

実験グリオーマ細胞に対するアルキル化剤の影響： 同調培養及び染色体分析による検索

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9038

実験グリオーマ細胞に対するアルキル化剤の影響

—同調培養及び染色体分析による検索—

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山本信二郎教授)

河野 寛 一

(昭和57年11月13日受付)

マウス脳に発生させた実験グリオーマに対するアルキル化剤の作用を検索した。20-メチルコラントレン結晶を C_3H/He マウス脳に挿入し発生させたグリオーマを継代培養し、株化させた cell line (mouse glioma-3: MG) を 10 mM 濃度のチミジンで同調培養して実験に用いた。この細胞に対するアルキル化抗腫瘍剤塩酸ニムスチン (ACNU) の作用機序を染色体分析により検索した。対照細胞として正常 C_3H/He マウス脳より分離培養したグリア細胞 (normal mouse glia cell-46: NMG), 対照アルキル化剤としてマイトマイシン C (MMC) を用いた。更に DNA の複製後修復を抑制する薬剤としてカフェインを用いた。ACNU, MMC 共にこれらの細胞の増殖を抑制した。この抑制効果は薬剤の濃度に比例するが、細胞の DNA-synthetic phase (以下 S phase と略) を経た後にみられ、ACNU (10 $\mu\text{g/ml}$) の作用では、MG は NMG より約 1.5 倍強く抑制された。ACNU 及び MMC は gap や break あるいは exchange 等の細胞の染色体異常を起こした。アルキル化剤による細胞増殖抑制は、染色体異常を有する細胞の出現頻度にほぼ比例した。染色体異常を有する細胞の出現も NMG よりも MG に強くみられた。カフェインはアルキル化剤作用後に生ずる染色体異常の exchange を抑制し gap や break を増した。その作用は S phase にみられ、NMG より MG に強い効果が認められた。アルキル化剤作用後にカフェインを併用して DNA の複製後修復を抑えると染色体に multiple break が生じたが、その頻度は MG に高くみとめられた。以上の結果より、アルキル化剤の抗腫瘍効果は DNA 合成阻害による細胞分裂を抑制することによるもので、S phase 通過後に染色体上に gap や break として表現される。抗腫瘍効果の程度は薬剤の濃度と細胞の有する DNA 修復能との関係で決定される。染色体上の exchange は DNA の複製後修復を示し、腫瘍由来の MG では低下しており、このことはアルキル化剤に対して MG が NMG よりも感受性が高い一因であることを示唆する。

Key words Experimental mouse glioma, Alkylating agents, Synchronization culture, Chromosomal aberration, Postreplication repair.

抗腫瘍剤の中のアルキル化剤の投与は細胞の遺伝情報の担い手である DNA 塩基をアルキル化し、ホスフォトリエステルを作り、また塩基の脱離やポリヌクレオチド鎖を切断し細胞に致死効果をもつ¹⁾。一方、細胞は DNA の損傷、あるいはその損傷によって生じる DNA 複製の誤まりを修復する能力を持つ。したがってアルキル化剤の投与は、DNA 損傷とそれに対する細胞の修復能との相互関係により、突然変異の誘発、発癌等を

も来たし得る²⁾。

細胞分裂の過程に出現する染色体は、DNA がその主構造を形成しており、その形状及び数は生物の種により一定である。従って染色体異常は遺伝物質である DNA の変化に基づく遺伝情報の異常を示唆する。アルキル化剤による染色体の形態変化については、Evans³⁾はナイトロゲンマスタードに関して、Brøgger⁴⁾らはマイトマイシン C に関して詳細な報告をした。

Effects of Alkylating Agents on Experimental Glioma Cells. —Studies by Synchronization Culture and Chromosomal Analysis— **Hirokazu Kawano**, Department of Neurosurgery, (Director: Prof. S. Yamamoto), School of Medicine, Kanazawa University.

本研究では同調培養したマウスグリオーマ由来培養細胞と正常マウス脳由来培養細胞を用いて、アルキル化剤の作用による細胞の増殖抑制効果と染色体の変化、及び DNA 複製後の修復能との関係について検索した。

材料及び方法

1) マウスグリオーマ由来細胞は Zimmerman ら⁹⁾の方法により作製した。25%の 20-メチルコラントレン(メチルコラントレン 1:3 コレステロール)を加熱融解後に冷却し、重量 1.0-1.5 mg のペレットを作製した。これを生後 5 週の雄 C₃H/He のマウスの右前頭葉内にエーテル麻酔下に挿入した。発生した腫瘍組織の一部を組織学的検索に供すると共に、他を細切トリプシン処理-ピペッティングの一連の操作により単離細胞として培養に移した。培養には 5% CO₂培養器(温度 36°C, 湿度 100%)を使用し、10%牛胎児血清(ギブコ製)を含むイーグル MEM(ニッスイ)メEDIUMで、単層継代培養した。培養ボトルは Falcon 3024 plastic culture bottle (75 cm²)を用いた。本実験に於いては、脳腫瘍を作製し継代培養した 47 系列のうち、組織学的に肉腫成分の最も少ないグリオーマ (Fig. 7)で、60 継代以上を経て培養状態の安定した一つの系 (mouse glioma cell line-3: MG)を用いた。この系列の 60 代細胞では 50×14 μ の紡錐形の胞体の一端に 60 μ 程の突起と対側に 2~3 本の 40 μ 程の突起を有するほぼ一定の形のものになり (Fig. 8)、電顕では 60~90 Å の microtubulus が認められた (Fig. 9)。電顕標本は久保ら⁸⁾の方法に準じて作製した。実験には 63~64 代の細胞を用いた。

2) 正常マウスグリア細胞は、生後 1 週間以内の雄 C₃H/He マウス大脳半球を前述の方法で培養に移して得た。各 10 匹のマウス脳を 5 系列、即ち 50 系列の培養を 10 代継代培養し、最もグリア細胞比の高い系 (normal mouse glia cell-46: NMG) を実験に用いた。実験には 12 代~14 代の細胞を使用した。NMG は 8×20 μ で 3~4 角形の胞体を有し、40~60 μ の数本の突起を有する細胞と、細胞体中央部に盛り上がりがなく胞体の薄い突起を有しない細胞が約 15% 混在していた (Fig. 10)。この細胞は 30 代以降は継代を維持できなかった。薬物を作用させる場合はいずれもコントロール培養を行い、これらには、実験期間中細胞の形態、染色体の分布及び形の変化をなさない事を確認した。

3) 細胞の同調培養: 細胞は G₁期 (postmitotic non-synthetic period), S 期 (DNA-synthetic period), G₂期 (premitotic non-synthetic period), M 期 (mitotic period) の 4 つの相を経て分裂増殖をする。

この過程は多量のチミジンの添加により S 期初期で止まるという Xeros⁷⁾の実験結果に基づき、細胞の同調培養を行った。継代後 24 時間目に MG 細胞の定着を確め、10 mM のチミジンを含む培養液に交換して 36 時間培養した。更に新鮮な培養液で 24 時間培養して上述の操作をもう一度くり返した。実験にはこの様に処理した細胞を 1×10⁶個/ml の密度で、Falcon 3012 plastic culture bottle (25 cm²) に 5 ml 分注し必要な数を製作して用いた。NMG は継代後細胞が安定増殖を開始するまでに約 48 時間を要した。従ってこの細胞については、10 代継代後 48 時間培養した後に 10 mM チミジン添加培養液に交換し 72 時間培養した。この操作を再度くり返して同調培養した。

4) Cell cycle analysis: 同調培養した細胞に RI の標識を行った。各培養瓶につき、4 時間の差をおいて ³H で標識したチミジン (³H-TdR) を 30 分間取り込ませた。同時に偏光顕微鏡下に、一視野 (10×10) 中の分裂期の細胞数を調べた。細胞数の算定は、0.2% トリプシン処理し剝離した細胞を Hanks (+) balanced solution で洗浄した後に 0.4% のトリパン青で死細胞を染色し、生細胞のみを数えた。DNA 合成は液体シンチレーションカウンターで細胞内に取り込まれた ³H-TdR を計測して算定した。

5) 染色体分析: 標本の作製方法は、森脇ら⁶⁾の方法、大野ら⁹⁾の改良法に従い、分析方法は Evans ら¹⁰⁾のリンパ球の染色体分析法を参照した。コルセミドは、0.1 μg/ml を 1 時間作用させ、0.062 M KCl 液で 20 分間低張液処理を行い、固定は水酢酸-メタノール液 (1:3) で 5 分、15 分、30 分と 3 回行った。固定した細胞は流水に浸したガラスに塗布し、1/15 M ゼーレン・リン酸緩衝液で 25~50 倍に希釈したギムザ液 (Merk 製) で染色し検鏡した。

6) アルキル化剤: アルキル化剤として、ニトロソウレア系製剤の中で、水溶性脂溶性の塩酸ニムスチン (1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl) 3-nitrosourea hydrochloride 以下 ACNU と略、三共製薬結晶) と、マイトマイシン C (以下 MMC と略、協和醸酵工業) を培養液で溶解及び希釈して用いた。両薬剤を各々 0.45 μ のミリポアフィルターで除菌して同調培養細胞の各時期に 1 時間作用させた。生細胞数の算定には前述の 0.4% トリパン青染色後、チュルクの計算板を用いて、一検体につき 5 回計測して平均値を求めた。

7) カフェイン: 無水カフェイン (C₈H₁₀N₄O₂ 和光純薬工業結晶) も上述の如く除菌、希釈し、1 mM の濃度のものを各細胞周期に作用させてその効果を検索した。

結 果

1) 細胞周期の分析: Fig. 1 は同調培養した MG 細胞の DNA 合成, 細胞数及び分裂期細胞数を示す。³H-TdR の細胞内取り込みは継代培養後 16 時間から 32 時間にみられ, 24 時間で最高に達した。M phase 細胞は 24 時間では一視野に 10 個程であるのに対して, 28 時間, 32 時間では各々 60 個, 40 個であった。細胞数は 24 時間より急に増加し, 36 時間で倍に達した。その cell cycle time は約 20 時間, G₁ phase は 8 時間, S phase は 8 時間, G₂M phase は 4 時間であった。従ってアルキル化剤及びカフェインの投与は S phase には継代後 16 時間目に, G₂M phase には 26 時間目に, G₁ phase には次の cell cycle の G₁ phase を用いて 32 時間目に行った。Fig. 2 は NMG の同調培養における DNA 合成, 細胞数及び分裂期細胞数を示す。³H-TdR の細胞内取り込みは 28 時間から 56 時間の間にみられ, 44 時間目に最高に達した。M phase 細胞は 64 時間目に最高となり, 一視野中 50 個であった。この細胞群の各期は重複する部分があったが, その cell cycle time は約 48 時間であり, その構成は G₁ phase は約 8 時間, S phase は約 28 時間, G₂M phase は約 12 時間であった。M phase 細胞が出現する時間は約 12 時間と幅広く,

そのために実験中の染色体分析は 6 時間毎に 2 回にわたって行った。アルキル化剤及びカフェインの投与は, S phase に対しては培養開始後 32 時間目に G₂M phase には 52 時間目に G₁ phase には次の cell cycle の G₁ phase にあたる 68 時間目に作用させた。

2) 細胞の染色体: MG は 14 代細胞では一組の bi-armed marker chromosome (Fig. 11) を持つ 46 染色体細胞が 80% と, 40 染色体(正 2 倍体)の細胞が 20% みられたが, 継代培養を重ねるに従って 46 染色体細胞が多くなり, 60 代継代細胞では 95% の細胞が 46 染色体を有し, 残りの 5% は 89 及び 92 染色体を有する細胞であった (Fig. 3)。NMG の 11 代培養細胞は染色体数 40 の細胞 (Fig. 12) (以下 NMG-40 と略) が 15% を占め, 残りの 85% は染色体数が 67 から 78 に分布し, 73 にピーク (mode 73, range 67-78, 低 4 倍体) をもって, 大むね正規分布を示す細胞群 (Fig. 13) (以下 NMG-73 と略) からなった (Fig. 4)。NMG-73 には exchange や minute 等の変化はみられなかったが, その 18% に 1 ないし数個の gap & break がみられ, その頻度 (gap & break/chromosome X 100) は 0.44 であった (Table 3)。

3) アルキル化剤の細胞増殖抑制効果: MG 及び NMG に対して, 種々の濃度のアルキル化剤を, G₁,

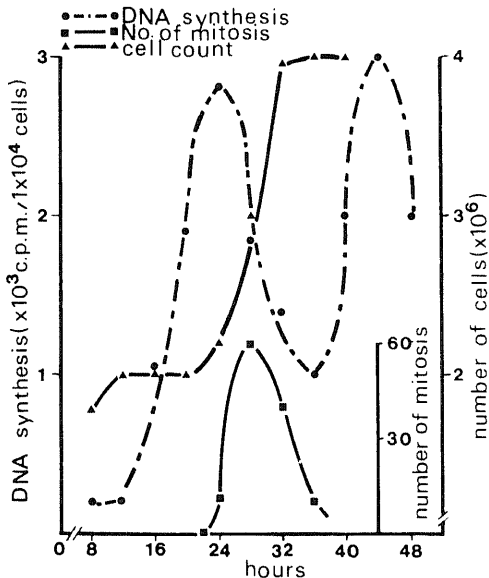


Fig. 1. Cell cycle analysis of MG revealed by synchronizing culture with thymidine.

●---● : DNA synthesis measured by pulse labelling with ³H-TdR.
 ■---■ : number of mitosis per visual field.
 ▲---▲ : number of the cells in the culture bottle.

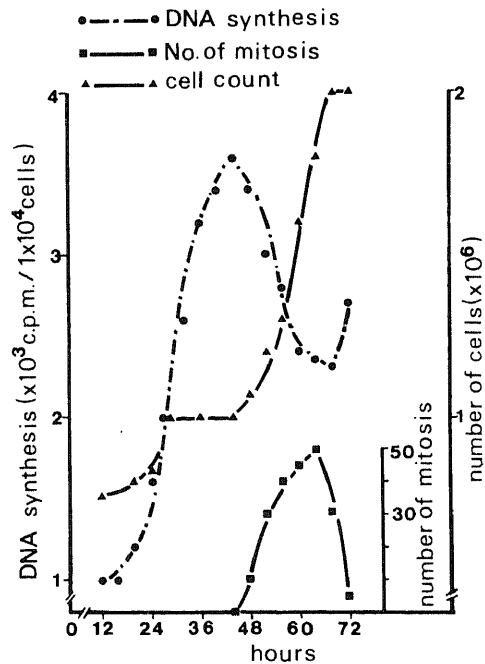


Fig. 2. Cell cycle analysis of NMG revealed by synchronizing culture with thymidine. Symbols are as shown in Fig. 1.

S, G₂M phase に投与し細胞が安定状態にある G₁ phase の細胞の生存率 (control との比: cell survival rate) を検索した。薬剤を投与した場合、その濃度に比例して S phase が 2~6 時間延長するので、M phase が終了して G₁ 期に移行した事を偏光顕微鏡下で確認した後に細胞数算定を行った。ACNU の 0.4 μ g/ml, 2 μ g/ml 及び 10 μ g/ml の濃度のものを MG の S phase に作用させた場合、作用後最初の G₁ phase の細胞生存率は 77%, 66%, 54% で次の G₁ phase では 50%, 42%, 35% となった (Fig. 5-1)。これに対し G₂M phase に作用させた場合の細胞生存率は最初の G₁ phase ではそれぞれ 100%, 90%, 67% になり、次の G₁ phase では 70%, 55%, 43% になった。G₂M phase に作用させて S phase を一度通過した後の G₁ phase の細胞生存率は、S phase に作用させて次の G₁ phase でみた細胞生存率の値と同程度になった。次に MMC の 0.

1 μ g/ml 及び 1.0 μ g/ml の濃度のものを MG の S phase に作用させた場合、最初の G₁ phase での細胞生存率はそれぞれ 80%, 70% で、次の G₁ phase では 65%, 55% であった (Fig. 5-2)。G₂M phase に作用させた場合は同様に 97%, 94% と 74%, 62% となった。ACNU, MMC の各濃度を G₁ phase に作用させた場合は、S phase に作用させた場合と同じ値を示したので、Fig. 5 にはその記載を省略した。NMG に対して上述と同様の実験を行った (Fig. 6-1, 6-2)。ACNU の 0.4 μ g/ml, 2 μ g/ml 及び 10 μ g/ml の濃度のものを S phase に作用させた後の最初及び第 2 回目の G₁ phase での生存率は、100%, 95%, 88% 及び 88%, 75%, 68% であった。同様に G₂M phase に作用させた場合は最初の G₁ phase では有意に生存率の低下を認めず、次の G₁ phase ではそれぞれ 98%, 95%, 77% であった (Fig. 6-1)。MMC を NMG の S phase に作用さ

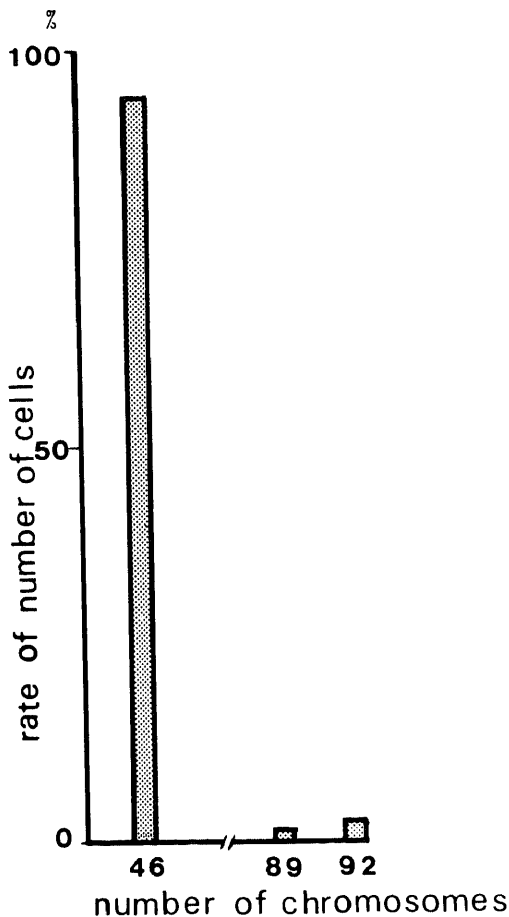


Fig. 3. Histogram of chromosome number of MG. 95% of cells have 46 chromosomes. ordinate: number of chromosomes. abscissa: rate of number of cells.

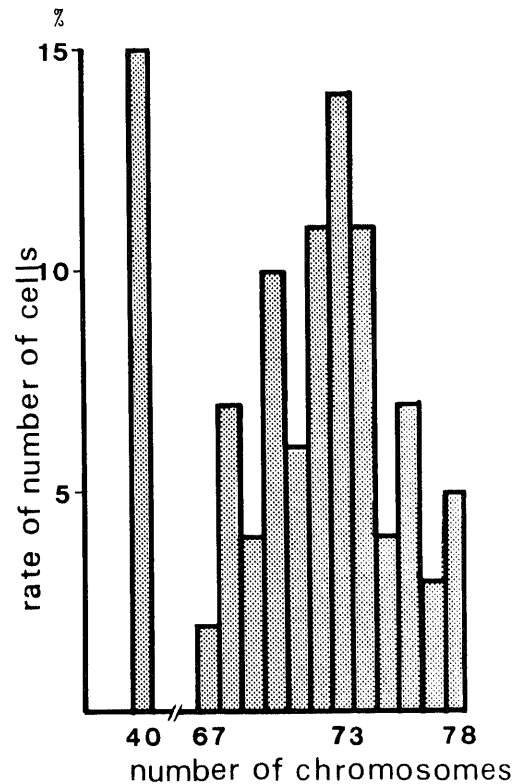


Fig. 4. Histogram of chromosome number of NMG. The cells were divided into two groups by number of chromosomes. Group I has cells with 40 chromosomes (NMG - 40) and the group II has mode 73, range 67 - 78 chromosomes (NMG - 73). ordinate: number of chromosomes. abscissa: rate of number of cells.

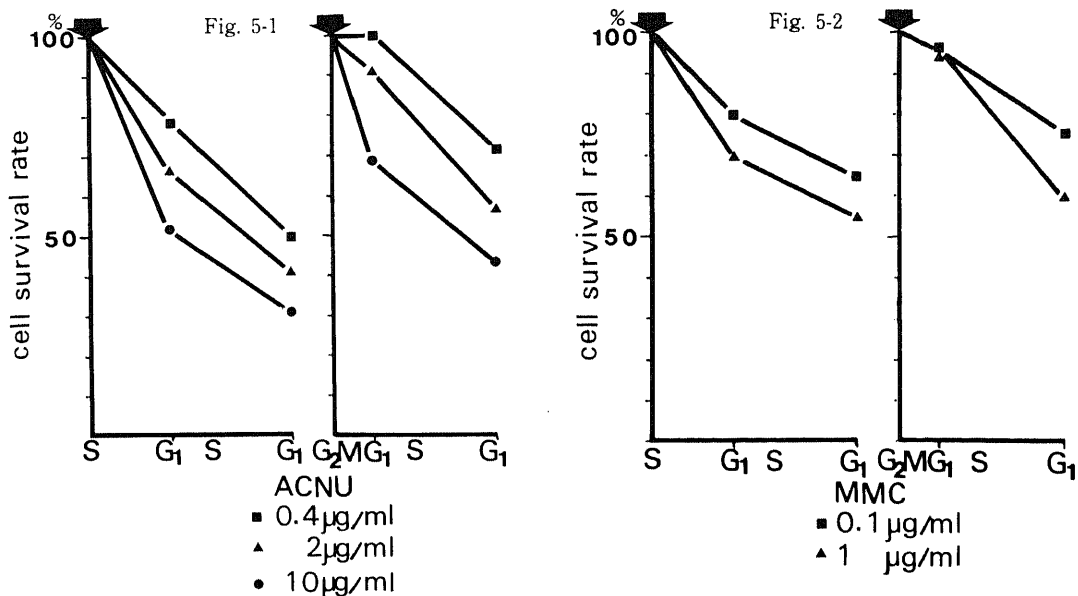


Fig. 5. Effects of alkylating agents on MG.

Fig. 5 - 1. Each dose of ACNU was administrated on S phase (left) and G₂M phase(right) of MG The number of cells were counted in G₁ phases.

Fig. 5 - 2. Each dose of MMC was administrated on S phase (left) and G₂M phase (right) of MG and treated as Fig. 5 - 1.

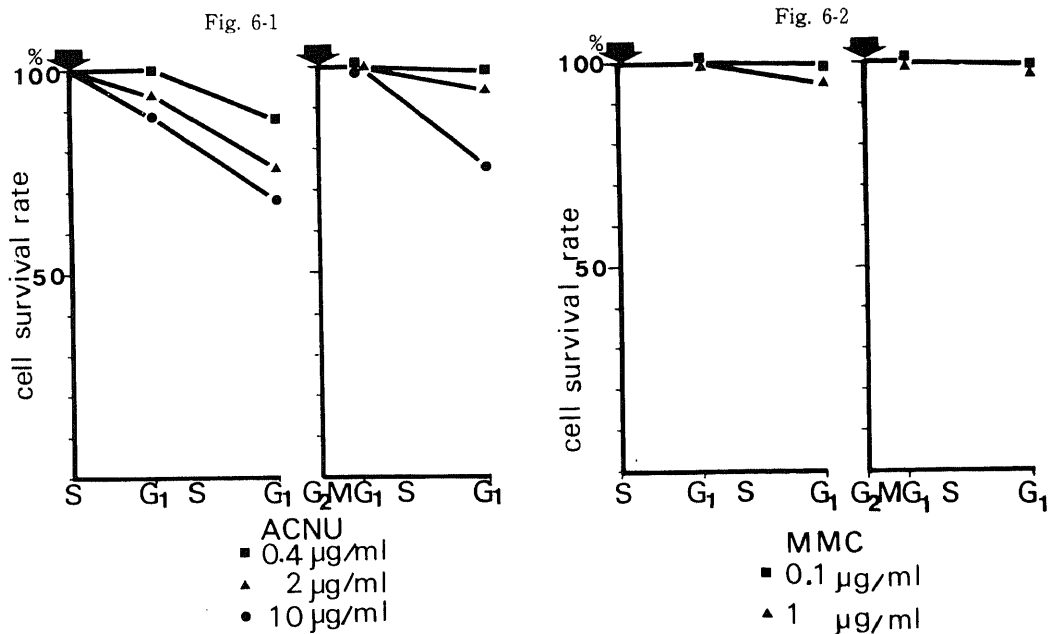


Fig. 6. Effects of alkylating agents on NMG.

Fig. 6 - 1. ACNU.

Fig. 6 - 2. MMC.

Symbols and treatment of cells are same as Fig. 5.

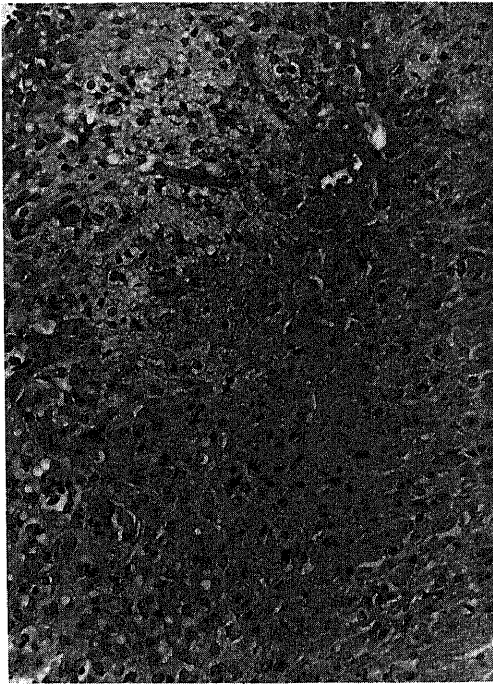


Fig. 7. 20 - methylcholanthrene induced mouse glioma ($\times 150$). HE stain.

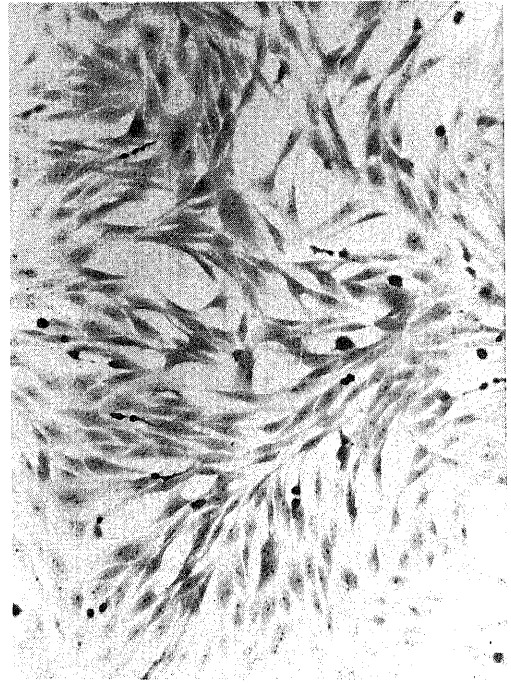


Fig. 8. MG established as cell line. Culture for 24 hours after passage ($\times 300$). PTAH stain.



Fig. 9. Electromicroscopic findings on MG. Microtubuli were noticed in cell ($\times 35,000$).

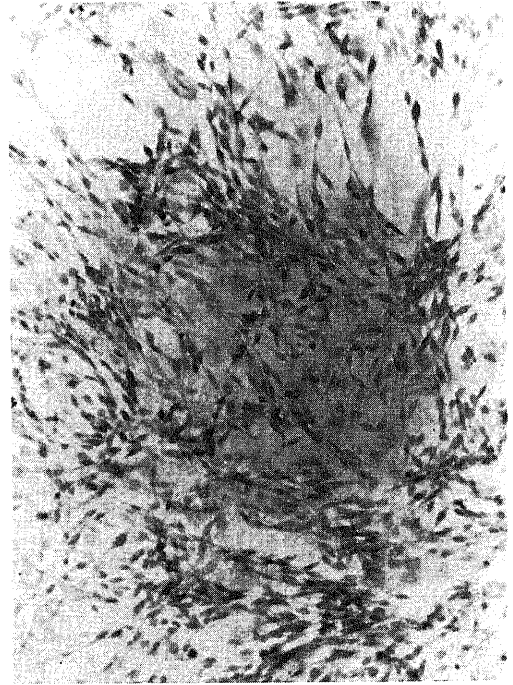


Fig. 10. NMG cell cultured for 48 hours after 11 passages ($\times 300$). HE stain.

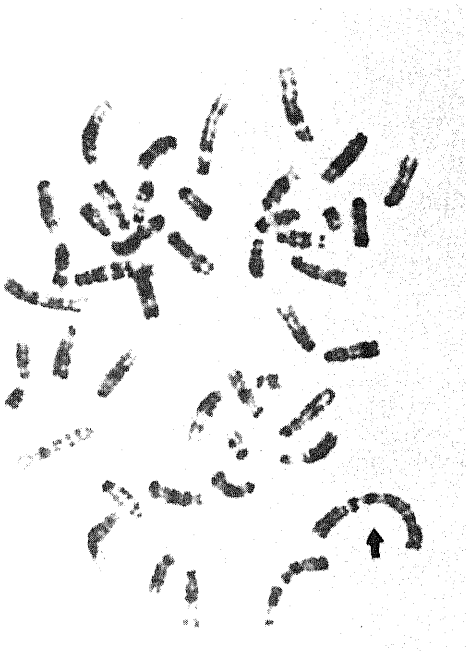


Fig. 11. Metaphase of MG showing 46 chromosomes from Trypsin - Giemsa banding method. Arrow: bi - armed marker chromosome ($\times 1,500$). Giemsa stain.



Fig. 12. Metaphase of NMG showing 40 chromosomes ($\times 1,200$). Giemsa stain.

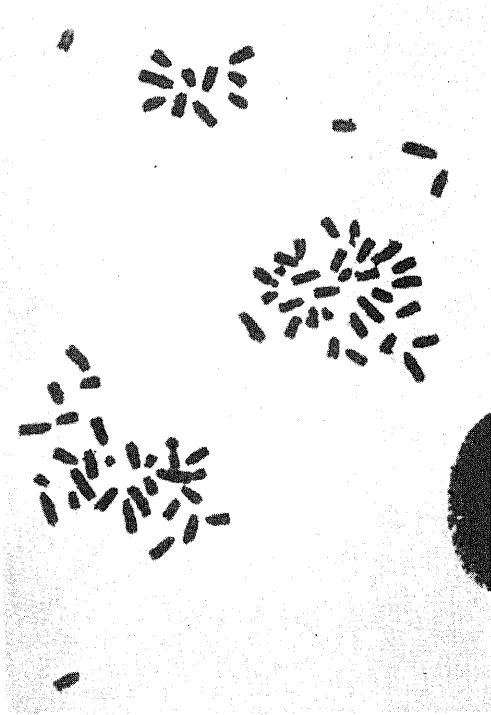


Fig. 13. Metaphase of NMG showing 73 chromosomes ($\times 1,000$). Giemsa stain.



Fig. 14. Change of MG with treatment of ACNU ($10\mu\text{g/ml}$) on S phase. Note the swelling of cells ($\times 300$). HE stain.

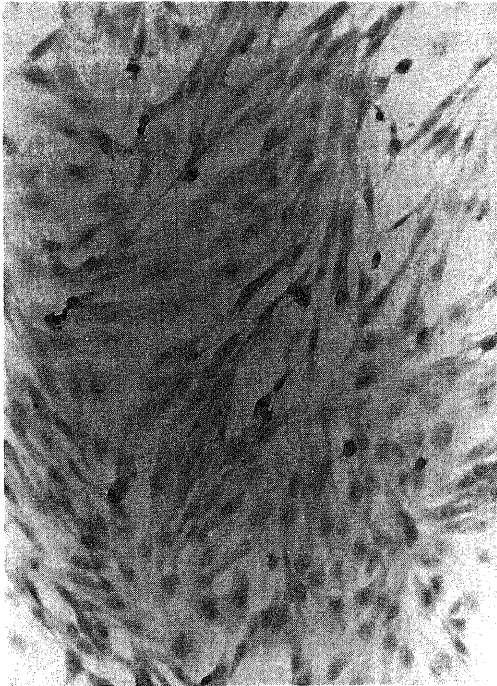


Fig. 15. ACNU ($2\mu\text{g/ml}$)-treatment on S phase of MG produced no noticeable changing in the cells ($\times 300$). HE stain.

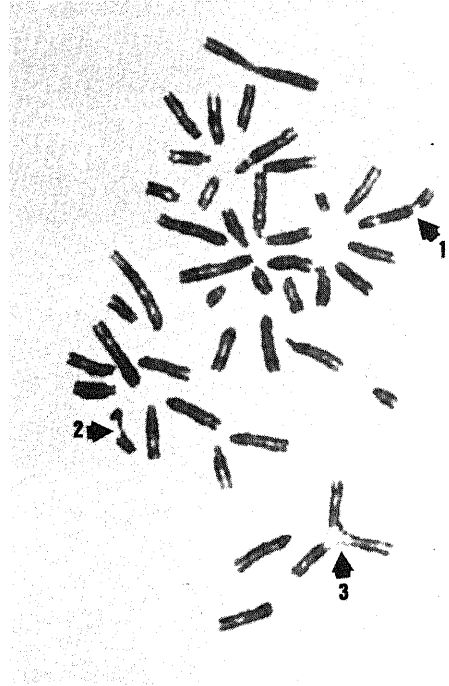


Fig. 16. Chromosome aberrations of MG induced by administration of MMC ($1\mu\text{g/ml}$) ($\times 1,500$). Giemsa stain. Arrow 1: gap of chromosome. 2: break of chromosome. 3: exchange of chromosome.

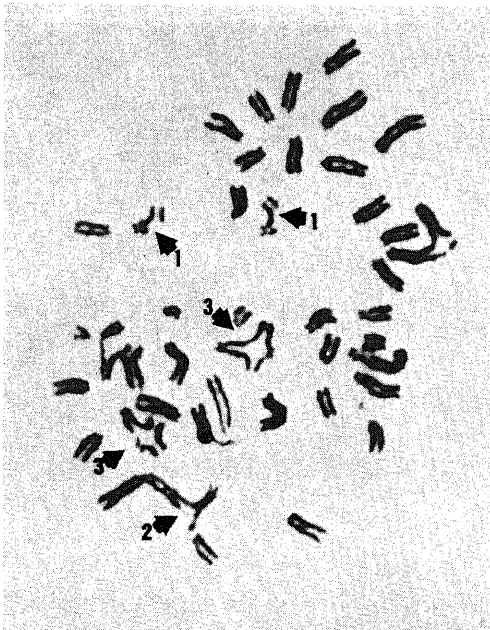


Fig. 17. Chromosome aberrations of MG induced by ACNU ($10\mu\text{g/ml}$)-treatment on S phase ($\times 1,100$). Giemsa stain. Arrow 1: gap & break of chromosomes. 2: incomplete exchange of chromosome. 3: complete exchange of chromosome.

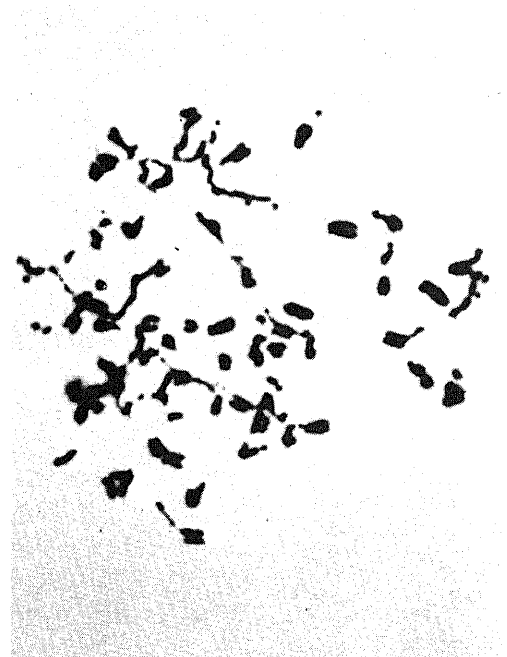


Fig. 18. Multiple breaks of chromosomes were observed after ACNU ($10\mu\text{g/ml}$)-treatment on S phase ($\times 1,500$). Giemsa stain.

せた場合、最初の G₁ phase では有意の生存率低下を認めず、次の G₁ phase で 1 μ g を作用させた系のみが 95% となった (Fig. 6-2.左). 同様に G₂M phase に作用させた場合には第 1 回目及び次の G₁ phase いずれでも細胞生存率の有意の低下がみられなかった (Fig. 6-2.右). また G₁ phase に作用させた場合は S phase に作用させた場合と同様の結果を得たので図には省略した.

4) ACNU 及び MMC 投与による細胞形態の変化: 単層培養の顕微鏡検査ではアルキル化剤投与による細胞形態の変化の所見は少なかった. 細胞の S 及び G₂M phase に、ACNU を 0.4 μ g/ml, 2 μ g/ml, 10 μ g/ml, MMC を 0.1 μ g/ml, 1.0 μ g/ml の各濃度を作用させて最初の G₁ phase 及び第 2 回目の G₂ phase での細胞の変化を顕微鏡下に検索した. MG の S phase に ACNU 10 μ g/ml ならびに MMC 1 μ g/ml を作用させて第 2 回目の G₁ phase にはじめて細胞体の膨化, 細胞突起の縮小, 多核化が観察され, 一部の細胞体には空胞化がみられたが (Fig. 14), これより低い濃度や最初の G₁ phase では認むべき変化を来さなかった (Fig. 15). NMG に対しては両薬剤共に実験濃度範囲内では認むべき効果を示さなかった.

5) ACNU, MMC による染色体の変化: ACNU と MMC を MG 及び NMG の S phase に作用させると, 両細胞共に M phase の染色体上共通の形態的変異が生じた. それは染色体の chromatid の一部に欠損は生じるが chromatid の連続性は失なわれていない gap (Fig. 16. arrow 1), 及び連続性が失なわれる break (Fig. 16. arrow 2), 更に他の染色体の chromatid と再結合した exchange (Fig. 16. arrow 3) 等である. exchange には一方の chromatid 端が free である incomplete exchange (Fig. 17. arrow 2) と両方の chromatid が再結合している complete exchange (Fig. 17. arrow 3) の両型がみられた. chromatid の欠損や, その欠失端である minute 等は認めなかった.

アルキル化剤作用後にカフェイン 1 mM を細胞の S phase に投与したものは染色体が細切され, 染色体の形を成さない multiple break (Fig. 18) が出現した. gap と break は判別が困難な場合もあり, 計測に際して同意義のものとして両者一括して数えた. 10 μ g/ml の濃度の ACNU を 1 時間, MG の S phase に作用させると, 最初の M phase [(M)₁] では, 染色体異常を有する細胞の頻度は 100%, gap & break は 100 個の染色体につき平均 (gap & break/chromosome X 100) 10.78 箇所, exchange は 1 個の細胞につき平均 (exchange/cell) 2.02 個の頻度で認められた (Table 1). 同様の処置を NMG に行った場合, NMG-40 では染色体異常を有する細胞は 71% で gap & break/chromosome X 100 が 2.50, exchange/cell が 0.28 であったのに対し, NMG-73 では異常染色体細胞の頻度は 96% で, gap & break/chromosome X 100 は 7.38, exchange/cell は 2.17 となった. 同様に 1.0 μ g/ml の濃度の MMC を MG 及び NMG に作用させて染色体の変化を検索した. ACNU 10 μ g/ml と MMC 1.0 μ g/ml は細胞に同程度の染色体変化をひき起こした (Table 1). NMG-40 はアルキル化剤による染色体の変化が少なかった. NMG-73 と MG では, gap & break が MG に高く, exchange は NMG-73 に高頻度で出現した.

6) 各細胞周期に対するアルキル化剤の作用. MG 及び ACNU を用いて, 前述のアルキル化剤の cell phase dependency を染色体分析により検索した. G₁, S, G₂M phase に ACNU 10 μ g/ml の濃度を 1 時間作用させて, 最初の細胞分裂期 (M)₁ 及び第 2 回目の分裂期 (M)₂ での染色体異常を調べた. S phase に作用させた場合 (M)₁ での染色体異常細胞の頻度は 100%, gap & break/cell は 4.96, exchange/cell は 2.02 であり, (M)₂ での染色体異常細胞の頻度は 70% に低下したが gap & break/cell は 4.88, exchange/cell は 2.16 と (M)₁ と

Table 1. Chromosomal damage induced by ACNU and MMC. ACNU (10 μ g/ml) and MMC (1 μ g/ml) were administrated on S phase of MG and NMG. chromosomal damage was examined at the first (M)₁ phase.

	ACNU (10 μ g/ml)			MMC (1 μ g/ml)		
	damaged cell	aberration		damaged cell	aberration	
		gap & break	exchange		gap & break	exchange
MG	100%	10.78	2.02	96%	6.30	1.88
NMG-40	71%	2.50	0.28	55%	2.68	0.11
NMG-73	96%	7.38	2.17	100%	7.07	2.45

damaged cell: frequency of chromosomal damaged cells. gap & break: gap & break/chromosome \times 100. exchange: exchange/cell.

同頻度であった (Table 2). G_2M phase に作用させた場合 (M_1) での染色体変化は少なかったが, (M_2) では S phase に作用させ (M_1) でみた場合に近似した. G_1 phase に作用させた場合も同様の値を示した.

7) アルキル化剤 ACNU の投与量による染色体の変化: 各濃度の ACNU (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を, MG 及び NMG の S phase に作用させて最初の M phase でみられる染色体の変化を比較検討した (Table 3). MG に於て染色体異常を有する細胞の頻度はそれぞれの作用濃度で, 60%, 80%, 100% で, gap & break/chromosome X 100 は, 2.8, 4.7, 10.8, exchange/cell は 0.02, 0.10, 2.02 であった. NMG - 40

に於ては, 異常染色体細胞の頻度はそれぞれ 32%, 40%, 71% で gap & break/chromosome X 100 は 0.9, 1.5, 2.5 であったが, exchange は ACNU 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で作用させた場合にのみ出現した. NMG - 73 の異常染色体細胞の頻度はそれぞれ 59%, 68%, 96% で, gap & break/chromosome X 100 は 1.6, 3.3, 7.4 で, exchange/cell は 0.12, 0.14, 2.17 であった. MG 及び NMG 共に染色体の変化の程度は, アルキル化剤 ACNU の濃度に比例した (dose dependent). MG 及び NMG - 73 では同頻度に染色体異常を有する細胞がみられたが, gap & break は MG に高く, exchange は NMG - 73 に高かった. NMG - 40 は上記両細胞に

Table 2. Effects of ACNU on each cell phase

ACNU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	examined phase	damaged cell	aberration/cell	
			gap & break	exchange
S	M_1	100%	4.96	2.02
	M_2	70%	4.88	2.16
G_2M	M_1	78%	1.86	0.08
	M_2	98%	3.60	1.96
$(G_1)_2$	M_2	100%	5.04	1.84

ACNU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was administrated on (G_1), (S), (G_2M) phase of MG. Aberrations of chromosomes were examined at the first (M_1) and the second (M_2) phase.

Table 3. Response of MG and NMG to dose of ACNU. 0.4, 2, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doses of ACNU were administrated on S phase of these cells. Chromosome damages were examined at the first M phase.

	dose of ACNU ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	damaged cell	chromosomal aberration	
			gap & break	exchange
MG	—	0	0	0
	0.4	60%	2.8	0.02
	2	80%	4.7	0.10
	10	100%	10.8	2.02
NMG-40	—	0	0	0
	0.4	32%	0.9	0
	2	40%	1.5	0
NMG-73	—	18%	0.4	0
	0.4	59%	1.6	0.12
	2	68%	3.3	0.14
	10	96%	7.4	2.17

gap & break ; gap & break/chromosome $\times 100$. exchange ; exchange/cell

比べ ACNU の影響が低かった。染色体異常を有する細胞が約 70% 出現する ACNU の濃度で各細胞を比較すると、NMG-40 は ACNU の濃度が 10 μ g/ml で NMG-73 は 2 μ g/ml, MG は 0.4~2 μ g/ml の間の濃度が相当した。この中では、NMG-40 に最も高い exchange が認められ、MG が最も exchange が少なかった。

8) Exchange の type による差: MG 及び NMG-73 では出現した exchange の type に違いがみられた (Table 4)。ACNU 10 μ g/ml の濃度を両細胞の S phase に作用させ、(M)₁ phase での complete exchange の比は、MG では 31.2%, NMG-73 では 53.8% に認められた。exchange の結合部位 (rejoining site of chromatid) の数を 1 個の細胞平均について比較す

ると、rejoining number/cell は MG は 2.64, NMG-73 は 3.34 であった。

9) 染色体修復に対するカフェインの作用: DNA の複製後修復を抑制するカフェインをアルキル化剤処理後に作用させて、アルキル化剤による染色体変化を検討した。実験は exchange/cell が 1.0 以上の染色体変化を起こす ACNU 10 μ g/ml の濃度のものを用いた。このものを MG 及び NMG 両細胞の S phase に 1 時間だけ作用させた後に 1 mM のカフェインを S から G₂ phase の間に作用させて、(M)₁ phase で染色体を観察した (Table 5)。この濃度のカフェインを単独投与した場合、gap & break/chromosome X 100 は ACNU 投与によるものよりも低い。MG に於てはカフェイン 1 mM の単独投与で、染色体異常を有する細胞が 52% に出現し、gap & break/chromosome X 100 は 2.13 になるが、exchange は出現しなかった。これに比して、ACNU 10 μ g/ml 作用後にカフェイン 1 mM を作用させると、染色体異常を有する細胞の頻度は 100% になり、染色体が細切された multiple break を有する細胞が 40% に出現した。exchange/cell は、ACNU 単独投与時には 2.02 であったが、カフェインの追加投与で 0.33 に著明に低下した。NMG-40 はカフェイン単独投与では染色体に変化が生じず、ACNU 単独投与時に比べて、ACNU とカフェインの併用で gap & break/chromo-

Table 4. Frequency of complete exchange and rejoining number of chromatid broken ends of MG and NMG-73. ACNU (10 μ g/ml) was administrated on S phase. Chromosome aberrations were examined at the first M phase.

	MG	NMG-73
complete exchange	31.2%	53.8%
rejoining number/cell	2.64	3.34

Table 5. Suppression of exchange by caffeine.

Caffeine (1 mM) was administrated on S-G₂M phase of MG and NMG after treatment of ACNU on S phase of these cells. Suppression of exchanges, enhance of gap & break and multiple break of chromosomes were observed.

	ACNU on S phase	Caffeine on S-G ₂ phase	damage cell	chromosomal aberration		
				M.B.	gap & break	exchange
MG	-	-	0	0	0	0
	-	1 mM	52%	0	2.13	0
	10 μ g/ml	-	100%	0	10.78	2.02
	10 μ g/ml	1 mM	100%	40%	>37.70	0.33
NMG-40	-	-	0	0	0	0
	-	1 mM	0	0	0	0
	10 μ g/ml	-	71%	0	2.50	0.28
	10 μ g/ml	1 mM	67%	0	10.30	0
NMG-73	-	-	18%	0	0.44	0
	-	1 mM	52%	0	1.27	0
	10 μ g/ml	-	96%	0	7.38	2.17
	10 μ g/ml	1 mM	100%	25%	>23.00	1.16

damaged cell; frequency of chromosomal damaged cell. M.B.; multiple break chromosome. gap & break; gap & break/chromosome \times 100. exchange; exchange/cell.

Table 6. Effects of caffeine on each cell phase of MG. 1 mM of caffeine was administrated on each phase (S-G₂, S, G₂) after MMC-treatment. Suppression of exchange was mainly observed by treatment of caffeine on S phase.

MMC	caffeine 1 mM	chromosome damaged cell	gap & break /cell	multiple break	exchange/cell
0	S-G ₂ phase	52%	0.89	0	0
1 μg/ml	—	96%	2.90	0	1.88
〃	S-G ₂ phase	100%	> 11.35	64%	0.96
〃	S phase	100%	> 11.00	42%	0.98
〃	G ₂ phase	100%	> 7.98	20%	1.48

some X 100 は 2.50 から 10.30 に著明に増加し, exchange/cell は 0.28 から 0 に低下した. NMG-73 ではカフェイン単独投与で異常染色体細胞は 52% にみられ gap & break/chromosome X 100 は 1.27 であったが exchange は認めなかった. ACNU 投与後にカフェインを作用させた場合, 染色体異常を有する細胞は 100% にみられ, 又 multiple break chromosome を有する細胞も 25% にみられた. exchange/cell は ACNU 単独投与時の 2.17 から 1.16 へ低下した. アルキル化剤 ACNU 投与後にカフェインを作用させると, 染色体の gap & break が強くなり exchange が低下した. カフェインによる multiple break を有する細胞の出現頻度の上昇及び exchange の抑制は NMG よりも MG に強く認められた.

10) 細胞周期の各期に於るカフェインの作用: MG の S phase に, MMC の 1 μg/ml の濃度のものを 1 時間作用させた. カフェインは① S-G₂M phase, ② S phase のみ, ③ G₂M phase のみに作用させ, (M)₁ phase での染色体変化を検索した (Table 6). 染色体異常を有する細胞の頻度は①, ②, ③の全てに 100% にみられた. multiple break を有する細胞の頻度は① 64%, ② 42%, ③ 20% であり, カフェインを S phase に作用させた作用時間の長さに比例する傾向があった. これに比して exchange/cell は① 0.96, ② 0.98, ③ 1.48 であり, ①②に対して③はカフェインを作用させない場合の値に近づいた. 以上よりカフェインの作用は細胞周期の S phase に認められた.

考 察

Seligman と Shear¹¹⁾ は, はじめて C₃H マウス脳内に 20-メチルコラントレンのペレットを挿入して, 20 匹中 11 匹に人グリオーマに類するマウスグリオーマを作製し得た. Zimmerman ら⁵⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾ はメチルコラントレン, ディベンツアントラセンによるマウスグリオーマの発生率, 異系マウスによる差等の一連の発癌実験をし, 実

験的脳腫瘍の再現性が確立された. 又 Druckrey¹⁵⁾ はニトロソウレア誘導体の静脈内投与により中枢神経系に多種類の腫瘍を発生させた. メチルコラントレン挿入により発生する腫瘍は sarcoma や sarcomatous component が混った glioma-sarcoma mixed tumor が多い. この方法により Zimmerman ら¹⁴⁾ は C₃H 系に 24%, Peers¹⁶⁾ は 55%, また Perese¹⁷⁾, 西川¹⁸⁾, 福井¹⁹⁾ らは 30% から 44% のマウスグリオーマの発生をみた. 本実験で用いた MG cell line は C₃H/He 系マウスに作製したグリオーマ 47 例中の 1 例である. この cell line は継代培養を進めるに従って細胞の突起が縮少し, 60 代継代細胞は紡錘形となった. その細胞突起や細胞質は PTAH 染色によく染まり, 又電子顕微鏡学的には, 核, 細胞質の電子密度は比較的 low, maturation した細胞の細胞質には, 60~90 Å の microtubulus が認められ, Aparicio²⁰⁾ や平野²¹⁾ のいうグリア細胞の特徴をそなえていた.

Makino²²⁾ はマウス腹水腫瘍の染色体分析により, 腫瘍にはその分裂増殖の主体をなす細胞群が存在するという種族細胞説を提唱したが, 腫瘍細胞の培養に於てはこのような stem-cell が継代を経るに従って優位を占め, その細胞の株の性状を規定する. MG では染色体数 46 の細胞が stem cell と考えられた. 正常組織の単層継代培養細胞は第 I 期 (初代培養期) 第 II 期 (細胞増殖期) 及び第 III 期 (終末期) で終り, いわゆる cell line にのるものは少ない²³⁾. 正 2 倍体細胞は第 II 期から III 期に移行する過程で染色体の異数性を獲得して cell line として安定増殖するものと, 第 III 期に移行してやがて死亡していくものにわかれる. NMG は, 15% の正 2 倍体細胞と, 上記の染色体の異数性を獲得した 85% の細胞の 2 種類の細胞集団から成り立っていた. ゆえに実験は, 染色体が正常である細胞 (NMG-40) と, 異数性染色体細胞 (NMG-73) について比較検討することが妥当であり, 腫瘍由来細胞 (MG) と合わせて三者について検討を加えた.

グリオーマの発生母地である脳には、血管系と脳組織の間に血液脳関門(Blood - Brain Barrier: B.B.B.)を有するという特徴がある。グリオーマの化学療法について星野²⁴⁾は、B.B.B.を考慮に入れ、薬剤の親水性、脂溶性、分解速度、或は腫瘍の Heterogenicity という観点に立ち考察している。ニトロソウレア系制癌剤は脂溶性で B.B.B.を通過し、その代謝産物のデアゾニウムイオンがアルキル化作用を有する²⁴⁾。その中でも ACNU は水溶性である為、直接血管内投与ができ、グリオーマの治療に用いられている²⁵⁾。抗生剤の MMC もアルキル化剤として作用するが B.B.B.は通過しない²⁶⁾。

脳の神経細胞は分裂増殖を停止した細胞である。したがってグリオーマの治療においては、分裂期の腫瘍細胞を選択的に目標として化学療法を行えば、神経細胞をそこなう副作用も少ない。この目的の為に分裂増殖過程にある細胞の比、及び cell cycle に要する時間等の細胞周期の分析を行うことは重要である²⁶⁾。ヒト悪性グリオーマについて Kury と Karter は²⁷⁾、細胞周期が 3~5 日、星野は²⁸⁾ 2~3 日と報告している。又 Tannock²⁹⁾は S phase が 5~13 時間であると報告している。細胞周期は In vitro のものは In vivo のものより若干短かく、中川ら³⁰⁾のメチルコラントレン誘発マウスグリオーマの細胞周期は 24 時間前後である。本実験で用いた MG は約 20 時間の細胞周期を有していた。正常脳由来の NMG は細胞周期が長く、S phase や M phase もなだらかな曲線を描いた。これは一つには正常脳由来である事や、染色体分析上 2 種類の細胞から成り立ち、両者の細胞周期に若干のズレがあるためと考えられる。

分裂増殖期の細胞はその phase によって化学薬剤に対する感受性が異なる。Cooper³¹⁾は、ピンクリスチンは S phase に最も強く作用し細胞を M phase にとどめ、MMC は G₁ phase に作用して G₂ phase に cell cycle を止め、ニトロソウレア系の BCNU (1,3-Bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea) や CCNU (1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea) は S, G₁/S, S/G₂ phase に作用が強いと主張している。本実験の結果は、ACNU は MMC と同様に働き、細胞増殖抑制効果は薬剤の濃度に比例した (dose dependent)。その効果は S phase を一度通過して cell survival rate の低下として発現される (S phase dependent) この、又 cell survival rate の低下は異常染色体を有する細胞の出現率にほぼ比例した。

アルキル化剤投与による細胞増殖の抑制や染色体変化の程度は、顕微鏡上みられる細胞の形態学的変化に比して著明であった。設楽ら³²⁾は ACNU はニトロソウレアの中でも cytotoxic action が BCNU に比べて弱いと

述べている。S phase を一回通過した時点では細胞の形態学的変化を来さない程度の濃度の ACNU や MMC でも S phase を 2 回以上通過した場合は、細胞数の減少のみならず形態学的変化を来す。その理由は第 1 回目の S phase で exchange 等の DNA 修復がなされた細胞でも、2 回目の S phase での DNA 読み取りと修復が損われ、細胞質や細胞膜の変化を生じたり、又 M phase で分裂できず細胞の染色体変化や巨細胞化等が生じる為と考えられる。

DNA に作用する抗癌剤は細胞死を生ずる反面、細胞に突然変異をひきおこし癌を発生させる。Brundrett ら³³⁾はニトロソウレア系の BCNU, CENU (N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea), PNU (N-nitroso-N-(n-propyl) urea) 等を用いて発癌させた。この原因として Swann ら³⁴⁾はニトロソアミンによる DNA のアルキル化が、グアニンの N-7 に生じる為であると述べている。これらの DNA の損傷に対して、細胞内では unscheduled DNA synthesis や excision repair, postreplication repair 等の種々の修復機構が作動すると考えられている³⁵⁾。損われた細胞のうち修復できないものは細胞死へ、誤った修復により突然変異や発癌へと導かれていく。このような DNA レベルでの変化に対して、染色体上でもいくつかの特徴的な変化が生じる。DNA の double stranded break が修復されずに染色体上に表現されたものが gap や break である。gap や break は従来顕微鏡レベルでは区別されていたが、DuPraw³⁶⁾は電顕による染色体の観察で、break の部分にも DNA が存在しており gap と break は形態上同じ意義を有すると述べた。Sax⁴⁰⁾, Evans ら⁴¹⁾は X-線 で誘発された DNA の double stranded breaks が S phase 前に生じれば両染色体に gap や break が生じ (chromosome type)、G₂M phase で生じた場合には単一染色体に gap や break が生じる (chromatid type) と分類したが、実際には Iso-chromatid type と chromosome type は区別が不能であり、今回の実験では作用させた phase が判別しているので、特に考慮を加えなかった。Cohen と Shaw⁴²⁾は MMC を作用させた場合は特定の染色体 (No.1, 9, 16) に異常が生じやすいと報告した。本実験では、ACNU や MMC により生じた染色体の gap や break は、薬剤の濃度に比例し、同じ濃度では NMG-40, NMG-73, MG の順により高頻度に出現した。

gap & break が、DNA の double stranded break が修復されず染色体上の欠損として表現されたものであるのに対し、exchange は DNA の double stranded breaks が修復される時に、他側と誤って再結合されたものであり、切断点の片側のみが結合された場合には

incomplete exchange に、両側の場合 complete exchange となる⁴⁾。即ち誤修復ではあるが、細胞の修復能力を表現している。本実験では gap & break は腫瘍由来細胞に高く、一方 exchange は正常脳由来細胞に高く出現した。又 exchange の中でも complete exchange は正常脳由来細胞に高かった。更に NMG-40 はこれらの変化が最も低かった。以上の事は DNA の修復能力が、MG, NMG-73, NMG-40 の順に低下している事を示唆する。

カフェインはそれ自体は軽度の染色体変化を生じさせる作用を有する⁴⁹⁾⁴⁴⁾が、紫外線照射⁴⁵⁾⁴⁶⁾、MMC 投与⁴⁷⁾あるいは他のアルキル化剤投与⁴⁷⁾⁴⁸⁾により生じる染色体変化を著しく増加する。この作用は本実験でも確かめられたように、その作用は S phase にあり gap や break を増加させ exchange を抑制する⁴⁸⁾。このカフェインの作用は細胞の DNA 複製後修復を抑制するためと考えられている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。また Bishun ら⁵¹⁾のように、腫瘍細胞でも細胞によりカフェインの作用に差があることをみた報告もある。本実験では、カフェインによる複製後修復抑制の作用が MG, NMG-73, NMG-40 の順に強くみられた。したがって、この複製後修復能は腫瘍由来細胞では低下しており、Sturelid.⁴⁹⁾や Roberts⁵¹⁾らはカフェインによる複製後修復の抑制は、アルキル化剤による cell killing effect を高めると報告しているため、この修復能の低下は腫瘍由来細胞のアルキル化剤に対する高い感受性の一因を成しているものと考えられる。また本実験では、アルキル化剤とカフェインの併用により multiple break chromosome が出現した。Kihlman ら⁴⁸⁾は、2'-デオキシアデノシン投与後のヒト染色体にこのものを認め、DNA のアルキル化と共に、修復が抑えられたためとしている。

結 論

同調培養したマウスグリオーマ由来培養細胞と正常マウス脳由来培養細胞を用いて、アルキル化剤の作用による細胞の増殖抑制効果と染色体の変化、及び DNA 複製後修復能との関係について検索した。

1) アルキル化剤の作用により、その作用濃度に比例して細胞増殖の抑制がみられた。この作用は細胞が S phase を通過した後に認められ又腫瘍由来細胞が正常脳由来細胞より感受性が高かった。

2) アルキル化剤の作用により細胞の染色体に gap, break や exchange 等の変化が生じた。細胞増殖抑制の程度は、染色体異常を有する細胞の出現頻度にほぼ比例した。

3) 染色体異常は、アルキル化剤の作用後に細胞が S phase を通過した後の M phase で認められ、その頻

度は薬剤の濃度に比例した。

4) gap や break は腫瘍由来細胞に高く、exchange は正常脳由来細胞に高くみられた。

5) アルキル化剤作用後にカフェインを作用させて細胞の DNA の複製後修復能を抑制すると、染色体の gap や break は増加し、exchange は低下した。又このカフェインの作用は、細胞の S phase にみられた。

6) アルキル化剤とカフェインの併用で染色体が細切された multiple break が出現したが、その頻度は腫瘍由来細胞に高くみられた。

以上の結果より、アルキル化剤の抗腫瘍効果は、DNA 合成阻害により細胞分裂を抑制することによるもので、S phase 通過後の M phase で染色体上に gap や break として表現される。抗腫瘍効果の程度は、作用薬剤の濃度と細胞の有する DNA 修復能との関係で決定される。染色体上の exchange は DNA 損傷の複製後修復を示し、腫瘍由来細胞では低下しており、このことはアルキル化剤に対して腫瘍由来細胞が正常由来細胞よりも感受性が高い一因であることを示唆する。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました山本信二郎教授に深謝いたします。また終始御助言、御支授をいただいた久保田紀彦、伊藤治英両講師、がん研分子免疫部大野真介博士、第三解剖尾小山重夫博士ならびに御協力をいただきました教職員各位に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Kleihues, P.: DNA damage and repair in experimental neuro-oncogenesis. Recent advance in Neuropathology, I, Churchill Livingstone. 161 - 178 (1979).
- 2) Miller, J.A.: Carcinogenesis by Chemicals: An Overview - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. Cancer Research, 30, 559 - 576 (1970).
- 3) Evans, H.J., and Scott, D.: The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis. Proc. Roy. Soc. B. 173, 491 - 512 (1969).
- 4) Brøgger, a., and Johansen, J.: A Model for the Production of Chromosome Damage by Mitomycin C. Chromosoma (Berl.), 38, 95 - 104 (1972).
- 5) Zimmerman, H.M., and Arnold, H.: Experimental Brain Tumors. I. Tumors produced with Methylcholanthrene. Cancer Research, 1, 919 - 938 (1941).
- 6) 久保長生, 上条裕朗, 永室 博, 沖野充彦, 喜多村孝一: 器官培養による脳腫瘍の形態学的研究. 神経進歩, 22, 165 - 174 (1978).

- 7) Xeros, N. : Deoxyriboside control and synchronization of Mitosis. *Nature*, 194, 682 - 683 (1962).
- 8) 森脇和郎, 定家多美子: マウス骨髄細胞, ミエローマ細胞の染色体及び染色体バンドパターン観察法. 免疫実験操作法 A, 59 - 65 (1975).
- 9) 大野真介, Wiener, F. : マウス染色体のトリプシン, ギムザバンド法. 免疫実験操作法VIII, 2335 - 2339 (1979).
- 10) Evans, H.J., and O'Riordan, M.L. : Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutation Research*, 3, 135 - 148 (1975).
- 11) Seligman, A.M., and Shear, M.J. : Studies in Carcinogenesis. VIII. Experimental Production of Brain Tumors in Mice with Methylcholanthrene. *Am. J. Cancer*, 37, 364 - 395 (1939).
- 12) Zimmerman, H.M., and Arnold, H. : Experimental Brain Tumors. II. Tumors Produced with Dibenzanthracene. *Cancer Research*, 3, 682 - 685 (1943).
- 13) Zimmerman, H.M. and Arnold, H. : Experimental Brain Tumors IV. The Incidence in Different Strains of Mice. *Cancer Research*, 4, 98 - 101 (1944).
- 14) Zimmerman, H.M. : The nature of gliomas as revealed by animal experimentation. *Am. J. Path.*, 16, 1 - 29 (1955).
- 15) Druckrey, H., Ivankovic, S., und Preussmann, R. : Selektive Erzeugung maligner Tumoren im Gehirn und Rückenmark von Ratten durch N-Methyl - N - nitrosoharnstoff. *Zeitschrift Für Krebsforschung*, 66, 389 - 408 (1965).
- 16) Peers, J.H. : The response of the central nervous system to the application of carcinogenic hydrocarbons. II. Methylcholanthrene. *Amer. J. Path.*, 16, 799 - 816 (1940).
- 17) Perese, D.M., and Moore, G.E. : Methods of induction and histogenesis of experimental brain tumors. *J. Neurosurg.*, 17, 677 - 699 (1960).
- 18) 西川喜作: 実験的脳腫瘍. *神経進歩*, 7, 37 - 60 (1963).
- 19) 福井仁士: 実験的脳腫瘍に関する研究. *医学研究*, 40, 117 - 138 (1970).
- 20) Aparicio, S., Lumsden, C.E., and Jennings, M. : Electron Microscopy of Glial Reactions Observed in CNS Cultures. *Brain Research*, 7, 268 - 285 (1968).
- 21) 平野朝雄: 神経病理を学ぶ人のために. 116 - 130 頁, 東京, 医学書院(1976).
- 22) Makino, S. : Some observation on the chromosomes in the Yoshida sarcoma cell based on the preliminary report. *GANN*, 42, 87 - 90 (1951).
- 23) 中西 宥: 培養細胞の染色体. 組織培養, 525 - 534 頁, 東京, 朝倉書店(1964).
- 24) 星野孝夫: 悪性脳腫瘍の化学療法, その Pharmacokinetics. *脳神経外科*, 8, 1007 - 1016 (1980).
- 25) 森 照明, 峯浦一喜, 片倉隆一: 親水溶性 nitrosourea 系制癌剤 ACNU の脳腫瘍患者における pharmacokinetics に関する一考察. *脳神経*, 31, 601 - 606 (1979).
- 26) Hildebrand, J., and Brihaye, J. : Chemotherapy of Brain Tumours. *Advances and Technical Standards in Neurosurgery*, 5, 51 - 91, Springer - Verlag Wien New York (1978).
- 27) Kury, G., and Carter, H.D. : Autoradiographic study of human nervous system tumours. *Arch. Path.*, 80, 38 - 42 (1965).
- 28) 星野孝夫: 脳腫瘍の cell kinetics. *脳神経外科*, 1, 453 - 459 (1973).
- 29) Tannock, I. : Cell Kinetics and Chemotherapy, A Critical Review. *Cancer Treatment Reports*, 62, 1117 - 1133 (1978).
- 30) 中川秀光, 堀 正治, 長谷川洋, 最上平太郎, 早川 徹, 中田陽造: 実験的脳腫瘍に対するニトロソウレア系制癌剤 ACNU と放射線の併用療法 - in vitro および in vivo における細胞増殖抑制効果の検討一, *脳神経*, 31, 927 - 936 (1979).
- 31) Cooper, E.H. : Cell synchrony and cancer treatment. A note of caution. *Cancer Clinical Trials*, 2, 175 - 178 (1979).
- 32) 設楽信行, 河野 武, 高倉公朋, 佐野圭司: Cellular Synchronization - Radiation therapy: 同調法の検討と臨床例の実際. 第 10 回脳神経外科特別問題懇話会講演録, 97 - 111 頁(1977).
- 33) Brundrett, R.B., Colvin, M., White, E.H., McKee, J.H., Hartman, P.E., and Diane, L. : Comparison of Mutagenicity, Antitumor of Activity and Chemical Properties of Selected Nitosoureas and Nitosoamides. *Cancer Research*, 39, 1328 - 1333 (1979).
- 34) Swann, P.F., and Magee, P.N. : Nitrosamine-induced Carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-METHYL-N-NITROSOUREA, DIMETHYLNITROSAMINE, DI-

- METHYL SULPHATE and METHYL METHANESULPHONATE. *J. Biochem.*, **110**, 39 - 47 (1968).
- 35) **Swann, P.F., and Magee, P.N.**: Nitrosamine - Induced Carcinogenesis. THE ALKYLATION OF N - 7 OF GUANINE OF NUCLEIC ACIDS OF THE RAT BY DIETHYLNITROSAMINE, N - ETHYL - N - NITROSOUREA AND ETHYL NETHANESULPHONATE. *J. Biochem.*, **125**, 841 - 847 (1971).
- 36) **Roberts, J.J., Crathorn, A.R., and Brent, T. P.**: Repair of Alkylated DNA in Mammalian Cells. *Nature*, **218**, 970 - 972 (1968).
- 37) **Horikawa, M., Nikaido, O., Tanaka, T., Nagata, H., and Sugahara, T.**: Carcinogenesis in Tissue Culture. X. Rejoining of Single - Strand Breaks in DNA of Mammalian Cells induced by Chemical Carcinogens (4 - nitroquinoline 1 - oxide and its derivative). *Experimental Cell Research*, **59**, 147 - 152 (1970).
- 38) **Röhrborn, G.**: Biochemical Mechanism of Mutation. "Chemical Mutagenesis in Mammals and Man" p 1 - 15, Springer - Verlag. Berlin. Heidelberg. New York (1970).
- 39) **DuPraw, E.J.**: DNA と染色体, 273 - 288 頁, 東京 丸善(1973).
- 40) **Sax, K.**: An analysis of X - ray induced chromosomal aberrations in *T.escantia*. *Genetics*, **25**, 41 - 68 (1940).
- 41) **Evans, H. J.**: Chromosome Aberrations Induced by Ionizing Radiations. *International Review of Cytology*, **13**, 221 - 321. Academic Press. New York. (1962).
- 42) **Cohen, M.M., and Shaw. M.W.**: Effect of Mitomycin C on Human chromosomes. *J. cell. Biol.*, **23**, 386 - 395 (1964).
- 43) **Palitti, F., Rizzoni, M., Gatti, M., and Olivieri, G.**: Chromosomal aberrations induced by caffeine in endoreduplicate chinese hamster cells. *Mutation Research*, **26**, 145 - 150 (1974).
- 44) **Weinstein, D., Mauer, I., Katz, M., and Kazmer, S.**: The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes: non - random distribution of damage. *Mutation Research*, **20**, 441 - 443 (1973).
- 45) **Sideropoulos, A.S., and Shakel D.M.**: Mechanism of Caffeine Enhancement of Mutations Induced by Sublethal Ultraviolet Dosages. *J. Bacteriology*, **96**, 198 - 204 (1968).
- 46) **Lumb, J.R., Sideropoulos, A.S., and Shankel, D.M.**: Inhibition of Dark Repair of Ultraviolet Damage in DNA by Caffeine and 8 - Chloro - caffeine. Kinetics of Inhibition. *Molec. Gen. Genetics*, **102** - 111 (1968).
- 47) **Hartley - Asp, B., and Kihlman, B.A.**: Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations. IV. Synergism between Mitomycin C and caffeine in Chinese hamster cells. *Hereditas*, **69**, 326 - 328 (1971).
- 48) **Kihlman, B.A., Sturelid, S., Hartley - Asp. B., and Nilsson, K.**: The enhancement by caffeine of the frequencies of chromosomal aberrations induced in plant and animal cells by chemical and physical agents. *Mutation Reserch*, **26**, 105 - 122 (1974).
- 49) **Sturelid, S.**: Enhancement by caffeine of cell killing and chromosome damage in Chinese hamster cells treated with thiotepa. *Hereditas*, **84**, 157 - 162 (1976).
- 50) **Okoyama, S., and Kitao, Y.**: Inhibition of chromosome repair by caffeine or isonicotinic acid hydrazide on chromosome damage induced by Mitomycin C in human lymphocytes. *Mutation Research*, **81**, 75 - 80 (1981).
- 51) **Roberts, J.J., Sturrock, J.E., and Ward, K. N.**: The enhancement by caffeine of alkylation - induced cell death, mutation and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells, as a result of inhibition of post - replication DNA repair. *Mutation Research*, **26**, 129 - 143 (1974).
- 52) **Van Den Berg, H.W., and Roberts, J.J.**: Post - replication repair of DNA in Chinese hamster cells treated with Cis Platinum (II) Diamine Dichloride. Enhancement of toxicity and chromosome damage by caffeine. *Mutation Research*, **33**, 279 - 284 (1975).

Effects of Alkylating Agents on Experimental Glioma Cells -- Studies by Synchronization Culture and Chromosomal Analysis-- -- Hirokazu Kawano, Department of Neurosurgery, (Director: Prof. S. Yamamoto), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920--J. Juzen Med. Soc., **91**, 1095--1111 (1982)

Key words: Experimental mouse glioma, Alkylating agents, Synchronization culture, Chromosomal aberration, Postreplication repair.

Abstract

Effects of alkylating agents were studied on cultured cells of experimental glioma. The glioma was induced by administration of a pellet of 20-methylcholanthrene in the brain of C₃H/He mouse and cultured in the MEM medium with 10% fetal bovine serum. One of 47 strains(MG) was used for the studies. One cell line from normal C₃H/He mouse brain(NMG) was also used for control studies. The cultured cells were synchronized by thymidine(10 mM)-treatment. 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chloroethyl) 3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) and Mitomycin C(MMC) were used as the alkylating agents and caffeine was used as the agent suppressing postreplication repair of cells.

ACNU as well as MMC inhibited the growth of MG and NMG. This inhibition was influenced by the dose of the agents and S phase of cell cycle. After ACNU(10 µg/ml)-treatment, the cell survivals were 1.5-fold higher in NMG than in MG. ACNU and MMC caused chromosomal gap & break and exchange. Inhibition of cell growth was related to the cells with chromosome aberrations. Chromosome aberrations were more frequent in MG than in NMG, indicating that MG was much more sensitive to the agent than NMG by ACNU-treatment. Caffeine suppressed the chromosomal exchange and potentiated the gap & break. MG was more sensitive to caffeine than NMG and the effect of caffeine depended on the S phase of cell cycle. Alkylating agents administered together with caffeine produced the multiple break chromosomes more frequently in MG than in NMG. Alkylating agents as antitumor drugs inhibits the cell duplication by suppressing the DNA synthesis and causes the chromosome aberration on M phase. The anti-tumor effect is dependent on the relationship between the dose of the agents and the DNA repair capacity of the affected cells.