

抗癌剤による癌細胞の形態変化と細胞動態に関する研究：
担癌マウスに対する抗癌剤投与における癌細胞の形態変化と細胞動態について

| | |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード: 作成者: 五嶋, 亜男 メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8795 |

抗癌剤による癌細胞の形態変化と細胞動態に関する研究

——担癌マウスに対する抗癌剤投与における癌細胞の
形態変化と細胞動態について——

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任：服部 絢一教授)

五 嶋 重 男

(昭和54年10月9日受付)

本論文の要旨は、日本臨床細胞学会第17回(昭和51年)、第18回(昭和52年)及び第19回(昭和53年)総会において報告した。

癌細胞の増殖動態は、種々の要因によって流動的に変化するが、細胞周期の時期によっては、癌細胞の抗癌剤に対する感受性に差異があり、このことが薬剤の効果左右する重要な因子の一つともなっている^{1)~3)}。

一方、諸要因によって惹起される細胞変性にもなる核の形態学的変化については、多数の報告がみられているが^{4)~13)}、変性過程における核構造の変化を、癌細胞の増殖動態、あるいは核構成成分である DNA、RNA またはヒストンなどの生化学的及び細胞化学的測定結果と相関せしめた研究^{14)~16)}は、比較的少ないようである。Di Marco らは HeLa 細胞などの培養系¹⁷⁾及び AH130 などの担癌動物において¹⁸⁾、daunorubicin による核小体の変化と RNA 含量の低下について報告し、鶴沼ら¹⁹⁾²⁰⁾も actinomycin D と *in vitro* で接触した癌細胞における核 RNA の消長とともに電顕的に核小体の顆粒成分の変化について観察している。また、吉田²¹⁾は細胞化学的ならびに生化学的手法で測定した Ehrlich 癌細胞の DNA 量と形態学的所見の比較検討を行ない、癌細胞の変性過程にあらわれる核構造の異常に注目している。

最近、当教室において急性白血病患者の寛解導入に adriamycin の間歇大量投与がきわめて効果的であり、また本症例において流血中白血球細胞の特徴的な形態変化、とくに核構造の異常が認められたことから、担癌生体に諸種の抗癌剤を投与した場合における癌細胞の増殖動態の様相と細胞像とくに核小体の異常形態

の出現との関係について一連の比較検討実験を行なった。

実験材料および方法

1. 動物

全実験を通じ、体重約 25g (5~6 週令)の dd 系雄性白色マウス (静岡実験動物)を使用した。

2. 腫瘍

金沢大学がん研究所化学療法部で継代保持されている Ehrlich 腹水癌の分与をうけ、実験に供した。

3. 抗癌剤ならびに薬液の調製

本実験に供用の抗癌剤としては、表 1 にみられるように生化学的作用特異性²⁾、あるいは殺細胞作用様式²²⁾²³⁾においてそれぞれ特徴ある薬剤を選択した。すなわち、殺細胞作用からみて濃度依存性薬剤としてアルキル化剤 cyclophosphamide (CPM, 塩野義製薬)、抗生物質 adriamycin (ADR, 協和醗酵工業)及び daunorubicin (DNR, 明治製薬)、また時間依存性薬剤として代謝拮抗剤 cytosine arabinoside (Ara-C, 日本新薬)及び有糸分裂毒 vincristine (VCR, 塩野義製薬)などである。これらの抗癌剤は実験に供用する直前、生理食塩水に溶解せしめて所定濃度液に調製した。

4. Ehrlich 癌細胞浮遊液の調製

約 2×10^6 個の Ehrlich 癌細胞 (以下エ癌細胞と略す)を腹腔内移植した担癌マウスから 1 週間後に癌性

Changes in Morphology and Cell Kinetics of Cancer Cells Treated with Anti-cancer Drugs in Mice Tsuguo Goshima, Department of Internal Medicine (III) (Director : Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

Table 1. Anticancer agents used in this study.

| Group | Common name | Abbreviation | LD ₅₀ in mice (mg/kg, ip) | Biochemical characteristics | Mode of action in cytotoxicity* |
|------------------|----------------------|--------------|--------------------------------------|---|---------------------------------|
| Alkylating agent | Cyclophosphamide | CPM | 432 | Deletion of DNA function | Concentration dependent |
| Antibiotic | Adriamycin | ADR | 13.7 | Inhibition of DNA and RNA syntheses | Concentration dependent |
| | Daunorubicin | DNR | 3-4 | | |
| Antimetabolite | Cytosine arabinoside | Ara-C | 10,000 | Inhibition of DNA synthesis | Time dependent |
| Mitotic poison | Vincristin | VCR | 2-3 | Inhibition of mitosis and RNA synthesis | Time dependent |

* According to Shimoyama *et al.*

腹水を採取し、これに生理食塩水を加え、生細胞 2×10^7 個/ml となるように希釈調製した。なお、生細胞数は erythrosin B 色素排除試験によって算定した。

5. 抗癌剤の投与

エ癌細胞 5×10^6 個を健康マウス腹腔内に移植し、移植5日後の担癌マウスを1群の平均体重が均等となるよう random に群別し、被検抗癌剤の所定量をマウス腹腔内に1回だけ投与した。抗癌剤の投与量は、それぞれの薬剤の LD₅₀ をもとにして算出し、大量、中等量及び少量の3段階とした。すなわち、CPM は 400 mg/kg、100 mg/kg 及び 20 mg/kg、ADR は 10 mg/kg、2 mg/kg 及び 0.2 mg/kg、DNR は 5 mg/kg、2 mg/kg 及び 0.2 mg/kg、Ara-C は 125 mg/kg、25 mg/kg 及び 5 mg/kg、また VCR は 3 mg/kg、1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg である。なお、対照群マウスには抗癌剤の代わりに生理食塩水を腹腔内投与した。

6. 抗癌剤投与後における腹水癌細胞の経時的形態観察

1) 染色標本についての光学的顕微鏡による観察：担癌マウスに薬剤を投与後、3、6、12、24、48 及び 72 時間に腹水を採取し、塗抹固定標本作製した。それぞれの標本については、Giemsa 染色及び Walter-Reed-Army-Hospital 変法による Papanicolaou 染色を施し、またとくに核小体 (nucleolus) の形態観察のため、Bouin 固定液で処理後、Mann 染色を施してから光顕的に細胞の形態観察を行なった。

2) 位相差顕微鏡による観察：各時間ごとに採取した腹水について薄層標本作製し、ただちに位相差顕微鏡(日本光学製、対物レンズ dark medium $\times 40$ 、 $\times 100$ 、緑色フィルター)下で観察、ネオパンFを使用して撮影した。

7. 腹水中の総癌細胞数、分裂指数及び死細胞率の測定

1) 総癌細胞数の測定：Ehrlich 腹水癌細胞 5×10^6 個を移植したマウス 200 匹を random に分別し、1薬剤、1用量につき 50 匹を1群とした。移植5日後に実験群マウスには所定量の抗癌剤を、対照群マウスには生理食塩水をそれぞれ腹腔内投与した。薬剤投与後 3、24、48 及び 72 時間にそれぞれ 10 匹宛のマウスを屠殺、開腹後、駒込ピペットを用いて癌性腹水を吸出し、ついで生理食塩水で腹腔内を十分に洗滌して全細胞を集め、室温下で生理食塩水を加えて一定容量とした。この癌細胞浮遊液 0.2 ml に Isoton II 液 (balanced electrolyte solution) 19.8 ml を加えて希釈し、ただちに Coulter Counter 装置 (米国 Coulter Electronics 社、ZB1 型) によって計測し、腹腔内癌細胞総数を算出した。

2) 分裂指数 (Mitotic Index, M.I.) の測定：総癌細胞数測定実験の際、癌性腹水の1滴をとり、Giemsa 染色塗抹標本作製した。1枚の標本について 2000 個の癌細胞を観察し、分裂期細胞数と総細胞数の比から M.I. を算定した。

3) 死細胞率の測定：薬剤投与群及び対照群マウスから各所定の時間ごとに採取した癌性腹水1容を erythrosin B 液9容で希釈後、ただちに Bürker-Türk 血球計算板を用いて計数した。すなわち、200 個の癌細胞のうち、erythrosin B によって染色された細胞を死細胞と判定し、死細胞数と総細胞数の比によって死細胞率を算出した。

8. エ癌細胞における ³H-thymidine 及び ³H-uridine のとりこみ実験

エ癌細胞の腹腔内移植マウスを1群3匹宛、実験群3群及び対照群1群の計4群に分別し、薬剤投与前及

び投与後3, 12, 24, 48及び72時間にそれぞれ腹水を0.5~1mlずつ採取し, Eagle's MEM培地(組織培養用, 日水製薬)によって癌細胞を3回洗浄(800rpm, 10分)した. 洗浄癌細胞は20%仔牛血清加MEM培地に浮遊させ, 1×10^6 個/ml濃度の癌細胞浮遊液を調製した. 次に1検体につき, 6本のゴム栓付小試験管を用意し, これに1ml宛前記癌細胞浮遊液を分注し, 3本の試験管には ^3H -thymidine(以下 ^3H -TdRと略す, 5.0 Ci/mmole, 第一化学)を, また残り3本には ^3H -uridine(以下 ^3H -URと略す, 5.0 Ci/mmole, 第一化学)をそれぞれ $1\mu\text{Ci}$ 宛添加し, 37°C でふ置した. 60分後, 反応液はただちに氷水で急冷し, 常法に従ってGlass fiber filter(Whatmann GF/C, 2.5cm)で濾過した. フィルター上の細胞は冷生理食塩水で2回, 冷5%トリクロール酢酸及びエタノールエーテル混液(3:1, v/v)でそれぞれ3回宛洗浄後, 風乾せしめた. 乾燥後のフィルターは, シンチレーター(PPO×トルエン)入りのバイエル瓶に移入し, 液体Scintillation system(Beckman LS-200B)によって放射活性の測定を行なった.

9. DNA 瞬間自動測定装置, Flow Microfluorometry (F.M.F.)による解析実験

Ehrlich 腹水癌細胞 2×10^6 個を腹腔内移植した dd マウスに対し, 移植5日後に所定量の抗癌剤を1回腹腔内に投与し, 以後6, 24, 48及び72時間と経時的に腹水を採取した. 癌細胞はリン酸塩緩衝食塩水(PBS, pH 7.2)で3回洗浄(800rpm, 5分)後, PBSに浮遊せしめて約 1×10^7 個/ml濃度の癌細胞浮遊液を調製した. 上記癌細胞浮遊液1容に Propidium iodide 溶液(0.1% Sod.citrate 溶液に Propidium iodide を0.05 mg/ml濃度に溶解せしめたもの)9容を加え, 4°C 下, 暗所で20分間染色後, 米国 Bio/Physics 社製 Cytofluorograph, SystemB によって細胞1個当りの相対的DNA量を測定し, 細胞集団のDNA量の分散分布をヒストグラムとして表現した.

10. 担癌マウスに対する抗癌剤1回投与による延命効果

Ehrlich 腹水癌細胞 5×10^6 個を dd 系マウスの腹腔内に移植し, 癌性腹水の貯溜が明らかに認められる5日後に, 担癌マウスを1群7匹宛に群別した. 抗癌剤の投与は2段階用量で行なった. すなわち, CPMは400 mg/kg及び20 mg/kg, ADRは10 mg/kg及び0.2 mg/kg, DNRは5 mg/kg及び0.2 mg/kg, Ara-Cは125 mg/kg及び5 mg/kg, またVCRは3 mg/kg及び0.3 mg/kgをそれぞれ, 癌移植5日後の

マウス腹腔内に1回だけ投与し, 対照群マウスには生理食塩水を1回腹腔内投与した. 以後40日間全動物の生存状態を観察し, 効果判定は動物の生存日数中間値(Median survival time, MST)及び40日後の生存動物数によって判定した.

実験成績

Ehrlich 腹水癌細胞を移植した担癌個体において, 腹腔内癌細胞が対数的に増殖している時期, 換言すれば Skipper ら¹¹のいう増殖分画(Growth fraction)の高い時期に抗癌剤を投与した場合, 腹腔内癌細胞にみられる形態学的変化, とくに核小体の変化が, 癌細胞集団の量と分裂指数, 核酸合成における前駆物質のとりこみ, 細胞回転の動態, あるいは担癌個体の延命とどのように相関するかを生化学的作用性において異なる抗癌剤の種類別に比較検討した.

I. 諸種抗癌剤投与後における総癌細胞数及び分裂指数の経時的変化

1. CPM: 図1は担癌マウスにCPMを投与した場

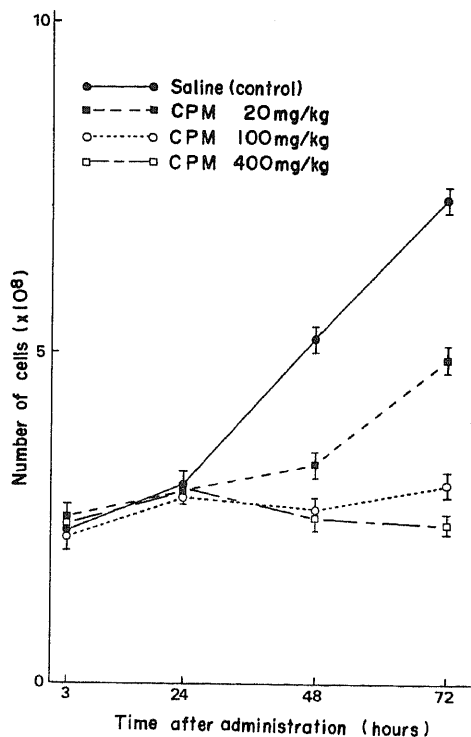


Fig. 1 Total tumor cell count in ascitic fluids of Ehrlich carcinoma bearing mice after treatment with cyclophosphamide (CPM)

合、経時的に測定した総癌細胞数の変化を示したものである。エヒリヒ癌細胞 5×10^6 個をマウスの腹腔内に移植すると、5日後の総癌細胞数は約100倍、 $3 \sim 5 \times 10^8$ 個に増加している。この時期に生理食塩水を腹腔内投与しても、細胞数は減少することなく増加し、24時間後ではわずかの増加に止まるが、48時間後で約2倍程度の増加、72時間後でさらに増加の傾向がみられ、その増殖は24時間以降ほぼ直線的に示された（対照群）。同様の条件下でCPMを400 mg/kg、100 mg/kg及び20 mg/kgの用量でそれぞれ1回だけ腹腔内投与すると、3時間及び24時間後の総癌細胞数は対照群のそれとほぼ同じ経過を示すが、48時間後ではCPMの用量に応じて不変、または減少しており、明らかにdose responsiveであった。しかし72時間後に至ると、少用量の20 mg/kg投与群では、急速な細胞増殖が認められ、細胞数の著しい増加がみられた。

一方、分裂指数については、図2に示されるように、CPM 20 mg/kg投与群で24時間後まではとくに変化はみられず、1%前後であったが、48時間後において約2.3倍の高率を示し、以後対照群と同様、定常状態がみられた。このことは総癌細胞数が48時間後から急速に増加し、72時間後に最高値を示していることと符合しているものと思われる。これに対し、100 mg/kg投与群では、投与3時間以後、時間の経過とともに減少する傾向にあり、また400 mg/kg投与群では、3時間後ですでに著しい低下がみられ、以後増大することなく、72時間後で0.25%程度であった。

2. ADR: ADRの3段階用量、すなわち10 mg/kg、2 mg/kg及び0.2 mg/kgをそれぞれ担癌マウスに1回腹腔内投与した場合、総癌細胞数の経時的変化

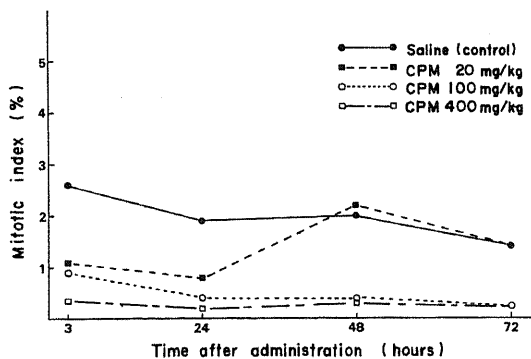


Fig. 2 Variations in mitotic index of Ehrlich ascites carcinoma cells after treatment with cyclophosphamide (CPM)

を示したのが図3である。ADR 0.2 mg/kg投与群では、まったく対照群と同様、ほぼ直線的に細胞数の増加がみられ、72時間後に約2倍強の細胞増加がみられた。2 mg/kg及び10 mg/kg投与群では、増殖抑制度において両者間に若干の差異はあるが、総癌細胞数における増加はまったくみられず、むしろ経時的に減少の傾向が認められた。

分裂指数については図4にみられるように、ADRの0.2 mg/kg投与群では、対照群の変動とはほぼ一致した経過がみられ、24時間後に対照群を超える高値3.2%を示し、以後漸減した。2 mg/kg及び10 mg/kg投与群では、3時間後ですでに0.1%程度となり、その後もほとんど増加することなく低率が持続された。

3. DNR: 化学構造がADRに近似しているDNRは、毒性の点でADRに劣るが、抗腫瘍活性ならびに作用特性については、ADRとほとんど同様であるといわれている²⁴⁾。従つて担癌マウスにそれぞれ0.2 mg/kg、2 mg/kg及び5 mg/kgのDNRを投与した場合の腹水中癌細胞集団の動態（総癌細胞数及び分裂指数）

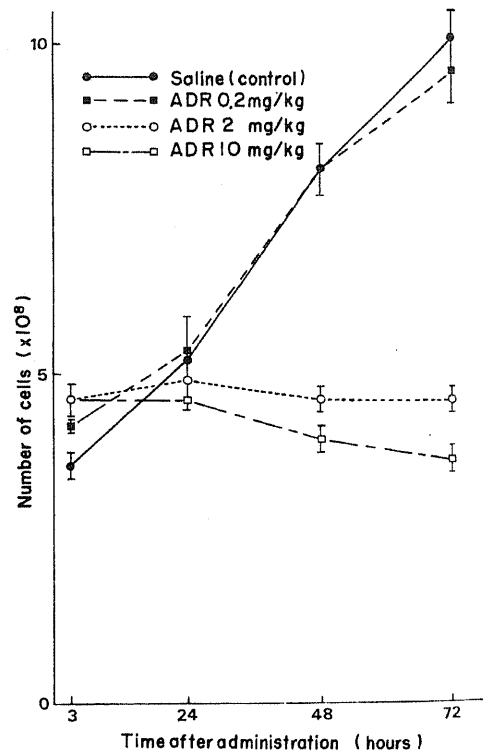


Fig. 3 Total tumor cell count in ascitic fluids of Ehrlich carcinoma bearing mice after treatment with adriamycin (ADR)

については、ADR 投与における場合とほとんど類似の
パターンとして認められ(図5及び図6)、2 mg/kg以
上の用量で、少なくとも72時間後に至るまでは、明ら
かに細胞増殖の抑制が認められた。

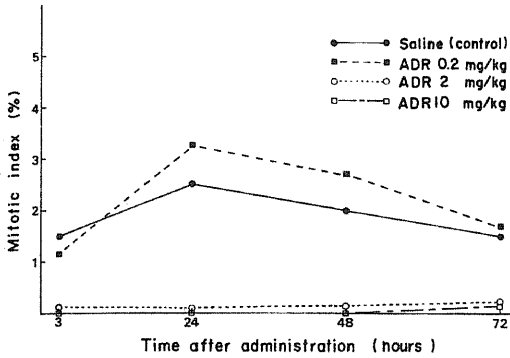


Fig. 4 Variations in mitotic index of Ehrlich ascites carcinoma cells after treatment with adriamycin (ADR)

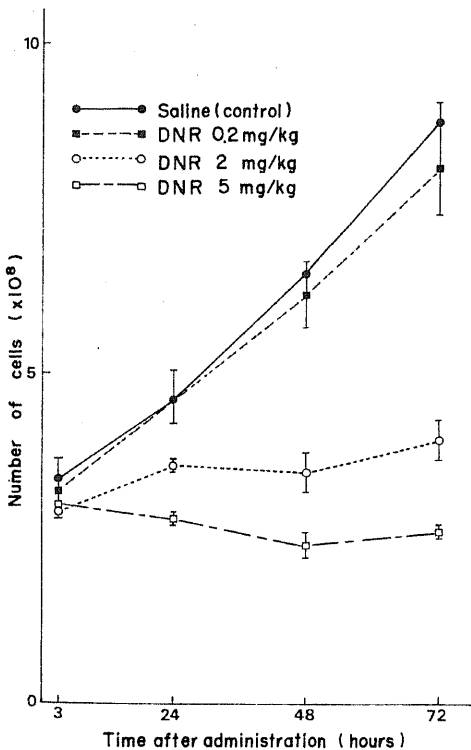


Fig. 5 Total tumor cell count in ascitic fluids of Ehrlich carcinoma bearing mice after treatment with daunorubicin (DNR)

4. Ara-C: 典型的に schedule dependent である
抗癌剤 Ara-C については、125 mg/kg、25 mg/kg 及
び 5 mg/kg の 3 段階用量で検討した。Ara-C 投与後
48 時間までの細胞増殖抑制は既述の CPM, ADR な
どと類似したが、48 時間以後については、CPM 及び
ADR の場合と異なり、25 mg/kg 投与群はもとより
125 mg/kg 投与群においても、増殖回復の傾向が認め
られた(図7)。

また分裂指数については、全群が3時間後で対照群
よりはるかに低いが、48時間以後において明らかに
増加傾向を示し、とくに少・中等量群の72時間値は対
照群とほぼ同程度を示した(図8)。このことは癌細胞
集団における増殖分画の増大を裏づけるものである。

5. VCR: VCR の場合もまた投与後 24 時間まで
は、投与量に比例した総癌細胞数の減少が一時的に認
められたが、24 時間以後は時間の経過とともに漸増
の傾向が示された(図9)。

一方、VCR 投与による分裂指数の変動はきわめて
特徴的に示された。すなわち、投与量のいかにわか
らず、24 時間後において最高値を示し、以後時間の
経過とともに急速に減少し、72 時間後にほとんど正
常に復した(図10)。24 時間後にみられたこの分裂期
細胞の増加は、分裂中期 (metaphase) の細胞数の増
加、すなわち VCR による metaphase arrest が誘導さ
れたものと思われる。

II. 諸種抗癌剤投与後における腹水癌細胞の経時的 形態観察

1. 位相差顕微鏡による観察

1) CPM: 生理食塩水を投与した対照群では、細胞
像とくに核小体における経時的変化はほとんど認めら
れなかった。CPM 投与群の投与6時間までは、用量の

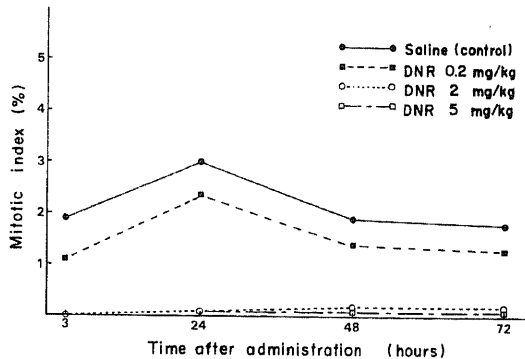


Fig. 6 Variations in mitotic index of Ehrlich ascites carcinoma cells after treatment with daunorubicin (DNR)

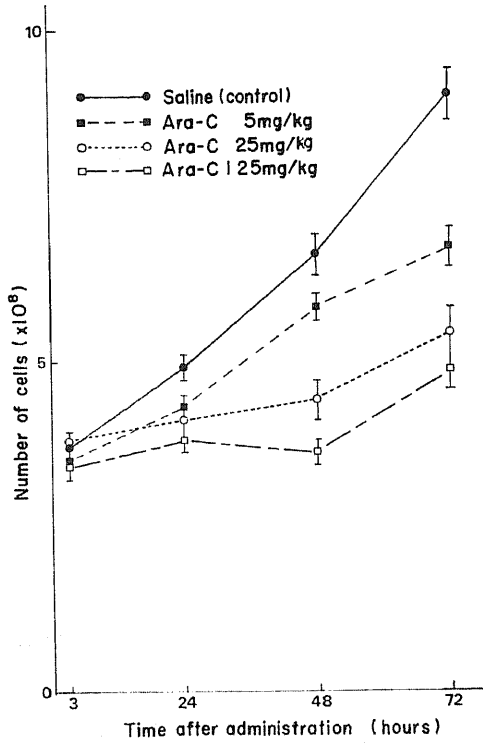


Fig. 7 Total tumor cell count in ascitic fluids of Ehrlich carcinoma bearing mice after treatment with cytosine arabinoside (Ara-C)

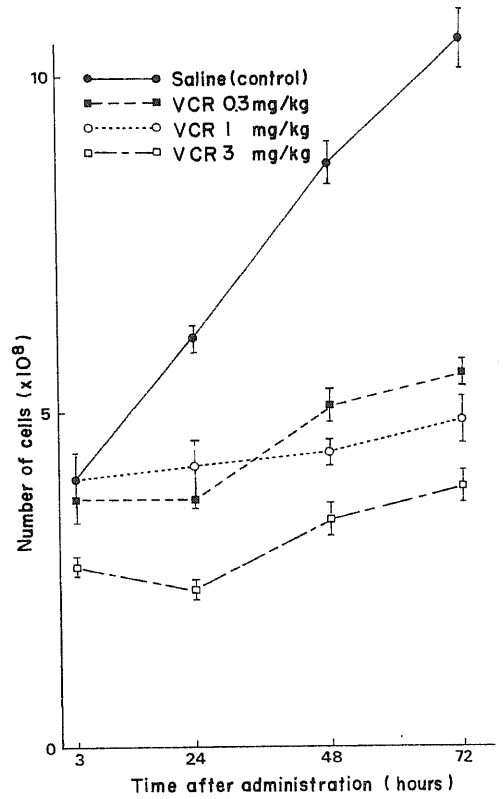


Fig. 9 Total tumor cell count in ascitic fluids of Ehrlich carcinoma bearing mice after treatment with vincristine (VCR)

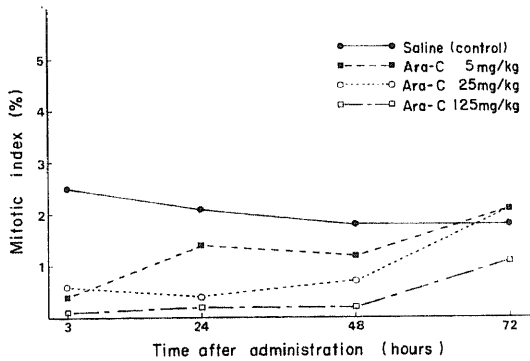


Fig. 8 Variations in mitotic index of Ehrlich ascites carcinoma cells treatment with cytosine arabinoside (Ara-C)

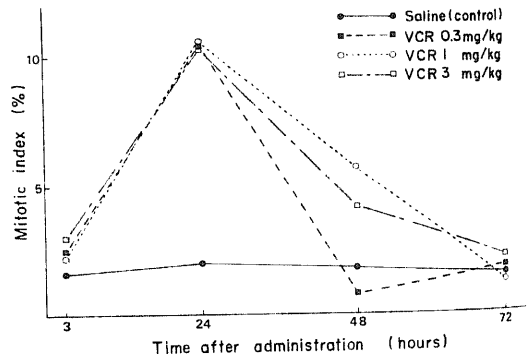
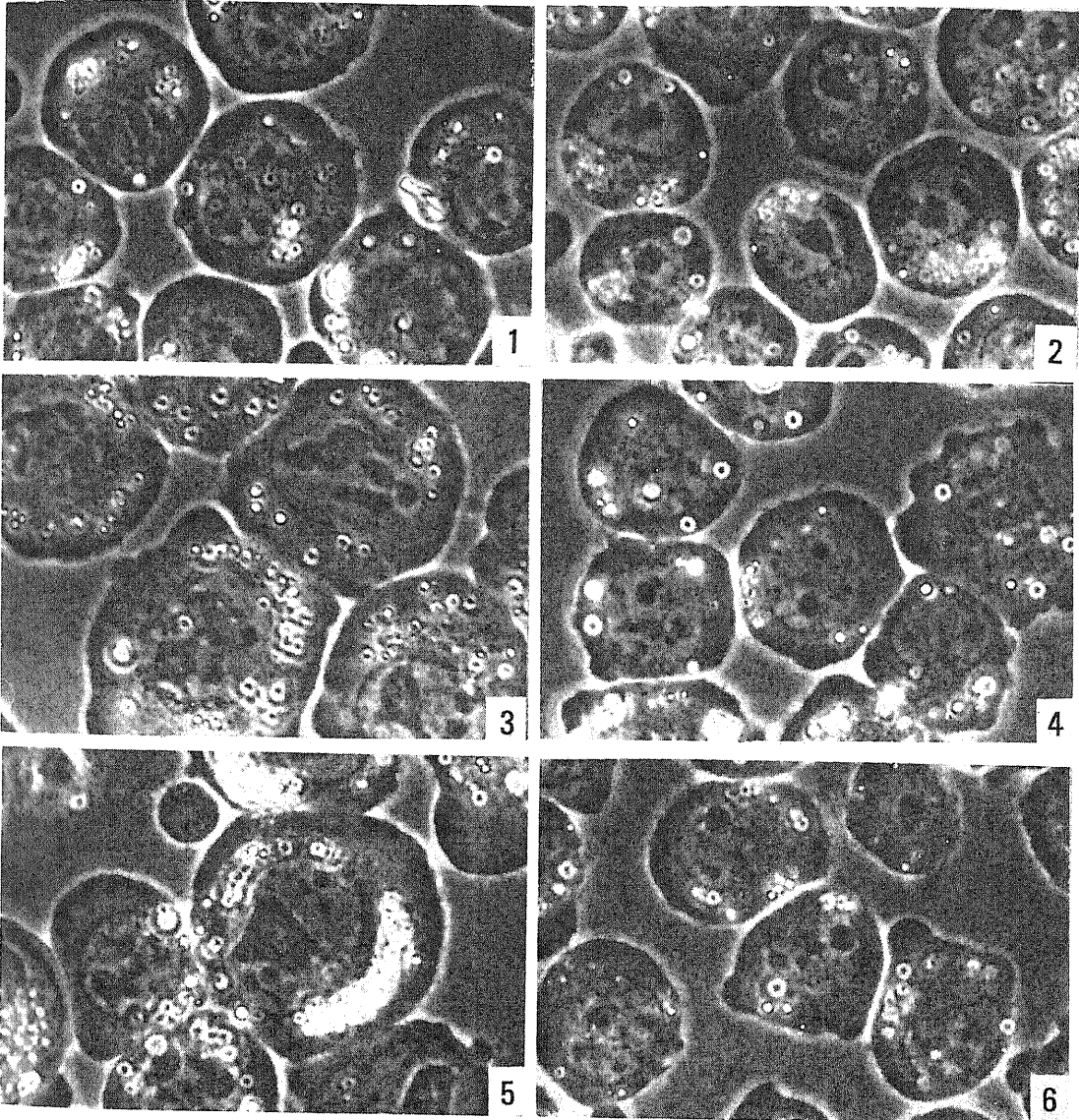


Fig. 10 Variations in mitotic index of Ehrlich ascites carcinoma cells after treatment with vincristine (VCR)

いかにかわらず対照群（写真1）と比較し、差異はみられなかった。CPM 100 mg/kg及び400 mg/kg投与群における、投与12時間後の細胞像ではわずかに核小体の小型円形化が認められ（写真2）、24時間以後に至って、細胞径及び核径が大となり、核小体も大型化するともに細胞質内の光輝性顆粒は数を増し、

ミトコンドリアの膨化が認められた（写真3）。しかし、CPM 20 mg/kg投与群では、投与24～48時間後においても対照群と比較し、差はみられなかった。

2) ADR: ADR 0.2 mg/kg投与群では、対照群の細胞像と比較し、とくに差異は認められなかったが、10 mg/kg投与群において、3時間後に核小体の



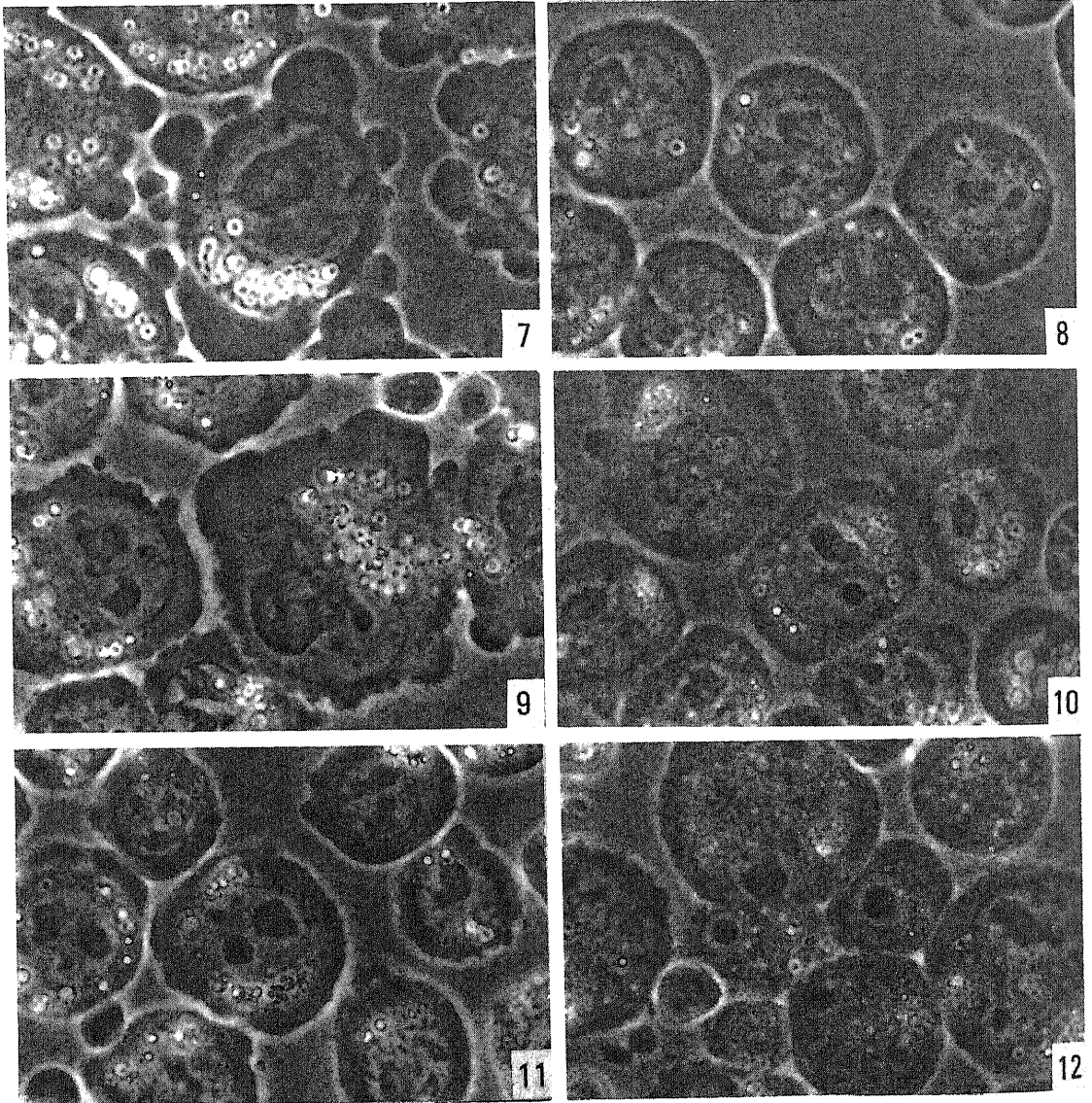
Phase contrast microscopic pictures of Ehrlich ascites cells treated with anticancer drugs *in vivo*

1. 0.85% Saline (Control, 12h after); 2. CPM (400mg/kg, 12h after); 3. CPM (400mg/kg, 48h after); 4. ADR (2mg/kg, 6h after); 5. ADR (2mg/kg, 48h after); 6. DNR (2mg/kg, 6h after).

小型円形化した細胞の出現が認められるようになり、6時間後の2 mg/kg投与群においても、同様の所見を呈する細胞が多く認められた(写真4)。24時間以後の2 mg/kg及び10 mg/kg投与群においては、細胞、核及び核小体の著しい大型化と、光輝性顆粒の増加ならびにミトコンドリアの膨化が著明であった(写

真5)。

3) DNR: DNRではADRの場合ときわめて類似した所見がえられた。すなわち、0.2 mg/kg投与群では、対照群の細胞像と比較してとくに差異はなかったが、5 mg/kg投与群では3時間後に、2 mg/kg投与群では6時間後にそれぞれ核小体の小型円形化が認めら



Phase contrast microscopic pictures of Ehrlich ascites cells treated with anticancer drugs *in vivo*

7. DNR (2mg/kg, 48h after); 8. Ara-C (125mg/kg, 6h after); 9. Ara-C (125mg/kg, 48h after); 10. VCR(3mg/kg, 24h after); 11. VCR(3mg/kg, 3h after); 12. VCR (1mg/kg, 48h after).

れた(写真6)。また、2 mg/kg及び5 mg/kg投与群の24時間以後の所見では、細胞径及び核径が増大し、核小体も著しく大型化した細胞の出現が認められ、光輝性顆粒の増加、ミトコンドリアの膨化及びプリスターの出現などが観察された(写真7)。

4) Ara-C: Ara-C 5 mg/kg投与群では、対照群と比較し、とくに差異は認められなかった。25 mg/kg及び125 mg/kg投与群では、6時間後に、核小体の小型円形化を示すものがわずかに認められ(写真8)、24時間以後はCPM及びADRと同様の变化、すなわち細胞、核及び核小体の大型化、光輝性顆粒の増加ならびにミトコンドリアの膨化などがみられた(写真9)。

5) VCR: 用量のいかんにかかわらず、VCR投与24時間後に、分裂中期細胞の蓄積が著明であった(写真10)。VCR 1 mg/kg及び3 mg/kg投与群においては、3時間後に核小体が円形化するものがみられ(写真11)、その変化はその後、長時間にわたって認められた。48時間後になると、多核細胞が多数認められた(写真12)。しかし、VCR 0.3 mg/kg投与群では上記

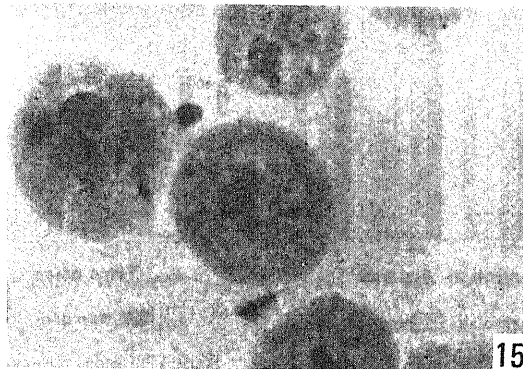
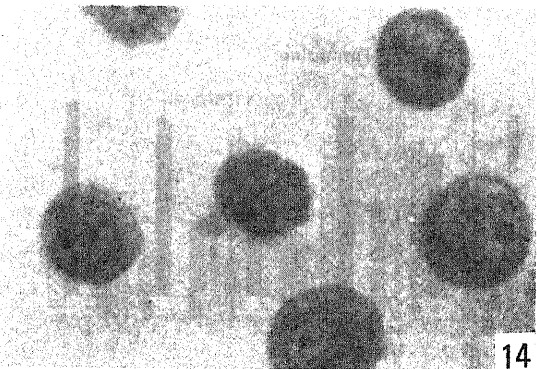
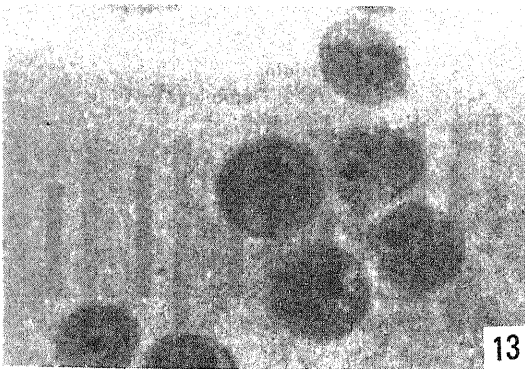
のような細胞像はほとんどみられなかった。

2. Mann染色標本についての所見

位相差顕微鏡による観察では、細胞質の変化に加えて、もっとも特徴的に観察されたのは、初期に核小体が小型円形化し、後期に大型不整形化しているのがみとめられたことである。そこで、とくに核小体の形態変化を明らかにするためにADR投与後の腹水癌細胞についてMann染色標本を作製し、形態観察を行なった。その結果、ADR 10 mg/kg投与群の6時間では、対照群に比較し、核小体が小型円形化し(写真13及び14)、48時間後になると核小体は不整形を呈し、著しく大型化していることが確認され(写真15)、位相差観察と一致した所見がえられた。

III 諸種抗癌剤投与後の腹水癌細胞における³H-TdR及び³H-URのとりこみ

マウスの腹腔内に移植されたエ癌細胞の対数増殖期に抗癌剤を投与し、以後経時的に採取した腹水癌細胞におけるDNA及びRNA生合成の様相を測知するために、核酸合成の前駆物質³H-TdR及び³H-URのとり



Mann stained specimens of Ehrlich ascites cells treated with adriamycin (ADR) *in vivo*
 13. 0.85% Saline (Control, 6h after); 14. ADR (10mg/kg, 6h after); 15. ADR (10 mg/kg, 48h after).

こみについて検討した。

1. CPM: 図 11 は CPM 投与後におけるエ癌細胞の ^3H -TdR 及び ^3H -UR とりこみの様相を経時的に示したものである。 ^3H -TdR とりこみについては、CPM 20 mg/kg 投与群で対照比がほとんど 100% 前後であり、48 時間以降のとりこみでは、むしろ対照を上回る傾向を示し、72 時間後では 126% という値であった。これに対し、100 mg/kg 及び 400 mg/kg 投与群では、時間の経過とともに ^3H -TdR のとりこみは漸次減少し、しかもその減少度は薬剤の投与量に比例してみとめられた。すなわち、24 時間後に一時的に若干とりこみ増加がみられたが、48 時間後では対照比が約 50%、72 時間後で 20% 前後となり、時間の経過とともに明らかにとりこみの減少がみとめられた。一方、 ^3H -UR のとりこみについては、薬剤投与後 48 時間までは、投与量のいかんにかかわらず、対照とほとんど同程度か、あるいはこれを超える値、いかえれば、とりこみの増加傾向がみられたが、72 時間後の 100 mg/kg 及び 400 mg/kg 投与群においては、とりこみの減少、とくに後者において著明な減少がみられ、対照の

約 30% 程度であった。従って CPM の大量投与の場合、まず ^3H -TdR とりこみの減少があらわれ、やや遅れて ^3H -UR とりこみが抑制されているパターンが示されている。

2. ADR: 図 12 は ADR 投与実験の成績を示したものである。ADR 0.2 mg/kg 投与群における ^3H -TdR とりこみでは、投与後の時間の経過とともにわずかの減少がみられているのに対し、2 mg/kg 及び 10 mg/kg 投与群では、24 時間以後著明にとりこみの減少がみられた。すなわち、24 時間後で 50~60% 程度にとりこみの抑制がみられたのに、48 時間及び 72 時間後における ^3H -TdR とりこみは、著しく減少し、対照の 10~15% という低値を示したことは明らかに DNA 合成の阻害を示唆するものである。 ^3H -UR のとりこみについては、 ^3H -TdR とりこみに比較して、減少度は全般的に軽度であり、0.2 mg/kg 及び 2 mg/kg 投与群では対照とほぼ同等か、わずかの抑制しかみられなかったし、10 mg/kg 投与群においても、全体を通じて 60~80% 程度の対照比を示したにすぎなかった。

3. DNR: DNR 投与後のエ癌細胞の実験成績は図

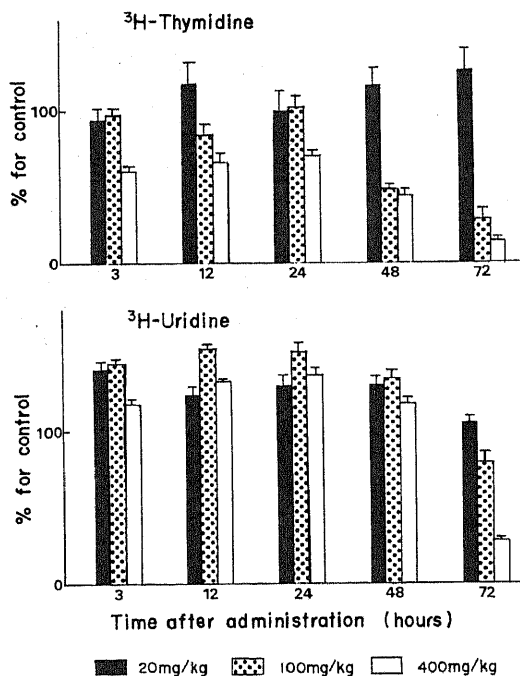


Fig. 11 Incorporation of ^3H -thymidine and ^3H -uridine into the ascites cells from Ehrlich carcinoma bearing mice treated with cyclophosphamide (CPM)

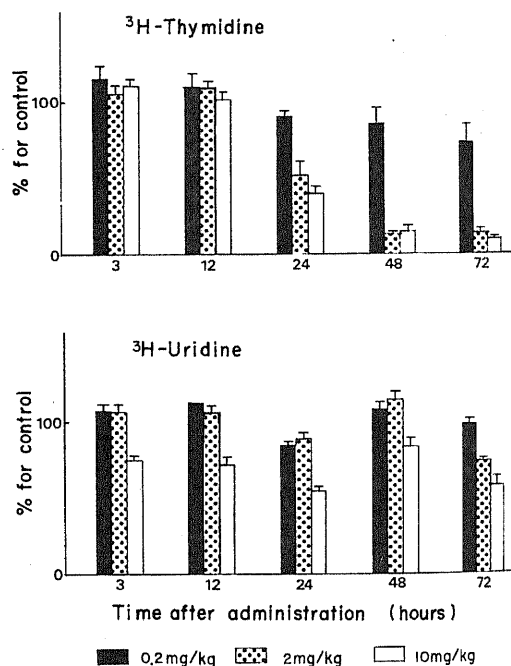


Fig. 12 Incorporation of ^3H -thymidine and ^3H -uridine into the ascites cells from Ehrlich carcinoma bearing mice treated with adriamycin (ADR)

13に示した。全般的に³H-TdR及び³H-URのとりこみ様相は、ADRの場合とほとんど類似しており、DNRの2 mg/kg及び5 mg/kg投与群では、ADRに比較して、核酸合成前駆物質のとりこみ抑制が若干強いように思われる。

4. Ara-C: DNA合成を特異的に阻害する代謝拮抗剤Ara-Cを投与した場合、CPM及びADRのそれと対比して著しく相違するパターンが得られた。図14はその成績を示したものであるが、まず³H-TdRとりこみについては、5 mg/kg投与群でも3時間後ですでに顕著な抑制(T/C 16%)がみられ、投与量の増加とともにとりこみ率が低下し、25 mg/kg及び125 mg/kg投与群では、それぞれ10%以下であった。しかし、12時間を経過すると、とりこみの回復がみられ、以後時間の経過ともななって、多少の変動はあるものの、ほぼ正常に復した。³H-URとりこみについては、ほとんど影響はみられなかったが、12時間後における125 mg/kg投与群において、一時的に若干の抑制傾向が認められた。

5. VCR: phase specificな薬剤に分類されているVCRについての成績は、図15に示した。VCRによる³H-TdRのとりこみ阻害は、Ara-Cのように著明では

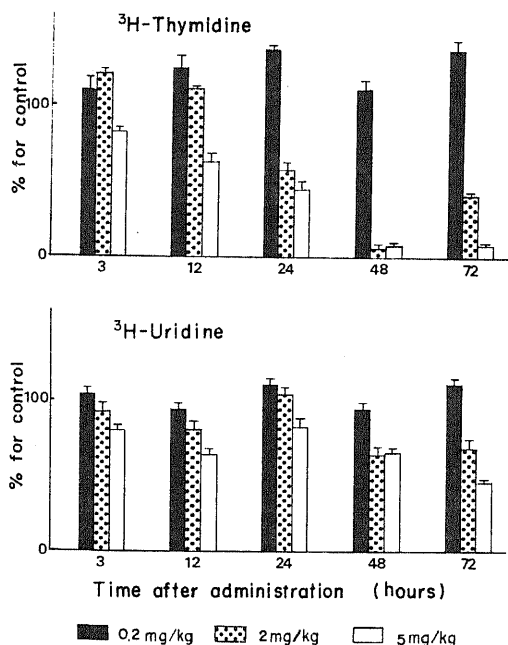


Fig. 13 Incorporation of ³H-thymidine and ³H-uridine into the ascites cells from Ehrlich carcinoma bearing mice treated with daunorubicin (DNR)

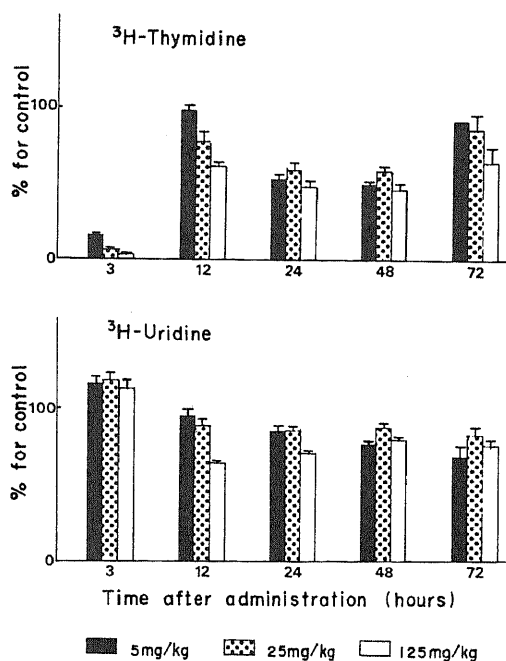


Fig. 14 Incorporation of ³H-thymidine and ³H-uridine into the ascites cells from Ehrlich carcinoma bearing mice treated with cytosine arabinoside (Ara-C)

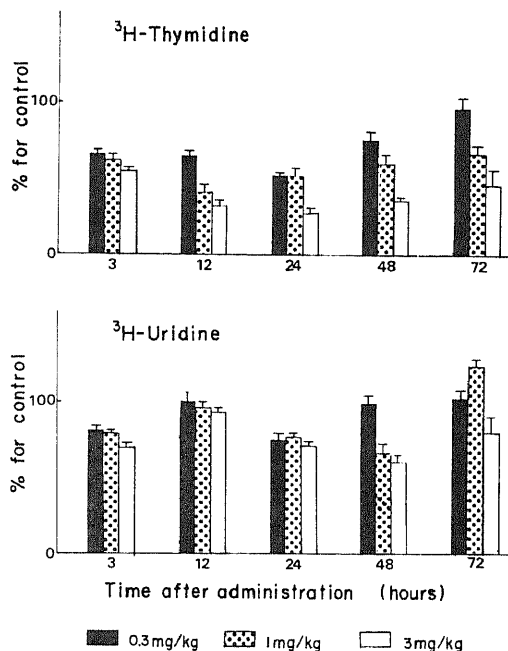


Fig. 15 Incorporation of ³H-thymidine and ³H-uridine into the ascites cells from Ehrlich carcinoma bearing mice treated with vincristine (VCR)

ないが、3 mg/kg 投与群において、投与3時間後ですら認められ、その効果は24時間後にもっとも強く発現され、しかもとりこみの対照比は50%以下に持続された。1 mg/kg 及び 0.3 mg/kg 投与群においても、3 mg/kg 投与群より阻害率は低い、阻害の時間的経過は、ほぼ同様のパターンとして示された。一方、 ^3H -UR とりこみについては、全体を通じて ^3H -TdR とりこみにみられる程阻害は明らかでなく、大量投与群においても、わずか20~40%程度の阻害率を示したにすぎなかった。

IV F.M.F.による解析実験

諸種抗癌剤の細胞回転に及ぼす影響については、従来 *in vitro* における培養細胞についての検討が多い^{25)~28)}。ここでは、担癌マウスについて行なった一連の検討実験と条件を同一にするため、*in vivo* における癌細胞動態について検索した。すなわち、Ehrlich 腹水癌移植マウスにおいて癌細胞増殖分画が増大している時期に、抗癌剤を1回腹腔内投与し、以後経時的に腹水癌細胞の回転動態をF.M.F.によって解析した。DNA ヒストグラムでは、*in vitro* 培養細胞の場合、典型的な2峰性を示すが、*in vivo* ではまず宿主に由来すると思われる小型有核細胞集団の峰(図16の破線

部分)があらわれ、その後癌細胞のG₁またはG₀期細胞群(2C)とG₂+M期細胞群(4C)の2峰(図16の実線部分)が観察された。各抗癌剤について得られた成績は次のごとくである。

1. CPM: 一般にアルキル化剤は、cycle non-specific であるとされているが、CPMはどちらかといえば増殖期に優先的に感受性を示す cycle specific な薬剤である²¹⁾。CPM投与6時間後では、対照と同様2峰性のパターンを示したが、24時間後ではG₁→S期移行が阻止され、G₂もしくはG₂+Mの蓄積が、48時間後では全体的にG₁期、S期及びG₂+M期細胞の著しい減少と、8Cまたは移行型細胞出現が認められた。

2. ADR: ADRはDNR同様、DNAと直接結合(intercalation)することから、いずれの期にも作用する cycle phase nonspecific の薬剤に区分されている²¹⁾²⁰⁾。ADR投与6時間後のDNAヒストグラムでは、若干G₂+Mの減少はあるが、対照とほぼ同型の細胞分布がみられ、24時間後では不可逆的にG₂blockがあらわれ、48時間後に至ると、S期細胞とともにG₁期及びG₂+M期細胞の著しい減少がみられた。

3. Ara-C: 一般に代謝拮抗剤は cycle phase specific であるが、とくにAra-Cはhydroxyureaとともに典型的なS-phase specific の薬剤とされている^{21)29)~31)}。Ara-C投与6時間後では、G₁→S期移行の一過程の阻止によってG₁期の蓄積が著明であったが、24時間後ではG₁→S期阻止が解除され、48時間後も同様の回復パターンが持続された。

4. VCR: VCR投与6時間後では、各期細胞の一過性の増加がみられ、投与時S期にあった細胞はG₂→M期と正常に移行し、24時間後では可逆的な分裂中期停止作用を示し、48時間後では、G₁期及びS期細胞の増加とともに、多核細胞の出現がみられた。

V 担癌マウスに対する抗癌剤1回投与による延命効果

表2はこの実験に用いたマウスについて、抗癌剤の延命効果を比較検討した成績である。

まず、生理食塩水投与の対照群マウスの生存日数中間値は17日で、全動物が腫瘍死したのに対し、ADR 10 mg/kg 投与群のそれは28日であり、しかも7匹中2匹が40日間生存し、剖検所見でも癌浸潤はまったく認められなかった。一方、DNR 5 mg/kg 及び CPM 400 mg/kg 投与群では、有意な延命はなく、むしろ短縮の傾向にあった。ところが死亡動物の剖検所見では、癌性腹水の貯溜はほとんどなく、また癌浸潤も認められなかったことから、これら抗癌剤の大用量

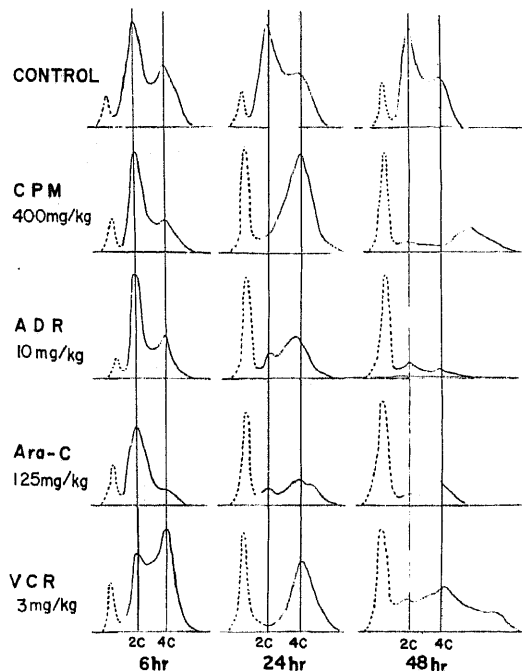


Fig. 16 DNA histogram of Ehrlich carcinoma cells treated with various anticancer drugs *in vivo*

で延命がみられなかったのは、宿主への毒性によるものであると考えられた。また、VCR 3 mg/kg の 1 回投与でも毒性発現があり、延命効果は期待できなかった。ただ Ara-C については、125 mg/kg 投与群で若干延命率の増加がみられた。しかし、各抗癌剤の少量用はすべて有意な延命及び治癒はなかった。

考 察

種々の要因による癌細胞の変性過程については、細胞形態学的にあるいは生化学的、細胞化学的に、個々の実験系において精査された報告は多いが、細胞像とくに核構造にみられる形態変化と、その背景となる細胞生物学的にみた細胞動態及び生化学的反應の様相を同一条件下で比較検討した報告については、あまり例をみない。

細胞の変性過程における形態と DNA 量の対比を検討した Leuchtenberger¹⁰⁾¹¹⁾, Albert⁹⁾, Lancker¹²⁾らの報告は、いずれも細胞化学的手段によって組織学的に検討されたもので、遊離癌細胞については、最近教室の吉田²¹⁾が Ehrlich 腹水癌細胞を対象とし、種々の保存条件下における癌細胞の変性過程を追究し、生化学的及び細胞化学的方法によって測定した細胞内 DNA 量を、併行して行なった位相差顕微鏡所見ならびに Papanicolaou 染色標本についての観察所見と対比し、DNA 量の減少とクロマチン構造の変化との間に一致した相関のあることをみとめており、また、三田村⁶⁾も胸腹水中のヒト腫瘍細胞の変性過程を追究

し、同様の結果を報告している。

本研究では、Ehrlich 腹水癌移植マウスに対し、諸種の抗癌剤を投与した場合、腹腔内癌細胞数及び分裂指数の変動、細胞集団における核酸生成前駆物質のとりこみの時間的変化、さらには細胞回転の様相などが、癌細胞における異常形態の出現、とくに核及び核小体の形態変化とどのように対応するかについての比較実験が行なわれた。

諸種の抗癌剤の生化学的作用機作については、それらのほとんどが直接細胞内 DNA に架橋形成 (cross linking) または、はまり込み (intercalation) して DNA の機能を停止させるか、あるいは DNA, RNA の生合成を代謝拮抗的に阻害するものである²²⁾³²⁾。従って、抗癌剤による癌細胞の変性、崩壊過程における形態観察は、まず第一に核の構造変化に向けられており、これに関する報告はきわめて多い^{33)~40)}。著者が今回の実験に際して行なった形態学的観察においても、癌細胞の表面構造への抗癌剤の影響は走査電子顕微鏡による観察ではほとんど認められなかったが、核小体の小型円形化ならびに大型不整形化は位相差顕微鏡によるばかりではなく、透過電子顕微鏡によっても観察された (写真省略)。

谷田⁴¹⁾は、癌細胞における変性特徴の出現と時間的経過について、cyclophosphamide 投与後 24 時間において、核小体の肥大、核肥大、細胞腫大が有意に増加していると報告している。Di Marco¹⁷⁾は HeLa 細胞、KB 細胞などの培養系で、daunorubicin の作

Table 2. Effect of one-shot administration of various anticancer drugs on Ehrlich ascites carcinoma in mice.

| Drug | Dose mg/kg, ip | Median survival time (day) | ILS* (%) | 40-day survivors/seven mice |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------------|----------|-----------------------------------|
| Cyclophosphamide (CPM) | 400 | 18** | 6 | 0 |
| | 20 | 21 | 23 | 0 |
| Adriamycin (ADR) | 10 | 28 | 65 | 2 |
| | 0.2 | 19 | 12 | 0 |
| Daunorubicin (DNR) | 5 | 14** | - | 0 |
| | 0.2 | 21 | 23 | 0 |
| Cytosine arabi- noside (Ara-C) | 125 | 23 | 35 | 0 |
| | 5 | 20 | 17 | 0 |
| Vincristin (VCR) | 3 | 14** | - | 0 |
| | 0.3 | 17 | 0 | 0 |
| 0.85% Saline (Control) | - | 17 | - | 0 |

Animal: Female ddYS mice, weighing 21-23 g.

Inoculum: Ehrlich carcinoma cells 5x10⁶/mouse, ip.

Treatment: Day 5 only, ip.

* Increase of life-span for control.

** Toxic.

用を検討し、クロマチンの凝集、濃縮、核小体の小型円形化の出現とともに、細胞増殖の抑制、分裂指数の低下、RNA量の減少をみとめている。彼ら¹⁸⁾はまた、Ehrlich 腹水癌マウスに daunorubicin を1回のみ腹腔内投与すると、分裂指数の著明な減少がみられ、投与後48時間においてはほとんどの細胞に核小体の大型化がみられたと述べ、さらにこのような核小体の形態異常は担癌動物に adriamycin を投与した場合でも認められることを報告している³³⁾。また、Smetana⁴²⁾は Novikoff hepatoma 移植ラットに adriamycin を投与すると、1時間後にすでに小型円形化した核小体が出現することを認め、竹中ら⁴³⁾は Ehrlich 腹水癌移植マウスに cyclophosphamide を投与し、投与48時間後の腹水中に核小体の大型化した細胞の出現が多数認められると報告している。また、広野ら⁴⁴⁾は臨床的に癌細胞の変性所見の一つとして、核小体の肥大を指摘している。

今回著者の実験に供用された抗癌剤は、cyclophosphamide, adriamycin, daunorubicin, cytosine arabinoside 及び vincristine の5種類であるが、これらは殺細胞作用において異なったタイプに区分され²²⁾²³⁾、それぞれ作用様式に相違があるにもかかわらず、共通した形態学的変化の一つは、核及び核小体の形態異常であった。もちろん核小体の形態変化の出現時期及び頻度は、抗癌剤の種類によって異なるが、その変化の特徴は初期(3~12時間)の小型円形化と後期(48時間以降)の大型不整形化で要約される。鶴沼¹⁹⁾²⁰⁾は初期の変化に対して、抗癌剤によりDNA依存RNA合成が阻害されたために、核小体で最初に作られる45SRNAが減少するからであろうとしている。後期の大型化については、これまでの報告によってはあまり明らかにされていないが、核小体内で45SRNAがさらに低分子のリボゾームRNA(28S, 18S)となって核外に放出される過程が阻害された結果とも考えられる。

また、この考えとは別に、初期に起った障害に対する修復機転の現われとして、後期に核小体の大型化が起る可能性もあろう。しかし、著者のCPM, ADR及びDNR投与実験にみるかぎり、48時間以降では、総癌細胞数及び分裂指数の減少、³H-thymidineのとりこみの著しい抑制、さらにF.M.F.によるDNAヒストグラムではDNA合成期細胞の減少と巨大細胞または多核細胞の出現など、すべて癌細胞の変性をうらづける所見がえられ、核小体の大型化は修復機転とは考えられない。

Ara-Cの場合、核小体の小型円形化はCPM, ADR

及びDNRほど著明でなく、24時間以後にみられた核小体の大型不整形化の頻度もこれらに比較して高くはなかった。Ara-C投与後48時間以後は総癌細胞数が増加し、分裂指数も回復し、DNAヒストグラムも回復の傾向がみられた。また、VCRの場合、Ara-Cよりさらに核小体大型化の頻度は低く、むしろ核小体の円形化の傾向が長時間にわたって認められた。VCR投与後24時間以後には総癌細胞数は漸増し、分裂指数も72時間後にほとんど正常に復し、DNAヒストグラムでも多核細胞の出現が多く認められたが、G₁期及びS期細胞が増加して正常な細胞回転への移行が示された。

以上のことを総合するならば、核小体の小型円形化が最初に現われ、ついで細胞の腫大、核の大型化及び核小体の大型不整形化が認められる場合、これはDNAの機能障害によって誘導された二次的変化とみなされるもので、結局、癌細胞の死滅・崩壊へとつらなる細胞変性の特徴を示す所見といえよう。この所見は、胸水や腹水、あるいは体液中の遊離癌細胞の形態観察のさいに抗癌剤の効果を予知する一つの指標となりうるものであろう。

結 論

Ehrlich 腹水癌移植マウスに対し、作用機作を異にする抗癌剤、cyclophosphamide (CPM), adriamycin (ADR), daunorubicin (DNR), cytosine arabinoside (Ara-C) 及び vincristine (VCR) をそれぞれ腹腔内に投与し、その後における総癌細胞数及び分裂指数、癌細胞への核酸合成前駆物質のとりこみ、細胞回転などについて経時的に検討するとともに、他方、細胞とくに核及び核小体の形態変化を、主に位相差顕微鏡によって観察し、次の成績がえられた。

1) 担癌マウスに対するCPM, ADR及びDNRの1回投与は、総癌細胞数及び分裂指数の経時的増加を用量依存的に抑制したが、Ara-C及びVCRの場合、大量投与群でも48時間以後再増殖の傾向がみられた。

2) 細胞形態の位相差観察では、薬剤投与6~12時間から核小体が小型円形化し、48時間以後には逆に大型化、不整形化した。しかし、この核小体の変化の出現時期は抗癌剤の種類によって若干差異があり、またその出現頻度はADR及びDNRにおいてももっとも高く、CPMがこれらにつき、ついでAra-C, VCRではもっとも低かった。VCR投与48~72時間後には多核細胞の出現が著明であった。

3) ³H-uridineのとりこみの経時的変化は、いずれの抗癌剤でも著明な阻害はみられなかった。³H-

thymidine とりこみについては、薬剤の種類によって差異があり、CPM, ADR 及び DNR では用量依存的に時間の経過とともに減少したのに対し、Ara-C では投与直後に著しい減少がみられたものの、12 時間以降はとりこみの回復がみられた。VCR では全時期を通じて著しい阻害はみられなかったが、中等用量以上では阻害が長期にみられた。

4) Flow Microfluorometry (F.M.F.) による DNA ヒストグラムでは、CPM または ADR 投与の場合、48 時間後に 2C (diploid) 細胞群及び 4C (tetraploid) 細胞群の著しい減少がみとめられた。これに対し、Ara-C 及び VCR 投与の場合、一過性に 2C 細胞群あるいは 4C 細胞群の蓄積がみられたが、48 時間後には正常な細胞回転への移行があり、また VCR では 8C 細胞群の出現が認められた。

5) 以上の成績を総合すると、生体内で抗癌剤の接触を受けた癌細胞の核及び核小体にみられた形態異常の所見は、細胞死に至る過程の一つであり、これは抗癌剤の効果を予知する一指標ともなるものと考えられる。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った服部絢一教授ならびに御助言をいただいた研究室の各位に深く感謝いたします。また、御指導を賜った金沢大学がん研究所越村三郎教授ならびに F.M.F. 実験に際し、御協力をいただいた村山次哉氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Skipper, H. E. & Schabl, F. M. Jr. : Quantitative and cytokinetic studies in experimental tumor models, p 629-650. *In* J. F. Holland & E. Frei, III (ed.), *Cancer Medicine*, 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1974.
- 2) Skipper, H. E., Schabel, F. M. Jr., Mellett, B. M., Montgomery, J. A., Wilkoff, L. J., Lloyd, H. H. & Brockman, R. W. : Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother. Rep.*, 54, 431-450 (1970).
- 3) Bruce, W. R., Meeker, B. E. & Valeriote, F. A. : Comparison of the sensitivity of normal hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered *in vivo*. *J. Nat. Cancer Inst.*, 37, 233-245 (1966).
- 4) Sinclair, W. K. : Hydroxyurea: Effects on Chinese hamster cells grown in culture. *Cancer Res.*, 27, 297-308 (1967).
- 5) Elkind, M. M. & Sinclair, W. K. : Recovery in X-irradiated mammalian cells, p 165-220. *In* M. Ebert & A. Howard (ed.), *Current Topics in Radiation Research*, Vol. 1, Elsevier, Amsterdam, 1965.
- 6) Wheeler, G. P., Bowdon, B. J., Adamson, D. J. & Vail, M. H. : Effects of certain nitrogen mustards upon the progression of cultured H. Ep. No. 2 cells through the cell cycle. *Cancer Res.*, 30, 100-111 (1970).
- 7) 朝村 光雄・斉藤 達雄 : 細胞周期と癌の化学療法. *癌と化学療法*, 5, 737-746 (1978).
- 8) 小川 一誠 : 細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法*, 3, 1093-1101 (1976).
- 9) Alfert, M. : Changes in the staining capacity of nuclear components during cell degeneration. *Biol. Bull.*, 109, 1-12 (1955).
- 10) Leuchtenberger, C. : A cytochemical study of pycnotic nuclear degeneration. *Chromosoma*, 3, 449-473 (1950).
- 11) Leuchtenberger, C., Vendrely, R. & Vendrely, C. : A comparison of the content of desoxyribonucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 37, 33-38 (1951).
- 12) Van Lancker, J. L. & Holtzer, R. L. : The fate of nuclei, desoxyribonucleic acid and desoxyribonuclease in the course of autolysis. *Lab. Invest.*, 12, 102-105 (1963).
- 13) 中村 忍 : がん細胞の変性過程における形態学的研究 : エールリッヒ腹水がん細胞の核の変性過程について. *十全医会誌*, 83, 749-774 (1974).
- 14) Majno, G., La Gattuta, M. & Thompson, T. E. : Cellular death and necrosis: Chemical, physical and morphologic changes in rat liver. *Virchows Arch. Pathol. Anat.*, 333, 421-465 (1960).
- 15) Trump, B. F., Laiho, K. A., Mergner, W. J. & Arstila, A. U. : Studies on the subcellular pathophysiology of acute lethal cell injury. *Beitr. Pathol.*, 152, 243-271 (1974).
- 16) 三田村 英一 : 腫瘍細胞の変性過程の研究 - 胸・腹水中のヒト腫瘍細胞の変性過程. *十全医会誌*, 88, 421-451 (1979).

- 17) Di Marco, A., Soldati, M., Fioretti, A. & Dasdia, T. : Activity of daunomycin, a new antitumor antibiotic, on normal and neoplastic cells grown *in vitro*. *Cancer Chemother. Rep.*, **38**, 39-47 (1964).
- 18) Di Marco, A., Gaetani, M., Dorigotti, L., Sodati, M. & Bellini, O. : Daunomycin, a new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother. Rep.*, **38**, 31-38 (1964).
- 19) 鶴沼 直雄 : 核小体の微細構造. *細胞*, **2** (5) 2-12 (1970).
- 20) 鶴沼 直雄 : 核小体の構造と機能. *細胞*, **8**, 392-397 (1976).
- 21) 吉田 喬 : がん細胞の変性過程の研究 : ユールリッヒ腹水がん細胞の DNA 量と形態との対比. *十全医学会誌*, **87**, 458-480 (1978).
- 22) 下山 正徳 : 制癌剤の Cell-Kill-Kinetics と至適投与方法. *癌と化学療法*, **3**, 1103-1110 (1976).
- 23) 下山 正徳・木村 禮代二 : 各種抗がん剤の *in vitro* における殺細胞作用について : L1210 細胞を中心に. *最新医学*, **28**, 1024-1040 (1973).
- 24) Di Marco, A. & Lenaz, L. : Daunomycin and adriamycin, p 826-835. *In* J. F. Holland & E. Frei, III (ed.), *Cancer Medicine*, 2nd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 1974.
- 25) 高本 滋・太田 和雄 : F.M.F. による細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法*, **5**, 727-736 (1978).
- 26) 高本 滋・太田 和雄 : 抗癌性抗生物質の細胞回転に及ぼす影響 : Flow Microfluorometry 分析による. *癌と化学療法*, **6**, 59-70 (1979).
- 27) Palme, G. & Liss, E. : Sensitivity of different phases in the cell cycle of ascites tumor cells under the influence of cyclophosphamide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **5**, 497-502 (1965).
- 28) Frei, E. III, Whang, J., Scoggins, R. B., Van Scott, E. J., Rall, D. P. & Ben, M. : The stathmokinetic effect of vincristine. *Cancer Res.*, **24**, 1918-1925 (1964).
- 29) Tobey, R. A. : Effects of cytosine arabinoside, daunomycin, mithramycin, azacytidine, adriamycin and camptothecin on mammalian cell cycle traverse. *Cancer Res.*, **32**, 2720-2725 (1972).
- 30) Tobey, R. A. & Crissman, H. A. : Use of flow microfluorometry in detailed analysis of effects of chemical agents on cell cycle progression. *Cancer Res.*, **32**, 2726-2732 (1972).
- 31) Bhuyan, B. K., Scheidt, L. G. & Fraser, T. J. : Cell cycle phase specificity of antitumor agents. *Cancer Res.*, **32**, 398-407 (1972).
- 32) 田中 信男 : 抗癌物質とその作用機作. (太田邦夫・山本 正・杉村 隆・菅野 晴夫編), *癌の制圧*, 第1版, 5巻, 168-192頁, 東京, 南江堂, 1979.
- 33) Di Marco, A., Gaetani, M. & Scarpinato, B. : Adriamycin (NSC-123,127): A new antibiotic with antitumor activity. *Cancer Chemother. Rep.*, **53**, 33-37 (1969).
- 34) Liss, E. & Palme, G. : Effects of cyclophosphamide on Ehrlich ascites cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **5**, 493-496 (1965).
- 35) Cardinali, G., Cardinali, G. & Enein, M. A. : Studies on the antimitotic activity of leurocristine (vincristine). *Blood*, **21**, 102-110 (1963).
- 36) Daskal, Y., Woodard, C., Crooke, S. T. & Busch, H. : Comparative ultrastructural studies of nucleoli of tumor cells treated with adriamycin and the newer anthracyclines, carminomycin and marcellomycin. *Cancer Res.*, **38**, 467-473 (1978).
- 37) Creasey, W. A. & Markiw, M. E. : Biochemical effects of the vinca alkaloids. II. A comparison of the effects of colchicine, vinblastine and vincristine on the synthesis of ribonucleic acids in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 601-609 (1964).
- 38) 野宮 文三・鍵野 慶之輔・折笠 義則・藤森 春海 : Daunomycin の抗腫瘍性に関する研究. 第2報 生体内腹水腫瘍細胞に対する影響について. *Jap. J. Antibiotics*, **23**, 181-188 (1970).
- 39) 北浦 皓三・渡辺 善博・石原 由紀子・高平 汎志 : Adriamycin に関する研究. 実験腫瘍に対する効果について. *Jap. J. Antibiotics*, **25**, 65-71 (1972).
- 40) 木谷 隆一 : 脳腫瘍培養細胞に対する vincristine の影響 - 光顕及び電顕による検索. 十全

医会誌, 87, 619 - 635 (1978).

41) 谷田 秀: 癌性腹水中に出現する各種細胞の変性に関する研究. 米子医誌, 20, 486 - 504 (1969).

42) Smetana, K., Merski, J., Daskal, Y., Busch, R. K. & Busch, H. : Effects of adriamycin and actinomycin D on nucleolar morphology: A simple biologic assay. Cancer Treat. Rep., 61, 1253 -

1257 (1977).

43) 竹中 正治・谷田 秀・竹内 隆・宗像 雅丈・谷田 理・阿部 重郎: 制癌剤の腹腔内投与法について. 最新医学, 28, 965 - 974 (1973).

44) 広野 正啓・井上 浩: 抗癌剤感受性試験に関する研究. 癌と化学療法, 4, 1077 - 1083 (1977).

Changes in Morphology and Cell Kinetics of Cancer Cells Treated with Anticancer Drugs in Mice. Tsuguo Goshima, Department of Internal Medicine (III) School of Medicine, Kanazawa University. Kanazawa, 920, Japan. J. Juzen Med. Soc., 88, 689-706(1979).

Abstract The present work was designed to investigate the effects of anticancer drugs, including cyclophosphamide, adriamycin, daunorubicin, cytosine arabinoside and vincristine, on the structural changes of neoplastic cells with the expectation that such information could be useful to evaluate the efficacy of the drug for cancer patients.

The mice bearing 5-day-old Ehrlich ascites carcinoma received a single intraperitoneal administration of an anticancer drug individually, and the possible relationship between morphologic changes and cell kinetics on the tumor cells withdrawn with the lapse of time was examined. *In vivo* treatment of Ehrlich ascites cells with increasing doses of anticancer drugs caused generally a progressive increase of degenerated cells. The degeneration was mainly limited to the nucleolar form, such as ring-shaped ones, micronucleoli and huge ones with large light areas. Such nucleolar alterations, however, showed some differences in frequency and time of appearance from drug to drug.

Data on total tumor cell count in ascites, ^3H -thymidine and ^3H -uridine uptakes of tumor cells and cytokinetic study by flow microfluorometry all showed a decrease in viable cells corresponding to the dose of the drug and in agreement with the appearance of the above-mentioned altered nucleoli. Since the morphologic changes in nucleoli observed in the present work are easy to detect, they can be useful tools for evaluating the efficacy of anticancer drugs in cancer or leukemic patients.