Ehrlich 癌細胞に及ぼす各種電解質の影響 特にCaの抑制作用について

箕 輪 真 一

群馬中央総合病院，群大医学部公衆衛生学教室

高 橋 熙 内

群 馬 中 央 総 合 病 院

松 山 研 二

群大医学部第2病理学教室

われわれは胃癌の疫学的検索により，Caが胃癌発生に対して抑制的な影響を及ぼすものと推論した。¹⁾

従つてかかる推論を実証するため，強いては積極的な癌予防の解決のために独自の考えで一連の「癌とCaに関する実験的研究」をすすめ，Ehrlich 癌発育は相当量のCa含有食品投与により抑制されることを明かにし，²⁾ これはCaが癌細胞増殖の代謝過程にある核蛋白合成に阻害作用を及ぼすためであろうと推定した。³⁾ また胃癌発生の素地をなすと考えられる高濃度食塩含有食品による胃粘膜障害⁴⁻⁷⁾の発生はCa添加により阻止し得ることを明かにし，^{8,9)} 癌に対するCaの影響の重要性を指摘してきた。

その後，未だ系統的研究に乏しいと考えられる癌に及ぼす電解質の影響を広範囲に検索し，同時に癌に対するCaの抑制効果の作用機序を明かにするため，可移植性のEhrlich癌を用いて一般的な各種電解質(Mg, Na, K, Ca)はその増殖ないし移植性に対して如何なる影響をもたらすかを実験的に検討し，さらにEhrlich癌細胞は各種電解質により如何に変化するものかを細胞学的に比較検討して興味ある2, 3の知見を得た。

なお本研究の一部は逐次速報^{10,11)}してきたがその詳細をまとめて明示し，さらに癌に対するCaの抑制効果について考察を加えた次第である。

実験方法

1) 実験方法の概略は図1に示す通りである。実験動物はすべて健康なdd系マウス，体重13g前後の雌性^{12,13)}を使用した。飼料はわれわれの考案した食パン固形飼料^{2,3)}を用い，水分補給には若干のキャベツを適宜投与した。

2) Ehrlich腹水癌罹患マウス(移植後7~10日目)から採取した腹水を，共通にClイオンをもちしかも癌

図 1 実験方法

実験成績

細胞に及ぼす滲透圧の影響のない等張な4種電解質溶液 1.47% $MgCl_2$, 0.90% $NaCl$, 1.15% KCl , 1.22% $CaCl_2$ 溶液¹⁴⁾でそれぞれ10倍希釈混和して Ehrlich 癌細胞の各電解質希釈混合液（いわば各電解質溶液による Ehrlich 癌細胞浮游液）を作り、希釈混和の30分後、12、24時間後の各時間的経過段階ごとにそれぞれ各液 0.2cc を動物の腹腔及び腹部皮下組織に注射移植した。

以上の操作はすべて無菌的に実施し、この際の希釈混和液の経過時間中は移植性を失わないように何れも 2°C に保存した。¹⁵⁾

3) Ehrlich 癌細胞浮游液移植動物の各群を同一環境条件で飼育し、体重増加、腹水増量、皮下腫瘍発育、生存期間などについて比較観察した。なお腹水の採取法は前報^{2,3)}と同様である。

4) 2)と同様にして作った Ehrlich 癌細胞の各電解質希釈混和の30分後、6、12、24時間後（経過時間中は無菌的に 2°C に保存）にスライドガラスに塗抹してメタノール固定し、ギムザ染色を行つて癌細胞の塗抹染色標本を作製して細胞学的に比較観察した。

I 腹腔内移植について

1. 体重推移

Ehrlich 癌細胞の各電解質希釈混和後の各時間的経過段階別の各群 4 例の腹腔内移植後のマウスの平均体重推移状況は図 2 に示す如くである。この際の対照は同時に飼育した健康なマウス 4 例の平均体重増加曲線を示している。希釈混和の30分後においては $MgCl_2$, $NaCl$, KCl , $CaCl_2$ の各溶液（以下 Mg , Na , K , Ca 液と称する）の場合ともほぼ類似して移植後10日目頃より腹腔内癌細胞増殖による腹水の増量のため著しく急速な体重増加傾向を示しており、何れも対照の場合とは全く異つた様相を呈している。6時間後においては Ca 液の場合は他に比してやや緩慢な体重増加傾向にあり、12時間後においては明かに Ca 液の場合のみが著しく緩慢

図 2

体重 移 推

(各群 4 匹の平均)

(273)

表1 腹水の増加傾向 (実験14日目, 各群4匹の平均)

	30分後		6時間後		12時間後		24時間後	
	腹水量 (cc)	体重1g当 腹水量 (cc)	腹水量 (cc)	体重1g当 腹水量 (cc)	腹水量 (cc)	体重1g当 腹水量 (cc)	腹水量 (cc)	体重1g当 腹水量 (cc)
Mg 液	10.5	0.36	9.9	0.32	10.5	0.37	9.9	0.33
Na 液	10.3	0.35	9.9	0.35	10.2	0.35	10.2	0.34
K 液	10.5	0.35	10.8	0.39	10.8	0.37	10.5	0.35
Ca 液	8.8	0.32	5.7	0.20	1.3	0.05	0	—

な体重増加を示し、24時間後においては Mg, Na, K 液の場合は何れも前と同様に著しく急速な体重増加傾向を示しているが、これらに対して Ca 液の場合は全例とも腹水の貯留は認められず、従つて対照の場合の体重増加曲線と殆んど一致した体重推移を示していることが認められる。なお Mg, Na, K 液の3者間の体重増加状況には著しい相異を認めないが、各経過時間段を通じて K 液の場合が Mg, Na 液に比して体重増加が若干著しいようである。

2. 腹水量

前と同様に各液別及び各時間段階別に各群4例について腹腔内に移植し、移植後14日目に癌細胞増殖により生じた腹水を全て採取して比較すれば表1に示す如くである。Mg, Na, K 液の場合は何れも各時間段階とも平均腹水量は10cc前後であり、体重1g当り腹水量は0.3~0.4ccであり3者間に明かな差は認められない。これらに対し Ca 液の場合はその趣を異にし、希釈混和の30分後においては平均腹水量は約9ccで他の場合と大差ないが、6時間後においては5.7ccであり、12時間後においては1.3ccで極めて少く、体重1g当り腹水量は0.05ccで甚だ少い。24時間後においては全例とも腹水は全く認められない。

3. 生存期間

同様にして各液別及び各時間段階別に各群4

表2 生存期間 (日数)

		30分後	6時間後	12時間後	24時間後
Mg 液	1	17	19	20	21
	2	19	19	21	21
	3	19	20	21	21
	4	19	21	22	22
	5	—	—	—	22
	平均	18.5	19.8	21.0	21.8
Na 液	1	20	18	17	21
	2	20	19	18	21
	3	21	19	19	22
	4	21	20	19	22
	5	—	—	—	23
	平均	20.5	19.0	18.3	21.8
K 液	1	17	18	16	19
	2	18	19	18	20
	3	19	19	19	21
	4	19	21	19	21
	5	—	—	—	21
	平均	18.3	19.3	18.0	20.4
Ca 液	1	21	23	27	60(生存)
	2	23	24	29	60(生存)
	3	23	25	60(生存)	60(生存)
	4	24	26	60(生存)	60(生存)
	5	—	—	—	60(生存)
	平均	22.8	24.3	—	60(生存)

~5例に Ehrlich 癌を腹腔内に移植して同一環

境条件で飼育し、その後の生存期間を比較観察すれば表2に示す如くである。概してMg, Na, K, Caの各液の場合とも希釈混和後の時間的経過が長いほど生存期間が若干延長する傾向が窺われるが、各液別にみるとCa液の場合は全く例外的であり、この場合は他に比して30分後においては約4日、6時間後においては約5日生存日数が延長しており、さらに12時間後においては半数、24時間後においては全例が長期にわたって生存を続け60日後も全く健康の状態であり、何れも剖検上癌の罹患所見は認められな

表3 皮下腫瘍の大きさ
(縦横径平均mm, 実験14日目)

		30 分 後	24 時 間 後
対 照	1	28.5	8.5
	2	33.0	12.0
	3	33.0	11.0
	平均	31.5	10.5
Mg 液	1	38.5	13.5
	2	37.0	12.0
	3	41.0	13.5
	4	42.0	13.5
	平均	39.6	13.1
Na 液	1	29.0	10.5
	2	29.5	9.5
	3	31.5	12.5
	4	30.0	10.5
	平均	30.0	10.7
K 液	1	31.5	8.0
	2	36.0	14.5
	3	32.5	10.5
	4	35.5	13.0
	平均	33.8	11.5
Ca 液	1	7.5	0
	2	10.0	0
	3	8.0	0
	4	10.0	0
	平均	8.8	—

った。なおMg, Na, K液の3者間の生存状況には明らかな差を認め難いが、強いてその差を見出すならば、K液の場合はやや生存期間が短縮の傾向にあるようである。

Ⅱ 腹部皮下移植による腫瘍の発育

Ehrlich 癌細胞の各電解質希釈混和液別に希釈混和後30分及び24時間後に各群4例について腹部皮下組織にこの各希釈混和液0.2cc注射移植し、実験開始後14日目の発育した腫瘍の大きさは表3のようである。この場合の対照は採取した腹水そのままのものであり、腫瘍は縦横径の平均を以つてその大きさとした。表示の如く発育したEhrlich癌の固型腫瘍の大きさは30分後においてはMg, Na, K液の場合は何れも30~40mmで対照の場合と殆んど同様であるが、Ca液の場合は9mmで明かに小さく、24時間後においては(図3参照)Mg, Na, K液の場合は何れも10~13mmで対照の場合と殆んど差異はないが、Ca液の場合は移植した際の注射針の痕跡を認めるのみで腫瘍の所見は全く認められない。

Ⅲ 細胞学的検討

Ehrlich 癌細胞の各電解質希釈混和液別並びに希釈混和後の時間的経過段階別に作製したEhrlich癌細胞の塗抹標本についての観察所見は表4に示す如くである。その際のEhrlich癌細胞の観察にあたっては、主として細胞の核、原形質及び細胞分裂や細胞活性の程度としての細胞集団の3つの点を指標として比較検討した。なお対照及びMg, Na, K, Caの各液の場合の希釈混和後12時間における細胞学的所見は図4~8に示した。

対照の場合(動物より採取した腹水をそのまま塗抹染色したもの)は各時間的経過を通じて何れも癌細胞の核及び原形質の変性は殆んどなく、細胞分裂による細胞集団は中等度に存在し総じて明かな変化は認められない(図4参照)。

Mg及びNa液の場合は概して時間的経過を追って細胞の核及び原形質は軽度の変性が認めら

表4

Ehrlich 癌細胞の変性の程度

		30 分 後	6 時間 後	12 時間 後	24 時間 後
対 照	核 変 性	—	—	±	—
	原 形 質 変 性	—	—	±	—
	細 胞 集 団	+	+	+	+
Mg 液	核 変 性	—	—	±	±
	原 形 質 変 性	+	+	+	±
	細 胞 集 団	—	—	+	±
Na 液	核 変 性	+	+	+	+
	原 形 質 変 性	+	+	+	+
	細 胞 集 団	—	—	+	+
K 液	核 変 性	—	—	—	—
	原 形 質 変 性	—	—	—	+
	細 胞 集 団	±	—	—	+
Ca 液	核 変 性	±	+	+	+
	原 形 質 変 性	+	+	+	+
	細 胞 集 団	+	+	—	—

れるが、細胞集団は12~24時間後においては却つてほぼ中等度に認められるので全体としての変性の程度は対照の場合と大差ないと言い得よう(図5, 6参照)。

K液の場合は細胞集団は極く軽度に認める程度であるが、細胞の核及び原形質の変性は殆んど認められず、しかも時間的経過による変性の変動も明かかでなく、概して対照の場合と相違がない(図7参照)。

これらに対してCa液の場合は全く異り、時間的経過を追つて明かに細胞の核は萎縮或いは星状変形し、原形質は崩壊或いは融解消失し、何れも高度な変性に陥り、特にこれは12, 24時間後において著明である。細胞集団は30分後、6時間後においては軽度に認められるが、12, 24時間後においては認められない。しかしてCa液の場合は他に比して癌細胞は特異的に強度な変性から崩壊にいたる障害を来することが認められた(図8参照)。

考 按

癌に対する電解質の影響を検索する目的でEhrlich癌細胞に及ぼすMg, Na, K, Caの各電解質の単独直接作用をみるため、Ehrlich癌細胞を各電解溶液で直接希釈混和した、いわばEhrlich癌細胞浮游液を作り、これを作用時間段階ごとに動物の腹腔、皮下組織に移植して発育を比較検討し、同時にそれぞれについて作製した塗抹染色標本によりEhrlich癌細胞を形態学的に比較観察した。

その結果は以上の実験成績の如く、Ehrlich癌発育に対してKはやや促進的に影響を及ぼすようであるがその程度は著しいものではなく、Mg及びNaの影響は明かでない。これらに対してCaは癌細胞に特異的な作用を及ぼし、増殖ないし移植性を極度に抑制し、遂には移植性を完全に阻止することが明かにされた。さらに細胞学的にはMg, Na, Kの場合には概してEhrlich癌細胞の核及び原形質の変性は軽度であり細胞集団も中等度に存在しており、何れも対照の場

合と大差なく、総じて Mg, Na, K の影響は殆んどないと言えよう。Ca の場合は癌細胞の核は萎縮変形し、原形質は崩壊消失して著しい障害を来すことが認められた。

従つて Ca が Mg, Na, K とは全く異つて Ehrlich 癌細胞に対して特異的に直接阻害作用を及ぼすことは in vivo 及び in vitro の実験から一致して認められることであり、疑いない事実と考える。

しかして癌と Ca に関する若干の文献的考察をなすならば、水野¹⁶⁾は子宮癌患者の血清 Ca 量は低下し、柳沢^{17, 18)}は癌患者の血清中の透析性 Ca は減少し Mg は増加しており、またダイコクネズミに吉田肉腫を移植してその腹水を分析して透析性 Mg は増加して透析性 Ca に比し高値であり、岸等¹⁹⁾は肝癌組織は正常肝に比して Mg が増加し Ca が減少していることを認めており、さらに水野²⁰⁾は azo 色素による実験的肝癌発生は Ca 塩投与により抑制され、この場合の肝の Ca 量は比較的多いことを認めている。最近、笹子、²¹⁾楠等²²⁾は Ca ion 水と歯牙、歯髓組織に関する研究に端を発して Ehrlich 腹水癌、吉田肉腫の移植動物は Ca ion 水の注射又は飲用により生命延長を来すことを明かにし、さらに Ehrlich 癌細胞が Ca ion 水により破壊されることを電子顕微鏡的に観察し、谷川等²³⁾は Ehrlich 癌発育に対し Ca は抑制的であるが Mg の作用は明かでないことを実験的に認めている。

このように少くも実験的に癌に対して Ca が抑制的影響を及ぼすということは諸家の一致した見解と言えよう。しかしその本態については未だ明確にされていない。水野²⁰⁾は実験的肝癌発生の研究から、Ca は癌性変化に転じた後の発展を抑制する作用よりはむしろ癌先行性初期変化である炎症性変化やこれに続発する異常細胞増殖を抑制するものであらうと述べ、一方、Sevag 等²⁴⁾は Streptococci から抽出した核蛋白は酸を作用させると Ca 塩によつて沈澱をおこし、Schneider²⁵⁾は肝臓からの核蛋白は CaCl₂

溶液で沈澱物を生ずると報告している。われわれは先の Ca と酵母に関する実験³⁾から Ca は癌細胞増殖過程にある核蛋白合成に阻害的影響を及ぼすものと推定した。これらと今回の実験、特に細胞学的検討の結果からあわせ考えると現在の段階では Ca は癌細胞に対して細胞膜透過性に変化を及ぼし、さらに原形質、核を構成する核蛋白或は核蛋白分子凝集などの侵襲作用を及ぼすのであらうと類推される。しかしこれが癌細胞において特異的にみられるものであるか、癌細胞の破壊過程における染色体、核酸の変遷、各イオン間の相互作用などについては今後の多くの検討にまたねばならない。

何れにせよ Ca が癌に対して抑制的作用を及ぼすことは実験的に明かである。この事実を直ちにヒトの場合にあてはめることは早計であるが、癌患者の血清 Ca 量は低下していることは水野、¹⁶⁾ 柳沢¹⁷⁾ その他の多くの研究者によつて認められており、更には癌と土壤或は地質に関する疫学的研究面において、われわれははじめに述べたように癌に対する Ca の抑制作用を推論し、¹⁾ Diehl²⁶⁾ は石灰石、砂地の地域は胃癌が少く、Stochs²⁷⁾ はカルシウム地帯に胃癌は少く、北川²⁸⁾ は「H 値が酸性で相対的に Ca より Na の値の大なる地域（第 3, 4 紀層）は癌死亡高く、pH 値が中性～塩基性で相対的に Ca が Na より大なる地域（古生層、火山岩）は癌死亡低いことを明かにし、更に野瀬等²⁹⁾ は実際に詳細に飲料水の成分と癌発生頻度との関係を検討して全く同様の関係あることを認めており、癌と Ca との関係は疫学的研究者の示唆するところである。

従つて癌と Ca の関連性は癌予防の見地から見逃し得ない興味ある今後の大きな課題であらうと考える。

要 旨

Ehrlich 癌細胞に対する Mg, Na, K, Ca の

各電解質の直接作用をみるため、各電解質溶液による Ehrlich 癌細胞浮游液を作り、これを用時間段階ごとにマウスの腹腔、皮下組織に移植して発育状況を検討し、同時にそれぞれの浮游液についての塗抹染色標本を作つて癌細胞の形態を比較検討した。

Ehrlich 癌細胞発育に対してKはやや促進的であるがその程度は顕著でない。Mg及びNaの影響は認められない。これらに対してCaはEhrlich 癌の増殖ないし移殖性に著しい阻害作用を及ぼすことが認められた。

さらに細胞学的にはMg, Na, KによつてはEhrlich 癌細胞は殆んど影響を及ぼさないが、Caにより細胞の核は萎縮変形し原形質は崩壊消失して顕著な変性に陥ることを認めた。

なおかかる癌細胞に対するCaの特異的な抑制作用の本態について考究し、さらに疫学的見地から癌とCaの関連性を論及し、癌に対するCaの影響の重要なことを指摘した。

(本論文の要旨は昭和35年11月第6回北関東医学会総会において発表した)

文 献

- 1) 箕輪真一, 高橋熙内他 : 日本医事新報, No. 1875 : 13, 1960.
- 2) 箕輪真一, 高橋熙内他 : 医学と生物学, 54(4) : 158, 1960.
- 3) 箕輪真一, 高橋熙内他 : 医学と生物学, 57(1) : 39, 1960.
- 4) 佐藤徳郎, 福山富太郎他 : 日本医事新報, No. 1835, : 25, 1959.
- 5) T. Sato, T. Fukuyama et al : Bull, Inst, Pub, Health, 8(1) : 10, 1959.
- 6) 佐藤徳郎, 福山富太郎他 : 総合医学, 16(11) : 1087, 1959.
- 7) 佐藤徳郎, 福山富太郎他 : 総合医学, 17(8) : 619及び17(9) : 699, 1960.
- 8) 箕輪真一, 高橋熙内他 : 医学と生物学, 54(5) : 185, 1960.
- 9) 箕輪真一, 松山研二他 : 北関東医学誌, 10(6) : 68, 1960.
- 10) 箕輪真一, 高橋熙内他 : 医学と生物学, 58(6) : 180, 1961.
- 11) 高橋熙内, 箕輪真一他 : 医学と生物学, 58(6) : 192, 1961.
- 12) 小山八郎 : 大阪医学誌, 6(4) : 349, 1954.
- 13) 山本正他 : 実験動物集報, 5(5) : 50, 1956.
- 14) W. W. Umbereit, R. H. Burris, J. F. Stauffer : Manometrie Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism, Burgess Publishing Co. Minneapolis, : 149, 1957.
- 15) F. Hesse : Zentr, Bakterial, Parasitenk, Abt, I, Orig, 102 : 367, 1927, 小川, 吉田編 : 基礎医学最近の進歩 解剖病理篇(Ⅱ) : 233 医歯薬出版, 1958より引用.
- 16) 水野潤二 : 産婦人科紀要, 20(9) : 1695, 1937.
- 17) 柳沢文正 : カルシウムおよびマグネシウム新定量法と代謝, 文光堂, 1955.
- 18) 柳沢文正他 : 日本臨床, 12(5) : 481, 1954.
- 19) 岸三二他 : 癌, 31 : 1, 1931.
- 20) 水野潤二 : 産婦人科紀要, 20(12) : 2299, 1937.
- 21) 笹子信一 : 歯科月報, 29(1) : 51, 1955.
- 22) 楠 正夫, 笹子信一 : 歯科月報, 29(2) : 26, 1955.
- 23) 谷川久治他 : 日本公衛誌, 7(9) : 783, 1960.
- 24) M. G. Sevag, J. Smolens : J. Biol, Chem, 140, : 833, 1941.
- 25) W. C. Shneider : J. Biol, Chem, 166 : 595, 1946.
- 26) J. C. Diehl et al : First Report on the geographical and geological Distribution of Carcinoma in the Netherlands, Leiden, 1953. 瀬木三雄他 : 癌の臨床, 3(7) : 821, 1957より引用.
- 27) P. Stocks : Cancer, 3 : 156, 1958. Butterworth, London.
- 28) 北川良雄 : 山口医学, 6(3) : 280, 6(4) : 436. 1957, 及び 7(6) : 836, 1958.
- 29) 野瀬善勝, 北川良雄他 : 日本公衛誌, 7(9) : 780, 1960.

Effects of Various electrolytes on Ehrlich's Cancer Cell,
Especially Inhibitory Action of Calcium.

Shinichi MINOWA

Gunma-Chiuo-Sogo Hospital

Department of Public Health, School of Medicine, Gunma University

Hirouchi TAKAHASHI

Gunma-Chiuo-Sogo Hospital

Kenji MATSUYAMA

2. Department of Pathology, School of Medicine, Gunma University

In order to investigate effects of electrolytes on cancer, Ehrlich's cancer cells were suspended in electrolyte solution of Magnesium, Natrium, Kalium and Calcium, and after various hours of incubation, each suspension was intraperitoneally injected into mice or subcutaneously inoculated in the their abdomen to observe the growth of the cells. Also histological samples were prepared from each suspension for cytological observation.

Calcium was found to act rather acceleratively on the growth of Ehrlich's cancer cells, but no effects of Magnesium and Natrium were observed. In contrast to these, Calcium was recognized to exert inhibitory action both on proliferation and metastasis of Ehrlich's cancer cells.

Also histological observation revealed scarcely any conspicuous effect of Magnesium, Natrium and Kalium on the cells, whereas pyknosis and destruction or almost all depletion of cytoplasm was shown after incubation with Calcium.

Also investigation was performed on the mechanism of specific inhibitory action of Calcium upon Ehrlich's cancer, and further on relationship between Calcium and cancer from epidemiological standpoint, to elucidate important effect Calcium on cancer.

図3 皮下移植による腫瘍の発育 (14日目)

図6 Na 液 の 場 合

図4 対 照

図7 K 液 の 場 合

図5 Mg 液 の 場 合

図8 Ca 液 の 場 合