

1937. ⑩赤羽治郎：日本薬物誌，33：1，1941.
 ⑪荒川美三：日本薬物誌，16：78，1933. ⑫落合英
 二：薬学，2：172，1948. ⑬鳥飼龍生：日本消化器
 病誌，39：266（1940）.

Pharmacological Studies on 6'- Aminohydrocinchonidine (III)

The Effects of 6'-AHC on Body Temperature and Gas Metabolism of Rats

Toshiro Kawamura

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine,
Shinshu University

(Director: Prof. J. Akabane)

The action of 6'-AHC on body temperature
and respiratory gas metabolism was studied in rats

in comparison with that of quinine. 6'-AHC differs from quinine in that a methoxyl group in the 6'-position of quinine is substituted by an amino group.

1) 6'-AHC induced a fall of body temperature and an inhibition of gas metabolism in both febrile and normal rats.

The minimal effective doses were 80 to 120mg. per kg. in normal rats and 80mg. per kg. in febrile rats.

2) Quinine had similar effects to those of 6'-AHC on body temperature and gas metabolism.

The minimal effective doses of quinine were 40 to 80mg. per kg. in normal rats and 40mg. per kg. in febrile rats.

3) The effects of 6'-AHC on body temperature and gas metabolism were found to be less than those of quinine.

吉田肉腫細胞における細胞分裂と チトクローム・オキシダーゼとの関係について

昭和31年7月18日 受付

信州大学医学部第一解剖学教室（指導：尾持教授）

永 田 哲 士

緒 言

吉田肉腫の細胞分裂における各種酵素の細胞化学的研究はフォスファターゼ、リパーゼ、スルファターゼ、デヒドロゲナーゼ、デスルフラナーゼ等について安田^①及び杉本等^②の報告がある。しかしながら酸化酵素に関する研究は少く、その結果も不定で吉田教授^③によればベルオキシダーゼ及びMナジオキシダーゼは陰性であり、Gナジオキシダーゼは長崎における実験では陽性、仙台のそれでは陰性であったという。私はわが教室における各種細胞の分裂に関する研究の一部として、吉田肉腫の細胞分裂を観察したが、同時に細胞分裂と酸化酵素との間の関係を知ろうとして、その消長を追求し、チトクロームオキシダーゼについて興味ある成績を得たので報告する。

研究方法及び材料

本学病理学教室より分与された吉田肉腫移植562代ラットより、肉腫細胞を含む腹水を5匹のラットに移植し、移植後24時間毎に腹水を採取し、Moogの原法^④にやゝ変更を加え次の如くGナジオキシダーゼ反応を行った。すなわち腹水1滴と0.003Mフェニールウレタン1滴をスライドグラスにとり混合し、38°C 3分間放置後ナジ試薬（1% NaCl溶液に0.01Mにとしたジメチルパラフェニレンジアミン溶液 1c.c. +

1% NaCl溶液に0.01Mにとしたαナフトール溶液 1c.c. + pH 5.8の0.066M 磷酸緩衝液 1c.c.）1滴を加え、カバーグラスをかけ38°C 5分間保温し検鏡する。すなわちこれはMoogの原法ではフェニールウレタンによりデヒドロゲナーゼの作用をおさえる対照試験である。Moogのナジ反応のみでも吉田肉腫細胞は陽性となるが、この対照試験の方が反応が強いのでこれを本試験とした。吉田肉腫にデヒドロゲナーゼの存在する事は既に証明されているからである。

対照としてスライドグラスに腹水1滴とpH 6の生理的食塩水にとした0.05MのNa₂S₂O₃ 1滴をとり、混合し38°C 3分後ナジ試薬 3c.c. + 0.02M Na₂S₂O₃ 1c.c.の混合液1滴加え、カバーグラスをかけ検鏡し、ナジ反応の阻止を見た。またナジ反応後1%フェリシアンカリ溶液1滴を加え、ナジ試薬の細胞内への滲透を確めた。たゞし反応著明な場合は省略した。

同時に腹水塗抹標本を直ちにエーテル・アルコール等量混合液で5分間固定し、アルコール系列を下降してツェンカー液で5分間再固定し、ヨードアルコール、チオ硫酸ソーダで脱水銀した後ヘマトキシリン・エオジン染色を施した標本を作成し、同一標本にて吉田肉腫細胞2000個を数え、有糸分裂及び従来無糸分裂と考えられていた偽二核細胞の出現率を求めた。

なおMナジオキシダーゼ及びペルオキシダーゼも同時に追求したが、すべての時期で陰性であつたので省略する。

実験成績

Gナジオキシダーゼによるインドフェノールプラウは移植翌日は殆ど認められないが2日目に細胞体にわずかに微細な青色顆粒として認めうるようになり、以後各動物ほぼ同様に顆粒の大きさ、数、濃度を増し4日目で最高に達する。5日目から再び顆粒の大きさ、数、濃度を減じ、9日で殆ど認めがなくなる。この顆粒は同時期の細胞においてはほぼ同じ大きさ、数、濃度であり、細胞体に均等にびまん性に分布し、安田^①が諸種酵素ならびに基質の異常なる集積部位と認めた明庭部位 (heller Hof, bright zone) にのみ限局する事はない。

対照試験はすべて満足されたから本反応による青色顆粒はGナジオキシダーゼによる事を示している。

なお興味ある事は10日以上生きのびた動物では早期(第9日)に死亡した動物が9日で反応全く陰性とな

るに反し、10日以後においてもかすかな陽性反応が認められ、反応が陰性となつた日に死亡した事で、この反応と動物の体力との間に密接不可分な関係のある事が推測される。

本反応は永久標本として保存する事が不可能であるので、実験毎にスケッチにより記録した。第1図より第9図は1日より9日迄の移植後日数の経過と共に反応の推移の様子を示す。

同時に作成した腹水塗沫標本における腫瘍細胞2000個中の有糸分裂細胞の出現率及び百分率は第1表に示す如くで、5%の危険率で2日から5日に多く、その前後に少い。偽多核細胞の出現率及び百分率は第2表に示す。この細胞は従来無糸核分裂により生じた多核細胞と考えられていたものであるが、私達^②の研究では一見多核の如くには見えるが核は互に細い核糸により連なり単核であつて決してちぎれない事が明らかとなつている。その出現率は第2表に見る如く3日から5日に少く、その前後で多い。

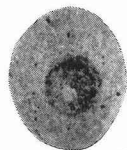


Fig. 1

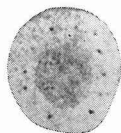


Fig. 2

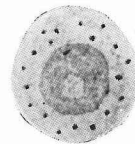


Fig. 3

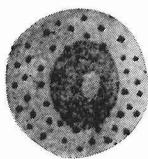


Fig. 4

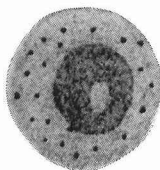


Fig. 5

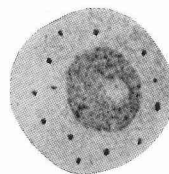


Fig. 6

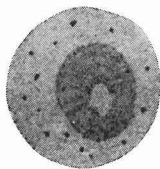


Fig. 7

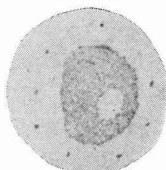


Fig. 8

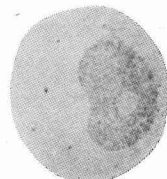


Fig. 9

The cytochrome oxidase in the Yoshida sarcoma cells, each number corresponding to the days after transplantation.

Table 1. Daily Frequency (Percentage) of Mitotic Cells

days after transplantation animal number	days after transplantation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
563-1	89 (4.45%)	101 (5.05)	30 (1.50)	31 (1.55)	11 (0.55)	73 (3.65)	42 (2.10)	14 (0.70)	10 (0.50)	8 (0.40)	8 (0.40)
563-2	70 (3.50)	140 (7.00)	55 (2.75)	43 (2.15)	74 (3.70)	44 (2.20)	48 (2.40)	19 (0.95)	9 (0.45)	—	—
563-3	40 (2.00)	30 (1.50)	50 (2.50)	98 (4.90)	52 (2.60)	17 (0.85)	12 (0.60)	18 (0.90)	7 (0.35)	—	—
563-4	31 (1.55)	70 (3.50)	66 (3.30)	61 (3.05)	32 (1.60)	19 (0.95)	22 (1.10)	15 (0.75)	5 (0.25)	1 (0.05)	—
563-5	85 (4.25)	78 (3.90)	105 (5.25)	87 (4.35)	161 (8.05)	76 (3.80)	39 (1.95)	61 (3.05)	19 (0.95)	18 (0.90)	8 (0.40)

Table 2. Daily Frequency (Percentage) of Pseudopolynucleate Cells

days after transplantation animal number	days after transplantation										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
563-1	21 1.05%	15 (0.75)	7 (0.35)	8 (0.40)	5 (0.25)	16 (0.80)	17 (0.85)	29 (1.45)	38 (1.90)	37 (1.85)	56 (2.65)
563-2	16 (0.80)	14 (0.70)	15 (0.75)	19 (0.95)	18 (0.90)	21 (1.05)	26 (1.30)	29 (1.45)	26 (1.30)	—	—
563-3	20 (1.00)	9 (0.45)	11 (0.55)	5 (0.25)	10 (0.50)	33 (1.65)	41 (2.05)	50 (2.50)	80 (4.00)	—	—
563-4	14 (0.70)	8 (0.40)	6 (0.30)	15 (0.75)	23 (1.15)	32 (1.60)	65 (3.25)	79 (3.95)	56 (2.80)	84 (4.20)	—
563-5	18 (0.90)	17 (0.85)	13 (0.65)	19 (0.95)	32 (1.60)	40 (2.00)	43 (2.15)	21 (1.05)	42 (2.10)	35 (1.75)	55 (2.75)

考察及び結論

G ナジオキシダーゼは Lison[®] 以来チトクロームオキシダーゼと考えられており、厳密な対照実験を含む Moog の方法によつて決定的な進歩がもたらされた。ナジ反応が陰性である事は必ずしもチトクロームオキシダーゼの存在しない事を意味しない。すなわち細胞内にナジ試薬が滲透しないためか、または滲透しチトクロームオキシダーゼによつてインドフェノールブラウが生じて細胞内のデヒドロゲナーゼによつて白色誘導体に還元されるため、チトクロームオキシダーゼの存在するにもかかわらずナジ反応が陰性となる事があるからである。現に私が実験した吉田肉腫においてもナジ反応は移植後4日目にかすかな陽性反応を示したのみであつたがフェニールウレタンによる対照試験では著明な青色顆粒の出現を見、これを本試験とした事は既に述べた通りである。しかもナトリウムアザイドによる対照試験が特異的に本反応を陰性化する

事は本反応がチトクロームオキシダーゼによる事を証明するものである。

吉田肉腫においてはインドフェノールブラウ顆粒が細胞体に均等に分布する事は吉田教授^④も認めている。新家他^⑦はキカノユリ及びテツボウユリの蒨の還元分裂で造胞細胞のナジ反応による青色顆粒は分裂の近づくに従つて濃度を増し、還元分裂開始と共に紫色に変わりこの紫色も還元分裂が進むに従つて淡くなる事を報告しているが、吉田肉腫の有糸分裂では分裂の前後において濃度の変化はなく、移植後日数の等しい細胞ならば分裂期、静止期を問わずほぼ等しい強さのナジ反応を示した。この事実は安田^④が本細胞において分裂期に入ると共に徐々に濃度の増加するのを認めた所のリパーゼ、フォスファターゼ等と異り、細胞内における分布が明庭部位に限局せずびまん性である事と共に本酵素が他酵素と異なる点である。その濃度が各動物一様に4日目で最大となるのはその肉腫細胞

胞の細胞呼吸も盛んとなるためであろう。有糸核分裂による細胞の増殖もその頃最高となる事、また反応が微弱となると同時に有糸核分裂も減少し、かつ無糸核分裂様の核の変形を示す偽多核細胞が増加する事を考えれば、チトクロームオキシダーゼの多い時に有糸核分裂多く、チトクロームオキシダーゼの減少と共に有糸核分裂減少し、偽多核細胞が増加する、換言すればチトクロームオキシダーゼの消長と有糸核分裂はほぼ平行関係にあるという事ができよう。このいずれが原因でいずれが結果であるかは未解決であり、何らかの細胞呼吸を障害する要因が起ると有糸核分裂が減少し、偽多核細胞が増加するとも考えられるが、今後検討を要する問題である。

終に臨み懇篤なる指導と校閲の労を執られた恩師尾持教授に心から拝謝する。なお実験に際し有益な助言をいたされた島津助教授、及び多大の便宜を与えられた病理学教室丸山雄造氏に対し敬意を表する。

(本論文の要旨は昭和30年10月、日本解剖学会第12回関東地方会において発表した。)

参 考 文 献

- ①安田：吉田肉腫の組織化学，癌，43 (2, 3)：64, 1952. ②杉本，高橋他：吉田肉腫の組織化学的研究，癌，44 (2, 3)：108, 1953. ③吉田：吉田肉腫，119, 東京，1952. ④Moog, F.: Cytochrome Oxidase in Early Chick Embryos, J. Cell. Comp. Physiol., 22: 223, 1943. ⑤尾持，永田：吉田肉腫細胞の無糸核分裂について，解剖誌，31 (1)：91, 1956. ⑥Lison, L.: Bull. Soc. Chim. biol., 18; 185, 1936. (Lison: Histochimie et cytochimie animal, principes et methodes. 今泉訳，東京，1954より引用). ⑦新家，飯島，平岡：還元分裂の細胞化学的研究，細胞化学シンポジウム，2; 2, 東京，1954.

On the Relationship between Cell Division and Cytochrome Oxidase in the Yoshida Sarcoma Cells (Lecture delivered on Oct. 9., 1955 in Tokyo)

Tetsuji Nagata

Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
Shinshu University

(Director: Prof. Dr. Sh. Omochi)

Cytochrome oxidase in the Yoshida sarcoma cells has been followed up with Moog's method. The indophenol-blue granules appear diffusely in the cytoplasm of the cells, not being localized at the bright zone where other enzymes are found. The granules increase in number, density and size day by day almost uniformly in all individuals, and the reaction becomes the strongest on the 4th day. Thenceforth the granules decrease gradually and finally become negative on the 9th day. The daily transition of this reaction is shown in Figs. 1~9.

On the other hand, mitotic and pseudopolynucleate cells have been calculated in smear preparations which were fixed with ether-alcohol and Zenker's solution. The daily frequency and percentage of mitotic and pseudopolynucleate cells on the basis of 2000 cells are shown in Tables 1. and 2. From these data it is evident that the number of mitotic cells increases in the early phase, remains highest from the 3rd to the 5th day and decreases towards the end. On the contrary, the number of pseudopolynucleate cells decreases in the early phase, lowest in the middle phase and increases in the late phase.

These results tend to indicate an approximate parallelism between an increase and decrease of the cytochrome oxidase and the frequency of mitosis.