原 著

Papaver rhoeas Linné 及び Papaver orientale Linné
種子抽出物質の抗腫瘍作用に就て (動物実験)

日本医科大学 衛生学教室 (指導: 八田貞義教授)

青 木 孝 好

Takayosi Aoki

ま え が き

中原 (1925)¹⁾ はオレイン酸の微量をマウス腹腔内に注射することにより、マウス特発癌の手術後の再発を或る程度まで抑制することの可能なことを確めたが、ついで斉藤²⁾ は灰白蒿苣、黒色蒿苣、菱の実及びその外皮、梅茸液、浜チシャ、岩チシャ、藤瘤などの植物含有成分を抽出し、それらの抗腫瘍性について検討を加えており、その後 Colchicin³⁾、小麦エキス⁴⁾、Podophylin⁵⁾、フマル酸⁶⁾ などの抗腫瘍性についての報告がなされている。

最近抗腫瘍性物質の Screening Test の対象として抗生物質を始め広義の植物が研究されつつあり、Tillandsia, Albizia⁷⁾ は RC Carcinoma 及び Lymphosarcoma 150 に対して効果を示し、Cooperia, horse chestnut, Albizia は Lymphosarcoma 150 及び Egg Cultivated C₃H mouse Carcinoma に対して効果があると報告し、更に Cucurbitaceae に属する Ecballium elaterium, Citrullus colocynthis⁸⁾ は necrotizing action があると述べている。

著者は Allium Cepa 切片を Nitromin (0.02%) 溶液に 10 分間浸漬し、0.5% Eosin 液にて染色すると同一細胞内に 2 核像を呈した。此の浸漬切片を種々と植物抽出液に再度浸漬すると細胞内構造に変化を及ぼし、そのなかでも Papaver rhoeas Linné 及び Papaver orientale Linné 種子よりの抽出液 (0.5 mg/cc) に上記 Nitromin 溶液浸漬切片を作用させると原形質融解像を認めたので報告する。

I. 抽出精製方法

表 1 に準じて抽出を行つたが P 物質及び P' 物質抽出精製方法、多糖体抽出方法を述べると

a) P 物質抽出方法

実験には Papaver rhoeas Linné 種子 (群馬県甘楽

郡産) を用いた。

まず種子中の異物を取除いた後細砕し、これに 10 倍量の蒸留水を加えて 100°C 40~60 分間 (70°C~80°C にては 120 分間位) 温浸する。(此の時の種子は必ずしも脱脂せずとも可) 冷却後濾紙 (東洋濾紙 No. 131 使用) で濾過し濾液を採取した。この濾液に 1/2 容量のエーテルを加えて強く振盪する。これを濾紙で濾別すると濾紙上にゼラチン様物質が残るので、これを集めて無水アルコール (エーテル、ベンゾール使用も可) でゼラチン様物質をすべて溶解するまで加えて濾紙にて不溶物を除去する。アルコール液を 1/10~1/20 容量に減圧濃縮し、5°C にて 2 日間放置し蛋白質、フミン質、多糖体等の析出物を除去する。不溶物を除去したアルコール液に 10 倍量の 1~5% 塩酸水を加え、充分振盪して沈渣を除去した後、温浴上で蒸発乾涸するとタール様物質を得る。更に可及的少量の無水アルコールに溶解せしめて、等量の飽和苛性加里液を加え還流冷却に付した後 (約 30 分間)、アルコールを除去し、ついで硫酸を加え沈澱物を除去し、これに 2~3 倍量のエーテルを加え充分振盪し、エーテル層を分液採取しエーテル蒸留後、アルコール可溶分を残留物質として得られる。タール様物質で P 物質と仮称している。収量は 0.3% 前後である。(但し種子よりの収量)

b) P' 物質抽出精製方法

種子を脱脂した時に留分として罌粟油を得ることが出来る。即ちこの油からの抽出方法を述べる。

油に等量 飽和苛性加里液を加え、30 分間煮沸しながら攪拌する。冷却後濃硫酸を加えて飽和脂肪酸を除去する。上清を 5% 塩酸水にて充分洗滌し、更に 10% の炭酸水素ナトリウム液にて再度充分に洗滌する。上清を無水アルコールに溶解せしめ分液漏斗にて分液

実験使用のエールリッヒ腹水癌細胞は移植後10日目腹水を生理食塩液にて洗滌 (1,000 r.p.m. 3 分間) 後使用し, 細胞呼吸への影響を検べた。主室には ① M/15 磷酸緩衝液 1.0 cc (pH5.6), ② 1% KOH 1.0 cc, ③ エールリッヒ 腹水癌 細胞浮游液 1.0 cc ($2 \times 10^4 \sim 10^5$ cells), ④ 生理食塩液 1.0 cc, 側室には P 及び P' 物質 (1 mg/cc) 溶液 1.0 cc を使用した。条件としては 37.5°C にて毎分 110 回振盪した。

表 2

物理化学的性質及び毒性

抽出物質	P-物質	P'-物質	多糖体	飽和脂肪酸
1. 性状 (室温にて)	タール様	ゼラチン様	半結晶 (吸湿性強し)	粉末
2. 呈色及び呈色試験				
Biuret 反応	—	—	—	—
Molish 反応	—	—	+	—
Alkaloid 呈色反応	—	—	—	—
Salkowski 反応	—	—	—	—
Casanova 反応	—	—	—	—
3. 溶解度				
水・熱水	難溶(黄色)	エマルジョン	易溶	易溶
酸性液 (PH=5)	可溶	エマルジョン	易溶	易溶
アルカリ性液 (PH=9)	易溶	エマルジョン	易溶	易溶
無水アルコール	易溶	易溶	易溶(加熱)	不溶
アセトン	易溶	易溶	易溶	不溶
クロロホルム	難溶	易溶	易溶	不溶
エーテル	易溶	易溶	不溶	不溶
ベンゼン	易溶	易溶	不溶	不溶
4. 赤外分光分析	CH_2 CH_3 COOH $\text{CH}=\text{CH}$ $\text{C}=\text{C}$ $(\text{CH}_2)_n$ $n > 4$	$-\text{OH}$ $-\text{C}-\text{OH}$ CH_2 $\text{C}=\text{C}$ $>\text{C}=\text{O}$ $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ $(\text{CH}_2)_n$ $n > 4$ $-\text{C}-\text{C}-$ O		
5. LD ₅₀ 量 (腹腔内注射)	1.5g/kg 以上	4g/kg	2g/kg	2.5g/kg

表 3

Warburg 検圧法 (P, P' 混合 240 時間印)

実験料	1A: P物質(1mg/cc)+エーテル性水産(20万個) +生理食塩液(1.8cc)
	2A: P'物質(1mg/cc)+エーテル性水産(20万個) +生理食塩液(1.8cc)
	3A: Nitromin(1mg/cc)+エーテル性水産(20万個) +生理食塩液(1.8cc)
	4A: ケンゲ子多糖体(1mg/cc)+エーテル性水産 (20万個)+生理食塩液(1.8cc)
対照料	5A: エーテル性水産(20万個)+生理食塩液(2.8cc)

保存温度 37.5°C
振盪回数 毎分 110 回

図 1 赤外分光分析

表 3 の如く P 物質は 30 分以後は呼吸阻害度 98% を維持し、一定時間後に腫瘍細胞の O_2 消費に対して阻害作用を呈し、P' 物質は 10 分 -231%, 20 分 -181%, 30 分 -165% の阻害度即ち賦活作用を示し、P' 物質は腫瘍細胞の O_2 消費に対して賦活作用を呈しているが、in Vitro テストに於いては短時間にて腫瘍細胞を変性に陥らしめており、化学的分析からは同様な不飽和脂肪酸誘導体と想定され乍ら、生物学的

には異つた作用を示している。P' には Epoxy が赤外部吸収スペクトルで現われる。

なお多糖体 (1 mg/cc) 及び Nitromin (1 mg/cc) については、多糖体は Control と同一の値を示したが、Nitromin は強い呼吸阻害作用を示した。

b) 多糖体による Schwartzman 試験

Schwartzman 試験にはウサギを用い、予め毛を剪り消毒した腹部に多糖体 0.2 cc (2 mg/cc) を皮内注

射(準備因子)し、惹起因子として緑膿菌菌体精製物質⁹⁾を1.5mg/cc量静脈内注射し、注射後1,3,5及び24時間の4回に亘り判定を行い、Ⅱ度、Ⅲ度、Ⅳ度、Ⅳ度と強陽性を呈した。

IV. 各抽出分割の in Vitro 及び in Vivo テスト

a) in Vitro テスト(実験方法)

エールリッヒ腹水癌細胞をd・d均一系マウスの腹腔内に移植し、移植後7~10日目のマウスの腹水を採取し直ちに生理食塩液で10倍に希釈した。各検液の濃度は1mg/cc量とし各試験管に0.5cc宛分注し、これと同量のエールリッヒ腹水癌細胞浮游液を加え、充分に混和後37℃に保存し、3時間目に試液を取り出して0.05ccをスライドガラス上に載せ、直ちに0.1% Eosin 液を等量加えて充分に混和し、白血球算定用のメランジュールを用い、Thoma 氏算定板に平等に拡散させ、総細胞200~300個を算えてEosin 赤染細胞の百分率(以下E赤染率とす)を求めた。

a') in Vitro テストによる実験成績

表4に見られる如く、P物質によるE赤染率(赤変率)は6.5%であるが(後に述べる)9時間値ではP'物質の3時間値と同一の96.3%を示している。

b) in Vivo テスト(実験方法)

i) 吉田肉腫に対する方法

吉田肉腫細胞の移植には、無菌的操作により毛細ガラス管で腹腔内穿刺を行つて腹水を採取し、市販雑系100gの雄性ラット腹腔内に約0.1ccの上記腹水を注入し、移植5日目に腹水像を検べ、純培養の状態を呈したラットについてLD₅₀当量の1/4~1/5量即ちP物質については500mg/kg P'及びP''物質については各々1g/kgを1回量とし、又多糖体については400mg/kg、飽和脂肪酸については500mg/kgを夫々0.2ccの滅菌蒸留水に溶かし1回量とし1日1回7日間連続腹腔内に注射した。対照群は生理食塩液0.2cc宛注射した。なおラットは5匹を1群として行つた。

ii) エールリッヒ腹水癌に対する方法

d・d均一系20gの雄性マウスを用い、7~10日目のエールリッヒ腹水癌腹水0.05ccを無菌的に腹腔内に移植後、24時間目より前記吉田肉腫と同様な方法をもつて実験を行つた。

b') in Vivo テストによる実験成績

表4に見られる如くP、P'及びP''物質は吉田肉腫、エールリッヒ腹水癌 in Vivo テストにより約10倍の延命効果が認められた。

抽出多糖体は吉田肉腫 in Vivo テストに於いて8~

表 4

Papaver rhoeas Linne 種子抽出物質の抗腫瘍性

in Vitro テスト

最終薬物濃度 1^m3/cc
最終pH 7.2~7.4(炭酸水素ナトリウムにて修正)
保存液 生理食塩水
エールリッヒ腹水癌腹水 14日目 0.5cc
保存温度 37℃
判定時間 3時間目

抽出物質	赤染細胞数/総細胞数	赤染率
P物質	16/246	6.5%
P'物質	209/217	96.3%
P''物質	209/210	99.5%
多糖体	40/200	20.0%
飽和脂肪酸	41/201	20.5%
対照	39/203	19.2%

in Vivo テスト

吉田肉腫動物実験は0.1cc移植後5日目腹腔内注射開始。
エールリッヒ腹水癌動物実験は0.05cc移植後24時間目
腹腔内注射開始(7回連続)

抽出物質	実験使用量	延命日数	
		吉田肉腫	エールリッヒ腹水癌
P物質	500 ^m g/kg以上	90~100日	90~100日
P'物質	1g/kg	100日以上	100日以上
P''物質	1g/kg	100日以上	100日以上
多糖体	0.4g/kg	80~100日	10~15日
飽和脂肪酸	500 ^m g/kg	9~10日	10~14日
対照	無処置	9日	10~14日

10倍近くの延命効果が認められたが、エールリッヒ腹水癌に対しては無効であつた。

飽和脂肪酸は両者何れに対しても無効で延命は認められなかつた。

V. P物質に関する実験

a) 毒性に就いて

i. 急性中毒致死量

P物質の急性中毒致死量(LD₅₀)を腹腔内投与法により量測した結果、健常雄性マウス(体重20g)では1.5g/kg以上であり、健常雄性ラット(体重100g)では1.2g/kg以上でP物質の毒性は比較的僅少と考えられる。

ii. P物質を連続投与した時の病理組織学的所見

ラット(体重100g)3匹を1群とし、これらに1日1回P物質の所定量を30日間腹腔内に投与し、生体に及ぼす影響を、肉眼的及び病理組織学的に観察した。

投与所定量はP物質120mg/kg量及び600mg/kg量とし、同時に試剤を含まない生理食塩水のみを等容量投与した対照群と比較した。この結果、P物質120mg/kg量投与群は30日間の発育曲線は対照群と類似

の発育を示した。600 mg/kg 量投与群は 1 例が 27 日目に突然死亡したほかは対照と略々同様な発育がみられた。

次に生体臓器との親和性を主に肝・腎・心・肺に就いて病理組織学的に検索したが、P 物質 120 mg/kg 量投与群ではいずれの臓器に対しても特記すべき著変は認められなかった。

600 mg/kg 量投与群では肝に軽い脂肪変性、核質の崩壊がみられ、腎に細尿管上皮細胞の核質崩壊、脂肪変性を疑わしめる所見がみられた。なお心・肺には著変を認めなかった。

b) in Vitro に於ける効果に就いて

i. N・F Carcinoma に対する実験

1. 実験方法

N・F Carcinoma 皮下移植後 10 日目のマウス（雌 18 g）をエーテル麻酔し、腫瘍を無菌的操作の下に摘出し、滅菌シャーレ内生理食塩液にて 1 mm³ に細切り、シャーレ内には対照群では生理食塩液 5 cc 量、実験群では P 物質 0.5 mg/cc 量の液 5 cc を入れ 50 個の細切組織を浸漬した。5°C にて 12 時間静置してから浸漬腫瘍組織を他の健常雌マウスの皮下に再移植し、移植性の成否に就いて検討した。

2. 実験の成績

著者は 4 週間まで観察を続けた後移植性の成否の判定を行つた。写真 1 及び写真 2 に示す如く、移植片の組織所見は P 物質 0.5 mg/cc 量浸漬群は核の染色性が淡く、その数も少くまた有糸分裂像も少い。生理食塩液浸漬群は核の染色性が濃く、数も多く有糸分裂像も多い。被移植動物実験群では N・F Carcinoma は 4 週間後の判定に於て移植が成立しなかったが、対照群では完全に移植が成立した。なお参考として浸漬腫瘍組織切片移植 4 週間後のマウスの状態を写真 3 に示した。

写真 1 P 物質 0.5 mg/cc 量浸漬腫瘍組織片の組織所見 (400 倍)

写真 2 生理食塩液浸漬腫瘍組織片 (対照) の組織所見 (400 倍)

写真 3 浸漬腫瘍組織片移植 4 週間後のマウス

注：矢印は移植部位を示す。左の 2 匹は P 物質 0.5 mg/cc 量浸漬群、右の 2 匹は生理食塩液浸漬群で夫々の代表例を示す。

ii. 吉田肉腫に対する実験

1'. 実験方法

吉田肉腫細胞をラット腹腔内に移植し、移植 5 日目の腹水を採取し、直ちに Rinaldini 液 (NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, NaH₂PO₄·H₂O 0.05 g, Glucose 1.0 g, NaHCO₃ 1.0 g, Sodium citrate 0.67 g, Distilled water 1,000 cc) で 10 倍に稀釈した。

P 物質を Rinaldini 液で 2 mg/cc 及び 3 mg/cc の濃度に稀釈し、各試験管に 0.5 cc 宛分注し、これと同量の吉田肉腫細胞浮游液を加え、十分に混和後 37°C に保存し、所定時間毎に試液を取り出して検液 0.05 cc をスライドガラス上に載せ、直ちに 0.1% Eosin を等量加えて十分に混和し、白血球算定用のメランジュールを用い、Thoma 氏算定版に平等に拡散させ、総細胞数 200~300 個を算えて Eosin 赤染細胞の百分率 (以下 E. 赤染率とす) を求めた。

2'. 実験成績

吉田肉腫の E. 赤染率より P 物質の障害性に就いて

みると、表5に示す如くP物質が2mg/cc 量の場合、作用5時間以上に及ぶと作用時間、作用濃度に比例して障害度も急速に増大してくる。

表5 P物質の吉田肉腫細胞E赤染率

時間			1	3	5	7
試験群						
実験群	2 mg/cc	吉田肉腫死細胞数	3	42	174	193
		吉田肉腫生細胞数	218	209	201	212
		〇〇	1.4	20.1	86.6	91.0
	3 mg/cc	吉田肉腫死細胞数	9	63	187	201
		吉田肉腫生細胞数	138	207	196	209
		〇〇	6.5	30.4	95.4	96.2
対 照 群		吉田肉腫死細胞数	0	23	43	50
		吉田肉腫生細胞数	200	199	199	216
		〇〇	0.0	11.6	21.1	23.2

iii. エールリッヒ腹水癌に対する実験

1'. 実験方法

エールリッヒ腹水癌細胞をd.d系マウスの腹腔内に移植し、移植後7～10日目のマウスの腹水を採取し、直ちに Rinaldini 液で10倍に稀釈した。P物質の濃度は1mg/cc 量とし、以下の実験術式は前記吉田肉腫細胞に対する場合と同様である。

2'. 実験成績

エールリッヒ腹水癌細胞のE赤染率よりP物質の障害性についてみると、表6に示す如くP物質が1mg/cc 量の場合、作用7時間目に於いて障害的に作用するのがみられた。

表6 P物質のエールリッヒ腹水癌細胞E赤染率

時間		1	3	5	7	9
試験群						
実験群	エールリツヒ死細胞数	9	16	65	171	209
	エールリツヒ生細胞数	229	246	237	224	217
	〇〇	3.5	6.5	27.4	76.3	96.3
対照群	エールリツヒ死細胞数	7	12	27	50	41
	エールリツヒ生細胞数	237	210	194	255	201
	〇〇	3.0	5.7	13.9	19.6	20.5

以上の in Vitro に於ける諸実験により、P物質が抗腫瘍性を有することを認めたが、その最少有効量は表7の如く吉田肉腫に対しては100 r/cc 量で、エールリッヒ腹水癌では300 r/cc 量を得た。

c) in Vivo に於ける効果に就いて

i. 実験方法

表7 最少有効量実験表

吉田肉腫 (100 r/cc)

	1	3	5	7
実験群	11/284	19/202	54/221	92/257
	3%	9%	24%	35%
対照群	6/203	15/201	35/267	48/222
	3%	7%	13%	21%

判定時間3時間目頃より対照群に比較し半分以下の直径を有する縮小した腫瘍細胞を60%近く認める。

エールリッヒ腹水癌 (300 r/cc)

	1	3	5	7
実験群	3/209	16/221	42/220	71/260
	1%	7%	19%	27%
対照群	0/200	11/240	19/218	39/249
	0%	5%	9%	15%

判定時間3時間目頃より対照群に比較し、半分以下の直径を有する。縮小した腫瘍細胞を40%近く認める。

吉田肉腫細胞の移植には無菌的操作により毛細ガラス管で腹腔内穿刺を行つて腹水を採取し、市販雑系雄性100gラット腹腔内に約0.1ccの腹水を注入した。移植5日目に腹水像を検べ、純培養状態を呈したラットに就いて、実験群はP物質100mg/kg量を1日1回7日間連続腹腔内に注射した。対照群は生理食塩液0.2cc宛注射した。なおラットは5匹を1群として行つた。

検液中の肉腫細胞は塗抹標本(Giemsa染色)に就いて2,000個中の有糸分裂像を検べ、これを前期(Prophase)、中期(Metaphase)、後期(Anaphase)及び終期(Telophase)の4期に分類し、P物質のMitosisに及ぼす影響に就いて検べた。

2'. 実験成績

表8、図2及び図3に示すようにP物質200mg/kg量投与により有糸分裂は漸次停止し、特にMetaphase以後は消失の傾向を示し吉田肉腫細胞数は減少している。実験群と対照群との体重の増加の割合及び延命日数などより効果を判定すると、対照群は顕著な体重の増加を示したが、実験群では正常ラット体重増加と類似の発育を示した。また延命効果に就いてみると実験群は対照群に較べ約10倍の延命を示した。

なお塗抹標本よりこの間の腹水中の吉田肉腫細胞像の

写真4 移植後5日目無処置 (400倍)

写真5 移植後6日目, P物質1回注射 (400倍)

写真6 移植後7日目P物質2回注射 (400倍)

写真7 移植後8日目, P物質3回注射 (400倍)

写真8 移植後9日目, P物質4回注射 (400倍)

写真9 移植後10日目, P物質5回注射 (400倍)

写真 10 移植後 11 日目, P 物質 6 回注射 (400 倍)

写真 11 移植後 12 日目, P 物質 7 回注射 (400 倍)

写真 12 移植後 13 日目, 物質 P 回注射後
24 時間目 (400 倍)

写真 13 移植後 14 日目, P 物質 7 回注射後
48 時間目 (400 倍)

写真 14 P 物質投与群, 移植 21 日目
ラット (体重 118 g)

写真 15 対照群, 移植 8 日目ラット
(体重 136 g)

写真 16 移植後 5 日目，無処置 (400 倍)

写真 17 移植後 6 日目，Nitromin 1 回注射
(400 倍)

写真 18 移植後 7 日目，Nitromin 2 回注射
(400 倍)

写真 19 移植後 8 日目，Nitromin 3 回注射
(400 倍)

写真 20 移植後 9 日目，Nitromin 4 回注射
(400 倍)

写真 21 移植後 10 日目，Nitromin 5 回注射
(400 倍)

写真 22 移植後 11 日目, Nitromin 6 回注射
(400 倍)

写真 23 移植後 12 日目, Nitromin 7 回注射
(400 倍)

写真 24 移植後 13 日目, Nitromin 7 回注射
後 24 時間 (400 倍)

写真 25 移植後 14 日目, Nitromin 7 回注射
後 48 時間 (400 倍)

Nitromin ではP物質と全く異つた所見を呈し、腫瘍細胞の縮少化は起らず、腫瘍細胞の破壊作用が強く Normal 細胞への影響も強い。

写真 26 移植後 4 日目, P 物質 4 回注射 (400 倍)

写真 27 移植後 6 日目 (対照群) (400 倍)

癌細胞の減少, その空泡変性及び Leucocyte, Monocyte, Lymphocyte の出現を示している。

写真 28 移植後 7 日目, P 物質 7 回注射 (400 倍)

白血球の盛んな浸入を認める。

写真 29 P 物質投与群, 移植
12 日目 マウス

写真 30 対照群, 移植
12 日目 マウス

表 8 P-物質 100 mg/kg を移植後 5 日目より 7 回腹腔内注射した際の吉田肉腫細胞 2,000 個中の有絲分裂数

動物 番号	注 射 開始日	分 裂 期	5 日目	6 日目	8 日目	10 日目	20 日目
1	移植後 5 日目	Prophase	15	18	8	3	2
		Metaphase	10	13	7	5	3
		Anaphase	4	2	1	0	0
		Telophase	8	3	2	0	0
		Total	37	36	18	8	5
2	移植後 5 日目	Pro.	25	17	10	8	7
		Meta.	15	16	7	6	2
		Ana.	7	5	8	9	3
		Telo.	4	2	5	3	1
		Total	46	40	30	26	13
3	対 照	Pro.	10	18	23		
		Meta.	8	12	20		
		Ana.	3	3	6		
		Telo.	2	7	8		
		Total	23	40	57		
4	対 照	Pro.	13	20	21		
		Meta.	9	16	19		
		Ana.	7	5	8		
		Telo.	5	6	9		
		Total	34	47	57

図 2 体 重 増 加 曲 線

図 3 延 命 日 数

推移についてみると（写真 4—13 参照）P 物質 3 回投与頃より吉田肉腫細胞は漸次原形質融解像を示し、細胞数も著しく減少してきた。さらに注射回数が進むにつれてその度合も強度となり、P 物質 6 回投与時では赤血球、白血球は比較的健全な像を示しているが、吉田肉腫細胞は強く障害され崩壊像を示しており、P 物質 7 回投与時では吉田肉腫細胞数は極めて少数となり変性細胞も吸収されつつある。P 物質 7 回投与後 48 時間目には吉田肉腫細胞は殆んどみられず Monocyte, Lymphocyte の盛んな侵入が認められた。なお参考までに対照群（移植 8 日目ラット）と実験群（移植 21 日目ラット）の腹部膨満状態の写真（写真 14 及び 15 参照）を示した。

更に Nitromin 溶液 0.2 mg/kg (LD_{50} 量 (I.P.I) = 80 mg/kg) を作製し、毒性を考慮する要のない程度で吉田肉腫を使用した in Vivo テストを行つたので、その腹水像を順を追ってあげてみる。上記の実験条件と同様で施行した。

以上を比較検討すると P 物質の注射に当り 4, 5 回目に Autolysis が強くおこり、7 回終了後 2, 3 日たつと肉腫細胞は Shrink し始めて消失するようである。

ii. エールリッヒ腹水癌に対する実験

1'. 実験方法

d-d 系雄性 20 g のマウスを用い 5 匹を 1 群として 7~10 日目のエールリッヒ腹水癌腹水 0.5 cc を無菌的に腹腔内に移植後、移植 24 時間目から 1 日 1 回 P 物質を 7 日間連続腹腔内に投与した。実験群は P 物質 200 mg/kg 量を、対照群には生理食塩水 0.2 cc 量を投与した。

2'. 実験成績

図 4 及び 5、写真 26 及び 28 に示す如く P 物質 200 mg/kg 量投与により、投与日数が進むに従いエールリッヒ腹水癌細胞数は著減した。

対照群は平均 15 日で腫瘍死したが、実験群では 1 例は移植後 40 日、1 例は移植後 45 日に死亡し、3 例は移植後 50 日以上生存し P 物質投与群は延命効果のあることがわかり、腹水中のエールリッヒ細胞の推移についてみると、P 物質 5 回投与によりエールリッヒ腹水癌細胞は著しく減少し、空泡変性が認められ、P 物質 7 回投与時ではエールリッヒ腹水癌細胞は認められず Monocyte, Lymphocyte の侵入がみられた。なお、体重の増加は対照群では急速に且つ著明に増加したが、実験群では体重の増加は著明でなかつた。なお参考

図4 体重増加曲線

図5 延命日数

までに対照（移植後 12 日目 マウス）と実験群（移植後 12 日目マウス）の腹部膨満状態の写真(写真 29 及び 30 参照)を示した。またエールリッヒ腹水癌使用実験では 21 日以上延命あるを有効とした。

以上の in Vivo に於ける動物実験により P 物質に抗腫瘍性のあることを認めたが、その最少有効量は吉

表 8

P 物質 300mg/kg:移植後24時間 日より筋肉注射2回			
N.F. Sarcoma.			
No	対 照 群	実 験 群	
1	1.0g	0.15g	
2	0.6g	0.15g	
3	0.4g	0.1g	
4	0.3g	0.08g	
平均腫瘍重量		0.58g	0.12g
平均体重変化		+3g	+1g
毒性		0%	0%
阻害度		0%	79.8%

田肉腫に対しては 50 mg/kg で、エールリッヒ腹水癌に対しては 100 mg/kg を必要とした。吉田肉腫に対しての 100 mg/kg 当量に於ける延命では対照の 3~4 倍、エールリッヒ腹水癌に対しては上記した如く 21 日以上延命であり、なおエールリッヒ腹水癌腹水 0.05 cc を腹腔内に移植した際の Survival の有効判定基準は必ず 21 日以上延命することが規定されている。

VI. P' 物質に関する動物実験に就て

1. N.F Sarcoma に対する効果

市販 d.d 均一系雌性マウス (18 g) の背部皮下に N.F Sarcoma 腫瘍組織を細切した切片を移植針にて無菌的に移植し、移植後 24 時間目より筋肉内に P' 物質 300 mg/kg 当量を注射した。対照群と実験群はともに 4 匹ずつにて実験を開始し注射回数は 2 回で中止、7 日目に撲殺して対照群との比較を腫瘍の大きさ及び重量に求めた。表 8 に示す通り実験群は 79.8% の発育阻害度を示していた。

2. エールリッヒ腹水癌 (腫瘍型)

市販 d.d 均一系雄性マウス (18 g) の背部皮下にエールリッヒ腹水癌腹水 (血性状を呈さない腹水) を注射器にて 0.1 cc 量を無菌的に移植し、移植後 4 日目

表 9

P 物質 300mg/kg:移植後4日目より 投与3回.			
エールリッヒ腹水癌(腫瘍型)			
No	対 照 群	実 験 群	
		筋肉注射群	経口投与群
1	2.7g	0.15g	0.3g
2	1.9g	0.09g	0.19g
3	1.0g	0.05g	0.15g
4	0.7g	0.03g	0.09g
平均腫瘍重量		1.6g	0.08g
平均体重変化		+2.8g	+1.9g
毒性		0%	0%
阻害度		0%	95%

即ち脊部を触診して確実に腫瘤に触れ、径 5 mm の腫瘤のあるマウスを撰び出して筋肉内注射群及び径口投与群（マウス用 Sonde を使用）とに分け、各群ともに P' 物質 300 mg/kg 当量を与えた（径口投与群は P' 物質を 300 mg/kg/0.5 cc～1.0 cc 当量を与えた）。対照群と二組の実験群はともに 4 匹づつにて実験を開始し、P' 物質の投与回数は 3 回で投与を中止し、7 日目に撲殺して対照群との比較を腫瘍の大きさ及び重量に求めた。表 9 に示す通り実験群の中筋肉内注射群は 95%，径口投与群は 88.7% の発育阻害度を示しており、以上により P' 物質は径口投与によつても腫瘍の発育を阻止することを in Vivo テストに於いて認めることができた。

考 察

以上の諸実験の結果は吉田肉腫、エールリッヒ腹水癌に対する in Vivo テストにより、有糸分裂を阻止しながら腫瘍細胞は縮小してゆくことが判明した。

吉田肉腫皮下結節腫瘍に対しては P' 物質 (25 mg/kg) を脊部筋肉内に注射すると、0.5 cm の直径を有する Solid tumour は 4～5 回目の注射の時には大福餅の如く柔軟となり 8～9 回目の注射の時には次第に縮小してくる。10 日目を終了する頃になると殆んど触診で探すのに困難となり、20 日目頃には完全に消失してしまう。ケン種子多糖体は肉腫に良効なるも癌腫には効果がない。このことは Schwarzman 反応に関係する報告が非常に多いことより血管分布に期待出来る Necrotizing action による現象と考えている。なお著者がエールリッヒ腹水癌細胞を 0.05 cc を腹腔内移植後、24 時間目より腹腔内注射による投与方法にて 7 回連続注射し、投与量は LD₅₀。(腹腔内注射) 量の 1/4～1/5 量を注射し（毒性強き薬物は Maximum Dose を使用し、植物 100 g は原料を蒸留水 500 cc にて温浸し、1/10 濃縮エキスを使用した）、その効果の一面を表 10 に纏めてみた。

犬の Sarcoma（外陰部及び腔部各 2 例づつ径 3 cm の肉腫）に対しても 25 mg/kg 量の P' 物質を 10 日間連続脊部筋肉内に注射して、吉田肉腫皮下移植の際と同様に硬度が漸次軟化し（注射 8,9 回目頃より）、次に縮小し始め（10 回注射以後 2,3 日頃より）30 日以内に全例腫瘍は消失する。消失後 1 カ月間注射を休止すれば再発する犬もいたが（外陰部 1 例）、消失後 30～40 日間注射した犬では現在の観察期間 2 年間で再発を見なかつた。

P' 物質は P 物質よりも腫瘤型に作用が強く、P 物

表 10 他抗癌剤についての比較

供 試 薬	実験使用量	延 命 日 数	腹水
Azan	20 mg/kg	18～20	貯溜
6-Mercaptopurin	50 mg/kg (Maximum Dose)	30～35	貯溜
Sarkomycin	1 mg/kg	26～35	貯溜
Carcinophilin	30 u/kg	27～30	貯溜
Mitomycin	1 mg/kg	50～58	一部 不明
Nitromin	16 mg/kg	30～35	貯溜
Nitrogen Mustard	0.3 mg/kg	50～55	一部 不明
あきののげし(全草)	3 cc/kg	12～18	貯溜
いわたばこ(全草)	3 cc/kg	10～13	貯溜
藤 瘤	5 cc/kg	8～10	貯溜
ひ し(実)	5 cc/kg	6～11	貯溜
ひ し(外皮)	3 cc/kg	10～15	貯溜
Tween 80	10 cc/kg	17～23	貯溜

質は P' 物質よりも腹水型に Homo に作用するようであるが、これは H₂O に対する溶解度の差異即ち腫瘍細胞内への“とりこみ”及び浮游細胞への接触量に関係し、多分に物理学的原因によると思う。本質的には Warburg 検圧法による如く P' 物質は呼吸作用に対しては peroxidatic に、P 物質は inhibit している生物反応が明瞭で此の反応は腫瘍細胞への現象としては Histology より P' 物質は Autolysis のために腫瘤型腫瘍が軟化した時期に P 物質を投与すれば一層早く縮小すると思うが、最初より P 物質と P' 物質を混合した物質を投与する方法が望ましいと思う。特に P' 物質の投与する方法は皮下注射法が最も良効と思われた。

む す び

著者は Papaver rhoeas Linné 及び Papaver orientale Linné 種子から下記の如き作用物質を抽出精製することができた。

P 物質は N・F Carcinoma, 吉田肉腫及びエールリッヒ腹水癌に対しては in Vitro 実験に於いて殺癌作用を示し、更に吉田肉腫、エールリッヒ腹水癌に対しては in Vivo 実験に於て抗腫瘍作用の有ることを確め、植物成分の抽出物のアルコール抽出液は或る程度の抗腫瘍作用を示すが同時にエーテル、ベンゾールにも可溶なる分割に、より強力な抗腫瘍性を有する物質

が存在すると思われ、特に有機溶媒可溶成分中に抗腫瘍性物質として有効なる物質が存在することが認められ、更に油分中より有効成分の分割を検討してみると、不飽和脂肪酸中にさらに有効なる抗腫瘍作用を有する物質の存在することが認められた。此の不飽和脂肪酸中の二重結合分子を酸化剤で oxidation させて Epoxy $\left(-\underset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{C}}}-\text{C}-\right)$ を構成せしめると、さらに一層抗腫瘍作用を強力にすることが in Vitro 及び in Vivo テストによつて明確になつた。

腫瘍細胞に対する作用として以下に示す事実を有することを知つた。

1. P物質投与により有絲分裂を漸次停止せしめやがて消失せしめる。
2. P物質の投与を続けると腫瘍細胞を急速に且つ著しく減少せしめる。
3. 腫瘍細胞消失後に Monocyte, Lymphocyte の侵入がみられる。その結果としてP物質投与群は対照群に較べると、体重の増加の度合は少く有意

の差のある延命効果を認めることができた。

稿を終るに臨み 日本医科大学学長塩田広重先生に敬意を表すると共に、終始御熱心な御指導御検閲を賜つた恩師八田貞義教授に深甚の敬意を表します。また実験に際し種々御便宜御助言下されました 癌研究所々長 中原和郎先生及び福岡文子博士に 厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 中原和郎：癌，**19** (1), 3 (1925)
- 2) 斎藤裕之助：癌，**31**, 275 (1937)
- 3) Andervont, H.B. : J. Nat. Cancer. Inst, **1**, 361 (1940)
- 4) 安藤徳弘：癌，**35**, 41, 58, 186, 192 (1941)
- 5) Semple, J.E. : Cancer, **1**, 523 (1948)
- 6) 新井恒人, 末広 励：癌，**44**, 361 (1953)
- 7) Alfred, T. : Texas Reports on Biology and Medicine, **14** (4), 538, Winter (1956)
- 8) Lavic, D. Symposium on the Chemotherapy of Cancer for the Pacific Asian Area, **53**, October (1957)
- 9) 新井秀男：日医大誌，**22** (9), 780 (1955)