Jindo KOBAYASHI: Some cytological and cytochemical studies on effects of 'mitomycin-X' on the spindle-cell sarcoma *in vitro* (A preliminary report).

培養した腫瘍細胞に及ぼす マイトマイシンの影響 (予報)

小 林 仁 道

北海道大学理学部動物学教室

昭和 34 年 8 月 30 日 受領

Résumé

The present study deals with the cytological and cytochemical effects of an antibiotics, "mitomycin X" upon the methylcholanthrene-induced spindle-cell sarcoma grown *in vitro*. The spindle-cell sarcoma was cultured according to the roller tube method. The application of the drug was made at dosages of 50 γ /cc and 25 γ /cc, with 1 hour-exposure in each dose. The cultures were sampled at appropriate intervals, fixed in methanol and stained with the May-Grünwald and Giemsa method (MGG-stain) for the specific reaction to DNA and RNA. For cytochemical tests of DNA and the nucleolar substance, cultures were fixed in Carnoy's solution and treated with Feulgen nuclear reaction in combination with light green (Feulgen-stain).

It was found that "mitomycin X" exerted specific actions to both nuclei and nucleoli of resting cells. The morphological changes of resting cells after the treatment were observed as follows: (1) fragmentation of the nucleus, (2) irregular condensation or coagulation of chromatin material, (3) extrusion of the nucleolar material into the cytoplasm, (4) the formation of vacuoles in the cytoplasm, *etc.* The number of nuclear fragments increased with time after the treatment. The nuclear chromatin material of untreated cells was stained homogenously showing a fine network of chromonemata with MGG-stain or Feulgen-stain, while in the treated cells the chromatin network was lost in the nucleus forming irregular aggregations into several masses. In such a nucleus, the nucleolus was stained lighter than the untreated nucleolus. One of the specific actions of "mitomycin X" was shown by the extrusion of the nucleolar material into the cytoplasm. Abnormal mitotic figures which are characterized by the fragmentation of chromosomes and bridge-formation were remarkable in treated cells.

It is thus evident that "mitomycin X" affects with a destructive action on both nuclei and nucleoli showing a remarkable damage to the nucleolar material.

Zoological Institute, Hokkaido University

癌の化学療法の基礎として、癌細胞に対する各種化学薬品の作用機構を細胞形態学と細胞化学の立場から平行的に研究することは重要な意味がある。牧野およびその共同研究者による数種の化学薬品の腫瘍細胞におよぼす細胞学的研究は細胞破壊機構を形態学的に *in vivo*, *in vitro* の材料において追求してきた (Makino & Cornman 1953, Makino & Tanaka 1953 a, b, Makino & Nakanishi 1955, Tanaka et al. 1955, Sasaki 1956, Kano 1957, Tanaka 1957, Hori & Sasaki 1958, Awa 1958)。

重要な問題は薬物の作用が細胞にいかなる化学的变化を与えて破壊に導くかであって、これを形態的变化の過程と平行的に追求する点が未だ不十分である。著者は組織培養したシロネズミの腫瘍細胞 (紡錘形細胞肉腫) を材料として、制癌剤としての抗生物質 "マイトマイシン X" の影響、特に静止核の核酸の消長について細胞化学的に研究した。

本文に入るに先だって終始御指導を賜わった牧野佐二郎教授に深謝する。数々の御助言をいただいた田中達也氏、直接培養の御指導をいただいた堀 浩氏、佐々木本道氏に深く感謝する。マイトマイシンの供給された協和醗酵工業株式会社、佐藤尚武氏に厚くお礼申し上げる。

材料および方法： 実験は Methylcholanthrene 皮下注射によってシロネズミの皮下に生じた紡錘形細胞肉腫 (Sato 1956, Sato & Sasaki 1957) を約 1 年間約 40 代、系統培養したものについて行なった。培養は回転培養法によった。培養開始後 6 日目に、マイトマイシン-X (Mitomycin-X) 1 γ /cc, 5 γ /cc, 25 γ /cc, 50 γ /cc を液体培地に溶解して投与した。作用時間は 1 時間。処理後、培養組織片を Tyrode 液でよく洗い、新培地に移して観察に供した。標本は薬品処理後 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 時間の各時期に固定染色して作成した。

観察は 1) メタノールにより 10 分間固定した後、May Grünwald and Giemsa (Jacobson & Webb 1952) の方法をもって染色し、核酸の消長および、細胞の形態の変化を調べた (以下 MGG 染色と記す)。2) Carnoy 液 (95% アルコール 6 : クロロホルム 3 : 酢酸 1) で 10 分間固定した後、N·HCl にて 8 分間加水分解をして Feulgen 染色をほどこした。light green にて重複染色して細胞質、仁の検討に供した。

観 察 結 果

投 与 量： 薬品の投与量決定のため、マイトマイシンを液体培地に 1 γ /cc, 5 γ /cc, 25 γ /cc, 50 γ /cc の濃度で投与した。その結果 1 γ /cc, 5 γ /cc には紡錘形細胞肉腫におよぼす変化は認められなかった。25 γ /cc 投与の場合は 3 時間後から、50 γ /cc 投与の場合は 1 時間後から、変化が認められた。この両者について詳述する。

未処理細胞の性状： 処理しない紡錘形細胞肉腫の細胞の核は MGG 染色にて赤色に、仁および細胞質は青色に染る。これは、MGG 染色が核の DNA、仁および細胞質の RNA に特異的に反応を示すためと考えられる (Jacobson & Webb 1952, Hori & Sasaki 1958)。分裂期の染色体は黒紫色に染る。分裂期細胞の細胞質は静止期の細胞質より濃い青色に染り、形は円形か球形である。

Feulgen 染色は未処理の紡錘形細胞肉腫の静止核および 分裂期細胞の染色体を 赤紫色に染める。これは DNA の存在を示すもので、特にチモ核酸の反応によると解釈される (Cowdry 1928)。重複染色に用いた light green は細胞質および仁を green に染める (Fig. 1)。

マイトマイシンによる影響の概略： 薬品投与後 25 γ /cc の場合は 3 時間後から、50 γ /cc 投与の場合は 1 時間後から、影響を受けた細胞が現われた。影響を受けた細胞の形態は、上記の両投与量とも同様であった。薬品投与後 1~3 時間の静止期細胞への影響として著しいものは、静止核では分葉状の核の形成と (Tomomura 1956, Hisada 1957) その染色性の消失、染色質の変化、仁の変化等があげられる。また細胞質には空胞をもつ細胞が多数現われた。空胞は 1 個で大型のものが多し。分裂細胞はまれにみられたが、外観的に異常は認められなかった。

薬品投与後 6~12 時間の静止期細胞においては、核が細分し核片 (fragments) となった細胞が多数現われた。仁の異常、染色性の変化も認められた。細胞質に空胞をもった細胞がまれに現われた。分裂細胞は激減し、まれにみられる分裂像の染色体は片々に切断をうけている (Fig. 12)。この時期においては細胞全体が粒々になり四散したものが多数現われる。処理後 24 時間、48 時間になると、静止核が片々に切断され、仁の染色性の消失、染色質 (chromatin) の形態的異常 (Fig. 6, 7)、核質の流出などがみられる。細胞質の染色性は著しく減少して、細胞質の化学的構成の変化を示している。崩壊細胞は処理後 6~12 時間の時期より多数みられた。48 時間後には、それまでにみられなかった球状の細胞がまれに現われる (Fig. 13)。この時期においてはまったく分裂像は認められなかった。処理後 72 時間になると、大部分の細胞が破壊されており、成長帯に点々と生き残った細胞が散在しているにすぎない。生き残つ

Figs. 1, 2, 5 show the result of Feulgen nuclear reaction and Figs. 3, 4, and 6 to 15 show the result of May-Grünwald and Giemsa staining, applied to methylcholanthrene-induced spindle-cell sarcoma following "mitomycin-X" treatment.

Fig. 1. the spindle-cell sarcoma, before treatment (control), ($\times 100$).

た紡錘形細胞には核の fragmentation, 仁の消失, 細胞質の染色性の消失等の異常を起こしている細胞が多く現われた。この時期では 48 時間後にまれにみられた球状の細胞が多数現われていた (Fig. 13)。分裂細胞は全くみられなかった。

次に静止期細胞, 分裂細胞, 巨大細胞等の各項に分け, マイトマイシンの影響を詳細に述べる。

静止期細胞への影響： 著しい影響としては処理後の時間の早い時期においても (1~3 時間後), 非常におそい時期 (72 時間後) においても, 核に与える変化の著しいことである。分葉状の核の出現は処理後早い時間の細胞に普通にみられる (Fig. 3)。分葉核の染色性は, 未処理細胞の核のそれよりも著しく減じている。これは MGG 染色によっても Feulgen 染色によっても, 同じ結果が得られている。分葉核の染色性が減じたのは, 核内の DNA 構成が変化を受けた結果と考えられる。処理後 6~12 時間の細胞において, 核の形態変化が著しく観察された。この時期にもっとも薬品の効果が著しいもののように思われる。核は細片に分かれた, 多数の片々たる小核をもった細胞が多数現われた (Fig. 4)。この現象を核の fragmentation と前述した。核の fragments の数は 12, 24, 48 時間のごとく処理後の時間経過にしたがい次第に増加する傾向がみられる。Fragment 核の染色度は, MGG 染色にても, Feulgen 染色にても非常に減少している。このことから核内における DNA の著しい変化が暗示される。変化をうけた核が必ずその染色性を減ずるのは DNA および他の蛋白の核内の構成が変化を受けた結果起こる現象と考えられる。

仁への影響は比較的早い時期から観察される。Lettré (1954) は methoxytolquinone 処理の実験において, 仁が核外に流出した細胞が出現することを報告している。マイトマイシンによっても少数の細胞に, 仁が核外に流出したものがみられた (Figs. 8~9)。この事実から細胞によっては仁に直接薬品の影響が現われることが想像される。染色の程度からみると, 処理後の細胞のいずれにおいても仁の染色性が減少していた。MGG 染色において, 仁の青色の度合が減じたのは RNA の構成に変化を受けたことを暗示する。

染色質への影響は, 処理後約 24 時間から顕著にみられた。未処理の核は MGG 染色でも

Fig. 2, irregular distribution of chromatin in the nucleus, 24 hours after treatment of 'mitomycin-X' (25 γ /cc, 1 hour-exposure), ($\times 100$)'

Fig. 3, spindle-cell sarcoma with lobated nuclei, 3 hours after mitomycin-treatment, ($\times 800$).

Fig. 4, fragmentation of the nucleus, 48 hours after mitomycin-treatment. ($\times 800$).

Fig. 5, extrusion of the nucleolar material into the cytoplasm, 24 hours after mitomycin-treatment ($\times 800$).

Figs. 6 and 7, irregular distribution of chromatin material in the nucleus, 12 (Fig. 6) and 48 hours (Fig. 7) after mitomycin-treatment, ($\times 800$). Note two types of irregular distribution of chromatin.

Figs. 8 and 9, extrusion of the nucleolar substances into the cytoplasm 12 (Fig. 8) and 24 hours (Fig. 9) after the mitomycin-treatment. A mass stained blue in the cytoplasm seems to be of nucleolar origin (Fig. 9), ($\times 800$).

Figs. 10-11, vacuole-formation in the cytoplasm, 6 hours after the mitomycin-treatment. The vacuoles show a mass staining blue (Fig. 10), ($\times 800$).

Fig. 12, fragmentation of chromosomes at metaphase, 48 hours after mitomycin-treatment, ($\times 800$).

Fig. 13, unaffected cells, round in outline; they seem to be residual cells. 72 hours after mitomycin-treatment, ($\times 400$).

Fig. 14, fragmentation of the nucleus in a giant cell, 48 hours after the mitomycin-treatment. The nucleoli are stained distinctly, ($\times 400$)'

Fig. 15, untreated control cells, ($\times 400$).

Feulgen 染色でも細いクロマチン糸(染色糸)からなる網目状構造を示している。処理をうけた細胞核の染色糸は個々の束状あるいは塊状となり、一見して分裂前期の核に似た形態をもつ細胞がしばしばみられた (Fig. 6)。処理後 48 時間から 72 時間になると、染色糸が核内に点々と小塊状に集った細胞が少なからずみられた (Fig. 7)。このような変化をした染色質は MGG 染色により赤紫色に染まり、赤色に染まる正常の染色質とは著しく性状の変化を示している。染色質が変化をうけた核においては、仁が消失するか、仁の染色性が極度に減少していた。染色質を構成する染色糸が個々に集合し塊状となる現象が仁の染色性の極度の減少あるいは消失の現象と一致して現われることは意味が深く、注目すべき現象である。処理後 24 時間から染色質が核外に流出した細胞がしばしばみられた (Fig. 5)。固定材料でみると、核内から染色質が流出するのは核膜の一部破損のためのもので、破損した所から内容物が流出するもののように思われる。

静止期細胞の細胞質への影響として著しいものは、空胞の形成、染色性の消失等である。処理後時間の早い細胞においては、大形の空胞が 1~2 個出現するのが普通にみられる (Figs. 10, 11)。比較的時間がたつと多数の小さい空胞が細胞質に現われる。それらの空胞は MGG 染色には染まらないが、light green により軽度に染色される。細胞質の染色性は処理後時間の早い細胞は正常細胞と変らない。処理後 24 時間から、多数の細胞において細胞質が染色性を失っているのが観察された。MGG 染色によって細胞質は非常にうすい青色に染る。この点、正常細胞とは非常な差異を示す。

上にのべた静止期細胞へのマイトマイシンの影響を要約すると、主として核および仁に顕著な変化をもたらすことが明らかになった。核においては特に染色質 (chromatin) がまず影響をうけてその性状が異常となる。すなわち、染色質の DNA およびその他の蛋白の構成が著しく変化をうける。仁の消失やその核外流出の現象は、核の調和を崩すために細胞の崩壊の前兆と考えられる。このような変化をうけた静止期の細胞が分裂を起こすとさまざまな異常分裂をひき起こすものと考えられる。

分裂期の細胞に及ぼす影響： 処理後時間の早いものでは分裂細胞の異常は認められない。しかし分裂細胞の数は非常に減少していることから、明らかに細胞分裂が抑制されていることがわかる。処理後 12 時間、24 時間においてまれにみられる中期分裂像において染色体が著しい切断をうけているものが観察された (Fig. 12)。未処理の分裂細胞においては MGG 染色により濃い青色に染る。処理後の分裂期細胞の細胞質は染色性が減ずるのが普通である。染色体の切断、染色体橋の形成、多極分裂などの異常分裂がみられるが、それらの原因はおそらく静止期に影響を受けた結果として生じたものと解釈される。

巨大細胞への影響： 紡錘形細胞肉腫には巨大細胞がしばしばみられる (Fig. 2)。巨大細胞は正常細胞に比し 3~4 倍の大きさをもっている。MGG 染色および Feulgen 染色によると、核および細胞質の染色性は普通の細胞と変らない。巨大細胞には分裂像はまったくみられず、全部静止期の状態である。マイトマイシン処理後、巨大細胞は核が片々に切断され (Fig. 14)、仁が消失し、細胞質の染色性が減少するなど、普通の細胞とはほぼ同様の変化を示している。このように、マイトマイシンは巨大細胞の核および仁にも作用し、その形態、染色性に著しい変化をもたらす。

考 察

マイトマイシン X は Wakaki et al. (1957) が *Streptomyces caespitosus* より分離した抗生物質である。

その制癌効果に関しては Ehrlich carcinoma, Sarcoma 180, Walker's carcinoma 等を用いた実験が報告されている (Sugiura 1959)。ここに述べた実験は培養した腫瘍細胞を用いて細胞学、細胞化学的にマイトマイシンの作用をしらべたものである。

マイトマイシンの紡錘形細胞肉腫の培養細胞に及ぼす影響は、投与量の大小により効果の現われる時期が同じでない。すなわち、25 γ /cc よりも 50 γ /cc 投与の場合の方が影響を受けた細胞の現われるのが早い。影響を受けた細胞の形態はどの投与量によってもほぼ同様である。特にこの薬品の著しい特性は静止期細胞の核および仁に作用を及ぼすことである。形態的にみると、分葉核の形成、その切断、核内における染色質 (chromatin) の凝集、仁の消失とその核外流出などがあげられる。細胞質には大小多数の空胞 (vacuole) が出現する。次に著しい変化について考察する。

分葉核形成と核の切断： 処理後時間の早い (1~12 時間) ものにおいては分葉核をもつ細胞が多数現われる。Hisada (1957) はボドフィロトキシンの処理により分葉核をもつ細胞が増加することを報告している。分葉核は MGG 染色に対しては、正常細胞の核より軽度の染色性を示した。分葉核の染色性が減じたのは、核内の DNA 構成が変化した結果と考えられる。処理後時間が経過するほど、変形を受けた核をもつ細胞は数的に増加する。分葉核の仁および細胞質には著しい変化は認められないが、染色性ははなはだしく減じている。分葉核細胞は処理後 1~6 時間までは多数みられるが、それ以後は少なくなり、それに代って核の切断を起こした細胞が多数現われるようになる。その結果からおそらく核の切断は分葉核の変化にもとづくもののように考えられる。核片の染色性は非常に減じ、核染色質が顕著に変化をうけていることを示している。MGG 染色および Feulgen 染色実験の結果より、核片の DNA の構成が正常核と比較して著しく変化をうけていることがわかった。DNA が単に量のみの変化でなく、質的な変化もしていると思われる。核片のあるものには細分した仁が小片となつてはいっているのが認められた。これらの結果から、静止核は薬品の作用によって分葉核を形成、さらにその切断を起こし karyolysis を起こす段階によって崩壊過程をたどるもののように考えられる。

染色質と仁の変化： 未処理の細胞においては核染色質は均一に染色される。Hori & Sasaki (1958) はカルチノフィリン投与によって核染色質の異常な分布の起こることを報告している。マイトマイシン処理によって、染色質を構成する網目状構造にはさまざまな形態変化がみとめられた。処理後時間の早いものにおいては、網目状構造を形成する細い染色糸が凝集をして個々の太い束となつて核内に現われる。Hori & Sasaki (1958) はカルチノフィリン実験において仁付随染色質が消失した核があらわれることを報告している。マイトマイシン処理では、早い時期に仁付随染色質が異常に増大した核がまれにみられた。処理後時間の経過したものでは、染色質は核内に小塊状となつて点在する。このように核染色質が異常分布を起こした細胞における仁は染色性が減少し、形態的にも変化を現わしている。異常分布をした核染色質は MGG 染色により赤紫色に染り、その核の仁はうすい青色か、あるいは全く染まらない。この現象は核染色質と仁の生理的な連関を示すもので、細胞学的に意味のある現象と思われる。

仁の核外流出： 薬品投与後時間の早いものにおいても仁が核外に流出していることを示す細胞がしばしばみられた。仁の核外流出の現象は、Hughes (1952) が adenosine 処理の実験により、Lettré (1954) が methoxytloquinone の実験により報告している。マイトマイシン処理によってみられた仁の核外流出の型には (1) 核外に仁の一部を突き出したものと、(2) 仁が全体として細胞質内にとび出したものとある。マイトマイシンが仁に直接作用することは既に述べたとおりである。仁が核外に流出するのは、核膜や核染色質などの異常が仁の形態的变化と同時に起こされた場合に現われたものではないかと考えられる。この薬品の仁にお

よぼす作用機構についてはさらに研究する必要がある。

静止核に変化を受けた細胞はほとんど崩壊をうける運命にあると考えられる。しかしそれらが分裂にまで進んだ場合にはさまざまな異常分裂を現わすであろうことは想像に難くない。事実そのような異常分裂像が観察されている。

上にのべたようにマイトマイシンは静止期にある細胞の核および仁に第一義的に作用し、その構造を異常に変化させてそれを崩壊に導く。特にまず仁に作用して変性を起こすことは、腫瘍細胞の仁が正常細胞の仁より著しく大きいことと、仁が細胞の代謝においてもきわめて重要な役割をしている点を考慮して、制癌剤としてマイトマイシンが興味ある薬剤であることを示すものであろう。

要 約

組織培養した紡錘形細胞肉腫におよぼすマイトマイシンの影響を細胞学的、細胞化学的に研究した。マイトマイシンは特に静止期にある細胞に第一義的に作用し核の DNA および仁の RNA の構成に変化を起こし、細胞の機能を乱し崩壊に導くようである。核は形態的に著しい変化を受けると同時に、その染色質は染色性を失う。特に核染色質の異常な変形と変質を引き起こす。仁もまたその形態、染色性に著しい変化を起こし、ついには仁物質は細胞質内に流出する。細胞質には多数の空胞が現われる。分裂期の細胞においては染色体に著しい切断や染色体橋の形成がみられ、分裂ははなはだしく乱される。仁に著しい変性を起こす点においてマイトマイシンの効果は特異である。

引 用 文 献

- Awa, A. 1958. Some cytological effects of carzinophillin on the MTK-III. Jap. Jour. Genet. **33**: 356-367.
- Cowdry, E.V. 1952. Laboratory technique in biology and medicine. 338-339.
- Hisada, Y. 1957. Behavior of tumor cells with lobated nuclei in the MTK-IV tumor after some treatments. Jap. Jour. Genet. **32**: 172-177.
- Hori, H.S. 1956. On the distribution of nucleic acids in tumor cells of the MTK-III. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool. **12**: 425-431.
- 1956. Further study on the distribution of nucleic acid in the tumor cells on the MTK-III. Gann **47**: 215-221.
- Hori, H.S. and Sasaki M. 1958. Some cytological observations on the effect of sarkomycin and carzinophillin on normal and neoplastic cells *in vitro*. Synposia a Cell Chem. **7**: 133-142.
- Hughes, A.F. 1952. The effect of purines and related substances upon cells in chick tissue culture. Exp. Cell Res. **3**: 108-120.
- Lettré, R. 1954. Observations on the behavior of the nucleolus of cells *in vitro*. Symposium on "Fine Structure of Cells". Ser. **2**: 141-150.
- Jacobsen, W. and Webb, M. 1952. The two types of nucleoproteins during mitosis. Exp. Cell Res. **3**: 163-183.
- Makino, S. and Cornman, I. 1953. Different cytological responses of malignant cells to podophyllotoxin *in vitro*. Cytologia **18**: 277-282.
- Sato, A. and Sasaki, M. 1957. Notes on a tissue culture clone of a methylcholanthrene-induced spindle-cell sarcoma of the rat. Mis. Rep. Yamashina's Inst. Ornith. Zool. **10**: 410-412.
- Sasaki, M. 1956. The cytological effect of chemicals on ascites sarcomas V. Effects of cortisone and sarkomycin on the MTK-sarcoma II. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool. **12**: 433-441.
- Sugiura, K. 1959. Studies in a tumor spectrum VIII. The effect of mitomycin C on the growth of a variety of mouse, rat, and hamster tumors. Cancer Res. **19**: 438-445.
- Tonomura, A. 1956. Behavior and mitotic cycle of tumor cells with lobated nuclei in the MTK-IV tumor. Jap. Jour. Genet. **31**: 125-129.
- Wakaki, S., Marumo, H., Tomioka, K., Shimizu, G., Kato, E., Kamada, H., Kudo, S. and Fujimoto, Y. 1957. Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. Antibiot. and Chemoth. **8**: 228-240.