

癌細胞の螢光染色ならびに界面活性物質を 併用した癌化学療法の研究

第 3 編

諸種界面活性物質の癌細胞膜透過性亢進作用に関する研究

岡山大学医学部第1外科教室（指導：陣内傳之助前教授，田中早苗教授）

森 下 和 郎

〔昭和38年5月14日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒言ならびに文献

第2章 実験方法

第1節 実験動物

第2節 実験材料

第3節 実験方法

第3章 実験成績

第1節 界面活性物質の生物学的比較標準 濃度

第2節 NTS 螢光色素による細胞膜透過性 に及ぼす影響の検討

第3節 エオジン色素による細胞膜透過性亢 進に及ぼす影響の検討

第4章 総括ならびに考按

第5章 結 論

文 献

英文抄録

第1章 緒言ならびに文献

従来、癌細胞と正常細胞との間の明確な差異を何らかの方法で見出そうとして多くの努力が払われてきたが、現在のところ癌細胞に決定的な特異性はまだ発見されるに至っていない。わたくしも第1編¹⁾、第2編²⁾において、NTS 螢光色素により癌細胞が特異的に染色されはしないかとの考えから若干の基礎的研究を行なつてきたが、この色素は酸性色素であつて medium が非常に高い pH 域にある場合にのみ癌細胞が正常細胞よりも良く染まるということを知りえたにすぎない。このことは、癌細胞には塩基性蛋白が正常細胞よりも多く含まれているためであつて、癌細胞に限らず塩基性蛋白の多い細胞はすべてこの酸性色素で染色されるもので、必ずしも癌細胞の検出に特異的に役立つものではないようである。

この螢光色素 NTS の基礎的な染色機構の解明に関する実験中、わたくしはエールリッヒ腹水癌マウスの腹腔中に抗癌剤を投与した後、NTS 螢光色素を用いて腹腔内細胞の超生染を試みたところ、抗癌

剤によつて変性をうけた癌細胞がきわだつて NTS 螢光色素によりよく濃染されることを知つた。第1編で酸性域の変性蛋白は NTS 螢光色素とよく結合して染色されやすいことをのべたが、抗癌剤投与をうけた癌細胞が NTS 螢光色素による超生染で良染される事実から、NTS 螢光色素がとくに変性細胞の変性蛋白とよく結合することを裏付け、これはエオジンなどの酸性色素と共通の性格を有するものであると考えた。この染色機構が超生染である限り、これら色素は細胞膜をよく透過するということが重要な条件になつているに違いない。

そもそも細胞膜はリポ蛋白より構成されているが、その物質透過性については膜電位と透過物質の分子の大きさや荷電の状態などの相互関係で説明が許されるであろう。このような機構を解明するには、従来から Nile blue, Janus green B等を用い、色として光学顕微鏡で観察できる超生体染色³⁾⁻¹⁵⁾あるいはこれを重金属などで固定して電子顕微鏡的¹⁶⁾⁻³³⁾に解析を加えようとする研究などが数多くされてきている。妹尾・大口^{34),35)}は、各種色素による超生体染色の研究より細胞膜の透過性を論じているが、

酸性色素は medium の酸性側で、塩基性色素は medium のアルカリ側で色素の細胞膜透過性が亢進され、その結果細胞内に色素が侵入し細胞が超生染されやすくなるとのべている。この細胞膜の透過性に着目していろいろの色素を用い、超生体染色によつて腫瘍細胞と正常細胞との間に相異点を見出そうと試みた研究もまた多い⁽³²⁾⁽³⁵⁾⁽⁴⁰⁾。また一方細胞膜の透過性の研究に当つて人工的な条件を加えて透過性の検討を試みたものに Bernard, Alexander⁽⁴²⁾ など⁽⁴³⁾⁽⁴⁵⁾ の仕事がある。すなわち、Alexander⁽⁴²⁾ は石鹼がその構造的特色より非常に高い界面活性能を持ち、これが生体細胞に透過亢進的に働くことを立証し、また B. Lucke & A. K. Parpart⁽⁴⁶⁾ は腫瘍細胞は正常細胞に比して高級アルコールに対し膜透過性が低いことを発表している。Bennet⁽⁴⁷⁾ によればオレイン酸のような界面活性能を有する物質により腫瘍細胞は赤血球と同様に著しく膜を破壊され、細胞質の流出を起し、したがつて細胞の呼吸の低下を来すようになることを報告している。

わたくしは、細胞膜の透過性を何らかの条件を与えることによつて人工的に亢進させることができれば、NTS 螢光色素やエオジン等の酸性色素を、通常では超生体染色されることのないアルカリ側に傾いた medium においても染色を可能ならしめるのではないかと考えた。わたくしはこの条件をみたくものとして界面荷電状態を変換しうる物質がよからうと考え、Tween 80, サポニン, 逆性石鹼(オスパン)などの界面物質を用い、細胞膜構造や細胞膜荷電を変えることによつて起る細胞内への物質の侵入のしかたやその変化を検討し、また正常細胞と腫瘍細胞についてのこの間の態度の差を観察しようと試みた。

さらにこの問題の解明に興味を添えたのは、わたくしどもの教室で行なわれた OX 物質(以下 OX という)の臨床的研究⁽⁴⁸⁾である。すなわち、OX は山本⁽⁴⁹⁾⁽⁵²⁾により X 線照射家兎の肝より抽出分離された抗腫瘍性の不飽和脂肪酸分画で、臨床に用いられるのはこれから作られた鹼化液であり、これはつよい界面活性能を有し癌巣に塗布あるいは癌病巣局所に注射を行なうと、その周辺正常組織には殆んど障害をもたらさず癌組織にのみ選択的な壊死作用を起す抗腫瘍作用をもっていることが明らかにされている。このものは、pH 7.2 の領域においても高い界面活性能を有しており、細胞膜の透過性に特別な変化をもたらしている可能性もあり、臨床的には上

述のように正常組織と癌組織との間に明らかな作用の相異がみられるので、抗腫瘍性のほかに OX には界面活性物質としての作用のあることも検討する必要があると考えてこの物質も実験に加えることとした。

さて、超生体染色に関する手法は種々の条件がかみあつてかなり複雑なものであるが、大口⁽³⁶⁾は色素による細胞膜透過性には medium の pH と超生染に要する時間とが重要な因子であるといい、後になつて彼はこの時間を一定にすることによつて超生体染色を成功に導いている。わたくしは、色素濃度ならびに medium の pH を一定にし、また染色時間もできるだけ一定にしたうえ、界面活性物質の濃度や種々変えて細胞膜構造の荷電状態に変化を与え、膜の透過性を人為的に亢進せしめて超生体染色を促進させようと考えた。このようなことが可能であれば、酸性色素である NTS 螢光色素、あるいはエオジン色素によつても、通常アルカリ側で超生染不能のものも超生染可能となるであろう。この間の細胞膜透過性の問題を充分検討してゆけば、臨床的にも人工的に癌細胞膜の透過性をたかめておいて、それに制癌剤を投与してよりよく癌細胞に選択的に制癌剤を作用せしめ得るような理想的な制癌方法が確立される筈である。本編ではこのような点に関し 2, 3 の基礎的実験の展開を試みた。

第2章 実験方法

第1節 実験動物

実験動物には、体重 20g 前後の市販雑系 dd 系マウスを使用した。

第2節 実験材料

1. 実験に使用した腫瘍細胞は岡山癌源研究所より分与され上記マウスに移植されたエールリッヒ腹水癌細胞の移植後 7~9 日目の腹水を使用した。

2. 対照としての正常細胞は、健康マウス腹水細胞、同腸上皮細胞、同肝細胞を選んだ。腹水細胞は細いガラス毛細管で穿刺により腹水を得、腸上皮細胞、肝細胞は、マウス撲殺後直ちに(5分以内)生理的食塩水中にて腸粘膜、肝切片を洗滌して後、これをオベクトガラス上に軽く圧迫(スタンプ)し、細胞の剝離脱落した浮游液を使用した。

3. 細胞膜透過性を観察するための色素は、NTS 螢光色素(住友化学)とエオジン(和光純薬)の2種類を用いた。NTS 螢光色素およびエオジンはいずれも McIlvaine 緩衝液にて pH 7.2 に調整し、

濃度は0.1%になるように溶解して使用した。

4. 界面活性物質としては、5%ブドウ糖液で稀釈した Tween 80 (片山化工製) 1%液, サポニン(武田化学製) 1%液, オスパン (逆性石鹼) (武田薬品製) 10%液, リノール酸2%液 (高速ホモゲナイザー処理) および OX (東芝製薬) 2.5%液の5種類を用いた。これら界面活性物質を細胞に接触せしめる最終濃度は、上記調整濃度のものから5%ブドウ糖液でつぎつぎに倍々稀釈したものを使用し、pH では McIlvaine 緩衝液にてつねに pH 7.2 に保つようにした。

第3節 実験方法

1. 各種界面活性物質の生物学的活性度を表わすために、わたくしは赤血球溶血限界濃度を標準とすることにした。すなわち、上記のように調整された Tween 80, サポニン, オスパン, リノール酸, OX などを5%ブドウ糖液でそれぞれ倍々稀釈したもの5ccに、健康人末梢血を1滴ずつ滴下し、室温放置15分後溶血開始濃度をもつてこれら界面活性物質の生物学的標準濃度とした。

2. NTS 螢光色素による細胞膜透過性亢進に及ぼす影響の検討法として、前述の各種細胞浮游液をオベクトグラス上に1滴採取後、pH が7.2に調整された各種濃度の界面活性物質を1滴宛加え、室温(20°C)にて手際よく混じ、1分後さらに pH 7.2 の0.1%の NTS 溶液を9滴加え、さらに1分間よく混じた後、デッキグラスで覆い、30分目に検鏡した。観察には、千代田光学製螢光顕微鏡を用い、フィルターはイワキ F1 を使用した。

3. エオジン色素による膜透過性亢進に及ぼす影響の検討法は、前項と同様にして採取した各種細胞浮游液に、McIlvaine 緩衝液にて pH 7.2 に調整された界面活性物質を1滴加え、1分間やはりよく混じた後、pH 7.2 の0.1%のエオジンを9滴加え、前記同様の操作を行ない、同じく30分目に検鏡した。観察には光学顕微鏡および位相差顕微鏡を用いた。

第3章 実験成績

第1節 界面活性物質の生物学的比較標準濃度

界面活性物質の比較標準濃度をきめるためには、赤血球浮游液に上述の界面活性物質を加え、室温に15分間放置して赤血球の溶解が起り始める濃度を指標とした。

これによると、Tween 80 は0.0038%, サポニン 0.0019%, オスパン 0.0011%, リノール酸 0.0038%, OX 0.0023%であつた。この濃度を界面活性物質の生物学的比較標準濃度とした。

第2節 NTS 螢光色素による細胞膜透過性亢進に及ぼす影響の検討

1. 対照：対照として界面活性物質を添加することなく諸種細胞の NTS 螢光色素による超生体染色を行なつたが、pH 7.2 では螢光色素によく染色される細胞群と、部分的には全く染色されない細胞群とに常にかかれた。この状態を部分染色と呼ぶことにする(△印)(表1, 写真1)。

2. Tween 80：表1にみられるように、エールリッヒ癌細胞および正常腹水細胞は、添加された Tween 80 が標準濃度の27倍というかなり高濃度であつても全細胞が決して均一に染色されることはなく部分染色像を示した。これに反し正常腸上皮細胞は標準濃度から上のすべての高濃度域で全細胞が均一に良染せられ、肝細胞は Tween 80 添加が26倍の高濃度以上で全細胞がすべて均一に染色され(均一染⊕印)る。この場合個々の細胞をみると、細胞質、核とも良染像を示す。しかし肝細胞では25倍以下、腸上皮細胞では2²以下の低濃度においては対照と同じく部分染色像を示すようになり、Tween 80の濃度と各種細胞との間に透過性の明らかな相異のあることが示された。

3. サポニン：各細胞とも高濃度においては膨化・破壊されるが、その破壊片までもみなすべてよく

表 1 NTS 螢光色素超生体染色

	標準濃度倍数 添加濃度(%)	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁴	2 ³	2 ²	2 ¹	2 ⁰	2 ⁻¹	2 ⁻²	対 照
		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0308	0.0154	0.0077	0.0038	0.0019	0.00095	
Tween 80	エールリッヒ癌細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正 常 腹 水 細 胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正 常 腸 上 皮 細 胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正 常 肝 細 胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

注：○全染 △部分的 ⊕濃染

色素にそまつている（均一染・良染像⊕印）。低濃度になればやはり対照と同じく部分染像を示す（表2）。サポニン は生物学的標準濃度の $2^5 \sim 2^7$ において各種の細胞膜の透過性にデリケートな差異をあらわす。写真2はエールリッヒ癌細胞と正常腸上皮細胞の混在浮游物を0.125%サポニン添加で染色したものであるが、両者ともすべてよく染色される。特に核染色性がつよい。

4. オスバン：サポニンと同様に各細胞とも高濃度（10～2.5%）になれば膨化，破壊を示すが（写真3），破壊片も均一によく染色され，良染像を示している。しかしオスバンは標準濃度の 2^2 から 2^5 倍の低濃度においても各細胞は均一に染まり，良染像（⊕印）を示す（表3）特徴がある。

5. リノール酸：各細胞とも標準濃度の $2^8 \sim 2^9$ 倍の高濃度においては膨化を示すが全細胞均一に染ま

り良染である（⊕印）。低濃度になるにしたがつて部分染色を示すようになる（表4）。

6. OX：表5に示すように，標準濃度の 2^{10} 倍にあたる2.5%の高濃度になれば細胞は膨化し一般に不染性を示すが，エールリッヒ腹水癌細胞は $2^9 \sim 2^5$ 倍の巾広い範囲で均一に染まり良染像を示した。 $2^9 \sim 2^{10}$ 以上では正常腹水細胞は膨化，破壊を示し染色性悪く不染像を示すが， 2^8 より 2^3 倍までは均一に染まり良染を示す。しかし正常腸上皮細胞は 2^9 倍より，肝細胞は 2^9 倍より均一に染まり良染状態となり，破壊や膨化像は認められないという非常に特殊な染色状態を示した。

小括：以上に示したように NTS 螢光色素による超生体染色は，上皮系，間葉系，腫瘍細胞を問わず必ずしも全部の細胞を均一に染色するとは限らない。NTS 超生体染色時に界面活性物質を添加する

表 2

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0308	0.0154	0.0077	0.0038	0.0019	0.00095	0.00047	
サポニン	エールリッヒ癌細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腹水細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腸上皮細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常肝細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

注：○全染 △部分的 ⊕濃染 ⊙破壊残片 ●破壊片

表 3

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	1.25	0.625	0.308	0.154	0.077	0.038	0.019	0.0095	0.0047	0.0023	0.0011	0.00055	0.00027	
オスバン	エールリッヒ癌細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腹水細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腸上皮細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常肝細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

注：○全染 △部分的 ⊕濃染 ⊙破壊残片 ●破壊片

表 4

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0308	0.0154	0.0077	0.0038	0.0019	0.00095	
リノール酸	エールリッヒ癌細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腹水細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腸上皮細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常肝細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

注：○全染 △部分的 ⊕濃染

表 5

	標準濃度倍数	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁴	2 ³	2 ²	2 ¹	2 ⁰	2 ⁻¹	2 ⁻²	対照
		2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0.0095	0.0047	0.0023	0.0011	0.00055	
O X	エールリッヒ癌細胞	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	△
	正常腹水細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常腸上皮細胞	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	△
	正常肝細胞	○	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	△	△	△	△	△	△	△	△

注：○全染 △部分的 ⊕濃染 -不染 ±微染 ⊗破壊片

と、一般にそれが高濃度の時は細胞膜から色素がよく侵入し全細胞が均一に染色されるようになる。さらに高濃度の添加が行なわれた場合は、細胞が膨化・破壊するがその破壊物も極めてよく色素と結合している。しかし OX のみは、高濃度添加の際に必ずしも細胞が均一に良染するとは限らず、特別の説明が必要とされる結果を得た。

生物学的比較標準濃度は赤血球破壊能をもつてあらわしたが、界面活性物質の細胞膜の物質透過作用の溶血能力と必ずしも併行するものではないことが示された。とくにオスパンは非常な低濃度でも細胞膜の透過性を亢進せしめる作用を有することが明らかにした。

第3節 エオジン色素による細胞膜透過性亢進に及ぼす影響の検討

1. 対照：NTS 螢光色素の場合と同様に、界面活性物質を使用せずにエオジンで超生染を行なったが、この場合は各種細胞ともいつも部分染色像（金印）を示した。

2. Tween 80：表6に示すように、エールリッヒ腹水癌細胞および正常腹水細胞は、1%以下の濃度ではどの濃度においても部分染色像を示しており、全細胞が均一平等に染色されることはない(写真4)。正常腸上皮細胞および肝細胞は、高濃度になれば均一に染まるが、標準濃度の2¹以下の低濃度においては部分染色を示している。

3. サポニン：標準濃度の2⁶という高濃度添加においては、エールリッヒ癌細胞および各種細胞とも膨化・破壊を示すが、全細胞とも均一に染まりよく良染する(写真5)。それより低濃度になるに従って個々の癌細胞の染色度は低下し不染性を示すようになるが、それに比し正常腹水細胞は、この範囲内の濃度ではかなり高濃度でも部分的染色で良染を示している。腸上皮細胞および肝細胞は全細胞とも均一に良染し、膨化・破壊像も認めず共通して透過性の亢進を示している(表7)。

4. オスパン：標準濃度の2¹³倍に相当する10%の高濃度になれば、癌細胞はじめ各種細胞とも膨化・破壊が強く、破壊核影を残すのみであるが、それ自体は良染されている。2⁵倍以下の低濃度になるにつれて、超生染色度は低下して部分染色になるが、正常腸上皮細胞および肝細胞は標準濃度になるまで均一に染まり良染を示している(表8)。

5. リノール酸：エールリッヒ腹水癌細胞および正常腹水細胞は甚しい高濃度の2⁸~2⁹倍になれば部分染を示し、2⁵~2⁷倍の濃度範囲においてエールリッヒ癌細胞は均一に染まり良染を示すが、正常腹水細胞は2²~2⁷倍の範囲にて均一に良染を示している。しかしそれ以下の濃度では部分染色像を示す。正常腸上皮細胞および肝細胞は2⁸~2⁹倍の高濃度になつても均一に染まり良染像を示すが、2¹倍以下の低濃度では部分染色である(表9)。

表 6

	標準濃度倍数	2 ¹⁰	2 ⁹	2 ⁸	2 ⁷	2 ⁶	2 ⁵	2 ⁴	2 ³	2 ²	2 ¹	2 ⁰	2 ⁻¹	2 ⁻²	対照
		4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0308	0.0154	0.0077	0.0038	0.0019	0.00095	
Tween 80	エールリッヒ癌細胞	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
	正常腹水細胞	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△	△
	正常腸上皮細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	正常肝細胞	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕

注：○全染 △部分的 ⊕濃染

6. OX: 表10に示すように, エールリッヒ癌細胞は, 極めて高濃度の OX すなわち 2^{10} 倍には膨化するが, どの細胞も均一に染色される。しかし個々の細胞をみると核微染の状態であり, かえって低い濃度の $2^8 \sim 2^9$ 倍で均一に安定して良染を示す(写真6)。それ以下では, 部分染色で細胞染色度に均

一性を欠くようになる(写真7)。正常の腹水細胞は, $2^9 \sim 2^{10}$ 倍の高濃度では, 細胞は膨化・破壊され核影の残存を認めるのみであるが, $2^6 \sim 2^8$ 倍の間では均一に染まり良染状態である。それ以下の濃度では, 部分染色にとどまる。腸上皮細胞は, 2^{10} 倍の高濃度になれば膨化の状態となり染色性は均一と

表 7

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0308	0.0154	0.0077	0.0038	0.0019	0.00095	0.00047	
サボニン	エールリッヒ癌細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腹水細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腸上皮細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常肝細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: ○全染 △部分的 ++濃染 ±微染 ⊙破壊残片 ⊗破壊片

表 8

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	1.25	0.625	0.308	0.154	0.077	0.038	0.019	0.0095	0.0047	0.0023	0.0011	0.00055	0.00027	
オスバン	エールリッヒ癌細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腹水細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腸上皮細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常肝細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: ○全染 △部分的 ++濃染 ⊙破壊残片 ⊗破壊片

表 9

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0308	0.0154	0.0077	0.0038	0.0019	0.00095	
リノール酸	エールリッヒ癌細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腹水細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腸上皮細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常肝細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: ○全染 △部分的 ++濃染 ±微染

表 10

		標準濃度倍数	2^{10}	2^9	2^8	2^7	2^6	2^5	2^4	2^3	2^2	2^1	2^0	2^{-1}	2^{-2}	対照
		添加濃度(%)	2.5	1.25	0.625	0.312	0.156	0.078	0.039	0.019	0.0095	0.0047	0.0023	0.0011	0.00055	
OX	エールリッヒ癌細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腹水細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常腸上皮細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	正常肝細胞	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注: ○全染 △部分的 ++濃染 ±微染 -不染 ±核微染 ⊗破壊片

表 11

	添加濃度(%)	0.8	0.6	0.5	0.45	0.4	0.3
		+	+	+	+	+	+
OX	エールリッヒ癌細胞	+	+	+	+	+	+
	正常腹水細胞	+	+	+	+	+	+
	正常腸上皮細胞	+	+	+	+	+	+
	正常肝細胞	+	+	+	+	+	+

注: ○全染 △部分的 +濃染 +軽染 ±微染

なるが、微染の状態を示し、 2^0 倍でもつとも均一によく染まる。 2^0 以下の濃度では部分染を示す。これに反し肝細胞は、 2^{10} 倍の高濃度でやはり膨化し不染色性を示すが、 $2^0 \sim 2^9$ では均一染、良染を示し、それ以下では部分染を示している。この実験で特徴的なことは、表11に示す通り、0.6~0.4%において、エールリッヒ腹水癌細胞、正常腹水細胞、正常肝細胞がいずれも均一染で良染を示すのに、正常腸上皮細胞のみは態度を異にし、部分染でしかも微染にとどまることである。今エールリッヒ癌細胞と正常腸上皮細胞の混在する細胞浮游液に0.4% OX を添加しエオジン超生染を行なえば、写真8のごとくエールリッヒ癌細胞は染色されるが腸上皮細胞は染まらず、細胞膜透過性に明らかな差異のあることが立証せられた。

小括: 以上のごとく、エオジン超生染は medium が pH 7.2 において通常はエールリッヒ腹水癌細胞や正常の腹水細胞を全部均一に染色することはあり得ない。しかし本実験において medium 中に細胞膜透過性亢進物質として界面活性物質を添加すると、一定の濃度以上ではエオジン超生染が完全に行なわれることが明らかにされた。とくに興味あることは、OX が添加された際、その適性濃度においては細胞は均一・良染の超生染像を示すが、かえってそれ以上の高濃度になると細胞は不染色になることである。このことは、細胞内オルガネラの蛋白荷電の状態と OX が変化を与えるために、極性染料が結合しなくなるものと理解せられる。なお、腸上皮細胞は OX に対し比較的抵抗が強いことがわかった。これに反し、OX 以外の界面活性物質すなわち Tween 80, サポニン, オスパン, リノール酸などは、高濃度になるにつれて膨化・破壊を示し、このような状態でも超生染像は均一染・良染を示しエオジンがよく細胞内オルガネラと結合することが示された。また、これら界面活性物質を添加した場合、癌細胞よりも腸上皮・肝細胞の方がより一層膜の透過性の亢進を起す結果が得られた。

第4章 総括ならびに考按

以上の結果に示されたように、界面活性物質を使つて細胞膜の透過性を亢進せしめると、元来、酸性色素である NTS 螢光色素やエオジンでも、pH 7.2 という高いところで超生染が完全が可能であることが判明した。

また、以上の実験結果から、界面活性物質で細胞が膨化し、リポド顆粒が胞体に増してきて変性機序が起り始めると、NTS 螢光色素による超生染がそれにつれて高度になることを認めた。このことは、従来行なわれていたエオジン超生染によるエオジン指数の概念と全く同じように、NTS 螢光色素でも細胞変性の有無を知ることができる筈である。

さて、実験成績にみるように、サポニン、オスパン、リノール酸などは高濃度になればなるほど NTS 螢光色素でよく濃染され螢光度を増すことを知った。これは細胞膜透過性の亢進とともに、細胞内に変性蛋白が増加し、NTS 螢光色素がこれとよく結合することを意味するものであろう。固定された細胞の場合は、塩基性蛋白の多い細胞が NTS 螢光色素によく染色されるということは、すでに第1編)で述べたとおりであるが、超生染の場合でも、界面活性物質のために細胞が変性におちいると変性蛋白が増え、これと NTS 螢光色素が結合することによりよりよく良染されたものということができよう。この NTS 螢光色素の超生染は、わたくしの観察したかぎりでは、各種界面活性物質を添加した場合に、それぞれに特徴的な染色現象が起るというものではなく、また細胞相互間においても超生染に特徴的な差は認められなかつた。要するに、細胞そのままの超生染にしろ、固定した場合の染色にしろ、NTS 螢光色素は癌細胞を特異的に染色する⁵⁴⁾ということはある。しかし、不飽和脂肪酸の OX 鹼化液の場合のみは、その濃度が2.5%を超えると、かえって NTS 螢光色素に不染の状態をきたすが、このことは OX の大きな特徴であつて、この高濃度の不飽和脂肪酸が細胞内のオルガネラと反応を起し、何か特殊な荷電状態を作りだして、NTS 螢光色素と結合しないようになったものではないかと考えざるを得ないが、この点に関しては、さらに OX の本態の究明と相まつて研究が進められなければならぬ。また、Tween 80 ではやはり濃度の上昇とともに NTS 螢光色素の染色性は高まるけれども、癌

細胞の染色性にむらがあり（不均一性）、かなり高い濃度でも NTS 螢光色素に不染性の癌細胞が残ることがあるのを観察したが、Tween 80 のこの特徴についてはなお解明すべき多くの問題を含んでいる。

次にエオジンによる超生染についてみると、やはり NTS 螢光色素の場合と同様に、サポニン、オスバンでは高濃度になるにしたがつて濃染されることを知った。これらは膨化・変性がつよく、細胞崩壊が起つてもその細胞碎片にもエオジンの親和性がつよいことは前述の通りである。ところが、OX のみは NTS 螢光色素の場合と同様に、高濃度になると細胞が超生染されなくなる。もちろん、この場合は細胞碎片も染色されないが、ある適性濃度においてのみ全細胞が均一によく超生染されることを知った。このこととはおそらく不飽和脂肪酸である OX と細胞内の蛋白とが結合して蛋白の荷電の変動をきたし、エオジン色素に対する親和性が低下するためと思われ、螢光色素の場合と同様の説明が与えられるべきであろう。細胞の膨化・破壊の像からすれば、この現象は透過性の低下によるものとは到底考えられない。この場合、OX は他の界面活性物質と違って特徴的なことは、癌細胞の均一・良染を示す 0.6 ~ 0.4% 濃度では、正常腸上皮細胞は癌細胞と異なりエオジンにはあまり染色されないことを知った（写真 8）。このことは、OX による人体消化器癌の局所療法に際して、腸上皮の刺戟損傷が少なく OX が癌巣のみに選択的に親和性をもっているという陣内ら⁴⁹⁾の臨床使用経験を裏付けるものであろう。また、不飽和脂肪酸であるリノール酸においても、あまり高濃度になると、エオジン超生染で癌細胞が良染されなくなるのは、OX の場合と同様に不飽和脂肪酸が細胞質の蛋白と結合し細胞質蛋白荷電の状態に変化をきたし、エオジン色素がこれと結合しなくなつたためであろう。実際、内海^{55,56)}は不飽和脂肪酸と血清アルブミンが *in vitro* でよく結合することを実験的に証明している。Tween 80 においては、エオジン超生染も NTS 螢光色素の場合と同様に細胞の均一染度が少ないが、このことはやはり界面活性物質としての Tween 80 の特徴であろう。

以上のように界面活性物質の存在のもとでは、細胞は膨化から崩壊に移行するが、その間、濃度の亢進とともに細胞膜の透過性の亢進がおこっていることが明らかになつた。

OX やリノール酸のような不飽和脂肪酸で、細胞

膜のリピドの多いエールリッヒ腹水癌細胞が、細胞膜のリピドの少ないマウス腸上皮細胞より膜透過性がより亢進せしめられてエオジンや NTS 螢光色素でより染まりやすくなるという結果は、界面活性物質の細胞膜リピドに対する脂溶性作用の差としても説明されるであろう。

ちなみに、細胞膜の化学構造の差は、当然細胞表面の荷電の相違となつて現われるわけであつて、悪性腫瘍細胞ほど負電荷が多いという Purdon⁵⁷⁾の実験からすると、癌細胞の悪性度と細胞膜表面の化学構造とはある程度の相関性ももてて興味深いものがある。

わたくしの実験ではエールリッヒ癌に限られたので、細胞の悪性度と膜表面活性との間に関しては、とくに注目すべき所見は把握していない。

しかしとにかく、界面活性物質や脂溶性溶媒 (Lucke⁴⁶⁾) を作用させることにより細胞膜の透過性が亢進することは事実である。癌細胞のみの膜透過性を選択的に高めるということは困難なことであるが、OX やリノール酸を始めとする界面活性物質の脂溶性作用が、上述のごときエールリッヒ腹水癌細胞と正常マウスの腸上皮細胞との間に、細胞膜のリピド含有量の差異と関連して、膜透過性の差を人為的に作りえたことは、はなはだ興味深いことといわねばならない。

Bennet⁴⁷⁾によるとオレイン酸のような高級脂肪酸の界面活性物質によつても、腫瘍細胞はかなり著しく膜がこわされ、細胞質の流出を起すことが明らかである。Ludford⁵⁸⁾は、腫瘍細胞膜は、脂溶性色素に対する透過性が正常細胞より大きいことを示しているが、これは腫瘍細胞膜の方にリピドが多いからだといつている。このような膜の化学構造の相異は、腫瘍細胞と正常細胞のミトコンドリア膜の間にも相対的なが認められるという^{58,48)}。

このように細胞形質を化学的構成が、たとえ量の多寡であるにせよ腫瘍細胞と正常細胞との間で異なり、ことにそれがリピドの含有量の差となつてくると、界面活性物質のそれに働く意義は非常に重大となつてくるわけである。

このことは、癌細胞の治療にも応用せられうることであつて、第 4 編においては、界面活性物質の膜透過性亢進作用を応用して、正常細胞よりも癌細胞の方により多くの制癌剤を導き入れようとする試みについて述べようと思う。

第5章 結 論

第1・2編において、わたくしは NTS 螢光色素の固定細胞に対する染色機構を基礎的実験により証明したが、本編においてはその超生体染色の際の染色態度の解明を試みた。併せて、超生体染色時に種々の界面活性物質を添加することにより、被染細胞の細胞膜透過性の亢進によつて惹起せられる染色性の動態を観察し、次のような結果をえた。

1. NTS 螢光色素は酸性色素であり、エオジンと同じように超生体染色の色素として充分鮮明な像がえられ、変性蛋白との親和性はエオジンと同様細胞変性の観察には有力な色素である。

2. NTS 螢光色素、エオジンのごとき酸性色素で超生染を行なうに際し、Medium pH を 7.2 に引きあげても、Tween 80, サポニン, オスパン, リノール酸, OX (抗腫瘍性不飽和脂肪酸) などの界面活性物質を添加すると、色素は細胞膜をよく透過し全細胞残らず陽性に染色されるようになることを明らかにした。

3. 上記の界面活性物質は、一般に添加濃度を高めるに従つて色素の細胞膜透過性は亢進するが、リ

ノール酸, OX などの不飽和脂肪酸の場合は、ある濃度域においてはそれらが細胞内オルガネラと結合しその蛋白電荷に変更を与えるためか、かえつて色素が細胞を染めださないという特殊な場合を発見した。

4. エールリッヒ腹水癌細胞、健康マウス腹水細胞、腸上皮細胞、肝細胞などを超生染の材料としたが、界面活性物質の種類によつて多少ともそれら細胞膜の透過性亢進作用に差があり、殊にオスパンにもつとも透過性亢進作用が強く、Tween 80 の場合にはかなり弱い結果が得られた。OX の場合は、正常腸上皮細胞よりもエールリッヒ癌細胞につよい膜透過亢進作用を与え、かかる界面活性物質は使用の方法によつては、腫瘍細胞にある程度荷電物質を選択的に導入せしめ得る根拠を作つた。

(尚本論文要旨は第20回癌学会総会において発表した。)

稿を終るに臨み、御指導・御校閲を賜つた陣内傳之助前教授ならびに田中早苗現教授に深謝するとともに、直接いろいろ御援助頂いた教室の小林淳一講師に感謝する。

文 献

- 1) 森下和郎：岡山医学雑誌，75，523，1963.
- 2) 森下和郎：岡山医学会雑誌，75，533，1963.
- 3) 清野謙次：生体染色の研究，2，南江堂，東京，昭和3.
- 4) Kiyono, K., Sugiyama, S. & Amano, S.: Die Lehre von der vitalfärbung (kyoto) 1938.
- 5) 天野重安：血液学の基礎，上巻，丸善，昭和24.
- 6) 杉山繁輝：血液及組織の新研究と其方法，南江堂，東京，昭和27.
- 7) Jacobs, M. H.: Cowdry's General Cytology, 3, Chicago, 1924.
- 8) Overton, E.: Jahrb. Wiss. Bot., 34, 669, 1900.
- 9) Ruhland, W.: Ebenda, 46, 1, 1908.
- 10) Ruhland, W.: Ebenda, 51, 376, 1912.
- 11) Ruhland, W.: Bor. Deutsch. Bot. Ges., 30, 139, 1912.
- 12) Ruhland, W.: Biochem. Z., 54, 59, 1913.
- 13) Ruhland, W.: Jahrb. Wiss. Bot., 54, 391, 1914.
- 14) Höber, R.: physik. Chem. d. Zelle. u. d. Gewebe, Leipzig, 1922.
- 15) Irwin, M.: J. Gen. Physiol., 8, 147, 1925.
- 16) Watanabe, Y.: J. electron microscope, 5, (annual ed.), 46, 1957.
- 17) 天野重安，ほか：日血会誌，19，3，1956.
- 18) 花岡正男：胞胞化学シンポジウム，5，71，1957.
- 19) 妹尾左知丸，吉沢浩洋：岡山医学会雑誌，
- 20) Dalton, A. J. & Kahlen, K.: J. Natl. Cancer. Inst., 11, 439, 1950.
- 21) Hanzon, V. et al.: Exp. Cell. Res., 7, 415, 1954.
- 22) Palade, G. E.: Ibid. 1, 567, 1955.
- 23) Palade, G. E.: J. biophys. and biochem. Cytol. 1, 59, 1955.
- 24) Karrer, H. E.: ibid. 2, 241, 1956.
- 25) Luse, S. A.: ibid. 2, 531, 1956.
- 26) Ruska, H. et al.: ibid. 3, 249, 1957.
- 27) Epstein, M. A.: ibid. 3, 851, 1957.
- 28) Maximow, A. A. & Bloom, W.: a textbook of Histology, 7th ed. 1957. Saunders, philadelphia. 1957.

- 29) Dalton, A. J. and Felix, M. D.: Symposium of the Society for experimental biology. No. X. P. 148—159. The University Press. Cambridge. 1957.
- 30) 神田三郎: 岡山医学会雑誌, 68, 733, 1956.
- 31) 中本孝: 岡山医学会雑誌, 71, 761, 1959.
- 32) 天野勲: 岡山医学会雑誌, 71, 761, 1959.
- 33) 林弘: 岡山医学会雑誌, 71, 765, 1959.
- 34) 妹尾左知丸, 大口基光: 日血会誌, 13, 183, 1956.
- 35) 大口基光: 岡山医学会雑誌, 68, 732, 1956.
- 36) Zamechnik, P. C.: Am. Rev Biochem. 21, 411, 1952.
- 37) Brachet, T.: 胞胞化学シンポジウム, 7, 181, 1958.
- 38) Ledoux, L.: Nature, 176, 36, 1956.
- 39) Ambrose, E. J.: James, A. M. and Lomich, T. H. S.: Nature, 177, 576, 1956.
- 40) Eastz, D. M., Ledoux, L. and Ambrose, E. J.: Biochem. et Biophys. Acta. 20, 528, 1956.
- 41) Bernard, C.: Lecous sur les anesthesigues et sur lasphyxie., Paris, 1875.
- 42) Trim, A. R. & Alexander, A. E.: Symp. Soc. Exp. Biol., 3, 1949.
- 43) Meyer, H.: Arch. Exp. Path. Pharmak., 42, 109, 1899.
- 44) Traude, J.: pflügers Arch. Ges. Physiol., 105, 541, 1904.
- 45) Bancroft, W. D & Richter, G. H.: F. Phys. chem., 35, 215, 1931.
- 46) B. Lucche, A. K. Parpart: Cancer Research, 14, 75, 1954.
- 47) L. R. Bennett, F. F. Cannon: J. Nat. Caucer Inst., 19, 999, 1957.
- 48) V. Mutols, F. Abrigorani: Brit. J. Cancer., 12 (2), 285, 1958.
- 49) D. Jinnai, et al.: Bulletin of the Cancer Inst., No. 1. Aug, 30, 1961.
- 50) 山本道夫: 細胞化学シンポジウム, 9, 141, 1959.
- 51) M. Yamamoto, et al.: Acta Med. Okayama, 14, 45, 1960.
- 52) M. Yamamoto, et al.: Acta Med. Okayama, 14, 68, 1960.
- 53) M. Yamamoto, et al.: Acta Med. Okayama, 14, 55, 1960.
- 54) 堂野前維摩郷, ほか: 阪大医学雑誌, 12(10・11), 1959.
- 55) 内海耕健, ほか: acta med. Okayama Vol. 16. No. 6. 317~338, 1962.
- 56) 浦上博之: 岡山医学会雑誌, 74, (10, 11, 12,) 903~913, 1963.
- 57) L. Purdon, E. J. Ambrose, G. Klein: Nature, 181, 1586, 1958,
- 58) C. Cooper, D. F. Tapley: Biochem. Biophys. Acta., 25, 426, 1957.
- 59) R. J. Ludford: Cytology Cell Physiology. (ed G. H. Bourn). N. Y. (1951)

Studies on Fluorescence Staining of Cancer Cells and Cancer Chemotherapy with Concurrent Use of Surfactants

3. Accelerative Effect of Various Surfactants on the Permeability of Cancer Cell Membrane

By

Kazuo MORISHITA

Department of Surgery Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dennosuke Jinnai, Sanae Tanaka.)

Author's Abstract

In previous reports 1 and 2, the author experimentally verified the fundamental staining mechanism of fluorescent NTS dye by its deposits in various cells. In the present experiment

an attempt has been made to see whether it is possible to perform supra-vital staining with this fluorescent NTS dye. At the same time observations have been carried out on the staining behaviors (or changes) induced by the accelerated permeability of cell membrane in the course of supra-vital staining with concurrent use of various surfactants (surface active substances), and the results are summarized as follows.

1. It has been found that fluorescent NTS dye, being an acidic dye, has affinity to denatured protein, revealing a staining mechanism similar to eosin, and it stains degenerated cells deeply.

2. It has also been elucidated that in the course of supra vital staining with acidic dyes such as fluorescent NTS dye and eosin, even when the medium pH is raised to 7.2, on the addition of such surfactants as Tween 80, saponin, osvan, linoleic acid, OX (an anti-tumor agent of unsaturated fatty acids from X-ray-irradiated rabbit liver) the dye readily permeates the cell membrane and thus the entire cell is uniformly stained positively.

3. These surfactants accelerate the permeability of the dye through the cell membrane as their concentration is raised, but in the case with saponified solution of fatty acids such as linoleic acid and OX at a certain range of concentration they bind chemically with intracellular organellae, bringing about changes in protein electrical charge of the organellae and as the result the cell becomes no longer stainable. Therefore, this point needs to be taken into consideration when the supra-vital staining of cells is attempted with concurrent use of surfactants of fatty acid series.

4. With fluorescent NTS dye and eosin supra-vital staining has been tried on Ehrlich ascites tumor cells, liver cells, epithelial cells of intestine, and ascites cells. It has been demonstrated that there is at least some difference in the accelerative effect of surfactants on the permeability of cell membrane depending on the kind of the substances. The accelerating effect of osvan, which is cationic surfactant, is especially marked. In the case of Tween 80 (a non-ionic surfactant) its effect is weak. In the case of OX, it imparts a greater permeability to Ehrlich ascites tumor cells rather than to epithelial cells of intestine.

From these results, it seems that to a certain extent the basis has been established for introducing selectively some of charged substances into tumor cells depending upon the use of these surfactants.

森 下 論 文 附 図

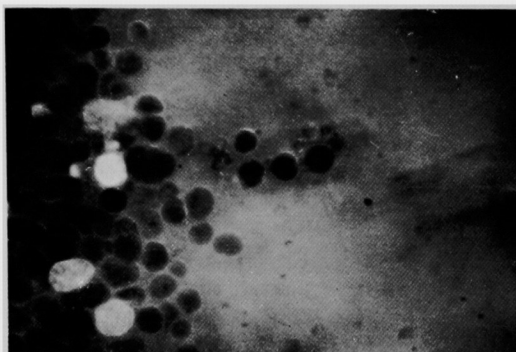


写真1 NTS 螢光色素によるエールリッヒ癌細胞染色。(対照:界面活性物質を添加せず)

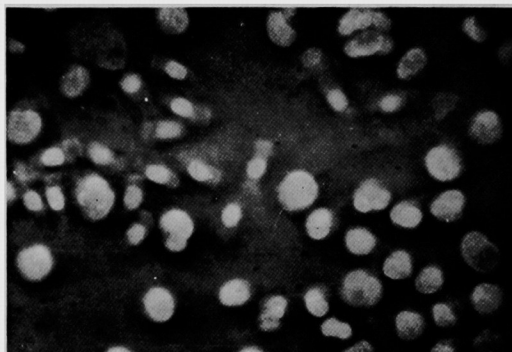


写真2 0.125% サポニン添加のエールリッヒ癌細胞とマウス正常腸上皮細胞(円柱状細胞)の全染像(NTS 螢光染色)

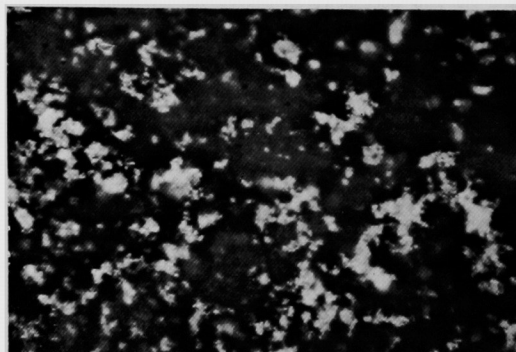


写真3 10% オスバン添加により膨化破壊されたエールリッヒ癌細胞(破壊残片もよく染色される)(NTS 螢光染色)

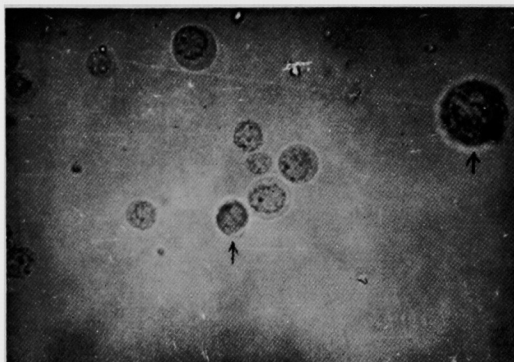


写真4 0.125% Tween 80 添加のエールリッヒ癌細胞部分染色像 ↑印はエオジン超生染, 陽性を示す。

森 下 論 文 附 図

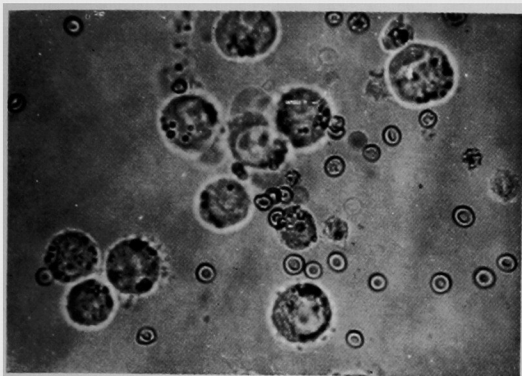


写真5 0.125% サポニン添加のエールリッヒ癌細胞全染像、(エオジン超生染)

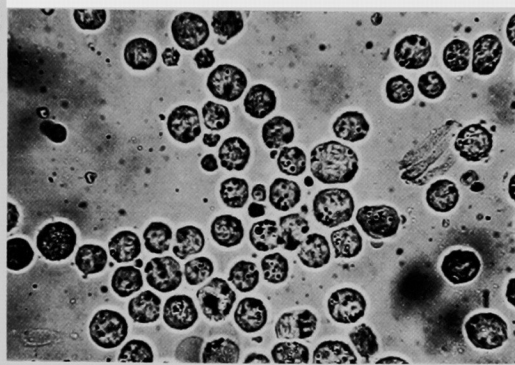


写真6 0.4% OX 添加のエールリッヒ癌細胞全染像 (エオジン超生染)

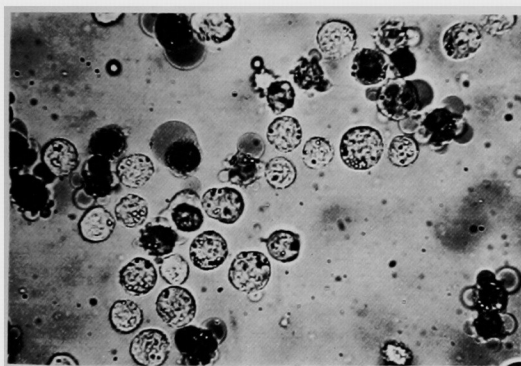


写真7 0.25% OX 添加のエールリッヒ癌細胞部分染色像 (Blistula formation もよく染色されている) (エオジン超生染)

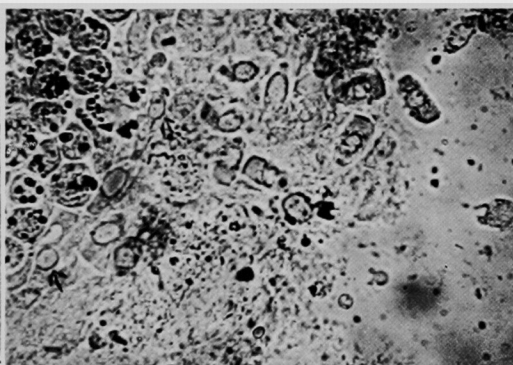


写真8 0.4% OX 添加のエールリッヒ癌細胞とマウス正常腸上皮細胞との混合のもとで、エールリッヒ癌細胞は全染なるも、マウス腸上皮細胞は不染像を示す。(エオジン超生染)
↑印は腸上皮細胞不染を示す。