

イガイから抽出した細胞分裂抑制物質に関する研究

岡山大学医学部第一生理学教室 (指導: 西田勇教授)

垣 内 一 郎

[昭和48年10月1日受稿]

先に半井 (1972)³⁰⁾ はマナマコ, マダコ, ムラサキイガイ, サザエ等の海産動物から cornin 抽出法, 硫酸分画法及びアルコール分画法等に従って細胞分裂抑制物質の抽出を試み, その夫々の分画について, 検定動物としてウニの受精卵, 培養細胞及び ddN 系マウスに移植した Ehrlich 腹水癌細胞を用いて, 細胞分裂抑制効果について screening を行い, ウニの受精卵も含めた *in vitro* の実験では, 濃度が 1% 以上の場合, ほとんど全ての分画が分裂の抑制作用を示すのに対し, Ehrlich 腹水癌細胞を用いた *in vivo* の実験では, イガイからアルコール分画法で得た分画のみが, その増殖を抑制すると報告した. この分画法では精製過程に長時間に亘る透析を必要としておく. 最近大塚 (1969)³⁰⁾, 寺山, 笹田 (1969)³⁰⁾ はラットの肝臓から抽出した DNA 合成抑制因子は EDTA 処理や長時間の透析で失活し, それが Mn^{++} や Zn^{++} を加えることによって再賦活させることを見出した. 又, Bullough (1964)³¹⁾ 1967)³¹⁾ 等は組織から抽出した細胞分裂抑制物質で adrenaline と特異的に結合して分裂抑制作用の亢進の認められる chalone と総称される物質の存在することを発表している.

そこで著者は ddN 系マウスに移植した Ehrlich 腹水癌細胞の増殖に対して Li-アルコール分画法に従ってイガイから抽出した細胞分裂抑制物質に, Mn^{++} , Zn^{++} や Cu^{++} 等の重金属と併用した場合の効果調べ, 更に, イガイから cornin 分画法に従って抽出したイガイ cornin と分裂抑制作用効果の比較を行い, 興味ある結果を得たのでここに報告する.

材料及び方法

実験動物には ddN 系マウスを用いた. マウスは夏期には約 25°C に, 冬期には約 15°C に恒温された部屋で飼育し, 自家増殖させている動物である. 飼料にはオリエンタル酵母工業社製の固形飼料 MF を用い,

飼料及び水は自由に与えた.

生後約 4 週間目に雌雄を別居させ, 実験には生後 5 ~ 8 週間の体重約 20 ~ 25g の成体を用いた. Ehrlich 腹水癌細胞は核数計算法によって算出した約 1×10^7 個の細胞を 0.5 ml の生理的食塩水に浮遊させた液を腹腔内に注射し, 継代は雄のマウスを用い, 7 日の周期で行った. 実験に際しては, 移植後 7 日目のマウスの腹腔より腹水を採集し多くの実験からその 0.1 ml 中に約 1×10^7 個の細胞を含んで居ることが確かめられているので, 無菌的に生理的食塩水で倍量に希釈し, その 0.2 ml を実験用マウスの腹腔内に移植した.

Ehrlich 腹水癌細胞の移植前にマウスの体重の測定を行い, 移植後毎日午前 9 ~ 10 時の間に, 又, 休日には午後 4 ~ 5 時の間に体重の測定を行い, 体重の変化を以って Ehrlich 腹水癌細胞の増殖曲線とした. 細胞分裂調節物質は香川県本島, 小槌島及び岡山県玉野市宇野港棧橋等で採集したムラサキイガイ *Mytilus edulis* から抽出した.

ムラサキイガイ (イガイと略す) からのコルニン分画は Nisida and Murakami (1965)³²⁾ の方法に従い, イガイの肉質部を貝殻より離し, ミンチを行った後 3 倍量の脱イオン水を加え, ホーロー引の鍋で 10 分間煮沸の後, 水冷, 天竺木綿で濾過し, 濾液に 4°C に冷した 99% エタノールを加えて 70% 濃度とし, 時々攪拌しながら 2 ~ 3 時間冷凍室に保存後, 久保田製の連続遠沈機を用いて, 10,000rpm で連続遠沈を行い, 上清を得る. この上清に更に冷却した 99% エタノールを加えて, エタノール濃度を 90% とし, よく攪拌した後一夜放置する. 再び 10,000rpm で連続遠沈法を行い, 沈澱物を得る. 沈澱物を冷凍遠沈機を用い, エタノール, メタノール, アセトン, エーテルの順で洗滌し, エーテルはガラス棒で攪拌しながら蒸発させ, 得られたイガイコルニンをデシケーターに保存する. 収量はイガイの肉質 1 kg よ

り約4.0 gであった。このイガイコルニンを更に透析性分画と非透析性分画に分離した。即ち、5%のイガイコルニン溶液を作り、冷凍遠沈機で10,000rpm、30分の遠沈の後、上清をViskingのセロファンチューブを用いて、冷凍室中で脱イオン水に対して透析を行う。最初の12時間の間に透析された外液をロータリーエバポレーターで濃縮し、凍結乾燥した物質をイガイコルニンの透析性分画とする。次で3日間、時々脱イオンを変えながら透析を続け、透析膜内に残った溶液を10,000rpm30分の遠沈を行い、わずかに存在する沈澱物を除き、上清をロータリーエバポレーターで濃縮の後凍結乾燥し、イガイコルニンの非透析性分画とした。イガイコルニン1 gから非透析性分画は約0.4 gが得られた。

イガイから抽出した熱に不安定な非透析性分画でEhrlich腹水癌細胞の増殖を抑制し、完全治癒の例も見られたLi等(1968)³¹⁾の分画の抽出を試みた。イガイの肉質部をミンチし、この重量の10倍量の冷した脱イオン水を加え、2時間冷凍室中でマグネチックスターラーで攪拌しながら水可溶性物質の抽出を行い、2重のガーゼで濾過し、濾液を2,000rpm20分間遠心分離を行う。上清に冷エタノールを加えて70%濃度とし、4℃で3時間攪拌の後、3,000rpmで20分間遠沈を行う。沈澱物に、最初に用いたミンチの重量と同量のNaHCO₃でpH7.4とした8%食塩水を加え、3時間抽出を行う。3,000rpmで20分遠沈を行い、上清をVisking製のセロファンチューブに入れ、しばしば脱イオン水を交換しながら4日間透析を行う。非透析分画は10,000rpmで30分間遠沈し、上清をロータリーエバポレーターで濃縮の後、凍結乾燥を行う。収量はイガイの肉質部1kg当り約1.1gであった。なお、上記の抽出過程は全て4℃の冷凍室で行った。

Ehrlich腹水癌細胞の増殖に及ぼす効果は試料を0.5mlの0.9%食塩水中に5mg、10mg等の目的とする濃度の溶液を作り、10,000rpm30分の遠沈を行い、この上清を更にオートクレーブで滅菌した0.45μのMillipore filterで濾過し、無菌的にナス型フラスコに保存した。なお、0.5ml中に1,000 units/mlの割合にペニシリンを加えた。又、CuCl₂、ZnCl₂、MnCl₂を加え、再賦活の効果を調べる実験では、0.9%生理的食塩水で目的とするモル濃度の塩類溶液を作り、それに試料を溶解し、遠沈、Millipore filterによる濾過を行って保存した。又、Bullough(1968)³¹⁾等の報告しているアドレナリンと結合して細胞分裂抑

制作用の活性が上昇するchalone様の働きがあるか否かを調べるために、0.9%の生理的食塩水で10⁻⁷g/mlのアドレナリン溶液を作り、この溶液で目的とする濃度の試料溶液を作り、既述のように遠心、Millipore filterによる濾過を行い、1,000 units/mlの割合にペニシリンを加えて保存した。いずれの場合も、対照群には検定試料を含まないのみで、その他は全て同一条件の溶液を使用した。

マウスの腹腔内にEhrlich細胞を移植して2日後から、対照群実験群共に1日当り0.5mlの溶液を腹腔内に連続5日間注射し、体重の変化と生存日数を測定した。accident deathの場合は開腹し、或は腹水の塗沫標本を作り細菌による感染死か否かを調べた。

更に、イガイコルニン及びイガイのLi(1968)³¹⁾エタノール分画の作用機序を調べる目的で培養細胞である、V79細胞を用い、その増殖に及ぼす影響を調べた。培養液は5%の割合にウシ血清を含むEagles essential medium(大五栄養化学製)を用いた。継代は0.15% trypsin (Difco社製)を含むEDTA(1:5,000)を用いて行った。上記の液で試験管の壁に附着している細胞をpipettingにより浮遊させ1,000rpm4分間の遠沈を行い、上清を捨て、所定の細胞数になるように正常の培養液を加え、再び浮遊させて15本の試験管に分注し、継代後2日、4日、6日に核計算を行い、増殖率曲線を得た。検定試料は培養液に0.25%、0.5%となるように加えて継代後2日目に培養液の交換の際作用させた。

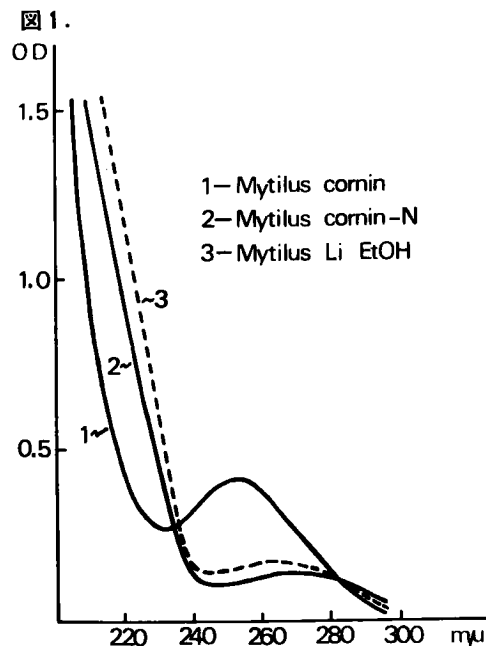
又一部はペトリ皿の中に硝酸で洗滌したカバーグラスを置き、この上で単層培養を行い、同じく継代後2日目に培養液交換の際試料を含む培養液を作用させ、3日あるいは5日後に標本をメタノールで固定、ヘマトキシリン、エオジン染色の後、分裂指数(mitotic index)を測定し、且つ、分裂細胞が分裂前期、分裂中期、分裂後期のいずれに属しているかも調べた。又培養液交換後46時間して、0.5μcの³H-thymidineを加え2時間ラベルさせ、冷却したエタノール：酢酸(3:1)の固定液で固定し、更に5%の冷した三塩化酢酸で酸可溶性分画を除き、DNAへとり込まれた³H-thymidineをラヂオオートグラフィによって調べ、ラベルされた細胞数の百分率を求めた。

なお、ペトリ皿の中での培養実験は炭酸ガスインキュベーターの中で行った。

実験成績

まず、イガイから抽出したコルニン分画及びその非透析性分画と Li 等 (1968)²⁰ の方法で抽出した Li-エタノール分画の紫外部の吸収曲線を図1に示す。イガイのコルニン分画は255m μ に吸収の極大を示しコルニン非透析性分画及び Li-エタノール分画は270m μ 辺に弱い吸収の山を示す、いずれも組成物として核酸塩基を含有していることがうかがえる。

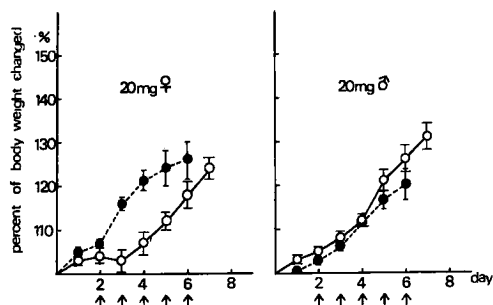
その各々の分画が Ehrlich 腹水癌細胞の増殖にどのような作用を示すかを調べた。イガイコルニン分画及びイガイコルニンの非透析分画 (以下 cornin-N と略す) を生理的食塩水0.5 ml 中に20mgをとかし Ehrlich 細胞を移植後48時間から5日間1日20mgの割合に腹腔内注射を行った。対照としては生理的食塩水のみを注射した。その結果イガイコルニン及びその非透析性分画共に雄のマウスの場合は対照と差がなく、雌の場合は増殖の促進がみられた。



イガイコルニン、イガイコルニン非透析性分画及びイガイ-Li-エタノール分画の紫外部の吸収曲線の比較、夫々、255m μ 、270m μ 辺に吸収の極大を持っている。1. イガイコルニン分画。2. イガイコルニン非透析性分画。3. イガイ-Li-エタノール分画。

図2には cornin-N を作用させた例を示した。又生存日数も調べたが、両者の間に差がなく移植後14日にはマウスは全て死亡した。

図2.



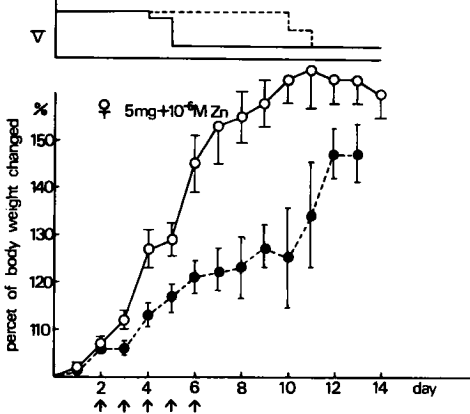
Ehrlich 腹水癌細胞約 1×10^7 個を成熟した ddN 系マウスの腹腔に移植した後体重の測定を行い縦軸には体重の変化のパーセントを、横軸には移植後の日数を示す。移植後48時間より5日間、1日0.5 ml の生理的食塩水を腹腔内に注射し、実験群には20 mg のイガイコルニン非透析性分画を含む0.5 ml の生理的食塩水を注射した。白丸は対照群、黒丸はイガイコルニン非透析性分画を与えた群、↑印は注射した日を示し、bar は standard error を示す。雌の場合は実験群では体重増加の促進が認められ、雄の場合は対照群と差が認められない。

次に生理的食塩水で 10^{-6} M $ZnCl_2$ 溶液を作り、同様の実験を試みた。対照群には同濃度の $ZnCl_2$ を含む生理的食塩水のみを、Ehrlich 腹水癌細胞を移植後48時間から連続5日間1日0.5 ml ずつ注射し、実験群には $ZnCl_2$ を含む生理的食塩水で0.5 ml 当たり5mgの cornin-N を含む溶液を注射した。この結果を雌の場合を図3に、雄の場合を図4に示した。 10^{-6} M $ZnCl_2$ だけでは Ehrlich 細胞の増殖に何等の抑制作用も与えていないが、5mgの cornin-N と $ZnCl_2$ を同時に注射した実験群では雌雄共にその体重増加が抑制されている。これは図2と比較して著しい体重増加の抑制であり、Ehrlich 細胞の増殖を抑制していることがうかがえる。しかし延命効果については、雌雄共、対照群、実験群共に差は認められない。

次に cornin-N の量を10mgとし、 $ZnCl_2$ の濃度は 10^{-6} M として同様の実験を行った。雌の場合は対照群は20匹、実験群には25匹を用いた。結果は図5に示すように、10mgの cornin-N を含む 10^{-6} M $ZnCl_2$

・生理的食塩水を注射した場合著しい体重の増加の抑制がある。しかし、延命効果については移植後20日以上生存した例は見られなかった。

図 3.



ddN系マウスの雌40匹を2群に分け、Ehrlich 腹水癌細胞を移植後2日目から対照群には $10^{-6}M$ ZnCl₂を含む生理的食塩水を0.5 mlづつ5日間腹腔内に注射し、実験群にはイガイコルニン非透析性分画5 mgを含む同量の溶液を注射し、体重の変化を調べた結果である。縦軸には体重の変化をパーセントで示し、横軸には移植後の日数を示してある。barはstandard errorを示し、上のV表は生存日数が示してある。白丸、実線は対照群で、黒丸破線は実験群を表わす。

図 4.

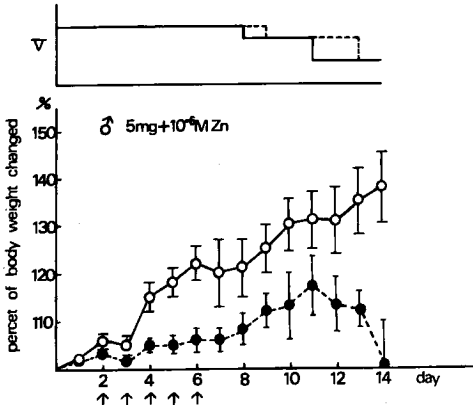
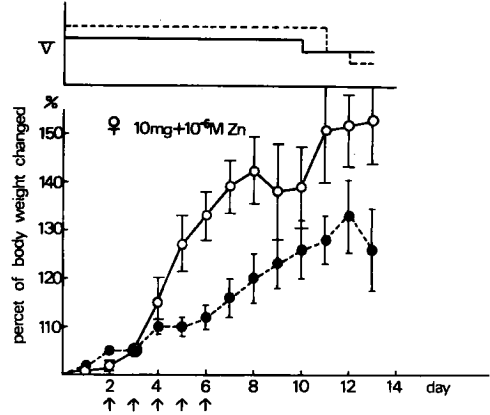


図 3 と同じ条件で雄の場合で、計50匹を用いて実験を行った結果である。

次に雄の場合を図6に示す。この場合対照群実験群共に20匹ずつを用いた。雌の場合と同様、実験群では著しい体重増加の抑制が認められた。延命効果に関しては対照群は20日以内に全部死亡したが、実験群では20匹中4匹は1ヶ月以上生存し、延命効果が認められた。

図 5.



ddN系マウスの雌を用い、ZnCl₂の濃度は $10^{-6}M$ とし、イガイコルニン非透析性分画の濃度を10 mgとした場合の体重変化曲線、対照群には20匹、実験群には25匹が用いられた。体重増加の抑制は認められたが延命効果は認められなかった。

図 6.

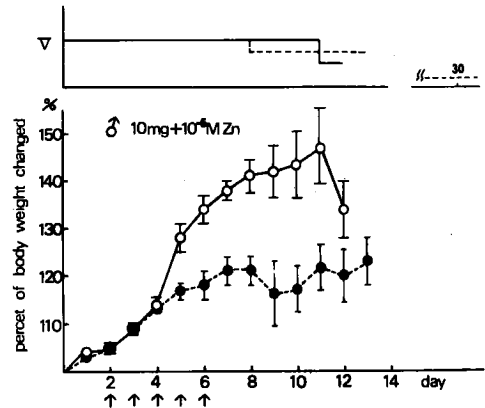


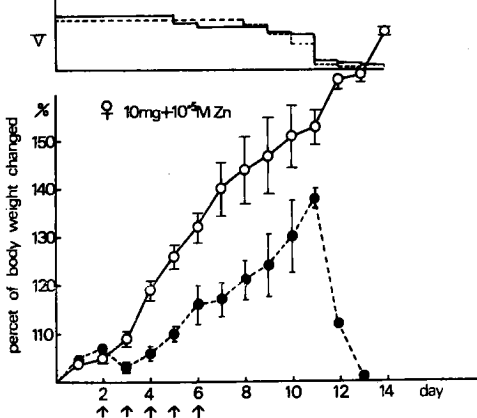
図 5 の場合と同じ条件で雄のマウスを用いた場合で、対照群、実験群共に20匹づつを用いた。体重増加の抑制が認められ、且つ実験群では20匹中4匹は30日以上生存した。

又, cornin-N を1回10mgとし, $ZnCl_2$ の濃度を $10^{-5} M$ として使用した. 対照群に雌23匹, 実験群には雌21匹を用いた場合の結果を図7に示す. $ZnCl_2$ 濃度が $10^{-5} M$ になっても Ehrlich細胞移植後の体重の増加には変化がない. しかし, 試料10mgを含む実験群の場合には, 体重の増加は著しい抑制が認められる. 延命効果に関しては図7に示してあるように, 対照群, 実験群の両者に全く差異は認められない. 同じく雄の場合を図8に示す. 実験群では著しい体重の抑制と共に, 延命効果も認められ, 30日以上生存したマウスは30匹中7匹であった.

次に $ZnCl_2$ 濃度を $10^{-5} M$ とし, cornin-N を20mgとし, 対照群として雄28匹, 実験群には雄20匹を使用した場合を図9に示す. 今迄の実験結果と同様に著しい体重の増加の抑制が認められ, 且つ30日以上生存したマウスは20匹中5匹で延命効果も認められた.

又, $ZnCl_2$ 濃度を $10^{-4} M$ として使用した場合には雌雄共に注射開始後3日目より下痢症状を起し, 7日以内に全て死亡するのでこれ以上の濃度については実験を行なわなかった.

図7.



前述と同様の実験で, イガicolニン非透析性分画 10mg を $10^{-5} M$ $ZnCl_2$ -生理的食塩水を用いた実験結果を示す. 対照群には雌23匹, 実験群には雌21匹を使用した. 実験群では著しい体重の増加の抑制が認められるが, 延命効果は認められない.

図8.

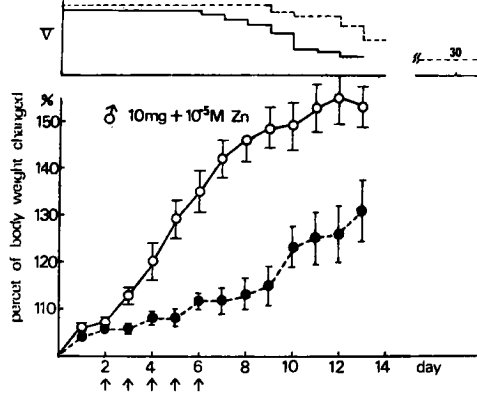
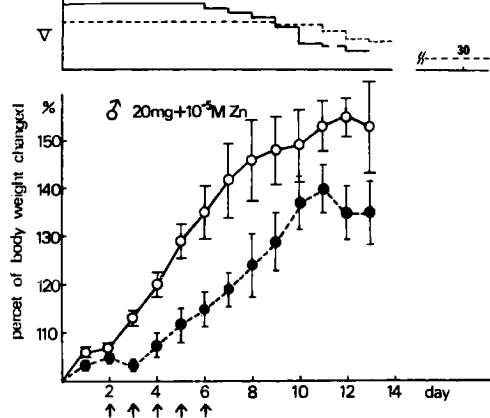


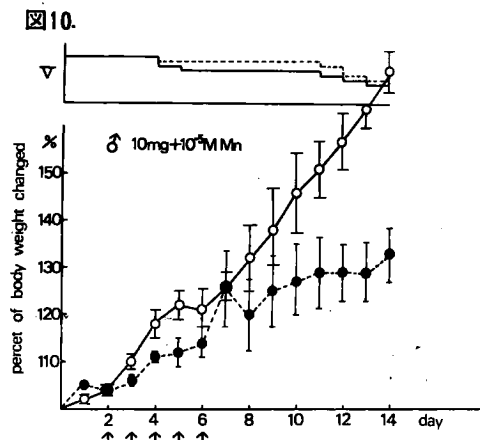
図7に示した同様の条件で対照群には雄28匹, 実験群には雄30匹を用いた実験結果を示す. 実験群では著しい増加の抑制が認められ, 且つ, 30日以上生存したマウスは30匹中7匹であった.

図9.



雄のマウスを用い $ZnCl_2$ 濃度は $10^{-5} M$ とし, イガicolニン非透析性分画の濃度を20mgとして使用した場合の実験結果を示す. 体重の増加の抑制と共に延命効果も認められた.

亜鉛と似た生理的機能を有すると云われる Mn^{++} の影響を調べるために、cornin-N 10mg と $MnCl_2 \cdot 10^{-6} M$ を含む生理的食塩水を、雄のマウスを使用して調べてみた。実験成績は図10に示してある。亜鉛の場合と同様、体重の増加の抑制は認められるが延命効果は認められなかった。

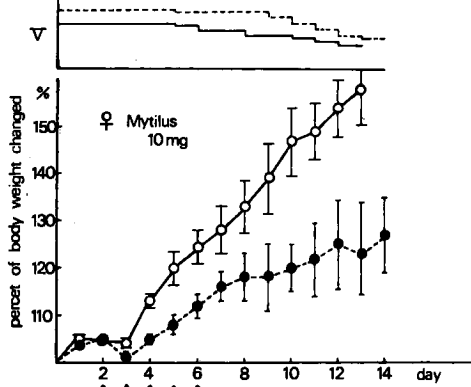


雄のマウスを計40匹用い、イガイコルニン非透析性分画の濃度は10mgとし、 $MnCl_2$ の濃度を $10^{-6} M$ とした場合の実験結果を示す。実験群では体重の増加の抑制が認められるが延命効果は認められなかった。

さて、イガイのLi-エタノール分画についても同様の実験を行った。今、Li-エタノール分画を生理的食塩水に溶解し、その濃度が10 mg/0.5mlの溶液を既述の方式で作用させて見ると、対照群として雌のマウス20匹、実験群25匹を使用しての実験成績を図11に示す。この場合も実験群では体重増加の著しい抑制が認められた。又、雄の場合には対照群として35匹を用い、実験群には30匹を用いた。図12。雄の場合同様に実験群では体重増加の抑制が認められ、且つ、30日以上生存したマウスは30匹中4匹で、延命効果も認められた。

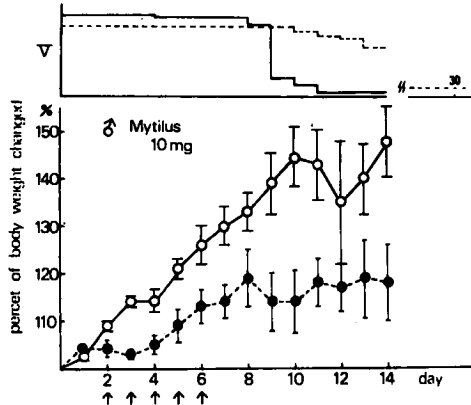
今、イガイ-Li-エタノール分画の一回の注射量を5mgとし、これに上記同様に $10^{-6} M ZnCl_2$ を加えて同様の実験を試みたところ、対照群として雌20匹、実験群として雌10匹を使用した場合、図13に示すように、実験群では体重の増加の抑制は認められず、かえって体重の増加が見られ、且つ、延命効果に関しても、その作用は認められなかった。又、対照群に雌25匹、実験群として雄30匹を使用した場合図14に

図11.



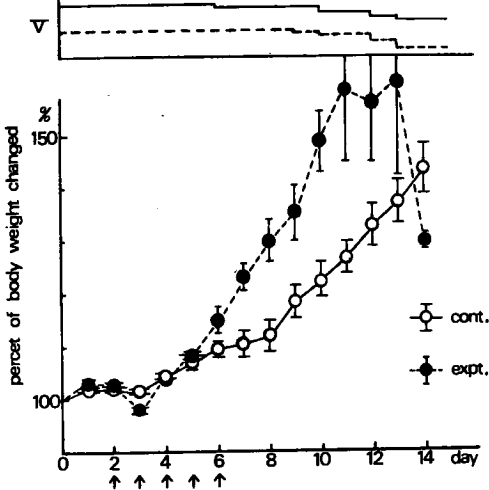
対照群として雌 20匹、実験群は雌 25匹を用い、Ehrlich 細胞移植後、2日目から6日目の間、対照群には0.5mlの生理的食塩水のみを、実験群には0.5mlの生理的食塩水に10mgの割合にイガイ-Li-エタノール分画を含む溶液を腹腔内に注射し、体重の変化をパーセントで示したものを。実験群では体重の増加の抑制が認められるが延命効果は認められない。

図12.



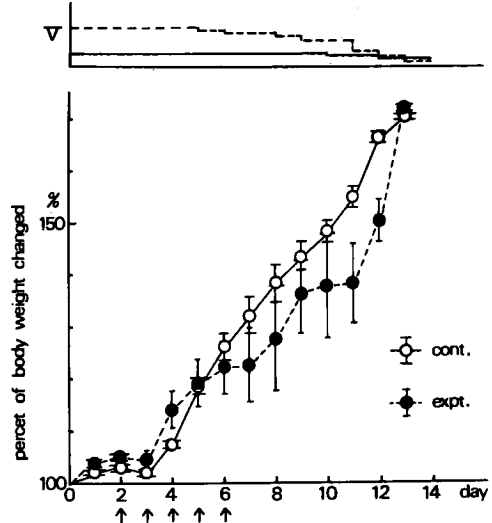
イガイ-Li-エタノール分画、10 mgを含む生理的食塩水を使用した場合の結果を示す。対照群には雄35匹、実験群には雄30匹を使用した。実験群では体重の増加の抑制が認められた。又、30日以上生存したマウスは30匹中4匹で、延命効果が認められた。

図13.



イガイ-Li-エタノール分画 5 mg, ZnCl₂ の濃度を 10⁻⁵M として, 対照群には雌20匹, 実験群には雌 10匹を使用した場合の体重の変化と生存日数を示す. 実験群では体重の増加の促進が認められ, 延命効果は認められない.

図15.



対照群に雌 5 匹, 実験群には雌15匹を使用, イガイ Li-エタノール分画10 mg, CuCl₂ の濃度を10⁻⁵M として作用させた場合の実験成績を示す. 実験群ではわずかな体重増加の抑制が認められるが, イガイ-Li-エタノール分画のみを作用させた図11を比べ, その効果は減少し, 且つ, 延命効果も認められない.

図14.

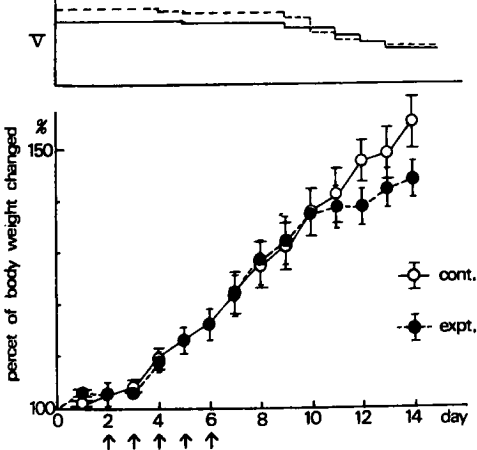


図13と同じ条件で, 雄を使用した場合の実験成績を示す. 対照群は25匹, 実験群には30匹を使用した. 両者の間に体重の変化, 生存日数共に差異は認められない.

図16.

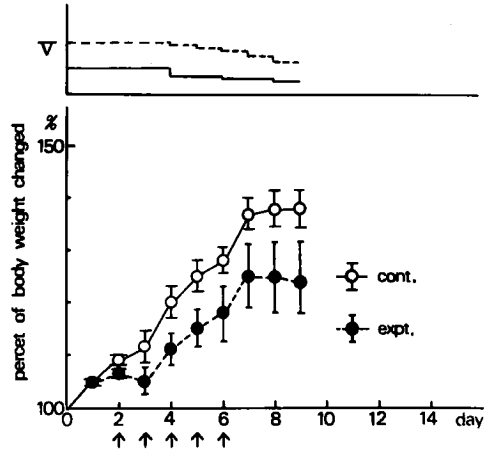


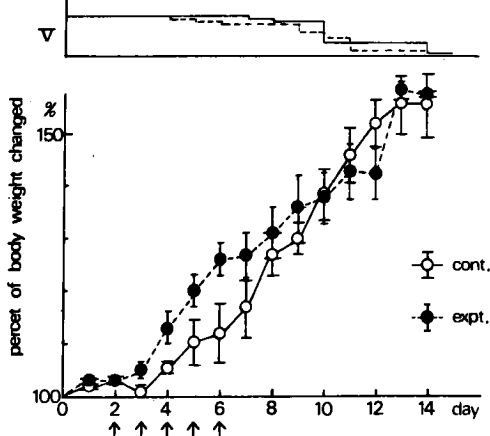
図15と同じ条件で, 対照群に雄10匹, 実験群に雄 20匹を使用した場合の実験成績を示す. イガイ-Li-エタノール分画のみを使用した図12と比べ, 体重増加の抑制作用及び延命効果も減少している.

示す様に、体重の変化、延命効果共に両者の間に差異は認められなかった。

次に、イガイ-Li-エタノール分画の濃度を10 mgとし、金属鉛としてCuCl₂を10⁻⁶Mを使用し雌5匹を対照群として用い、実験群には雌15匹を使用した場合を図15に示す。わずかな体重増加の抑制が認められるが、図11に示した、イガイ-Li-エタノール分画のみを使用した実験例と比べ、体重増加の抑制は減少している。又、生存日数も、実験群の方が早く死亡した結果が得られ、延命効果は全く認められない。同じく雄の場合で、対照群に雄10匹、実験群に雄20匹を使用した場合の成績を図16に示す。この場合もイガイ-Li-エタノール分画のみを使用した図12と比べ、体重の増加の抑制作用は低下し、且つ、延命効果も認められない。従って、銅イオンとの相乗作用は認められない結果を得た。

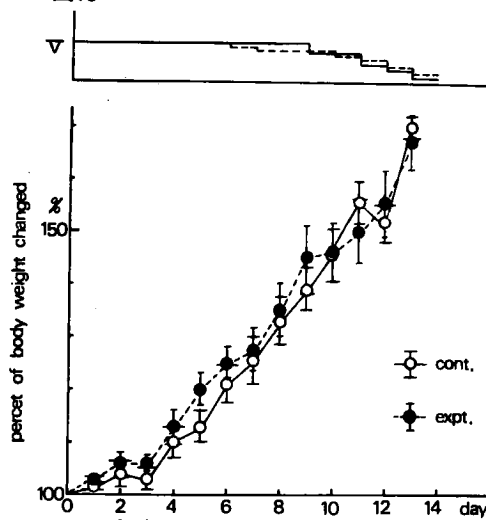
イガイ-Li-エタノール分画に chalone と同じように adrenaline と結合して、分裂抑制作用を示す作用があるか否かを調べた。まず、イガイ-Li-エタノール分画の濃度を5 mgとし、adrenaline の濃度を10⁻⁷g/mlとして雄のマウスを使用し、対照群、実験群共に15匹づつ用いて調べてみた。その結果を図17に示す。実験群では注射をしている期間、やゝ体重増加の促進があるがその後対照群と差がなくなり、生存日数においても両者の間に差がない。

図17.



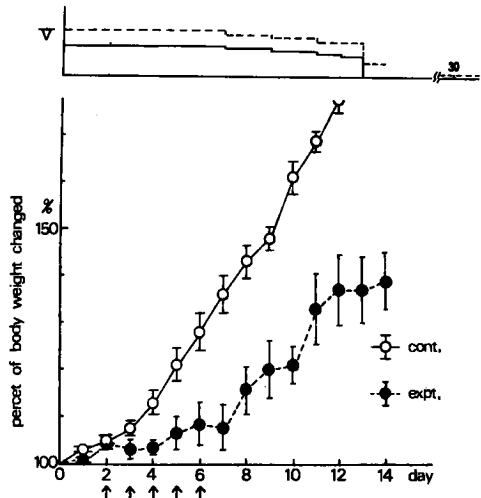
イガイ-Li-エタノール分画を5 mgと10⁻⁷g/ml のadrenaline を作用させた場合の実験成績。対照群には1回に10⁻⁷g/ml注射した。この実験には雄のマウスを使用し、対照群、実験群共に両者の間に差は認められない。

図18.



イガイ-Li-エタノール分画10 mg, adrenaline 濃度を10⁻⁷g/mlとして作用させた場合の実験成績を示す。対照群には雌13匹、実験群には雌15匹を使用した。実験群には体重増加曲線、及び生存日数共にに対照群と差が認められない。

図19.



対照群に雄13匹、実験群に雄15匹を用い、図18に示した条件と同様の実験を試みた。実験群では体重の増加の抑制が認められる。生存日数は対照群では Ehrlich 細胞移植後13日で全て死亡したが実験群では30日以上生存したマウスは15匹中1匹であった。

次に、イガイ-Li-エタノール分画を10 mgと増加させ、adrenaline は前回と同様 10^{-7} g/mlの濃度で作用させてみた。対照群、実験群共に15匹づつを使用した。実験結果を図18に示す。体重増加、及び生存日数共に両者の間に全く差異は認められない。又、対照群に雄マウス13匹、実験群には15匹を使用し、同様の実験を行ったところ、図19に示す如き結果を得た。試料を注射する期間中、ほとんど体重の変化は認められず、対照と比べて、著しい体重の増加の抑制があるが、その後体重は増加した。生存日数も、30日以上生存したマウスは15匹中1匹でありLi-エタノール分画のみを与えた場合に比し(図12)体重の増加の抑制も延命効果も差が認められない。

試験管内の実験としてV79細胞を用い、イガイコルニン分画、及びcornin-Nの細胞増殖に及ぼす影響を調べた。濃度は夫々0.5%及び0.25%とし、 ^3H -thymidine をとり込ませ、核にとり込んだ細胞のパーセント、分裂細胞、更に、分裂細胞を前期、中期、後期の3つの段階に分け、そのおのおののパーセントを表1に示した。V79細胞の増殖の抑制因子は非透析性分画にあることがうかがえる。そしてその作用機序としては ^3H -thymidine でラベルされた細胞数の減少からみてDNA合成の抑制が考えられ更に非透析性分画の0.5%を作用させたときに、分裂中期の細胞が約2倍になっていることから、分裂中期においても抑制があるのではないかと推論される。そして、この非透析性分画を作用させたときのV79細胞の増殖曲線に及ぼす影響を調べた結果を図20に示してある。0.5%の濃度で作用させると細胞の増殖は完全に抑制されている。

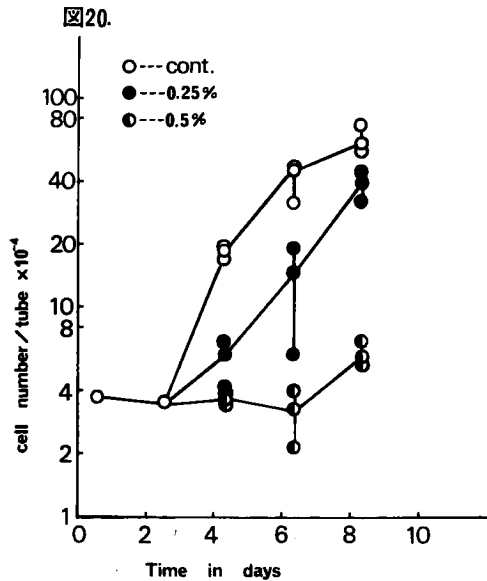


図20. V79細胞の増殖に及ぼすイガイコルニン非透析性分画の影響。細胞を継代後2日目に培養液の交換を行い、その際、イガイコルニン非透析性分画を0.25%及び0.5%含む培養液を加え、以後2日目ごとに核数計算により、細胞数を求めた。縦軸は一試験管当りの細胞数を示し、横軸は継代後の日数を示してある。

Table 1 V79細胞のDNA合成及び分裂期に及ぼすイガイコルニン、及びイガイコルニン非透析性分画の影響

cell line	fraction	concentration (%)	labeled cell (%)	mitosis (%)			
				total	prophase	metaphase	anaphase
V 79	Mytilus cornin	0.00	20.7	3.2	32	45	23
		0.25	13.8	4.5	45	35	20
		0.50	10.8	4.5	42	42	19
V 79	Mytilus cornin N-fraction	0.00	18.4	4.0	39	37	24
		0.25	8.1	2.3	50	30	20
		0.50	5.0	1.9	16	71	13

autoradiography により labeled cell のパーセントを求め、更に分裂期の細胞を各時期に分けて、その各々のパーセントを求めた。

考 察

海産動物の内、貝類から、細胞分裂の調節物質、特に抗癌物質の抽出について、最近幾つかの報告に接することができる。Schmeer (1964)⁵²⁾ は北米産のハマグリ *Mercenaria* の水抽出液が Swiss マウスに移殖した Sarcoma-180 や Krebs-2 腹水癌細胞の増殖を抑制することを報告した。この物質は -20℃ に冷した 4 倍量のメタノールを加えた上清に約 70% 存在し、100℃ で 25 分処理すると失活し、50℃ で 25 分の処理でも活性の低下があり、非透析性で凍結乾燥によっては失活しない等の性質を持っている。続いて Hegyeli (1964)¹⁷⁾ も *Mercenaria* から 2 倍量の水で抽出し、8,000 rpm で遠沈し、その上清を濃縮し、蒸留水に対して透析し凍結乾燥した物質がマウスに移殖した Krebs-2 細胞の増殖を抑制することを報告した。そしてこの活性は冬期においては著しく低く、夏期に高いことに気付き、冬期に採集したハマグリを 15.5~21℃ で約 1 ヶ月間飼育すると、その活性は 8~9 倍に高まる事を実験的に確めた。

Li 等 (1965)³⁰⁾ はアワビ (*Haliotis*)、カキ (*Crassostrea*)、ハマグリ (*Mercenaria*)、ソデガイ (*Strombus*) 等から抗ウイルス性の物質の抽出されることを報告した。ハマグリ (*Mercenaria*) を材料とした場合は 2 倍量の水で抽出し、遠沈の後、上清を 36 時間蒸留水に対して透析し、非透析性分画を凍結乾燥した物質、或はハマグリを Waring blender でホモジネートし、これに 40% 硫酸を等量に加え、遠沈した上清を 36 時間以上透析し、非透析性分画を凍結乾燥した物質が、ウサギの腎臓を単層培養した細胞に移殖したヘルペスウイルスやアデノウイルス 12 型の増殖を抑制する事を見出した。これらの物質は pH 8.0 で 95℃ 45 分の熱処理で失活するが、中性においては 126℃、30 分のオートクレーブ処理によっても失活しないこと、又、Sephadex G25 を用いて数種の分画に細分画され、この中で分子量 9,000~10,000、1,400~1,700 の物質が有効であることを報告した。Prescott & Caldes (1967)⁵¹⁾ はハマグリ *Mercenaria* の肝臓から抽出した抗癌作用を持った分画の化学的特性を調べた。その成績によると、非透析性で、70℃ 以上で熱処理を 30 分行うと失活する。しかし、pH 8.0 では失活しない、三塩化酢酸、硫酸、アルコール、スルフォサルチル酸等で沈澱させることが出来る。化学組成は窒素 12%、燐 0.25%、硫黄 1.6%、炭素 42.5% と水素 7.0% からなり、6 N HCl

で加水分解後 18 種のアミノ酸が検出されたことを報告した。更に Li 等 (1968)³¹⁾ は *Mercenaria* の肝臓を取出し、Waring blender でホモジナイズし、10 倍量の水で抽出、遠沈後、エタノールを加えて 70% の濃度とし、再び遠沈、沈澱物に 8% NaCl を加えて抽出を行い、遠沈上清を透析し、濾過後凍結乾燥した物質が Leukaemia L-1210 細胞を移殖したマウスに対して延命効果を持つことを報告した。これら一連の報告の中で熱に対する安定性があるか否かは、報告された論文によってまちまちであり、中にはアワビの膵膵が有効であるとの報文も紹介されている。Li 等 (1968)³¹⁾ によれば、上記の方法で抽出した物質は 100℃ 1 時間の熱処理やオートクレーブによって失活したと述べている。半井 (1972)³⁶⁾ は瀬戸内海産の海産動物から Ehrlich 腹水癌細胞の増殖の抑制因子の抽出を試み、ムラサキイガイ (*Mytilus*) 及びサザエ (*Batillus*) から、Li 等 (1965)³⁰⁾ の水抽出法、硫酸分画法、Nisida & Murakami (1965)⁴¹⁾ のコルニン分画法、Li 等 (1968)³¹⁾ のエタノール分画法によって得られた各分画の効果を調べ、ムラサキイガイから Li 等 (1968)³¹⁾ のエタノール分画法によって抽出した物質が最も効果的であり、マウスに Ehrlich 細胞を移殖後 2 日目から連続 5 日間、1 日 20 mg を腹腔内に投与した場合延命効果が認められ、完全治療の例もあることを報告した。そして、この分画は 100℃ で 10 分間の熱処理を行うと失活すると述べている。

Li 等の水抽出法、硫酸分画法やエタノール分画法等で抽出精製過程に長時間の透析過程が必要なこと。Amborski & Moskowitz (1968)¹⁾ は培養液に用いる bacto-peptone や preteose-peptone を Sephadex-G15 を用いて細分画し、分子量の大きい分画は細胞の増殖を促進しないばかりでなく、時には細胞を clump させることもあると述べていること、又、西田、村上 (1972)⁴⁵⁾ 及び牧山 (1972)³²⁾ は各種臓器から抽出したコルニン分画のうち、透析によって、透析性分画と非透析性分画に分けると、どちらの分画にも細胞分裂抑制作用はあるが、特に非透析性分画の方に活性の高い細分画が存在していること。且つ、コルニンの活性を高める目的で透析、DEAE-セルローズ、Sephadex、或いは Dia-filter 等で細分画していくと、予期された程、活性は上昇せず、その原因として細分画の過程での変性が考えられ、-SH 基還元剤で処理しても、なお、活性の上昇が得られないことから著者は細分画の過程で補助因子 (cof-

actor) が失われたためではないかと考えた。元来、カイ類は Zn^{++} や Cu^{++} イオンを多量に含んでおると云う大植等 (1954,⁷⁾ 1955)⁴⁸⁾ の報告がある。又最近寺山、笹田 (1969)⁵⁰⁾ 大塚 (1969),⁵⁰⁾ Maniloff and Millen (1970)⁵¹⁾ も、透析等で失われたと思われる補助因子として Zn^{++} や Mn^{++} を与えると失活していた DNA 合成阻害因子が再賦活されることを報告している。そこで cornin-N や Li-エタノール分画に Zn^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} イオンを加えて、Ehrlich 細胞の増殖に及ぼす影響を調べて見た。イガイコルニンのみを与えた場合には、その濃度が 20 mg の場合でも、雌雄共、生理的食塩水のみを注射した、対照群に比べて体重増加の抑制や延命効果は認められない。しかも、cornin-N を 20 mg 投与した場合は図 2 に示す様に体重増加の抑制は全く失われ、雌の場合には、わずかな促進が現われた。ところが、図 3、図 4 に示すように cornin-N の濃度を 5 mg とし、 $ZnCl_2$ 濃度を $10^{-6}M$ 加えることによって、著しい体重増加の抑制が現われて来た。 $10^{-6}M$ の $ZnCl_2$ を含む生理的食塩水のみを与えた対照群は、生理的食塩水のみを与えて来た従来の対照群と体重増加曲線に差がなく、体重は増加し続け、マウスの行動においても認められる変化はなかった。ところが図 5、6 に示す様に、 $ZnCl_2$ の濃度は $10^{-6}M$ とし、cornin-N の濃度を倍量の 10 mg とすると、雄の場合、30 日以上生存したマウスは 20 匹中 4 匹と云う延命効果が認められる。次に cornin-N の量は 10 mg とし、 $ZnCl_2$ の濃度を $10^{-5}M$ とすれば図 7、8 に示すように体重増加の著しい抑制が認められる。この場合も延命効果は雄の場合に限り認められた。又、図 9 に示すように $ZnCl_2$ の濃度は $10^{-5}M$ とし、cornin-N 分画の濃度を 20 mg とすると、やはり延命効果が認められた。cornin-N を Mn^{++} と同時に投与した場合図 10 のように体重増加の抑制は認められるが延命効果には差がない。又 Cu^{++} を併用した場合も体重増加の抑制は認められるが延命効果は認められなかった。延命効果が認められる群に雄の場合が多いのは性ホルモンが影響していることも推察される。Meek (1970)⁵⁴⁾ の総説にも性ホルモンが種々の制癌剤として利用されていることを述べている。マウスの乳癌由来の Ehrlich 癌細胞の増殖に性ホルモンが関与することは考えられるが、一般的に乳癌の治療に androgens が利用されていることは周知の事実である。半井 (1972)⁵⁵⁾ も述べているように、Ehrlich 細胞の増殖に対しては、イガイコルニンは全く作用がない。

そして、この非透析性分画も図 2 に示したように、全く作用がないが或はわずかな体重の増加の促進すら見られる。この分画に Zn^{++} , Mn^{++} , Cu^{++} を作用させると、著しい体重の増加の抑制と、 Zn^{++} の場合には延命効果も現われて来ることは興味深い。その理由は未だ明らかでないが、まず、イガイの軟体部を $100^{\circ}C$ で 10 分間熱処理した時期、続いてアルコール濃度の 70~90% の間の沈澱物を得る間、或は透析の間に、このような低分子の金属塩が除去されることは考えられることである。イガイの Li-エタノール分画法で得た分画がそれ自身、Ehrlich 細胞移植後の体重増加の抑制作用を持っているが半井 (1972)⁵⁵⁾ はこの分画を $100^{\circ}C$ で 10 分間の熱処理を行うと、その作用が失われたと報告しており、熱による蛋白の変性のみの問題か否か、更に、金属イオン以外、性ホルモン等との共軛機構も考えられ、今後、その原因を明らかにして行きたい。次に、イガイ-Li-エタノール分画が Ehrlich 細胞の増加に如何に作用しているかを考察すると、図 11, 12 に示したように、イガイ-Li-エタノール分画を 1 日 10 mg 作用させると、マウスの体重の増加の抑制と雄の場合は、延命効果が認められる。しかし、その量を 1 日 5 mg とし、 $10^{-5}M$ の Zn^{++} と共に作用させた場合には、図 13, 14 に示すように体重増加の抑制はない。雌の場合にかえって、わずかの体重の増加の促進が見られる。これは cornin-N を 5 mg と $10^{-5}M$ Zn を作用させた場合と最も異なる点である。イガイ-Li-エタノール分画 10 mg と $10^{-5}M$ Cu^{++} を同時に投与した場合においても図 15, 16 の如く、ごくわずかな体重増加の抑制が認められずに過ぎず、延命効果も現れない。このように、イガイ-Li-エタノール分画はこれらの金属イオンによる賦活作用は認められないことが判明した。

次にイガイ-Li-エタノール分画に chalone 様の作用があるか否かを調べてみた。adrenaline の濃度は Bullough 等の行った実験を参考にして $10^{-7}g/ml$ を用い、イガイ-Li-エタノール分画を 5 mg 投与した場合は図 17 に示すように adrenaline のみを投与した対照群と、ほとんど差がないが、わずかな体重増加の促進が認められる。10 mg に増加すると、図 18, 19 に示すように、雌の場合には、対照群と全く差がないが、雄の場合には著しい体重の増加の抑制が現われる。しかし、投与期間を過ぎると、再び体重の増加が始まる。そして 30 日以上生存したマウスは 15 匹中 1 匹であった。Bullough and Launence (1968)⁶⁾ は epidermal chalone をエタノール分画法でエタノ

ール濃度71~80%の沈澱物をとると、粗製 chalone 1mgより40 μ gが得られ、更に電気泳動と透析によって製精すると0.6 μ gが得られたと報告している。イガイ-Li-エタノール分画法とは抽出法が異っており chalone との差を論じられないが、adrenaline を含まない実験結果、図12と比べて見ても adrenaline の効果は認められず、イガイ-Li-エタノール分画-adrenaline-complex の作用はないと結論づけられると思う。

生活組織から抽出される細胞分裂調節物質に関し熱に対する安定性及び透析性の面から論じてみたい。Heilbrunn等(1954,¹⁸⁾ 1956¹⁹⁾ 1957²⁰⁾ はウニ、ヒトデ、魚類、カエル、ニワトリ、イヌ、ブタ、ネズミウシ等の卵巣からエタノール分画法で抽出し、ウニ卵の発生や Ehrlich 腹水癌細胞の増殖を抑制する分画は、熱に安定な透析性の heparin 様物質であることを報告している。又、Yamanouchi (1955)⁴²⁾ Nigrelli and Jakowska (1960)³⁷⁾ はナマコから holothurin と呼ばれる saponin 様の物質を抽出し、これわマウスに移殖した Krebs-2 細胞の増殖を抑制することを報告した。この物質は熱に安定で、非透析である。又、Szent-Györgyi等(1962,³³⁾ 1963,³⁴⁾ 1965³⁶⁾ 1966³⁾ 1967¹⁰⁾ はスイスマウスに移殖した Krebs-2細胞の増殖を抑制する物質を仔ウシの胸腺、ヒトの尿、ウシの臍、大動脈、骨格筋、等から抽出した。これらは熱に安定な、透析性の活性中心に ketoaldehyde を持つ物質である。又、ハマグリからも抑制物質を抽出し、これには低分子と高分子の物質があり、非透析性分画の活性中心は透析性の低分子の物質が原因しているのかどうかは未だ不明であると述べている。Bullough and Laurence (1964,³⁾ 1967,⁴⁾ 1968⁹⁾ 等の報告している chalone-adrenaline complex 以外にも Nillson and Phillipson (1968)³⁸⁾ はヒトの腎臓から、培養した腎細胞の、Chopna and Simnett (1969)⁸⁾ は両棲類の腎臓から、培養した腎細胞の、Hindener等 (1970)²⁴⁾ はヒトの子宮内膜から、培養した HeLa 細胞の、Hall (1969)¹⁴⁾ は成熟ハムスターの cheek pouch から、新生の同系ハムスター cheek pouch の培養した細胞の夫々、組織特異性のある抑制物質を抽出しているが、これらはいずれも非透析で、65 $^{\circ}$ C 30分の熱処理、或は100 $^{\circ}$ C 10分の熱処理によって失活している。しかし組織を最初から熱処理することによって、分裂促進因子の抽出にも成功している例もある。

さて我々の教室で研究の進められているコルニン

分画について考察してみると、西田等 (1958)³⁹⁾ によって発見された縮腫物質コルニンは、最初ネコの眼の前房水中に存在していることがわかり、続いて福井 (1958)²³⁾ はウシの角膜からコルニンの抽出に成功し、コルニンは熱に安定で非透析性であることを発見した。宮原 (1958)³⁵⁾ はコルニンが縮腫作用の他平滑筋運動の亢進や血圧下降作用のあることを見出した。門 (1961)²⁵⁾ は縮腫物質は家兎の骨格筋からも抽出され、縮腫作用は透析性分画の方が活性が大であると報告した。得本 (1962)⁶⁰⁾ は角膜や骨格筋の他、ほとんど全ての組織から縮腫物質を抽出することが可能で、その分布が substance P とほぼ一致すると述べた。日野 (1962)²¹⁾ は substance P は分裂促進作用があるのに反し、角膜コルニンは著しい分裂抑制作用を示すことを発見した。西田等 (1964)⁴⁰⁾ は角膜コルニン、筋肉コルニン共に細胞分裂の抑制作用を持っていること、及びその作用機序としてミトコンドリアの P/O ratio は約 $\frac{1}{2}$ に減少させ、DNA合成を抑制することを報告した。Nisida and Murakami (1965)^{41, 42)} は角膜コルニンを細分画し、非透析性分画の内に強い分裂抑制因子が2分画存在することを見出した。金尾 (1965)²⁶⁾ は筋肉コルニンの細分画を行い、分裂抑制作用を示す分画は透析性で xanthine を base とした、polypeptide であることを述べた。又、西田等 (1964)⁴⁰⁾ は、角膜コルニンと筋肉コルニンの分裂抑制因子の分析を行い、前者は非透析性であり、後者は透析性であるが共に熱に安定であると報告した。西田等 (1966)⁴³⁾ イヌの小腸から抽出した小腸コルニンは組織培養した正常細胞の増殖には何の影響も及ぼさないのに対し、SV-40ウイルスの DNA で発癌させた細胞には分裂抑制作用を持っていることを発見した。越宗 (1966)²⁸⁾ は、筋肉コルニンの作用機序として、筋肉コルニンが酸化的燐酸化を著しく抑制するために生じたものであると述べた。原田 (1967)¹³⁾ は筋肉コルニンはマウスに移殖した C₃H 腫瘍の増殖を抑制することを見出した。寺坂 (1967)⁵⁶⁾ は、各種臓器からコルニン分画を抽出し、角膜及び筋肉コルニンに続いて、肺臓、心臓コルニンも著しい分裂抑制作用を示すが、再生肝、胎盤や直腸コルニンでは最終有効濃度が10⁻⁴g/mlであることを見出した。Ohya (1967)⁴⁹⁾ は、Ehrlich 腹水癌細胞と C₃H 腫瘍の増殖に対し、筋肉コルニンは作用が少ないが、小腸コルニンには抑制作用のあることを報告した。Zimmerman等 (1968)⁶³⁾ は、筋肉コルニンは細胞を崩れ易くすることを見出し、木本等

(1968)²⁷⁾は小腸コリニンを透析性、非透析性分画に分ち、JTC-11細胞の増殖に対しては両者の間に大差のないことを報告した。高橋(1969)²⁷⁾は筋肉コリニンは分裂装置の出現を著しく遅延させることを見出し、藤田(1969)³⁴⁾はJTC-11細胞の thymine, thymidine, uracil, uridine のとり込みに及ぼす筋肉コリニンの影響を調べ、コリニンは thymidine, uridine は whole cell 及び酸不溶性分画へのとり込みを抑制すると述べた。Kobayashi (1969)²⁸⁾は発生中のウニ卵に対し、筋肉コリニンは uridine のとり込みを促進させるが、thymine, thymidine, uridine のとり込みは抑制することを報告した。智片(1970)⁶⁾は、角膜コリニンは *in vitro* でヘルペスウイルスの増殖を抑制するが、マウスにインターフェロンの産生を誘起する効果はないことを見出した。藤井(1970)¹¹⁾は筋肉コリニンの生殖能に及ぼす影響を調べ、筋肉コリニンは精子形式、妊娠期間、分娩頭数に何の作用も及ぼさず、且つ奇形児の発生もないことを報告した。山田(1970)⁶¹⁾はラット肝コリニンは正常のラット肝細胞の増殖は抑制するが、DABで発癌させた肝癌細胞には作用のないことを見出した。Chikata(1971)⁷⁾は角膜コリニン、筋肉コリニンのアミノ酸組成と窒素、磷、DNA、RNA 組成を分析した結果を報告し、西田等(1972)⁴⁶⁾は、角膜コリニン、筋肉コリニンを Sephadex カラムで細分画し、ラット肝由来の RLN-10細胞の DNA 合成抑制因子を調べ、DNA 合成抑制因子は多くの分画に分散して存在し、DNA 合成の抑制はいくつかの因子の相乗作用によるのではないかと考えた。牧山(1972)³²⁾は、イヌの小腸コリニンを Dia-filter で分子量の差によって分画し、HeLa 細胞の増殖を抑制する因子は透析性、非透析のいずれにも存在するが、特に、分子量 55,000 以上の分画の 1つが最も強い抑制を示したことを報告した。半井(1972)³⁶⁾は種々の海産動物から細胞分裂抑制因子の抽出を試み、培養細胞に対しては熱に安定な非透析分画が著しい分裂抑制作用を示すのに対し、Ehrlich 細胞の増殖に対しては熱に不安定な非透析分画のみが抑制を示すことを見出し、以上は西田、村上(1972)⁴⁶⁾によって総説されている。

そして、Ehrlich 細胞に高分子の物質がとり込まれるか否かについては最近 Juliano and Mayhew (1972)²²⁾は、¹⁴C-uridine でラベルした RNA を組織培養している Ehrlich 細胞にとり込ませた結果、高分子の RNA のとり込みは anionic な polymer,

例えばアルブミンや polyglutamic acid 等を加えると低下するが、cationic polymer, 例えば, polylysine 等によって強く刺激されること、更に RNA のとり込みは細胞代謝の抑制剤による影響を受け難いことを報告しており、又、日野(1962)²¹⁾も述べているようにウニ卵の発生に関する実験でも、受精後作用させると分裂抑制作用がないが、受精前、或は受精後、受精膜をとり除くと分裂抑制作用が強く現われて来ることから、細胞膜の透過は可能なのではないかと考えられる。

イガイコリニン非透析性分画の細胞増殖抑制機序に関しては、表1、及び図20に示すように、DNA 合成の抑制が主なる原因であり、又、分裂期中期の細胞が増加していることから、分裂装置の崩壊現象も起しているのではないかと考えられる。

結 論

Ehrlich 腹水癌細胞をマウスの腹腔に移殖し、移殖後48時間して、ムラサキイガイから抽出した、イガイコリニン非透析性分画、及びイガイ-Li-エタノール分画を1日当り5~20mg腹腔内に連続5日間投与し、体重の増加曲線及び延命効果に及ぼす影響を調べた。更に、Zn⁺⁺, Mn⁺⁺, Cu⁺⁺, adrenaline を同時に与え、これらの影響について調べ、下記のような結果を得た。

1) イガイコリニン非透析性分画は Ehrlich 腹水細胞の増殖には何等の影響も与えない。

2) 1日当りイガイコリニン非透析性分画 5mg を含む 10⁻⁶M Zn - 生理的食塩水 0.5ml を投与すると著しい体重増加の抑制が現われる。

3) イガイコリニン非透析性分画の投与量を1日当り10mg とすると著しい体重増加の抑制と共に、雄の場合延命効果が現われる。

4) イガイコリニン非透析性分画量を 10mg~20mg とし、Zn⁺⁺濃度を 10⁻⁶M としても著しい体重増加の抑制があり、雄の場合、延命効果が現われる。

5) Zn⁺⁺の代わりに Mn⁺⁺を用いた場合には、体重増加の抑制は認められるが延命効果は認められない。

6) イガイ-Li-エタノール分画を1日10mg投与すると著しい体重増加の抑制が現れ、延命効果も認められる。

7) 1日当りイガイ-Li-エタノール分画 5mg を含む 10⁻⁶M Zn - 生理的食塩水 0.5ml を投与する場合、体重増加の抑制及び延命効果は認められない。

8) イガイ-Li-エタノール分画10 mgに 10^{-8} M Cuを投与した場合には体重増加の抑制はあるが延命効果は認められない。

9) イガイ-Li-エタノール分画と adrenaline を併用した場合には、雄にのみ体重増加の抑制と延命効果が認められるが、Bullough等のいう adrenaline-complex の作用は現われない。

10) イガイコルニン非透析分画による細胞分裂抑制の作用機序の主なるものは DNA 合成の抑制にあると考えられる。

稿を終るに当り、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師西田勇教授ならびに村上哲英助教授に深く感謝致します。

イガイの採集に当っては、岡山大学理学部附属臨海実験所の御世話になりました。又、本研究の一部は、山陽放送学術文化財団研究助成金によって行なわれたことをここに記して感謝の意を表わします。

参 考 文 献

- 1) Amborski, R. L. and Moskowitz, M. (1968) The effect of low molecular weight materials derived from animal tissues on the growth of animal cells *in vitro*. *Exptl. Cell Res.*, **53**, 117-128.
- 2) Bullough, W. S. (1968) Growth regulation by tissue-specific factors, or chalones. *In* "Cellular control mechanisms and cancer." Ed. by Emmelot, P. and Mühlbock, O. Elsevier Pub. Co., Amsterdam, 124-145.
- 3) Bullough, W. S. and Laurence, E. B. (1964) Mitotic control by internal secretion: The role of the chalone-adrenaline complex. *Exptl. Cell Res.*, **33**, 176-194.
- 4) Bullough, W. S. and Laurence, E. B. (1967) Epigenetic mitotic control. *In* "Control of cellular growth in adult organisms". Ed. by Teir, H. and Rytömaa, T. Academic Press, London and New York, 28-40.
- 5) Bullough, W. S. and Laurence, E. B. (1968) Control of mitosis in mouse and hamster melanomata by means of melanocyte chalone. *Europ. J. Cancer*, **4**, 607-615.
- 6) 智片芳子 (1970) ウィルスの増殖および哺乳動物細胞の DNA 合成におよぼす cornin の影響. *日本生理誌*, **32**, 803-812.
- 7) Chikata, Y. (1971) The effect of cornin on DNA synthesis in mammalian cells: On the chemical properties of cornin extracted from muscle and cornea. *日本生理誌*, **33**, 266-267.
- 8) Chopra, D. P. and Simmet, J. D. (1969) Demonstration of an organ-specific mitotic inhibitor in amphibian kidney. The effects of adult *Xenopus* tissue extracts on the mitotic rate of embryonic tissue (*in vitro*). *Exptl. Cell Res.*, **58**, 319-322.
- 9) Együd, L. G. and Szent-Györgyi, A. (1966) Cell division, SH, ketoaldehyde, and cancer. *Biochem.*, **55**, 388-393.
- 10) Együd, L. G., Mc Laughline, J. A. and Szent-Györgyi, A. (1967) Ketone aldehydes in tissue. *Biochem.*, **57**, 1422-1425.
- 11) 藤井義信 (1970) 筋肉コルニンの細胞分裂調節作用と、その *in vivo* 応用への基礎的研究. *岡山医誌*, **82**, 549-560.
- 12) 藤田興 (1969) 腫瘍細胞の核酸合成におよぼす筋肉 cornin の影響. *日本生理誌*, **31**, 543-552.
- 13) 原田英樹 (1967) 筋肉 cornin の抗腫瘍効果とその *in vivo* 応用への基礎的研究. *岡山医誌*, **79**, 89-96.
- 14) Hall, R. G. Jr. (1969) DNA synthesis in organ cultures of the hamster cheek pouch. Inhibition by a homologous extract. *Exptl. Cell Res.*, **58**, 429-431. **58**

- 15) Hegyeli, A., Mc Laughlin, J. A. and Szent-Györgyi, A. (1963) Preparation of retine from human urine. *Science*, **142**, 1571-1572.
- 16) Hegyeli, A., Mc Laughlin, J. A. and Szent-Györgyi, A. (1963) On the chemistry of the thymus gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**, 230-232.
- 17) Hegyeli, A. (1964) Temperature dependence of the activity of the antitumor factor in the common clam. *Science*, **146**, 77-78.
- 18) Heilbrunn, L. V., Chaet, A. B., Dunn, A. and Wilson, W. L. (1954) Antimitotic substances from ovaries. *Biol. Bull.*, **106**, 158-168.
- 19) Heilbrunn, L. V. and Wilson, W. L. (1956) Antimitotic substances from the ovaries of vertebrates. *Biol. Bull.*, **110**, 153-156.
- 20) Heilbrunn, L. V., Wilson, W. L., Tosteson, T. R., Davidson, E. and Rutman, R. J. (1957) The antimitotic and carcinostatic action of ovarian extracts. *Biol. Bull.*, **113**, 129-134.
- 21) 日野道夫 (1962) CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響. *岡山医誌*, **74**, 729-740.
- 22) Juliano, R. and Mayhew, E. (1972) Interaction of polynucleotides with cultured mammalian cells. I. Uptake of RNA by Ehrlich ascites carcinoma cells. *Exptl. Cell Res.*, **73**, 3-12.
- 23) 福井正男 (1958) 角膜から抽出される縮腫物質 cornin について. *米子医誌*, **9**, 673-681.
- 24) Hinderer, H., Volm, M. and Wayss, K. (1970) Spezifische Hemmung der DNS-Synthese von HeLa-Zellen durch endometrium-Extrakt. *Exptl. Cell Res.*, **59**, 464-468.
- 25) 門長生 (1961) 角膜より抽出される縮腫物質 cornin に関する研究. *米子医誌*, **12**, 673-681.
- 26) 金尾浩志 (1965) 筋肉から抽出した CORNIN の細胞分裂抑制作用に関する研究. *岡山医誌*, **77**, 631-644.
- 27) 木本克彦, 藤田興, 小林芳治, 高橋誠一郎, 藤井義信, 山田俊典, 智片芳子, 大月恒, 村上哲英, 西田勇 (1968) 生理学的活性 Polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響 (IV). *岡山医誌*, **80**, 1211-1222.
- 28) Kobayashi, Y. (1969) Effect of cornin on nucleic acid synthesis during early development in sea urchin eggs. *Acta Med. Okayama*, **23**, 569-588.
- 29) 越宗猪一郎 (1966) ウニ卵および再生肝の酸可溶性磷酸分画におよぼす筋肉 CORNIN の影響. *日本生理誌*, **28**, 308-316.
- 30) Li, C. P., Prescott, B., Eddy, B., Caldes, G., Green, W. R., Martino, E. C., and Young, A. M. (1965) Antiviral activity of paolins from clams. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **130**, 374-382.
- 31) Li, C. P., Prescott, B., Martino, E. C. and Liu, O. C. (1968) Antineoplastic activity of clam liver extract. *Nature*, **219**, 1163-1164.
- 32) 牧山政雄 (1972) イヌの小腸から抽出したコルニン分画の細胞分裂抑制作用に関する研究. *岡山医誌*, **84**, 143-155.
- 33) Maniloff, J. J. R. C. and Miller, M. W. (1970) Effect of metals on cells, subcellular elements, and macromolecules. C. C. Thomas Pub, Springfield.
- 34) Meek, E. S. (1970) Antitumour and antiviral substances of natural origin. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- 35) 宮原昌彦 (1959) 角膜から抽出される縮腫物質 CORNIN の生物学的性状について. *米子医誌*, **10**, 13-20.
- 36) 半井昭英 (1972) 数種の高産動物から抽出した細胞分裂調節物質に関する研究. *岡山医誌*, **84**, 535-550.
- 37) Nigrelli, R. F. and Jakowska, S. (1960) Effects of holothurin, a steroid saponin from the Bahamian sea cucumber (*Actinopyga agassizi*) on various biological systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**, 884-892.
- 38) Nillson, G. and Phillipson, L. (1968) Cell growth inhibition of human cell lines by human

- tissue extracts. *Exptl. Cell Res.*, **51**, 275-290.
- 39) 西田勇, 中山沃, 福井正男, 三好実三, 浜村寛 (1958) 動眼神経切断後にみられる奇異なる縮腫現象について. *米子医誌.*, **9**, 545-550.
- 40) 西田勇, 村上哲英, 金尾浩志 (1964) 生物学的活性 Polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響. *細胞化学シンポジウム.*, **14**, 57-70.
- 41) Nisida, I. and Murakami, T. H. (1965) Antimitotic action of cornin as a biologically active polypeptide I. Biochemical properties of cornin. *Acta Med. Okayama*, **19**, 1-9.
- 42) Nisida, I. and Murakami, T. H. (1965) Antimitotic action of cornin as a biologically active polypeptide II. Physiological effects of cornin on dividing cell. *Acta Med. Okayama*, **19**, 11-18.
- 43) 西田勇, 村上哲英, 藤芳子, 原田英樹 (1965) 生物学的活性 Polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響. (II). *細胞化学シンポジウム.*, **15**, 225-231.
- 44) 西田勇, 村上哲英, 藤芳子, 越宗猪一郎, 寺坂俊明, 高橋誠一郎, 木本哲夫 (1966) 生物学的活性 Polypeptide CORNIN の細胞分裂に及ぼす影響. (III). *細胞化学シンポジウム.*, **17**, 207-216.
- 45) 西田勇, 村上哲英 (1972) 組織から抽出される細胞分裂調節物質について. *日本生理誌.*, **34**, 131-146.
- 46) 西田勇, 村上哲英, 牧山政雄, 大野尚文, 半井昭英, 垣内一郎, 池宗宏典, 大月恒, 智片芳子 (1972) 筋肉 cornin および角膜 cornin の DNA 合成抑制因子について. *岡山医誌.*, **84**, 119-125.
- 47) 大植登志夫, 伊藤猛夫, 村上哲英, 三谷嘉毅 (1954) ミドリガキの生物学的研究. *愛媛大学地域社会総合研究所報告. B.* **1**, 1-9.
- 48) 大植登志夫, 伊藤猛夫, 村上哲英, 三谷嘉毅 (1955) ミドリガキの生物学的研究 (II). *愛媛大学地域社会総合研究所報告. B.* **3**, 1-15.
- 49) Ohya, T. (1967) Studies on the effect of tissue substance "cornin" on transplantable malignant tumor in mice. *Acta Med. Okayama*, **21**, 227-250.
- 50) 大塚治城 (1969) 肝臓中に存在する DNA 合成阻害因子について. - その作用機作及び実体 - *細胞化学シンポジウム*, **20**, 39-46.
- 51) Prescott, B. and Caldes, G. (1967) Chemical studies of an antitumor substance from clams. *Fed. Proc.*, **26**, 314.
- 52) Schmeer, M. R. (1964) Growth-inhibiting agent from *Mercenaria* extracts: Chemical and biological properties. *Science*, **146**, 77-78.
- 53) Szent-Györgyi, A., Hegyeli, A. and Mc Laughlin, J. A. (1962) Constituents of the thymus gland and their relation to growth, fertility, muscle, and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **48**, 1439-1442.
- 54) Szent-Györgyi, A., Hegyeli, A., Mc Laughlin, J. A. (1963) Growth and cellular constituents. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **49**, 878-879.
- 55) Szent-Györgyi, A., Hegyeli, A., and Mc Laughlin, J. A. (1963) Cancer therapy: A possible new approach. *Science*, **140**, 1391-1392.
- 56) Szent-Györgyi, A. (1965) Studies in growth. *Current Therapeutic Res.*, **7**, 85-90.
- 57) 高橋誠一郎 (1969) 筋肉コルニンの細胞分裂抑制作用について. - 位相差顕微鏡映画撮影法による観察 - *岡山医誌.*, **81**, 59-70.
- 58) 寺坂俊明 (1969) 各種臓器から抽出した CORNIN の細胞分裂抑制作用に関する研究. *岡山医誌.*, **79**, 734-742.
- 59) 寺山宏, 笹田昌良 (1969) 動物組織中存在する肝癌細胞の DNA 合成阻害因子に就て. *細胞化学シンポジウム*, **20**, 27-37.
- 60) 得本博允 (1962) 縮腫物質 cornin の生体内分布について. *岡山医誌.*, **74**, 679-683.
- 61) 山田俊典 (1970) ラットの肝臓から抽出した cornin のラット肝細胞の分裂に及ぼす影響. - 位相差顕微鏡映画撮影法による観察 - *岡山医誌.*, **82** 561-574.

- 62) Yamanouchi, T. (1955) On the poisonous substance contained in holothurians. Pub. Seto Mar. Biol. Lab., 4, 183-203.
- 63) Zimmerman, S. B., Murakami, T. H. and Zimmerman, A. M. (1968) The effects of selected chemical agents on furrow induction in the eggs of *Arbacia punctulata*. Biol. Bull., 134, 356-366.

Antimitotic factors extracted from *Mytilus*.

Ichiro Kakiuchi

Department of Physiology, Okayama University Medical School,
Okayama, Japan.

(Director: Prof. Isamu Nisida)

In these experiments, two kinds of extracts, *Mytilus* cornin-nondialyzable fraction and *Mytilus* Li-ethanol fraction, were used to study the inhibitory effects on Ehrlich ascites carcinoma. And also investigated the complexing action of extracts with $ZnCl_2$, $MnCl_2$, $CuCl_2$ and adrenaline. In studying carcinostatic action the author used ddN strain mice. These were inoculated routinely with 1×10^7 Ehrlich ascites tumour cells in a volume of 0.2 ml of ascites fluid. Then 48 hours after inoculation, treatment with the extracts was begun. Each day for five days, each one of the mice was given intraperitoneally injection with a solution containing 5-20 mg of the material per 0.5 ml of saline. Obtained results are summarized as follows.

1) *Mytilus* cornin and *Mytilus* cornin-nondialyzable fraction had no effect on ascites bearing mice.

2) 5-20 mg of *Mytilus* cornin-nondialyzable fraction in 10^{-5} - 10^{-6} M of $ZnCl_2$ -saline injected intraperitoneally into ascites bearing mice for five days produced a marked reduction in mean body weight and an increase in survival time.

3) In the case of $MnCl_2$ and $CuCl_2$, a similar effect was demonstrated in the reduction of body weight, but not in survival time.

4) *Mytilus* Li-ethanol fraction in saline led to inhibition of Ehrlich carcinoma, and also an increase in survival time, when it was given intraperitoneally at dose level of 10 mg per mouse on the second day after tumour transplantation and continued for each of five days.

5) *Mytilus* Li-ethanol fraction in heavy metal ions and adrenaline had no effect on ascites bearing mice.