Akio AWA: Some cytological observations of the effects of thio-TEPA on the rat and mouse ascites tumors. Jap. Jour. Genet. **34** (1959): 245-252

Thio-TEPA のネズミ腹水腫瘍に及ぼす 細胞学的影響

阿 波 章 夫

北海道大学理学部動物学教室

昭和 34 年 5 月 15 日 受領

Résumé

The present paper deals with some cytological effects of triethylene thio-phosphoramidate (thio-TEPA or 'Tespamin', SUMITOMO Co.), a derivative of ethyleneimine compounds, upon tumor cells of the transplantable ascites tumors of the rat (MTK-sarcoma III) and mouse (EM-tumor), with particular regard to mitotic abnormalities induced by the drug. Intraperitoneal injections of the drug at dose levels of 1 mg/kg, 2 mg/kg and 5 mg/kg were made in tumor-bearing animals on the 4th day of transplantation.

By the application at a dose of 1 mg/kg in the MTK-sarcoma III, thio-TEPA exerted a destructive influence upon interphase cells with a considerable increase of cell-volume and morphological deformation in various ways. At the same time, there was a marked decrease in mitotic rate of the tumor cells. Predominant patterns of abnormalities induced in tumor cells are: the formation of micro-nuclei and multi-lobated nuclei, the reduction in stainability of the cytoplasm and nucleus, the swelling of the cytoplasm, and the formation of vacuoles in the cytoplasm.

Damaging effects of the drug on the chromosomes were also remarkable. Fragmentation and translocation of chromosomes were rather common at metaphase. In addition, the formation of bridges and heavy stickiness of chromosomes were usual in treated tumor cells at ana- and telophase. Basing on the results of present study by means of the Feulgen reaction, it is suggested that the mitotic abnormalities induced by the drug may be caused by the disturbance of the nucleic acid metabolism in the interphase nucleus.

It was found that some of tumor stem-cells infiltrated in the omentum have remained alive unaffected by the drug. It seems probable that they form a primary source for regrowth of the tumor by their proliferation.

Zoological Institute, Hokkaido University

Nitrogen mustard が細胞の分裂毒として作用し、強い制癌作用を有することが多くの研究者によって報告されて以来、アルキル化剤の制癌作用についての研究が進歩し、数多くの注目すべき事実が知られつつある。しかしながら、この薬物は腫瘍細胞のみならず、他の体組織にもかなりの毒性を有することから、担癌動物に対して毒性のすくない薬品をうることが望まれていた。近年 Nitrogen mustard 系化合物の生体内変化の薬理学的研究によって、活性中間体として ethyleneimine 環を有するアルキル化剤で、かなりの制癌作用を有する TEM (triethylene melamine) が発見されさらに、二、三の ethyleneimine 系の抗腫瘍性物質が発見されるに至った。

Thio-TEPA (triethylene thiophosphoramidate, Tespamin) は上述のごとき ethyleneimine 環を有するアルキル化剤で、その制癌作用などについては既に Personeus *et al.* (1952),

Crossly *et al.* (1953), Crossley *et al.* (1953), Stock (1954), Sugiura and Stock (1955), Goldie *et al.* (1957) 等による広汎な研究結果が報告されている。著者は細胞学的な立場から Thio-TEPA の腹水腫瘍に及ぼす抑制作用, ならびに核および染色体にみられる細胞学的作用に注目し研究しつつあるが, 現在までに得られた二, 三の事実をここに報告する。

稿を草するに当り終始御懇切な御指導を賜った牧野佐二郎教授に深甚なる謝意を捧げる。また適切な御助言を与えられた田中達也講師をはじめ研究員一同に深謝する。

材料および方法： 実験に用いた腹水腫瘍はシロネズミの MTK-肉腫 III およびハツカネズミの EM-腹水腫瘍である。いずれも腫瘍移植後4日目の個体を用いた。シロネズミは純系交配の Wistar King A/Ma 系, Wistar/Ma および Long-Evans/Ma, ハツカネズミは EM-black 系を用いた。

Thio-TEPA (triethylene thiophosphoramidate 'Tespamin' 住友化学製品: ベンジルアルコールおよびポリエチレングリコール混液に溶解されている) を蒸留水に溶解させたのち, 生理食塩水で稀釈して使用した。シロネズミ, ハツカネズミとも主として 1 mg/kg を腹腔内注射による投与をおこない, さらに 2 mg/kg および 5 mg/kg の投与による実験も併せておこなった。

Thio-TEPA 処理後腹水を採取し, 固定染色してこれを観察に供した。標本は主として酢酸・ダーリアによるおしつぶし法を用い, 染色体の観察には水前処理法 (Makino, 1957) に従って標本を作成した。また Carnoy 液固定による Feulge 染色もあわせて用いた。

観 察 結 果

細胞学的観察をおこなうために, まず MTK-肉腫 III を移植して4日目の腫瘍動物に 1 mg/kg の Thio-TEPA を投与し, 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 時間ごとに腹水を採取して観察した。

Figure 1. Curves showing mitotic frequencies of tumor cells in thio-TEPA-treated and control animals. (A) MTK-sarcoma III (rat). (B) EM-ascites tumor (mouse).

Figure 2. Histograms showing (A) relative frequencies of mitotic cells, and (B) percentage of cells with micro-nuclei, after the treatment with 1mg/kg of Thio-TEPA in MTK-sarcoma III.

Thio-TEPA の作用は非常に緩慢で、処理後6時間ごろまでは腫瘍細胞に注目すべき形態的変化はほとんど観察することができない。しかしながら第1図Aにみられるごとく、腫瘍細胞の分裂頻度は次第に低下し、処理後24時間には最低値を示すことから、まず休止期細胞に作用して細胞分裂を抑制していることは容易に想像される。また、同時に腫瘍細胞の核および細胞質の染色性がいちじるしく低下することから Thio-TEPA 処理により細胞内の代謝に何らかの変化を生じていることも十分考えられる。処理後24時間をすぎると分裂細胞の出現頻度は上昇しはじめるが、それらのほとんどすべてが第3図に示すように異常を呈する。これらの分裂異常については後に詳述したい。休止期細胞にあっては、細胞は例外なく膨潤しはじめ、核の染色性の低下、あるいは細胞質における泡状の空胞形成などが認められる(第4~6図)。対照の標本と比較する時、分葉核の形成や核質の異常な凝縮が顕著である。さらに詳細に観察すると、核は分葉して不定形となり、仁もまたいちじるしく膨潤して大きくなり、形も不規則となる。核膜はきわめて不明瞭となるため核と細胞質との境界が認識困難となる。さらに核内では染色質が粒状、あるいは塊状に凝縮して細胞内に点在しはじめ、ついには核質の崩壊をみるにいた

る。また細胞質には空胞形成や、発泡状の細胞質突起が著しくなり、全体として非常に膨潤して大きくなる。時間の経過に伴って、これらの異常はさらにいちじるしくなるのである。処理後72時間をすぎると、核質の崩壊した細胞や多数の片々たる切断核を有する細胞がかなり観察される(第2図B)。これらの細胞はやがて退行してゆくため、腫瘍細胞は急速に減少してついには消失してしまう。

Thio-TEPA 1 mg/kg 投与による腫瘍細胞の形態的変化と崩壊はハツカネズミの EM-腹水腫瘍を用いた場合においても認めることができた(第1図A, B)。

つぎに Thio-TEPA 処理による腫瘍細胞の染色体に起こる異常について詳述する。既に述べたごとく処理後24時間を過ぎると一たん最低値を示した細胞の分裂頻度は上昇しはじめるが、この時の分裂のほとんどすべては異常である。かかる異常分裂をおこなう細胞の染色体と水前処理法ならびに Feulgen 染色によって観察をおこなった。分裂前期細胞の出現頻度が非常に低かったため詳細な観察は困難であったが、前中期から終期までの染色体をみると、前中期および中期の細胞では切断と転座が異常の80%以上を占め、粘着や凝縮がそれに次いでいる。また後期および終期では染色体の遅滞、染色体橋形成が90%以上出現している(第6, 7, 9, 10図)。これらの細胞はやがて休止期に移行するが、その結果として小核(micro-nucleus)を有する細胞が次第に増加してゆく(第2図B)。また第2図Aからも明らかなごとく、処理後の時間経過とともに分裂中期細胞の出現頻度は増加しはじめるが、小核を有する細胞の出現頻度とあわせて考えると、異常分裂の進行はきわめて緩慢であると考えられる。

Feulgen 染色により核の形態を観察した。休止期の核は対照に比較してわずかながら弱い反応を呈し、核の形も不規則である(第8, 9, 10図)。これらの結果から DNA 含有量の増減

Figure 3. Histograms showing the number of normal (white column) and abnormal (black column) mitotic cells in (A) control, and (B) thio-TEPA (1 mg/kg) treated rats bearing MTK-sarcoma III.

Figure 4. Abnormal metaphase chromosomes of the MTK-sarcoma III cells induced by the application of thio-TEPA (1 mg/kg). A and B, 48 hours after injection $\times 1500$. C, dicentric chromosome. D, fragmentation of chromosome. E. and F, translocation of chromosomes. Figure 4C and D correspond to C' and D' chromosomes indicated by arrows in Figure 4A, and E and F correspond to E' and F' in Figure 4B, respectively.

が問題となるが、核が膨潤して大きくなること考え合わせると、必ずしも断定的な結論は下し得ないので、今後の研究にまきたい。

つぎに腫瘍死した処理動物の剖見をおこない、浸潤部位の細胞について観察した。シロネズミの MTK-肉腫 III は主として大網に浸潤して腫瘍を形成することは既に Hori (1956) により報告されている。著者のおこなった観察からつぎのようなことが明らかにされた。すなわち Thio-TEPA 処理後の腫瘍動物においても大網を中心とした浸潤がみられ、肝臓、脾臓および腎臓に変色を伴う変化がみられた。さらに大網および腎臓をおしつぶし標本により観察すると、多くの腫瘍細胞が核質の崩壊などの異常を示していることが観察された。これには壊死に原因するものも混在すると考えられるが、薬物処理による異常分裂も含まれていることは想像に難くない。一方、正常組織細胞の核にはあまり影響が及んでいないように見受けられた。それらの間に介在して分裂をおこなっている腫瘍細胞が観察された。その分裂は無処理の腫瘍細胞にみられるものと同様であることから、それらの腫瘍細胞が薬物の影響を免れて生存している腫瘍の種族細胞 (residual stem-cells) であることは Makino (1957) その他の研究に照して明らかであって、それらが腫瘍の再発のもとになるものと思われる。

Figure 5. Tumor cells on the 4th day after transplantation (untreated, control). Fig. 6. Cytoplasmic swelling and striking reduction in stainability in treated cells. 48 hours after injection of thio-TEPA (1 mg/Kg). Fig. 7. Tumor cells showing abnormal mitosis and swelling of the cytoplasm, 72, hours after injection. All are from MTK-sarcoma III, $\times 400$. Fig. 8. Translocation and fragmentation of chromosomes at metaphase (water pretreatment, acetic dahlia). $\times 1500$. This figure corresponds to Figure 4A. Fig. 9. Control. Figs. 10 and 11. 72 hours after injection of thio-TEPA (A mg/kg). Note chromosomal abnormalities in anaphase cells and a poor reaction of lobated nuclei. Feulgen reaction in MTK-sarcoma III, $\times 1200$.

実験例数は少ないが、Thio-TEPA 処理による腫瘍動物の延命効果をしらべた結果は第 1 表の通りである。MTK-肉腫 III を移植後 1mg/kg の Thio-TEPA 処理をおこなった場合、7 例中 6 例が腫瘍死し、そのうち 5 例の生存日数は 10 日から 15 日で、対照と比較してほとん

Table 1. Life span of the MTK-sarcoma III rats and the EM-ascites tumor mice after the treatment with thio-TEPA.

Tumors	MTK-sarcoma III (rat)		EM-ascites tumor (mouse)	
	No. of animals (cured, %)	Average survivals (days)	No. of animals (cured, %)	Average survivals (days)
Control	0/4* (0%)	9.0	0/3 (0%)	9.7
1 mg/kg	1/7 (14.3%)	13.8	—	—
2 mg/kg	1/3 (66.7%)	18.0	0/2 (0%)	11.0
5 mg/kg	2/2 (100.0%)	—	0/2 (0%)	10.0
1 mg/kg (4 times once daily)	—	—	0/3 (0%)	12.0

* The numerator shows the number of animals cured after the application of Thio-TEPA, and the denominator indicates the number of animals received injection of the tumor.

ど差はなかった。1 例は結節状の腫瘍を皮下に形成し、移植後 30 日目に腫瘍死した。完全治癒は 1mg/kg で 7 例中 1 例、2mg/kg では 3 例中 2 例、5mg/kg では 2 例すべてという結果が得られた。これに対して EM-腫瘍による実験では、どの投与量においてもすべて腫瘍死した。これらの結果は Sugiura and Stock (1955) によって既に指摘されているごとく、腫瘍の悪性度と密接に関連しているものと考えられる。

考 察

Thio-TEPA は既に述べたごとく TEM などと同じアルキル化剤で、その制癌効果については数多くの報告がある。著者はこの薬品の腫瘍細胞に及ぼす影響を細胞学的、形態学的な面から観察をおこなった。上述の観察結果を要約するとつぎのようになる。Thio-TEPA 処理後まず細胞分裂の抑制、細胞とくに核の染色性の低下、ならびに細胞のいちじるしい膨潤などがみられ、次いで異常分裂および核質崩壊による腫瘍細胞の壊死がみられる。しかしながら浸潤のみられる大網の部分に薬物の影響を免れて生き残っている残存腫瘍細胞が観察されることから、腫瘍はそれらの残存腫瘍細胞の増殖によって再発されるのではないかと考えられる。

ここで注目すべきことは薬物投与直後には腫瘍細胞に顕著な形態的異常は認められず、かなりの長時間を経過して後に染色体の異常を伴う異常分裂および核崩壊が多数出現しはじめることである。これらの事実は Thio-TEPA がまず休止期細胞に作用して正常な細胞代謝機能に障害を与えるのではないかということを暗示する。細胞の染色性の低下はその可能性を裏書きするものである。

これらの結果を現在までに発表されている各種薬物処理の結果と比較するのは興味がある。Makino and Hori (1957) は X 線照射およびコーチゾン処理による MTK-肉腫の III DNA 量を分光比色計で測定し、その結果から X-線は DNA 合成に影響を及ぼし、異常分裂を誘起するものではないかと結論している。さらに内海(未発表)は Thio-TEPA と同じ誘導体である MEPA (N-(3-Oxapentamethylene)-N',N''-Diethylene-

phosphoramidate) を吉田肉腫に作用させ、その DNA 量を調べているが、核は大きくなるにもかかわらず DNA 量は対照のとそれと比較してあまり変化はなく、投与量によっては対照とはやや異なる含有量および分布の変動がみられたという。俣野(未発表)は TEM 処理によって生ずる染色体の異常を詳細に分析しているが、今回著者の得た結果と同じように染色体の切断や転座が高率に出現することを観察している。

このような放射線類似の作用や、各種の細細胞異常分裂を誘起するものとしてはアルキル化剤に限らず、多くの抗腫瘍剤、すなわち抗代謝性物質、抗生物質その他において知れている (Makino 1957, Makino and Cornman 1953, Makino and Tanaka 1953, Makino and Nakanishi 1955, Tanaka 1957, Tanaka et al 1955, Sasaki 1956, Hori and Sasaki 1958, Awa 1958, Bieselee 1956a, b.)。かかる異常分裂は薬物が細胞の核酸代謝をなんらかの形で阻害する結果であることは明らかであって、細胞の SH 基等に作用してこれらを不活性するためにおこるもののように考えられている (Danielli, 1950)。薬物処理の細胞崩壊のしくみの研究が生化学的な解明と形態的分析との両方面より進められることにより、新しい制癌剤の発見に貢献するところあると考えるのである。

摘 要

1) Ethyleneimine 系誘導体の Thio-TEPA (triethylene thiophosphoramidate 'Tespamin') のシロネズミ MTK- 肉腫 III およびハツカネズミ EM- 腹水腫瘍に及ぼす作用を細胞学的および形態学的に追求した。

2) Thio-TEPA の作用はまず休止期細胞に働き、細胞の分裂を抑制しその正常な代謝機能を失わせる。その結果、染色体の構造に変化を与え異常分裂を誘起し、休止期細胞にあっては核や細胞質の極端な膨潤や染色性の著しい低下、小核 (micro-nucleus) や分葉核の増加、および細胞質における顆粒状の空胞形成などの異常を生ずる。また、分裂中期の染色体における切断、転座および融着、後期の染色体橋形成や遅延などが著しい。そしてついには腫瘍細胞の崩壊がみられるに至る。

3) 浸潤部位の腫瘍細胞の中にも核の崩壊した細胞がみられるが、薬物の作用から免れて生き残っている残存腫瘍細胞が観察される。それらは腫瘍の再発に関与するものと考えられる。

4) MTK- 肉腫 III においては 1 mg/kg 投与では対照に比して腫瘍動物の延命効果はあまり顕著ではなかったが、投与量の増加に伴う生存日数の増加や治癒した実験個体がみられた。ハツカネズミの EM- 腫瘍では延命効果はほとんど認められなかった。これは腫瘍の悪性度に関係していると思われる。

引 用 文 献

- Awa, A. 1958. Jap. Jour. Genet. **33**: 356-363.
Bieselee, J.J. 1958a. Mitotic poisons and the cancer problem. New York, Elsevier Publ. Co.
——— 1958b. Ann. New York Acad. Sci. **71**: 1054-1067.
Crossley, M.L., Allison J.B., Wannemacher, R., Migliarese, J., Parker, R.P., Kuh, E., Seeger, D.R. and Partridge, R. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **83**: 398-400.
Crossley, M. L., Allison J.B., Parker, R.P., Kuh, E. and Seeger, D.R. 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **83**: 438-447.
Danielli, J.F. 1950. Cell physiology and pharmacology. New York, Elsevier Publ. Co.
Goldie, H., Walker, M., Graham A.R. and Mitchell, G.B. 1957. Cancer Res. **17**: 374-381.
Hori, S.H. 1956. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool. **12**: 480-486.
Hori, S.H. and Sasaki, M. 1958. Symp. Cell. Chem., **7**: 133-142.
Makino, S. 1957. Intern. Rev. Cytol. **4**: 25-84.
Makino, S. and Cornman, I. 1953. Cytologia **18**: 277-282.

- Makino, S. and Hori, S. H. 1957. Annot. Zool. Japan. **30** : 162-168.
- Makino, S. and Nakanishi Y. 1955. Cytologia, **20** : 29-95.
- Makino, S. and Tanaka T. 1953. J. Nat. Cancer Inst. **13** : 1185-1199.
- Personeus, G., Halliday, S.L., McKenzie, D. and Williams, J.H. 1952. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **81** : 614-616.
- Sasaki, M. 1956. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool. **12** : 433-441.
- Stock, C.C. 1954. Advances in Cancer Research **2** : 426-492.
- Sugiura, K. and Stock, C.C. 1955. Cancer Res. **15** : 38-51.
- Tanaka, T. 1957. J. Fac. Sci., Hokkaido Univ., Ser. VI, Zool. **13** : 320-235.
- Tanaka, T., Kano, K., Tonomura, A., Okada T.A. and Umetani, M. 1955. Gann **46** : 15-26.