殆んど認められない。

ii. L細胞も McCoy 細胞も、培地に10mg/ml以上に Lithospermum エキスを加えると何れも発育は抑制されるが、その程度は HeLa 細胞にくらべて軽度であり、Lithospermum エキスを加えた培地に HeLa 細胞と L細胞とを同時に混合し培養すると、培養日数の経過とともに両細胞数の比には著明な減少が認められる。

iii. Lithospermum エキスが培地中の HeLa 細胞に与える影響をその形態学的変化から観察すると、培養早期からの分裂細胞比率及び静止原形細胞比率の減少、膨化、巨細胞比率の増加、矮小型細胞比率の著しい増加が認められる。しかし細胞数にあまり影響を与えないヨモギエキスでは、形態学的変化は対照との間に著しいちがいはない。

iv. Lithospermum エキス 20mg/ml 添加培地に HeLa 細胞、L細胞及び McCoy 細胞を夫々、別々に培養し、その培養経過中の分裂細胞、静止原形細胞、膨化、巨細胞及び矮小型細胞の比率を、同じく対照における比率を夫々100として換算し観察すると、何れも分裂細胞と静止原形細胞は、すべて100以下を示し、矮小型細胞は100以上を示すが、培養日数とともにL細胞と McCoy 細胞とは諸種細胞とも概むね漸減の傾向をとるに對して、HeLa 細胞のみは矮小型細胞と膨化・巨細胞、殊に前者において著しい増加傾向が認められる。

v. 以上組織培養による実験から、Lithospermum エキスの細胞への影響は強力ではないが、非腫瘍細胞にくらべて HeLa 細胞に対し特に強く発育阻害的に働くものようである。

3. 吉田肉腫を用いての動物実験

(1) 実験材料並びに実験方法

佐々木研究所から分与をうけた吉田肉腫腹水型を100g前後の雑系ラツテに移植し、Lithospermum エキスの細胞効果及び延命効果について実験した。即ち移植3日目の腹水中の腫瘍細胞 10^6 個をラツテ腹腔内に移植し、移植後7日目に Lithospermum エキスの一定量を腹腔内に注入した群と3日目に注入した群について、注入後24, 48, 72時間目及び96, 120時間目に腹水を採取し塗標標本を Giemsa 染色して細胞効果を観察した。細胞効果の判定には腫瘍細胞が専ら有糸分裂によつて増加するので、腫瘍細胞2000個中

の有糸分裂を行つている細胞を分裂各期に分けて算定し、その総数をもつて腫瘍細胞分裂率を出して、対照群のそれと比較推定した。

また移植後7日目に Lithospermum エキスの一定量を腹腔内に注入して毎日体重測定を行い延命効果を観察した。

(2) 実験成績

i. Lithospermum エキスの LD₅₀ について

動物実験に當り、Lithospermum エキスの腹腔内注入量を決めるため、先ずその LD₅₀ を調べた。即ち、体重100~130gのラツテ16匹を選び、そのうち4匹には Lithospermum エキス2.0g宛、6匹には3.0g、残る6匹には4.0gを腹腔内に注入した場合の24時間後の生死は第9表の如く、この結果から Behrens-Kaerber 氏の平均致死量法により LD₅₀ を算出するとその値は30.4g/kgとなる。従つて、あとの実験にはラツテに対する注入量を1.0gとすることにした。

第9表 Lithospermum エキスのラツテ腹腔内注入による致死量

動物番号	1	2	3	4	5	6	7	8
体 重	120	120	120	120	100	100	130	130
注 入 量	2.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	3.0	3.0
結 果	生	生	生	生	死	死	生	生
動物番号	9	10	11	12	13	14	15	16
体 重	130	130	100	100	100	110	110	110
注 入 量	3.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
結 果	生	生	死	死	死	死	死	死

ii. Lithospermum エキスの細胞効果

Lithospermum エキスの細胞効果をみるため移植後3日目及び7日目に Lithospermum エキスを腹腔内に注入して、吉田肉腫細胞2000個中の有糸分裂細胞数と崩壊腫瘍細胞数とを算定した。なお有糸分裂細胞は次の前・中・後・終期の4期に分けた。

前期：核分裂の第1段階で、染色体が細長いラセン形として核質から組織化される時期

中期：染色体が紡錘体の赤道面上の単一平面に並び、赤道板を形成する時期

後期：娘染色体が核紡錘体の極に向つて双星を形成して離れてゆく時期

終期：染色体が再び集つて中間核を形成する時期

また崩壊腫瘍細胞には、空胞形成があり細胞が死んでいると考えられるもの、染色性の低下しているもの、

原形質の膨化・流出・断裂しているもの及び細胞の残影をこれに含めた。

a. 移植後3日目に Lithospermum エキスを注入した場合

成績は第10表の如く、注入前認められた前期細胞及び中期細胞の24時間後における減少とそれ以降一般に有糸分裂細胞の増加傾向、並びに崩壊腫瘍細胞の24時間後における著しい増加を認めた。

第10表 吉田肉腫移植3日後Lエキスを注入群の腹水腫瘍細胞の変化〔()内は対照群〕

細胞種類		注入前	24時間	48時間	72時間
有糸分裂細胞	前期	28 (30)	14 (28)	18 (21)	30 (20)
	中期	4 (8)	0 (4)	2 (0)	4 (6)
	後期	0 (10)	0 (10)	4 (6)	14 (10)
	終期	0 (20)	0 (12)	8 (3)	10 (14)
	計	32 (68)	14 (54)	32 (30)	58 (50)
崩壊腫瘍細胞		270(118)	1434(150)	580(338)	276(216)

なお、Lithospermum エキス注入後24~48時間までの有糸分裂細胞数及び崩壊腫瘍細胞数の変動は第17, 18図の如く、12~24時間に夫々減少、増加のピークを認めた。

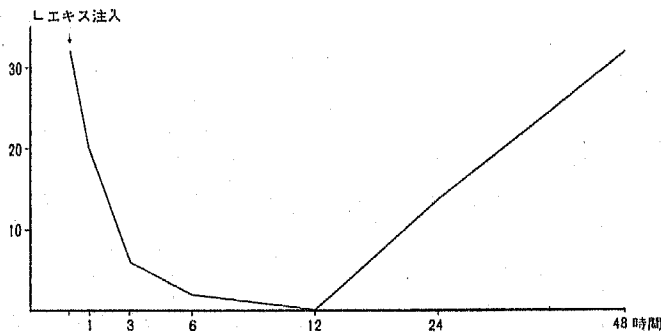
b. 移植後7日目に Lithospermum エキスを注入した場合

成績は第11表及び第19, 20図の如く、対照群では全期間を通じて一般に有糸分裂細胞は多少の増減はあるにしてもほぼ一定の値を示すのに対して、Lithospermum エキス注入群では、24時間(1日)目に著減し、以後再び増加を示す。また崩壊腫瘍細胞数はこれと対照的に注入後24時間(1日)目に著増し、以後再び減少の傾向をたどる。

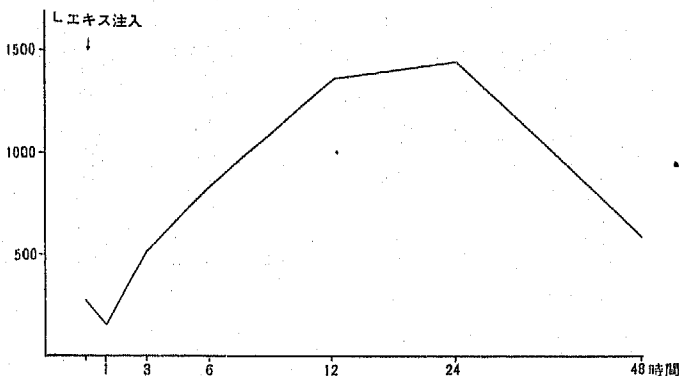
この際、腫瘍細胞の崩壊の仕方は、先ず核では核質が数個に断裂しているものが現われ、次に細胞質に空胞変性、細胞膜の崩壊等が認められる。

また第21~28図に経過を示す如く、これらの変化した腫瘍細胞は Lithospermum エキス注入後24~48時間以内に多数にみられるが、72時間以後は再び正常

第17図 Lエキスを注入後の有糸分裂細胞数の変動

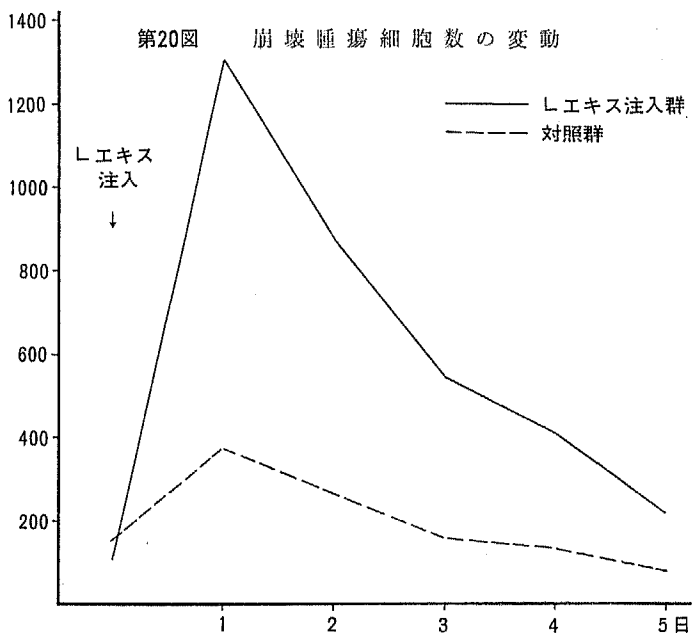
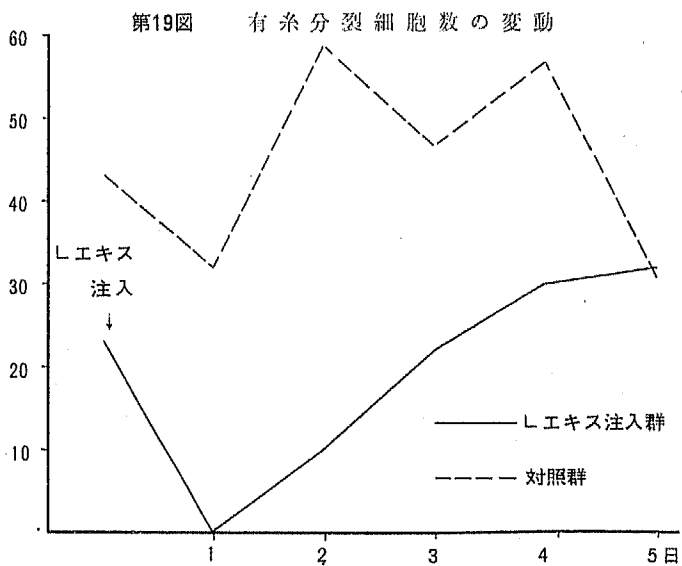


第18図 Lエキスを注入後の崩壊腫瘍細胞数の変動

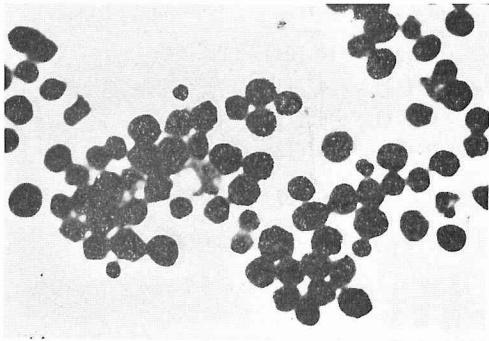


第11表 吉田肉腫移植7日後Lエキス注入群の腹水腫瘍細胞の変化
〔()内は対照群〕

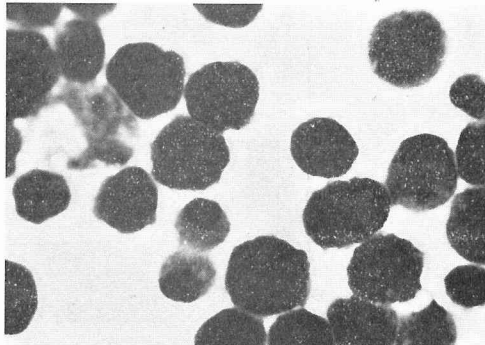
細胞種類		注入前	24時間	48時間	72時間	96時間	120時間
有糸分裂細胞	前期	10 (13)	0 (19)	6 (42)	16 (30)	16 (24)	24 (21)
	中期	3 (8)	0 (5)	0 (3)	0 (4)	4 (11)	4 (2)
	後期	7 (4)	0 (2)	0 (2)	6 (1)	6 (10)	2 (5)
	終期	3 (18)	0 (6)	4 (12)	0 (12)	4 (12)	2 (3)
	計	23 (43)	0 (32)	10 (59)	22 (47)	30 (57)	32 (31)
崩壊腫瘍細胞		107(144)	1316(369)	876(271)	540(169)	418(144)	220 (73)



第21図 Lエキス注入前(移植後7日目)の吉田肉腫腹水細胞(×400)

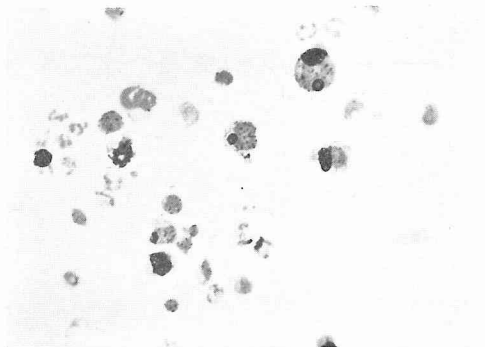


第22図 同上(×900)



有糸分裂の前期及び後期の細胞がみられる。

第23図 Lエキス注入後24時間目の腹水細胞(×400)

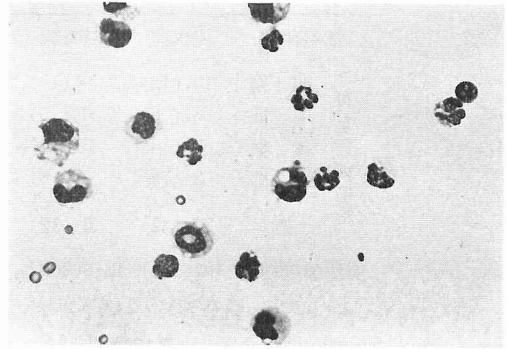


崩壊腫瘍細胞が多数みられる。

腫瘍細胞が増加して96~120時間目には細胞の殆んど大多数を占めるに至る。

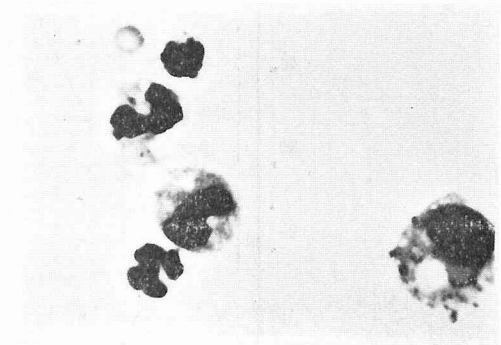
一方、細胞の崩壊が甚しい場合も、常に形態を正常に保全した腫瘍細胞の共存がみられることは、上記の如き Lithospermum エキスの腫瘍細胞に対する作

第24図 注入後48時間目の細胞(×400)



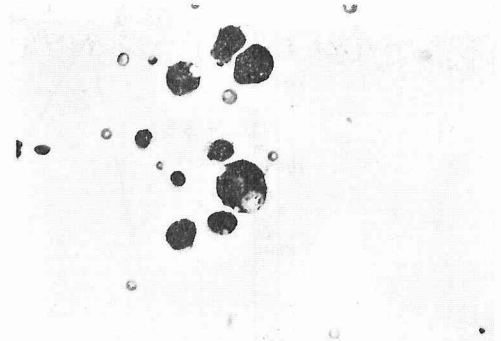
空胞変性。

第25図 同上(×900)



空胞変性と核の断裂。

第26図 注入後72時間目の細胞(×400)



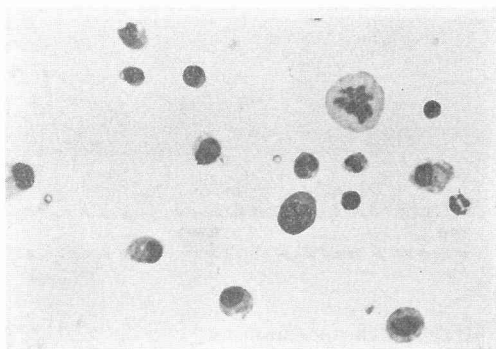
空胞変性がみられる、核質の黒い正常腫瘍細胞が多く存在する。

用が、それほど強力でないことを示している。

iii. Lithospermum エキスの腫瘍移植ラットに対する延命効果

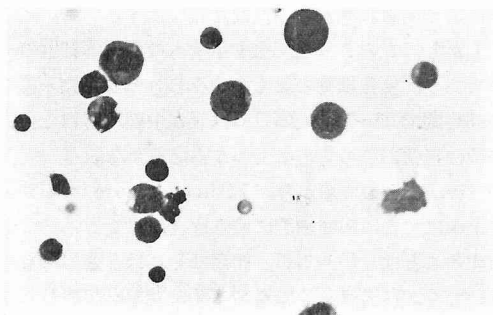
以上の実験にみられたような Lithospermum エキスの吉田肉腫細胞への直接的傷害作用が移植動物の延

第27図 注入後96時間目の細胞 (×400)



殆んど正常の腫瘍細胞，再び有糸分裂がみられる。

第28図 注入後120時間目の細胞 (×400)



正常の腫瘍細胞。

第12表 生存期間・体重

動物群別	動物番号	注入前	1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	8日	15日	20日	25日
L エキス 注入 群	1	125	138	135	140	140	141	142	146	142	153	158	168
	2	151	145	140	135								
	3	167	164	164	162								
	4	175	165	157	148								
	5	181	185	176	178	174							
	6	157	156	157	153								
	7	147	157	156	155								
	8	136	153	165	171	178	176	174					
対 照 群	9	116	133	130	130	131	130	121	116				
	10	164	162										
	11	171	162										
	12	186	173	174	180	177	182						
	13	171	169										
	14	141	145	147	138	143	147	148	153	154	173	176	180

第13表 平均生存日数

動物群別	25日生存	平均生存日数
Lエキス注入群	1/8	25/7=3.57
対照群	1/6	15/5=3.0

命効果にどの程度の影響を示すかをみるため更に本実験を行った結果、吉田肉腫腹水型移植後7日目に腹腔内に Lithospermum エキス 1 ml を注入したラツテ (8匹)、及び同じく対照 (生理食塩水 1 ml 注入) ラツテ (6匹) の生存期間並びに弊死までの体重は第12表の如くである。平均生存日数を第13表に一括して示したが、Lithospermum エキス注入群では撲殺まで25日間生存したもの1匹、残る7匹の平均生存日数は3.75日、また対照群では6匹のうち撲殺まで生存したもの1匹、残る5匹の平均生存日数は3.0日で、両者

の間に殆んど差はなく、Lithospermum エキス注入ラツテに延命効果を認めることはできなかつた。

(3) 小 括

i. 吉田肉腫腹水型をラツテに移植後7日目に Lithospermum エキスを腹腔内に注入して腫瘍細胞の変動をみると、有糸分裂細胞は、対照ではほぼ一定の値で経過するのに対して、注入群では24時間目に著しく減少し、以後再び増加する傾向がみられ、崩壊腫瘍細胞には、これと逆の経過がみられる。

ii. この変動は細胞増殖の未だ盛んでない移植後3日目に Lithospermum エキスを注入した場合にもすでに同様の傾向を認めることができ、腫瘍細胞崩壊は注入後3時間から現われはじめ、12~24時間に有糸分裂細胞減少と崩壊腫瘍細胞増加の夫々のピークを認めた。

iii. この場合の腫瘍細胞崩壊の状態は、核質の数

個断裂, 細胞質の空胞変性, 細胞膜の崩壊等, 抗腫瘍剤による崩壊状態とやや似た変化を示す。

しかし, このような変化を示すものは腫瘍細胞の一部であり, 変化細胞の最も多くみられるのは注入後24~48時間で96~120時間目には腹水中の腫瘍細胞の大多数は正常形態のものによつて占められる。

iv. 以上の成績から, Lithospermum エキスが腹水中にて吉田肉腫細胞に或る程度, 直接傷害的に作用することは, わかるが, 作用はそれほど強力なものではなく, 移植ラツテに対する延命効果を実験した成績でも, 少数匹ではあるが Lithospermum エキス1回注入群の平均生存日数は3.57日, 対照群のそれは3.0日であり, これの延命効果を認めることはできなかった。

4. Lithospermum エキスの抗菌作用

核酸合成阻害に関係をもつ抗腫瘍剤は一般に抗腫瘍性と共に抗菌性をも有している。そこで腫瘍細胞に直接的作用のある Lithospermum エキスが細菌の発育増殖にも影響する可能性を考えて, これの抗菌性の有無について実験を行つた。

(1) 実験材料並びに実験方法

使用菌株はブドウ球菌 209 P 株及び大腸菌 EW40 株の2株を選び, Cup 法と稀釈法(ブイヨン)とによつて夫々の菌株に対する Lithospermum エキスの抗菌性につき実験した。Cup 法には Lithospermum エキス2倍稀釈のものを注ぎ, 稀釈法は4倍から128倍まで倍数稀釈したブイヨンに, ブイヨン24時間培養の1滴宛を加えて37°C, 24時間後の菌発育の状態(抗菌作用)をみ, 更に各試験管から1標準白金耳量を寒天平板に塗抹して, 発生集落数から生菌数の程度を観察した。

なお同時にヨモギエキスについても, これと同じ実験を併せ行つた。

(2) 実験成績

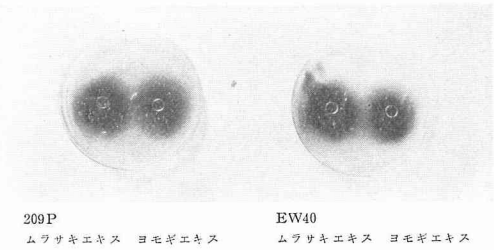
先ず Cup 法では, Lithospermum エキスは, EW40 株に対しては阻止円を作らなかつたが, 209 P 株では直径約1cmの阻止円が認められ, ヨモギエキスでは両菌株共に阻止円はみられなかつた(第29図)。

次に稀釈法では, 成績は第14表及び第15表の如く, Lithospermum エキスでは209 P 株に対しては16倍稀釈まで, EW40株に対しては4倍稀釈で発育を阻止したが, ヨモギエキスではこのような発育阻止は, みられなかつた。

また Lithospermum エキス各倍数稀釈添加のものを24時間培養後, 更に寒天平板に培養して生菌を検

第29図

Cup 法



第14表 Lithospermum エキスのブドウ球菌209株に対する作用

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7
稀 釈 倍 数	4	8	16	32	64	128	対照
L エ キ ス	-	-	-	+	+	+	+
ヨモギエキス	+	+	+	+	+	+	+

第15表 Lithospermum エキスの大腸菌 EW40株に対する作用

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7
稀 釈 倍 数	4	8	16	32	64	128	対照
L エ キ ス	-	±	+	+	+	+	+
ヨモギエキス	+	+	+	+	+	+	+

第16表 寒天平板への移植培養試験

菌株別	稀釈倍数							
	菌の生死	4	8	16	32	64	128	対照
209 P	菌 発 育 (抗菌作用)	-	-	-	+	+	+	+
	生 菌	±	+	+	++	++	++	+++
EW40	菌 発 育 (抗菌作用)	-	±	+	+	+	+	+
	生 菌	+	++	++	++	++	++	+++

した成績は第16表の通りで, 発育阻止のものからも生菌を認めた。以上の成績から Lithospermum エキスには多少の静菌作用のあることが推測される。

(3) 小 括

Lithospermum エキスにブドウ球菌 209 P 及び大腸菌 EW40の各株に対する抗菌性を認めた。稀釈法にてはブドウ球菌 209 P 株には16倍まで, 大腸菌 EW40 株には4倍まで発育を阻止したが, ヨモギエキスでは4倍稀釈にても両菌株共, このような発育阻止は, みられなかつた。

5. 総括並びに考按

Lithospermum エキスには性周期の抑制, 抗 Gonadotropin 作用及び, これに由来すると思われる性腺萎縮等の作用があることが知られており, 教室の成績では, 抗 Gonadotropin 作用はエキス中のキノンによるものであることが明らかにされている。最近, 抗腫瘍性物質の開発に伴い, 多種の植物のうち, レンギョウと Lithospermum の夫々のエキスは抗腫瘍作用を示すことが発表されたが実験の詳細は明らかでない。そこで著者は, これを確認するために本研究を企てた。

元来, 抗腫瘍性物質の Screening に当つては, 少くとも或る一つの動物腫瘍について確実な特殊な細胞効果が明示されるべきである。また究極は人癌の化学療法剤の発見を意図しているのであるから, 組織培養による人癌細胞への細胞効果を追究する方法も成立するであろう。しかし, これらの細胞効果のみならず, 抗腫瘍性物質の Screening には動物腫瘍に対する生命延長効果が示されねばならないが, 植物エキスの如き, 極めて純粋性に乏しい不安定な素材を以てする場合にはなおさら, 生命延長効果はなくとも細胞効果が著明に特殊なものであれば, それは更に研究を進める目安, 手がかりとして有意義であることは吉田も述べているところである。

以上の観点から, 著者は本研究において, Lithospermum エキスの HeLa 細胞発育への影響並びにその形態学的変化の推移を, キノンを含まないヨモギエキス, L細胞, McCoy 細胞等の非癌由来細胞を対照として実験すると共に, 吉田肉腫腹水型に対する細胞効果並びに延命効果につき実験し, 併せて一般に抗腫瘍剤にみられる抗菌作用についてその有無をヨモギエキスを対照として観察した。

まず HeLa 細胞を用いての実験では, ヨモギエキスでは培地中の添加によつて殆んど発育への影響がみられない量と同量の Lithospermum エキスを添加した場合, 培地中の HeLa 細胞の発育は L細胞や McCoy 細胞のそれと比較しても著しく阻害され, Lithospermum エキスの一定量を加えた培地に HeLa 細胞と L細胞とを同時に混合培養すると, 培養日数の経過と共に両細胞数の比率には著明な変化があらわれる。またヨモギエキス添加では HeLa 細胞の形態に対照と著しい変化がみられない量の Lithospermum エキスを培地中に加えた場合, 培養早期から形態に変化をきたし, 分裂細胞比率及び静止原形細胞比率に著しい増加が認められる。また, Lithospermum の, やや高い濃度で, 培養経過中の HeLa 細胞の変化を L 細

胞, McCoy 細胞の変化と比較すると, L細胞と McCoy 細胞では分裂細胞, 静止原形細胞, 膨化, 巨細胞及び矮小型細胞等の諸種の細胞は非添加培地におけるものより漸減傾向をとるが, HeLa 細胞のみは矮小型細胞と膨化・巨細胞, 殊に前者において著しい増加傾向がみられる。以上の如く, Lithospermum エキスは HeLa 細胞に対して他の細胞より強く発育阻害的に働くものようである。

次に Lithospermum エキスの細胞効果を吉田肉腫腹水型を用いて実験した。先ず細胞変化を一定数細胞中の有糸分裂細胞数と崩壊腫瘍細胞数とから観察すると, 有糸分裂細胞は対照では, ほぼ一定の値で経過するのに対して吉田肉腫移植後7日目に Lithospermum エキスを腹腔内に注入した場合には, 24時間目になるとこれが著しく減少し崩壊腫瘍細胞の著明な増加がみられるが, この変化は注入後数時間からあらわれはじめ, 12~24時間がピークのようにである。しかし, その後は有糸分裂細胞は再び増加し, 崩壊腫瘍細胞は減少の傾向をたどり, 96~120時間目には腹水中の腫瘍細胞の大多数は通常形態のもので占められるようになる。また細胞変化を崩壊の状態から観察すると, 核質の数個断裂, 細胞質の空胞変性, 細胞膜の崩壊等の変化がみられた。以上の如く Lithospermum エキスは, HeLa 細胞におけるようにこの場合にも吉田肉腫細胞に傷害的に作用するとみることが出来る。しかし, このような腫瘍細胞に対する直接作用が強力なものでないことは, 変化を示すものが一部の腫瘍細胞のみで, 崩壊の著しい時期にも通常形態の腫瘍細胞が, そのまま多数みられることから明らかである。このことが関係すると思われる吉田肉腫移植ラツテに対する延命効果は, Lithospermum エキス1回注入群の平均生存日数は3.57日, 対照群のそれは3.0日と殆んど効果を認めることはできなかった。

Lithospermum の腫瘍細胞に対する直接作用の機序は, もとより不明であるが, 一般に抗腫瘍剤は核酸の生合成を侵害し細菌の発育に対しても阻害作用を示すものが多いので, Lithospermum エキスの抗菌作用をブドウ球菌 209 P 株と大腸菌 E W40株とについて調べた結果, 特に前者に対し弱いながらも静菌作用に基づくとと思われる発育阻害作用を有することを認めた。この抗菌性を1つの手がかりとして作用物質の本態究明に今後の研究を期待したい。

結 論

1. Lithospermum エキスに HeLa 細胞及び吉田肉腫腹水型細胞に対する直接的発育阻害作用を認め

た。

2. *Lithospermum* エキスの吉田肉腫腹水型移植ラツテに対する延命効果は認められなかつた。

3. *Lithospermum* エキスに軽度の抗菌性を認めた。

なお、本論文の要旨は、第17回日本産婦人科学会総会において発表した。

稿を終るに臨み御指導御校閲を賜つた恩師岩井正二教授に感謝し、また絶えず御指導御鞭達を賜つた石井次男講師に深甚なる謝意を表します。又、実験に際し種々、御指導御便宜を賜つた本学細菌学教室田崎教授、田波助教授、山田学士及び、同教室員の皆様衷心より感謝の意を表します。

文 献

①Cranston, E. M. *J. Pharmacol. & Exp. Therap.* 83: 130, 1945
 ②Cranston, E. M. & Robinson, G. A. *Proc. soc. Exper. Biol. & Med.* 70: 66, 1949
 ③Cranston, E. M., Kucera, C. R. & Bettner, J. J. *Proc. soc. Exper. Biol. &*

Med. 75: 779, 1950
 ④福沢芳章 *日産婦誌* 10: 1183, 1958
 ⑤秦藤樹 *癌の化学療法* 78 医歯薬出版 1957
 ⑥堀田進・大山昭夫 *組織培養の基本と実際* 永井書店 1963
 ⑦岩井正二・石井次男 産と婦 22: 473, 1955
 ⑧五十嵐彰 *日産婦誌* 16: 1, 1964
 ⑨伊藤寛治 *信州医誌* 8: 2284, 1959
 ⑩丸山雄造 *診断と治療* 51: 1647, 1963
 ⑪松浦敏男 *信州医誌* 13: 417, 1964
 ⑫三浦良治 *信州医誌* 8: 2305, 1959
 ⑬マイトマイシン基礎文献 協和醸酵 1960
 ⑭野嶽幸雄 *産婦の世界* 13: 1879, 1961
 ⑮中原和郎 *癌* 岩波書店 1955
 ⑯貫文三郎 *薬理学実験* 金原出版 1962
 ⑰小川玄一他 *日産婦誌* 17: 201, 1965
 ⑱Paul, J. *Cell & Tissue Culture Livingstone Ltd.* 1960
 ⑲田中富子他 *昭和39年癌学会抄録集* 1964
 ⑳戸田忠雄 *戸田新細菌学* 南山堂 1957
 ㉑梅沢浜夫 *癌の化学療法* 64 医歯薬出版 1957
 ㉒吉田富三 *吉田肉腫* 寧楽書房 1952
 ㉓吉田富三 *癌の化学療法* 23 医歯薬出版 1957
 ㉔吉村正 *日産婦誌* 17: 7, 1965