

# 悪性腫瘍の化学療法に関する研究

## 第1編 Nitrogen mustard 抵抗性吉田肉腫を使用した化学療法剤の作用機序に関する実験的研究

金沢大学大学院医学研究科第一外科学講座(主任 卜部美代志教授)

綱 村 史 郎

(昭和37年1月31日受付)

1946年 Nitrogen mustard がリンパ腫、白血病その他に使用され、その効果が認められた<sup>1)</sup>。以来悪性腫瘍の化学療法に関する幾多の業績が発表され、またこれを契機として現在までに数多くの抗腫瘍性物質の発見をみた<sup>2)-10)</sup>。しかしそれらの治療効果に関しては、細菌感染における諸種抗生物質や Sulpha 剤のその如き真に満足すべき成績が挙げられていない現状である。

その原因として、化学療法剤の作用を受ける悪性腫瘍細胞が宿主個有細胞から発生し、かつ代謝機構がその母細胞のそれと類似していることも<sup>11)</sup>あげられるが、薬剤耐性の問題もまた最近注目されるようになってきた。吉田<sup>12)</sup>は同じ臓器より同じ方法で発生させた腹水肝癌のなかにも、Nitromin 感受性細胞と抵抗性細胞が存し、同一腫瘍のなかにも先天的に薬剤の感受性に差があると述べている。杉浦<sup>13)</sup>、臼淵<sup>14)</sup>は腫瘍の種類によつて、薬剤の抗腫瘍に差があるのを認め、各種移植腫瘍には先天的に薬剤耐性を有するものがあると述べている。このことは、臨床的にも高橋<sup>15)</sup>、福井<sup>16)</sup>等によつて報告され、かつ悪性腫瘍に化学療法剤を投与中、耐性を二次的に獲得することが、実験的<sup>17)-21)</sup>並びに臨床的<sup>22)23)</sup>にも多数報告されている。

このように薬剤耐性が確認されている以上實際上臨床的に癌化学療法剤を使用するに際し、薬剤の選択や変更等はその治療成績に重要な意義を有するものである。悪性腫瘍を組織培養して化学療法剤に対する感受性の有無を検することが、事実上極めて困難である現状では、何等かの他の方法で例えば腫瘍細胞の薬剤に対する生化学的変化<sup>24)</sup>を指標として、その耐性を検索することが出来るならば、ある程度薬剤使用の適応決定の上に役立つものと考えられる。

最近、腫瘍の薬剤耐性機構に関して、腫瘍細胞膜<sup>24)</sup>、酵素<sup>25)</sup>、核酸<sup>26)27)</sup>などの面から、多数の研究業績があげられているが、これらの研究は、他面、腫瘍の薬剤に対する感受性の本態の究明を目的としたものであり、終局的には薬剤の作用機序を究明することに帰し得るのである。この際、薬剤抵抗性腫瘍に諸種薬剤を作用させ、薬剤感受性腫瘍の場合と比較しつつ、それぞれの腫瘍細胞のそれぞれの薬剤に対する反応や態度を観察することは、各種薬剤の作用機序の差を解明する手掛りになる。しかし一つの薬剤についても、腫瘍細胞の感受性や抵抗性に関して種々の因子が想定され、更に宿主生体との関連性も考慮すべきであり、極めて複雑な問題が提供される。著者は Nitrogen mustard 抵抗性吉田肉腫細胞を使用し、感受性細胞との生物学的、組織化学的、及び生化学的差異を検討すると共に、諸種の化学療法剤に対するこれら腫瘍細胞の態度を検索し、二三の知見を得たので報告する。

### I. 実験材料

腫瘍細胞は、Nitrogen mustard 感受性吉田肉腫と抵抗性吉田肉腫細胞を使用した。(以下 NM 感受性及び抵抗性細胞または株と略記)、両者共、東京佐々木研究所分室において、ラッテに累代移植し保存されているものである。抵抗性細胞は、NM (in vitro) の連続処理によつて作成され、in vitro-assay で2500倍の耐性を有するものである<sup>28)</sup>。

実験動物は、体重 100g 前後の雑系ラッテを使用した。この腫瘍増殖の態度は、ラッテの性別には特に関係ないといわれているので<sup>29)</sup>、雌雄両性を使用した。同一実験にはなるべく同性のラッテを使用した。

Studies on the Chemotherapy of Malignant Tumor. Part I. Experimental Studies on the Mechanism of Chemotherapeutic Action of the Drugs for Nitrogen Mustard Resistant Yoshida Sacoma Cells. Shiro Tsunamura, Department of Surgery (Director: Prof. M. Urabe), School of Medicine, University of Kanazawa.

## II. 実験方法

### 1. 生物学的検索法

#### i) in vivo 法

NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫をラットの腹腔内へ移植後 7~8 日目の純培養になつた状態の腹水を採取し、各々 1000 万個宛体重 100~120g のラットの腹腔内及び右背部皮下へ注射器で移植し、Nitromin (NM O) 使用群に関しては、次のような群に分けて実験に供した。即ち対照群、0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0mg/kg 投与の 6 群に分け、NMO の生理的食塩水溶液 0.2ml 宛を 1 日 1 回連日腹腔内に注射した。Thio-TEPA (TSPA), Mitomycin (MC), Carzinophilin (CZ) の使用量は、生物学的検査法における最小有効量を使用した。即ち Thio-TEPA 1.0mg/kg<sup>30)31)</sup>, MC 300 $\mu$ g/kg<sup>14)32)</sup>, CZ 1500 $\mu$ /kg<sup>33)34)</sup> を同様腹腔内へ注射した。

a) 生存日数: 腫瘍細胞を腹腔内へ移植後、2 日目より薬剤を 7 日間連続注射し、移植より死亡までの日数である。

b) 皮下腫瘍の大きさの測定: 腫瘍細胞を皮下へ移植後、腫瘍の発育しているのを確かめて 7 日間連続薬剤を注射した。腫瘍の大きさには移植後 9, 10, 15 日目に体表より Caliber で長径と短径を測定し、その相加平均を算出したものを指標とした。

c) 腹水腫瘍細胞数: 移植後 4 日目に NMO 注射前及び注射後 12, 24, 48 時間目に毛细管 Pipette で腹水を採取し、腫瘍細胞数を白血球算定用 Mélangeur で吸い、蒸溜水で稀釈後 Thoma 血球算定盤で算定した。

d) 有糸核分裂細胞数: c) の腹水を同時に一部 object-glass に塗抹し Giemsa 染色をほどこし、腫瘍細胞 1000 個中の分裂細胞数を数えた。

#### ii) in vitro-in vivo 法

感受性及び抵抗性吉田肉腫を腹腔内へ移植後 7 日目の腹水を heparin 加生理的食塩水にそれぞれ 300 万個/0.1ml になるように浮遊しこの 4.5ml に次の最終濃度になるように、0.5ml の生理的食塩水に溶解した NM を添加した。即ち感受性株では  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  及び  $10^{-7}$ M とし、抵抗性株では  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  及び  $10^{-6}$ M とした。この混合液を  $37^{\circ}\text{C}$ 、1 時間、緩除震盪後生理的食塩水で NM を 2 回洗滌除去し、腫瘍細胞 1200 万個宛、ラットの背部皮下に移植し 8 日目に腫瘍を剔出しその重量を測定した。

### 2. 組織化学的検索法

皮下移植腫瘍を有するラットに、移植後 6 日目より前述の如き諸濃度の NMO を連日腹腔内へ注射し、

5 日目に腫瘍を剔出し、その組織切片に次の染色を行なつた。即ち核酸染色 (Pyrone-Methylgreen 染色<sup>35)</sup>), Alkaline phosphatase<sup>36)</sup> 及び Acid phosphatase 染色<sup>37)</sup>, Hematoxylin-Eosin 染色を行なつた。

### 3. 生化学的検索法

NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞を、移植後 7 日目のラットの腹腔内より、腹水と共に採取し氷冷せるヘパリン加生理的食塩水に懸濁する。一容の滅菌蒸溜水を添加して、混在せる赤血球を溶解後、低速遠心<sup>38)</sup>し沈下せる細胞を pH 7.4 の Krebs-Ringer-Phosphate (K.R.P.) 溶液または Tyrode 液で 2 回洗滌した。この細胞を氷冷せる K.R.P. 溶液または Tyrode 液に細胞数  $10^8$ 個/ml になるように浮遊し実験に供した。

#### i) 腫瘍細胞呼吸測定法

Warburg 検法<sup>39)</sup>によつて腫瘍細胞の酸素消費量を測定した。Warburg 検圧計の flask 内の組成として、主室は吉田肉腫細胞浮遊液 0.5ml (細胞数  $5 \times 10^7$  個) 薬剤 0.25ml, K.R.P. 液 1.5ml 0.01M Natrium Adenosine Triphosphate (Na-ATP) 0.25ml, 副室は 20% KOH 溶液 0.2ml, 計 2.5ml とした。気相は空気として  $37.5^{\circ}\text{C}$  の温度下に、10 分間の空振りの後 2 時間振盪 (70 回/分) して目盛を読んだ。但し基質呼吸測定時には、0.10M Glucose 0.25ml を加えて、その分だけ K.R.P. の量を減じ全量は同様 2.5ml とした。

薬剤の最終濃度は、次の如くである。即ち NM  $2 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ M, NMO  $2 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ M, Thio-TEPA  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ M, MC 500, 250, 50 $\mu$ g/ml, CZ 1000, 500, 250, 50 $\mu$ /ml である。

#### ii) 腫瘍細胞解糖測定法

腫瘍細胞の産生する乳酸量をもつて、細胞の解糖力を測定した。この乳酸量は Barker-Summerson 法<sup>40)</sup>によつて測定した。試験管内の組成は、K.R.P. 液 1.25ml, 細胞浮遊液 0.5ml (細胞数  $5 \times 10^7$  個) 0.01 M Na-ATP 0.25ml, 薬剤溶解液 0.25ml, 0.10 M Glucose 0.25ml, 計 2.5ml である。すでに混合液中に含まれる乳酸量を測定するため、混合後ただちに 1ml をとり出し、10% Trichloroacetic acid (TCA) 9ml を加えて反応を停止せしめ、残りを Thumberg 管に入れ、水流ポンプにより吸引し気泡が全く出なくなつて 3 分後、Thumberg 管の側室部を回転閉鎖して、 $37.5^{\circ}\text{C}$  の恒温槽に 2 時間静置した。乳酸量は光電比色計を用いて測定し、生成乳酸量には、2 時間後の乳酸量より最初の乳酸量を差し引いたものをあてた。

薬剤の最終濃度は、呼吸測定時のときと同様の濃度を用いた。

乳酸生成量はすべて細胞数  $5 \times 10^7$  個のそれに換算した。

iii) 腫瘍細胞の核酸代謝測定法

Isotope  $P^{32}$  を使用し、その核酸への incorporation によって核酸代謝を測定した。試験管内の反応液の組成は、Tyrode 液 1.05ml, 細胞浮遊液 0.5ml (細胞数  $5 \times 10^7$  個) 0.01M Na-ATP 0.25ml, 薬剤溶解液 0.25 ml, 0.10M Glucose 0.25ml,  $Na_2HP^{32}O_4$  0.2ml (20 $\mu$ c を含む) 計 2.5ml である。薬剤の代りに生理的食塩水を 0.25ml を入れたものを対照とした。この混合液を Warburg 検圧計用の flask に入れ、37.5°C, 2 時間振盪した。気相は空気である。反応終了後、速かに反応液の 2ml を氷冷せる 20% TCA 溶液 2ml と混じり反応を停止せしめ、柴谷氏法<sup>41)</sup> によつて Deoxyribonucleic acid 及び Ribonucleic acid (以下 DNA 及び RNA と略記) の分割を検した。

即ち反応液の沈渣を冷 10% TCA で洗滌し、その沈渣に冷 80% Ethanol を加え、遠心後、沈渣を醋酸ソーダ飽和 Ethanol に分散し、12時間放置後、Ethanol で洗滌し、沈渣を pH 7.1, 4ml の Veronal 醋酸 Buffer 食塩水に分散し、0.5ml Sodium Lauryl Sulfate 溶液を加え、100°C 30分煮沸し、30% NaCl 1ml を加え、再び 100°C 30分煮沸後、2ml の Chloroform を加えて振盪し、3000rpm 30分遠心した。この上清に約 1 容の Aceton と約 2 容の Ethanol を加え、ただちに遠心しその沈澱を 3ml の水に溶解し 7ml の Ethanol を加え、遠心沈澱を Ethanol 及び Ether で洗滌後、冷水に溶かし 1N HCl 1ml にて沈澱させ、更にその沈渣を水に分散、1N NaOH 2 滴を加え溶解後ただちに 1N HCl 1ml で再沈澱し遠心した。この沈澱を新たに 0.1N NaOH 2ml に溶解し 80°C 10分放置後、1N HCl 0.5ml と 50% TCA 0.3ml を加え遠心しその上清を RNA fraction とした。更にこの沈澱を 2ml 0.1N NaOH に溶解し、1N NaOH 1 滴を加え 80°C 20分放置し、1N HCl 1.0ml を加え、遠心後沈澱を 3.5ml の 5% TCA と共に 90°C 15分保ち遠心後その上清を DNA fraction とした。この液状の試料の 1ml 宛を鋼鉄製測定皿にとり、乾燥後 G.M. 計数管にて放射能を測定した<sup>42)</sup>。各分割の放射能は Counter Per Minute (cpm) で表わした。同時に他の 1ml で燐の定量を Fiske & Subbarow の方法<sup>43)</sup> によつて行なつた。以上の値より次の如くして、各分割の比放射能を算出した。

$$\text{比放射能} = \frac{\text{各分割の } P^{32} \text{ Count (cpm)}}{\text{各分割の燐量 } (\mu\text{g})}$$

III. 実験成績

I. 感受性及び抵抗性吉田肉腫間の諸種の相異

i) 生物学的相異

a) 生存日数(第1表): 感受性株を腹腔内に移植したラットの生存日数は、7.2 日であるが、抵抗性株のそれは 8.3 日である。抵抗性株は、感受性株よりやや生存日数の延長を認める。

b) 皮下移植腫瘍の発育(第2表): 抵抗性株を移植

第1表 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫腹腔内移植ラットの生存日数の相異

実験	1	2	3
感受性株	8	8	8
	7	8	8
	7	8	8
	6	7	7
	6	7	7
平均	6.7	7.3	7.6
総平均	7.2		
抵抗性株	9	9	9
	9	8	8
	9	8	8
	8	8	8
	8	8	8
平均	8.5	8.2	8.2
総平均	8.3		

第2表 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫皮下移植腫瘍の発育の相異

株種及び実験番号	日数				
	6 日	9 日	12 日	15 日	
感受性株	1	10.5	16.5	19.8	21.3
	2	8.0	16.2	21.5	28.5
	3	11.2	14.0	17.8	23.5
平均	9.9	15.6	19.7	24.4	
抵抗性株	1	9.0	12.9	15.6	16.7
	2	11.0	16.0	19.8	21.5
	3	10.8	13.8	16.5	20.5
平均	10.3	14.2	17.1	19.4	

数字は腫瘍の長径と短径の相平均を表わし、単位は mm である。

した場合、腫瘍の発育は感受性株を移植した場合に比べて劣っているのを認めた。

c) 腹水腫瘍細胞数及び有糸核分裂数 (第3表) 腫瘍細胞1000万个宛ラットの腹腔内へ移植し3日目より死亡するまで連日腹水を少量宛採取し検索した。感受性株と抵抗性株との移植の間に、腹水腫瘍細胞数並びに有糸核分裂数について有意の差異を認めなかつた。

ii) 組織化学的相異: 核酸 (DNA 及び RNA), Alkaline 及び Acid phosphatase の量 及び 分布を感受性株と抵抗性株を移植した腫瘍について比較したが両者の間に有意の差異を認めない。

iii) 生化学的相異

a) 呼吸及び解糖力(第4表): 感受性株の平均酸素消費量及び乳酸生成量は、129 $\mu$ l/120分及び 3.36mg/flask である。抵抗性株のそれらは、それぞれ 110 $\mu$ l/120分及び 2.80mg/flask である。即ち抵抗性株においては、感受性株に比較して呼吸及び解糖力の活性が减弱しているのを認めた。

b) 核酸代謝(第5表): 感受性株の RNA 及び DNA 代謝を、比放射能で表わすとそれぞれ 141.9 及び

37.8cpm/ $\mu$ g であり、抵抗性株のそれはそれぞれ 150.3 及び 35.3cpm/ $\mu$ g である。両者の間には、著

第3表 MN 感受性及び抵抗性吉田肉腫の腹水腫瘍細胞数及び有糸核分裂数

(1) 腫瘍細胞数

株種	実験	移植 4日目	5日目	6日目	7日目	8日目
感受性株	1	198	638	1227	2312	1762
	2	222	682	1025	2208	1650
抵抗性株	1	187	599	1108	2421	2201
	2	193	659	1009	2226	1648

(2) 有糸核分裂数

株種	実験	移植 4日目	5日目	6日目	7日目	8日目
感受性株	1	18	13	10	17	15
	2	13	20	19	14	12
抵抗性株	1	16	19	16	21	18
	2	19	18	14	19	15

第4表 感受性株と抵抗性株の内因性呼吸並びに嫌気性解糖力の相異

細胞の種類	酸素消費量 $\mu$ l/120分	乳酸生成量 mg/flask
感受性株	96	2.42
	104	2.60
	120	3.19
	126	3.26
	132	3.26
	136	3.30
	138	3.54
	142	3.90
	142	4.04
	154	4.12
平均	129	3.36
抵抗性株	87	1.97
	92	2.02
	106	2.43
	109	2.65
	110	2.68
	112	2.86
	115	2.98
	118	3.04
120	3.08	
126	3.24	
平均	110	2.80

第5表 感受性株及び抵抗性株における核酸への<sup>32</sup>P incorporation の相異 (単位は c.p.m./ $\mu$ g)

	R N A	D N A
感受性株	112.5	22.2
	114.4	41.4
	126.3	38.6
	128.8	44.3
	148.9	36.8
	150.3	32.6
	154.9	56.9
	158.7	40.3
	160.0	20.7
	164.8	42.8
平均	141.9	37.8
抵抗性株	112.4	36.4
	122.6	14.2
	133.5	37.8
	139.2	28.6
	149.1	29.9
	150.2	42.8
	159.6	39.9
	168.6	58.0
172.4	29.8	
194.9	36.5	
平均	150.3	35.3

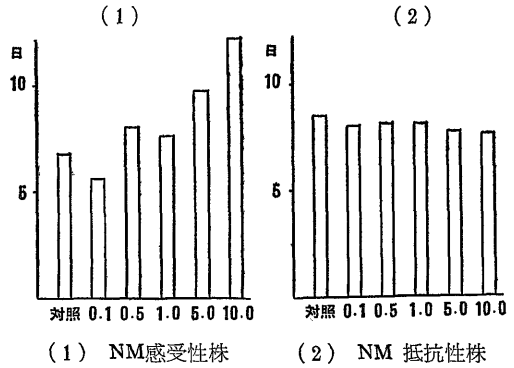
明な差異は認められない。

2. NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫の 腹水腫瘍及び皮下腫瘍に及ぼす NMO の影響

i) 生存日数 (第6表, 第1図)

感受性株に対し (NMO 0.5mg/kg 以上を投与した群においては 移植ラットの生存日数の延長を認め, 10.0mg/kg を投与した群においては5.5日の延命が認められた。抵抗性株に対しては NMO 10.0mg/kg の大量を投与した群においても, ラットの延命効果を全く認めず, 却つて平均生存日数の短縮を認めた。また感受性株に対し 最小有効量以下の 0.1mg/kg を投与

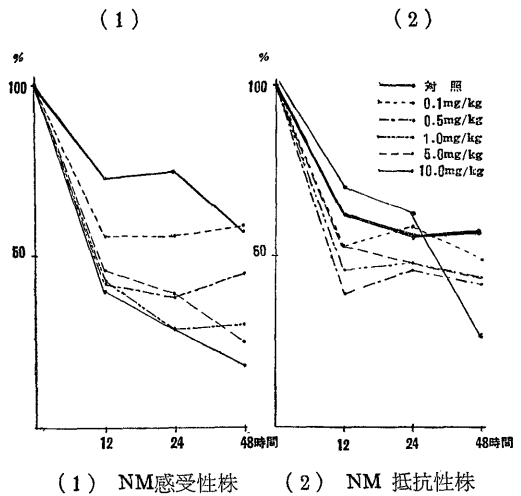
第1図 NMO の吉田肉腫腹水腫瘍移植ラットの生存日数に及ぼす影響 (平均生存日数)



第6表 NMO の吉田肉腫腹水腫瘍移植ラットの生存日数に及ぼす影響

量 mg/kg/日	対照	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0
感受性株	8	6	9	8	11	18
	7	6	8	8	10	11
	7	6	8	8	10	11
	6	5	8	7	9	11
	6	5	7	7	9	10
平均	6.7	5.6	8.0	7.6	9.7	12.2
抵抗性株	9	9	9	9	8	8
	9	8	9	8	8	8
	9	8	8	8	8	8
	8	8	8	8	8	8
	8	7	7	8	7	7
平均	8.5	8.0	8.2	8.2	7.8	7.7

第2図 NMO の吉田肉腫腹水腫瘍細胞数に及ぼす影響 (各濃度群の薬剤投与前の腫瘍細胞数を100%と表わす)



第7表 NMO の腹水腫瘍細胞数に及ぼす影響 (単位100個/mm<sup>3</sup>)

薬剤量 mg/kg	株種 時間 個体	感受性株				抵抗性株			
		0	12	24	48	0	12	24	48
対照	1	2402	1843	1710	1590	2300	1724	1742	1792
	2	2500	1762	1980	1220	3190	1708	1288	1328
	平均	2451	1803	1845	1405	2745	1716	1515	1560
	%	100	73	75	57	100	62	56	57
0.1	1	2510	1790	1490	1390	2550	1208	1568	1143
	2	2824	1190	1483	1330	2602	1510	1452	1367
	平均	2667	1490	1486	1360	2526	1359	1510	1255
	%	100	56	56	59	100	53	59	49

0.5	1	2690	958	816	840	2804	1100	1340	1130
	2	2850	1384	1246	1460	2740	1058	1200	1224
	平均	2770	1171	1031	1250	2772	1079	1270	1177
	%	100	42	38	45	100	39	46	42
1.0	1	2342	1010	590	655	3155	1526	1610	1240
	2	2168	942	730	696	3445	1542	1516	1630
	平均	2255	976	660	675	3300	1534	1563	1435
	%	100	43	29	30	100	46	48	44
5.0	1	2790	1164	1183	624	2752	1623	1520	1097
	2	2610	1308	936	720	3290	1573	1360	1538
	平均	2700	1236	1060	672	3021	1598	1440	1318
	%	100	46	39	25	100	53	48	44
10.0	1	2800	1220	984	600	2720	1800	1514	740
	2	3608	1362	886	533	2030	1595	1586	470
	平均	3204	1291	935	567	2375	1698	1550	605
	%	100	40	29	18	100	71	65	25

た群にあつてはラッテ生存日数は、却つて対照より短縮している。

ii) 腫瘍細胞数 (第7表, 第2図)

感受性株に対し、NMO 0.5mg/kg 以上を投与した群においては、腹水腫瘍細胞数は対照と比較して、経時的に著明な減少を来す。抵抗性株に対しては、NMO 5.0mg/kg 以下を投与した群においては、腹水細胞数は著変を示さない。10.0mg/kg を投与した群においては、腹水腫瘍細胞数は、第1回注射後24時間減少しないが、第2回の注射後24時間に至り、注射前の25%まで減少する。即ち感受性株においては最小有効量 0.5mg/kg、抵抗性株においては 10.0mg/kg といひ得る。

iii) 有糸核分裂細胞数 (第8表, 第3図)

有糸核分裂細胞の出現頻度は感受性株、抵抗性株共、腫瘍細胞数1000個中平均13個であり時間と共に若干の変動を示す。感受性株に対し (NMO 0.5mg/kg 以上を投与した場合、12時間後細胞分裂像の発現は著明に減少し NMO 1.0mg/kg 以上を投与した場合、48時間後細胞分裂像を殆んど認めなくなる。抵抗性株に対しては、NMO 5.0mg/kg 以上を投与した場合、24時間後核分裂細胞の中等度の減少を認めるが、それ以下の濃度の NMO を与えた場合には著しい減少はない。但し 10.0mg/kg を投与した群においては48時間後分裂細胞の消失をみる。

vi) 皮下腫瘍の大きさ (第9表, 第4図)

感受性株の移植腫瘍に対し NMO 1.0mg/kg 以上

を投与した場合、注射3日目皮下腫瘍の発育は阻害されるが、0.5mg/kg を投与した場合は注射後3日目腫

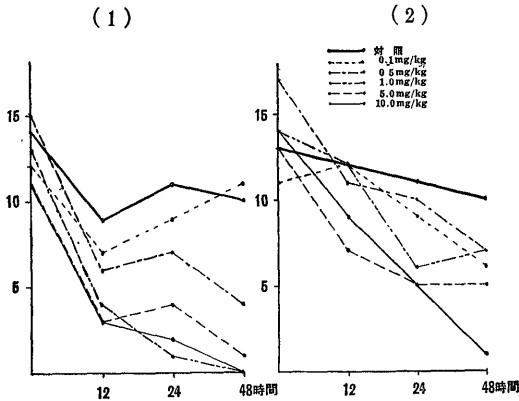
第8表 NMO の腹水腫瘍細胞の有糸核分裂数に及ぼす影響 (腫瘍細胞, 1000個中の数)

薬剤量 mg/kg	株種 時間 個体	感受性株				抵抗性株			
		0	12	24	48	0	12	24	48
対 照	1	15	9	10	12	13	14	13	11
	2	13	9	12	8	12	10	9	9
	平均	14	9	11	10	13	12	11	10
0.1	1	9	5	8	9	12	13	8	3
	2	14	9	10	13	10	11	10	8
	平均	12	7	9	11	11	12	9	6
0.5	1	20	4	6	3	16	14	10	8
	2	9	8	7	5	17	8	9	6
	平均	15	6	7	4	17	11	10	7
1.0	1	8	2	2	0	11	13	4	6
	2	17	5	0	0	16	11	8	8
	平均	13	4	1	0	14	12	6	7
5.0	1	12	2	3	2	13	8	4	3
	2	11	3	4	0	12	5	6	7
	平均	12	3	4	1	13	7	5	5
10.0	1	13	1	1	0	15	10	5	0
	2	10	4	2	0	13	7	4	1
	平均	12	3	2	0	14	9	5	1

瘍の大きさは非注射群に比べ差異なくその後において初めて腫瘍の縮小を認める。抵抗性株の移植腫瘍に対し、NMO 10.0mg/kg を投与した場合、皮下腫瘍は中等度に縮小し不完全耐性を認める。

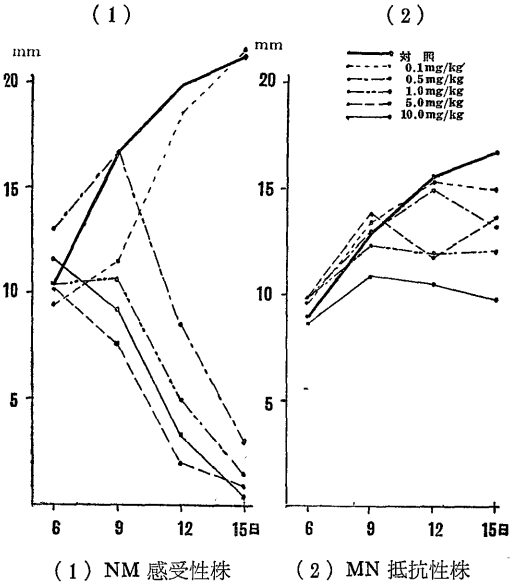
v) 組織化学的变化 (第10表, 第10図~第19図)

第3図 NMO の吉田肉腫腹水腫瘍細胞の有糸核分裂数に及ぼす影響 (腫瘍細胞1000個中の数を示す)



(1) NM 感受性株 (2) NM 抵抗性株

第4図 NMO の吉田肉腫皮下腫瘍の発育に及ぼす影響 (大きさは長径と短径の相加平均mmを示す)



第9表 NMO の皮下腫瘍の発育に及ぼす影響 (大きさは長径と短径の相加平均, 単位 mm)

薬剤量 mg/kg	株種 個体 日数	感受性株				抵抗性株			
		6	9	12	15	6	9	12	15
対照	1	9.0	19.5			12.5	19.0	23.0	
	2	10.0	14.5	19.5	22.0	8.0	11.5	16.0	20.5
	3	10.0	13.0	19.5	20.5	8.5	13.0	14.0	14.0
	4	13.5	19.5	20.5	21.5	8.0	11.0	12.0	15.5
	5	10.5	16.5			8.0	10.0	13.0	
	平均	10.5	16.5	19.8	21.3	9.0	12.9	15.6	16.7
0.1	1	8.5	9.5	16.5		9.5	9.5	8.5	8.0
	2	10.5	11.5	20.5	22.0	9.0	15.0	17.5	15.5
	3	9.0	10.0	17.5	20.0	10.0	16.5	19.5	21.5
	4	7.5	13.0	18.0	20.5	9.0	13.5	14.5	
	5	12.0	13.5	20.0	23.5	11.0	13.0	17.0	
	平均	9.5	11.5	18.5	21.5	9.7	13.5	15.4	15.0
0.5	1	15.0	19.5	10.5	3.5	10.5	14.0	15.0	
	2	10.0	15.0	6.0	2.0	11.0	12.0	12.5	
	3	13.0	15.5	10.0	1.0	11.5	16.5	19.5	16.0
	4	14.0	16.0	7.5	5.5	7.0	9.5	13.0	10.5
	5	13.0	16.5			9.5	13.5		
	平均	13.0	16.5	8.5	3.0	9.9	13.1	15.0	13.3
1.0	1	10.0	11.5	4.0	0	11.0	8.5	8.0	
	2	10.0	11.0	3.5	0	10.5	14.5	15.5	16.5
	3	11.0	11.0	7.5	4.5	8.5	12.0	10.5	8.5
	4	9.0	9.5	3.0	1.0	9.0	13.5	12.0	10.0
	5	10.5	10.5			10.5	13.0	14.0	13.5
	平均	10.5	10.7	4.5	1.4	9.9	12.3	12.0	12.1

5.0	1	8.0	6.0	2.5	1.0	7.5	13.0	8.0	14.0
	2	14.0	9.5	2.0	1.0	8.5	12.0	11.5	12.5
	3	9.5	6.5	2.5	0	9.0	12.5	11.5	14.5
	4	9.5	8.5	1.5	1.5	11.5	18.0	14.5	
	5	10.0	7.5			13.0	14.0	13.5	
	平均	10.2	7.5	2.1	0.9	9.9	13.9	11.8	13.7
10.0	1	11.5	8.5	5.5	1.0	10.0	12.0	12.5	
	2	9.5	7.0	4.0	0	6.5	9.5	8.5	11.5
	3	11.5	9.5	4.0	0.5	9.5	12.5	13.0	
	4	14.5	11.5	0	0	7.5	10.0	8.5	6.5
	5	11.0	9.5			10.0	10.5	10.0	11.5
	平均	11.6	9.2	3.4	0.4	8.7	10.9	10.5	9.8

第10表 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫皮下腫瘍に及ぼす NMO の組織化学的变化

株種	NMO量 mg/kg/日		対照	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0
感受性株	変性度	線維増生	—	—	—	+	++	+
		疎化	—	—	+	+	+	++
		細胞の膨化	—	—	+	++	++	++
	酵素	alkaline phosphatase	±	±	+	++	++	++
		acid phosphatase	—	—	+	++	++	++
	核酸	RNA	++	++	++	+	±	—
DNA		++	++	+	±	—	—	
抵抗性株	変性度	線維増生	—	—	—	—	—	+
		疎化	—	—	—	—	—	+
		細胞の膨化	—	—	—	—	—	++
	酵素	alkaline phosphatase	±	±	±	±	+	++
		acid phosphatase	—	—	±	—	—	+
	核酸	RNA	++	++	++	++	++	±
DNA		++	++	++	++	++	+	

感受性株を移植した皮下腫瘍に対し、NMO 0.5mg/kg 以上を投与した場合腫瘍発育の抑制を認める。即ち腫瘍細胞の壊死、核の不鮮明化、融解、濃縮、空胞変性、核及び胞体の膨化などを認めた。抵抗性株を移植した皮下腫瘍に対し、NMO 5.0mg/kg 以下の量を投与した場合腫瘍の組織像に上記の変化は認められず、NMO 10.0mg/kg を投与した群において部分的に変化を認める。

また感受性株を移植した皮下腫瘍群においては薬剤効果を示す NMO 0.5mg/kg 以上を投与すると核酸、特に DNA の著明な減少を認め、かつその減少度は投与薬剤量と平行関係にあるのを認めた。しかし薬剤効果量に達しない 0.1mg/kg を投与すると核酸は非注射群に比べ何等変化はない。抵抗性株を移植した皮下腫瘍群においては NMO 10.0mg/kg を投与すると核

酸は中等度に減少し、それ以下の薬剤量を投与すると核酸は対照との間に有意の差を示さない。

感受性株及び抵抗性株を移植したそれぞれの皮下腫瘍の Alkaline 及び Acid phosphatase は薬剤効果のあるものにおいて増加した。しかしその増加度と薬剤量との間には密接な平行関係はみられない。

### 3. NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫に及ぼす NM (in vitro) の影響 (第11表, 第5図)

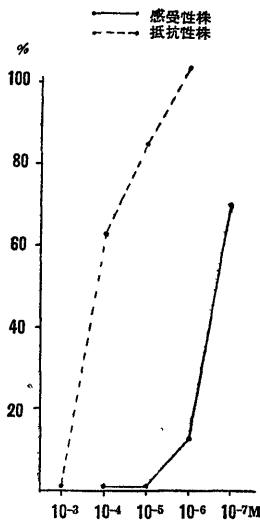
感受性株及び抵抗性株の各々を移植した全部のラッテに腫瘍の発育を認めた。感受性株細胞に対し  $10^{-7}$  の NM を in vitro で作用させて移植した場合、移植腫瘍の重量は対照の70%となり、 $10^{-6}$ M の NM を作用させると重量は対照の14%となり、 $10^{-5}$ M 以上の濃度の NM を作用させると腫瘍は全く発育しない。抵抗性株細胞に対し NM  $10^{-6}$ M を作用させても移植



第11表 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫に及ぼす NM (in vitro) の影響

濃度M	株種	感 受 性 株		抵 抗 性 株	
		腫瘍動物数 実験動物数	腫瘍重量 (平均重量) g	腫瘍動物数 実験動物数	腫瘍重量 (平均重量) g
対 照		5/5	1.4~4.1 (3.06)	6/6	1.2~3.6 (2.13)
10 <sup>-7</sup>		5/6	0.8~4.7 (2.15)		
10 <sup>-6</sup>		5/6	0.0~0.7 (0.42)	6/6	1.3~3.4 (2.21)
10 <sup>-5</sup>		0/6	0.0~0.0 (0.0)	6/6	1.1~2.8 (1.80)
10 <sup>-4</sup>		0/6	0.0~0.0 (0.0)	6/6	0.5~2.6 (1.35)
10 <sup>-3</sup>				1/6	0.0~0.1 (0.02)

第 5 図 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫に及ぼす NM (in vitro) の影響 (対照の腫瘍重量の%で表わす)



腫瘍は対照と同様の発育を示し、10<sup>-4</sup>M の NM を作用させた時その移植腫瘍は初めて対照重量の63%となり、10<sup>-3</sup>M の高濃度の NM を作用させる時は腫瘍の発育を全く認めない。即ち完全に腫瘍の生物学的活性を抑制する NM の濃度は感受性株においては 10<sup>-5</sup>M であり、抵抗性株においては NM10<sup>-3</sup>M である。両株共この薬剤濃度の 1/10 及び 1/100 の濃度においては一部の細胞は生物学的活性を保持し、換言すれば両株共個々の細胞によつて薬剤に対する感受性に相異が存するものと考えられる。

第12表 Thio-TEPA, MC, CZ の腹水腫瘍移植ラットの生存日数に及ぼす影響

株種	薬剤	対 照	Thio-TEPA 1.0mg/kg	MC 300μg/kg	CZ 1500u/kg
		感 受 性 株	8	13	13
		8	12	13	16
		8	11	12	15
		7	11	12	15
		7	10	12	15
		6	9	11	14
平 均		7.3	11.8	12.2	15.3
抵 抗 性 株		9	10	14	16
		9	9	13	15
		8	9	13	15
		8	9	12	15
		8	8	12	15
		8	8	11	14
平 均		8.3	8.9	12.5	15.0

4. 感受性及び抵抗性吉田肉腫の腹水腫瘍及び皮下腫瘍に及ぼす Thio-TEPA, MC, CZ の影響  
i) 生存日数 (第12表, 第6図)

NM 感受性株のラットに対し Thio-TEPA 1.0mg/kg を投与すると対照より4日の延命効果を認めるが、NM 抵抗性株ラットにおいては対照と差はない。

MC 300μg/kg, または CZ 1500u/kg 投与すると NM 感受性株ラットにおいても、NM 抵抗性株ラットにおいても5日から7日の延命効果を認め、両株の間に生存日数の差は認められない。即ち Thio-TEPA

は NMO と交叉耐性を有するが、MC 及び CZ は私共の検索の範囲では NMO に交叉耐性を有しない。

ii) 皮下腫瘍の大きさ (第13表, 第7図)

NM 感受性株を移植した皮下腫瘍に対し Thio-TEPA 1.0mg/kg を投与して著明な発育の抑制を認めるが、NM 抵抗性株を移植した皮下腫瘍においては対照の1/3程度発育抑制をみるのみである。しかるに MC, CZ を投与した場合、感受性、抵抗性両株の間に発育抑制差は認められない。

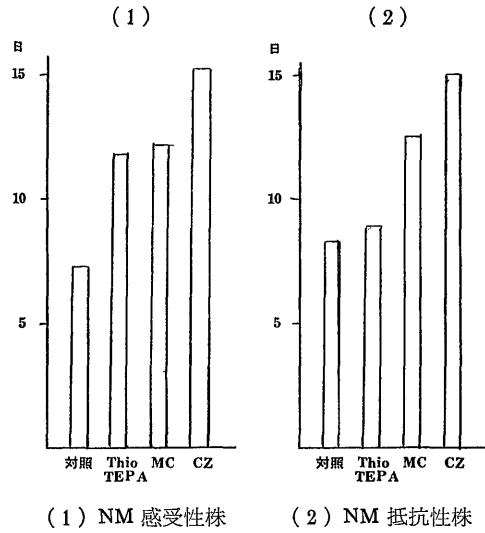
即ち皮下腫瘍の発育抑制の程度を指標として交叉耐性の有無を検索すると、NMO は Thio-TEPA と交叉耐性を有するが、MC, CZ とは交叉耐性を有しないことを認めた。

5. NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫の呼吸及び解糖に及ぼす化学療法剤の影響

i) NM の影響 (第14表, 第8図)

NM 感受性株に対し NM 10<sup>-4</sup>M 以下の濃度を作用させると腫瘍細胞の内因性呼吸及び嫌気性解糖は対照の90%程度を示し、NM 2×10<sup>-3</sup>M の高濃度を作用させると対照の70%前後となる。抵抗性株に対し NM

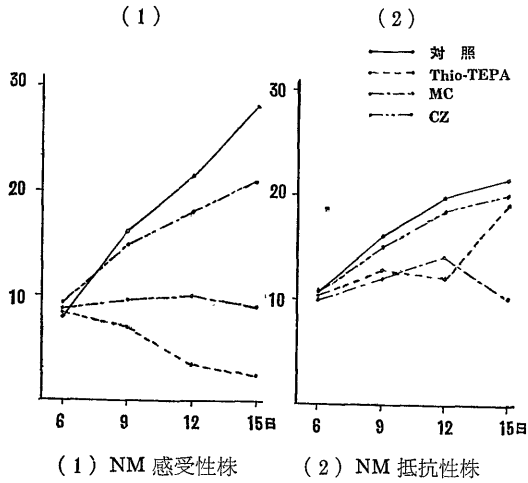
第6図 Thio-TEPA, MC, CZ の腹水腫瘍移植ラットの生存日数に及ぼす影響 (平均日数)



第13表 Thio-TEPA, MC CZ の皮下腫瘍に及ぼす影響 (大きさは長径と短径の相加平均 単位mm)

薬剤名及びその量	株種 日数 個体	感受性株				抵抗性株			
		6	9	12	15	6	9	12	15
対 照	1	7.5	17.5	20.5	24.5	11.5	19.0	20.5	23.0
	2	7.0	17.0	23.5	30.5	11.0	15.5	19.0	19.5
	3	6.5	15.5	21.0	29.5	10.5	13.5	18.5	—
	4	8.0	16.0	21.0	28.0	11.5	16.0	19.0	21.0
	5	11.0	20.0	—	—	10.0	16.0	19.5	22.5
	平均		8.0	16.2	21.5	28.2	11.0	16.0	19.3
Thio-TEPA 1.0mg/kg	1	7.5	3.0	4.5	3.5	8.5	12.0	10.5	—
	2	7.0	6.5	3.5	2.0	12.0	14.0	13.0	19.0
	3	10.0	7.0	3.0	3.0	11.0	13.0	11.5	18.0
	4	6.0	6.5	3.5	1.5	12.0	13.0	13.5	19.5
	5	11.0	7.0	3.0	2.0	9.0	12.5	11.5	—
	平均		8.3	7.0	3.5	2.4	10.5	12.9	12.0
Mitomycin 300μg/kg	1	9.5	9.0	10.5	8.5	12.5	12.5	13.5	10.5
	2	8.5	8.5	9.5	9.0	9.0	10.5	12.5	8.5
	3	11.0	11.5	12.5	—	9.5	11.5	13.5	9.5
	4	6.0	8.5	9.0	9.5	9.0	13.0	15.5	12.0
	5	8.0	10.0	10.5	9.0	10.0	13.5	15.0	11.0
	平均		8.6	9.5	10.4	9.0	10.0	12.2	14.0
Carzinophilin 1500u/kg	1	9.5	16.0	20.0	23.0	11.5	14.0	19.0	20.0
	2	9.0	14.0	16.5	18.5	10.0	13.5	17.5	19.5
	3	8.5	14.5	18.5	22.5	12.0	16.5	18.0	21.0
	4	10.0	15.5	19.0	21.0	11.5	17.5	19.0	—
	5	9.0	15.0	16.5	20.0	10.0	14.5	18.5	20.0
	平均		9.2	15.0	18.1	21.0	11.0	15.2	18.4

第7図 Thio-TEPA, MC, CZの皮下腫瘍に及ぼす影響



$10^{-3}M$  を作用させても、腫瘍細胞の内因性呼吸及び嫌気性解糖は、対照に比べ有意の差異を示さない。 $NM\ 2 \times 10^{-3}M$  を作用させると対照の80%程度となる。感受性株と抵抗性株との間において腫瘍細胞の呼吸及び解糖に及ぼすNMの作用に明らかな差異がある。即ち抵抗性株腫瘍細胞の耐性を呼吸及び解糖の抑制程度から窺うとNM  $10^{-3}M$  の濃度において完全耐性を、 $2 \times 10^{-3}M$  の濃度において不完全耐性を示している。一方感受性株、抵抗性株共、基質としてGlucoseを添加することにより呼吸は20%程度抑制されCrabtree効果を示し、かつNMの呼吸阻害の程度は弱くなる傾向を示した。

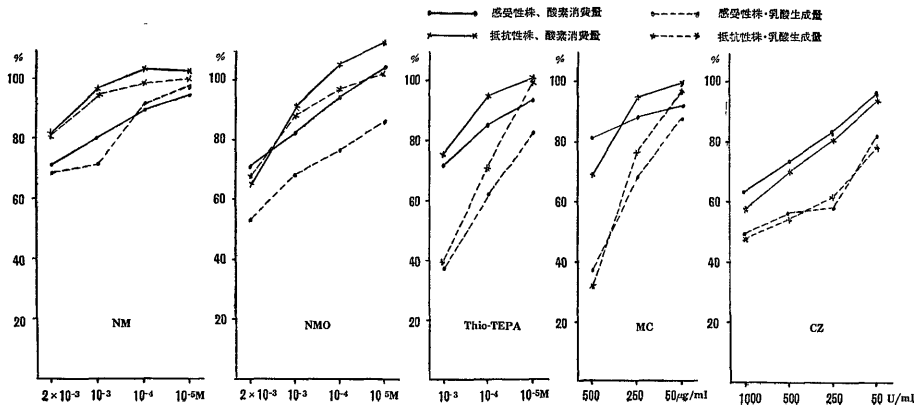
ii) NMOの影響(第15表, 第8図)

NM感受性株、抵抗性株両株の腫瘍細胞の解糖は呼吸よりも強く抑制される。特に感受性株腫瘍細胞においてその程度が強く、解糖は呼吸の2割程度余計に阻害される。 $2 \times 10^{-3}M$  の濃度のNMOを作用させた場

第14表 NMの内因性・基質呼吸及び嫌気性解糖に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度M	酸素消費量 $\mu l/120分$				乳酸生成量 mg/flask	
		基質なし		glucose 添加			
感受性株	0	138	142	113	120	3.54	3.26
	$10^{-5}$	132	138	—	—	3.50	3.24
	$10^{-4}$	126	131	99	108	3.28	2.93
	$10^{-3}$	112	114	—	—	2.62	2.28
	$2 \times 10^{-3}$	104	100	90	98	2.48	2.22
抵抗性株	0	120	118	101	100	3.24	2.86
	$10^{-5}$	126	120	—	—	3.25	2.92
	$10^{-4}$	128	118	100	102	3.21	2.85
	$10^{-3}$	118	112	—	—	3.14	2.67
	$2 \times 10^{-3}$	98	94	85	88	2.72	2.24

第8図 化学療法剤の腫瘍細胞の内因性呼吸及び嫌気性解糖に及ぼす影響



第15表 NMO の内因性・基質呼吸及び嫌気性解糖に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度M	酸素消費量 $\mu\text{l}/120\text{分}$				乳酸生成量 mg/flask	
		基質なし		glucose 添加			
感受性株	0	154	140	124	110	2.42	3.19
	$10^{-5}$	159	149	119	104	1.98	2.81
	$10^{-4}$	148	136	—	—	1.89	2.39
	$10^{-3}$	132	114	98	98	1.69	2.17
	$2 \times 10^{-3}$	110	100	—	—	1.35	1.66
抵抗性株	0	110	126	88	92	2.02	1.90
	$10^{-5}$	118	138	89	94	2.08	1.99
	$10^{-4}$	118	130	—	—	1.98	1.89
	$10^{-3}$	100	114	86	89	1.82	1.74
	$2 \times 10^{-3}$	68	86	—	—	1.25	1.31

合、呼吸の阻害度は両株の間に差異を示さないが、解糖の阻害度は両株の間に差異を認める。また  $10^{-4}\text{M}$  の濃度の NMO を作用させると抵抗性株腫瘍細胞の場合、呼吸解糖共、殆んど影響は受けないが、感受性株腫瘍細胞の場合、呼吸は対照の95%に、解糖は76%になる。即ち NM 抵抗性株腫瘍細胞は NM に対すると同様に NMO の  $10^{-4}\text{M}$  の濃度において完全耐性を、 $2 \times 10^{-3}\text{M}$  の濃度において不完全耐性を有している。

iii) Thio-TEPA の影響 (第16表, 第8図)

NM 感受性株, 抵抗性株両株の腫瘍細胞の解糖は呼吸よりも強く抑制される。両株共  $10^{-3}\text{M}$  濃度の Thio-TEPA を作用させると呼吸は対照の70%に阻害され、解糖は40%となり、その阻害効果は著しい。また呼吸を全く阻害しない Thio-TEPA の濃度において解糖は対照の70~80%に抑制される。さらに NM 感受性株腫瘍細胞に対する Thio-TEPA の作用はその解糖抑制制度において同じ Alkylating agent に属する NM や NMO に比べ3割から5割強力である。Thio-TEPA  $10^{-4}\text{M}$  以下の濃度で作用させると NM 感受性株と抵抗性株との腫瘍細胞の呼吸及び解糖の阻害度に差異を認める。Thio-TEPA  $10^{-5}\text{M}$  の濃度においては NM 抵抗性株は全く薬剤の作用を受けない。即ち Thio-TEPA は NM 及び NMO と交叉耐性を有し、その程度は  $10^{-5}\text{M}$  の濃度において完全耐性を、 $10^{-4}\text{M}$  の濃度において不完全耐性を有する。 $10^{-3}\text{M}$  の濃度においては耐性現象を認知することが出来ない。

iv) MC の影響 (第17表, 第8図)

MC は Alkylating agent と同様腫瘍細胞の解糖の抑制が呼吸のそれに比べて一般に強い。しかし NM 感受性株と NM 抵抗性株とを比較すると、呼吸及び解糖

第16表 Thio-TEPA の内因性呼吸及び嫌気性解糖に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度M	酸素消費量 $\mu\text{l}/120\text{分}$		乳酸生成量 mg/flask	
感受性株	0	120	136	3.26	3.90
	$10^{-5}$	112	130	2.78	3.12
	$10^{-4}$	104	116	2.02	2.46
	$10^{-3}$	88	95	1.24	1.46
抵抗性株	0	106	112	2.98	3.04
	$10^{-5}$	108	111	2.97	3.06
	$10^{-4}$	98	108	2.08	2.18
	$10^{-3}$	91	85	1.25	1.16

第17表 MC の内因性呼吸及び嫌気性解糖に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度 $\mu\text{g}/\text{ml}$	酸素消費量 $\mu\text{l}/120\text{分}$		乳酸生成量 mg/flask	
感受性株	0	104	126	4.12	3.30
	50	93	118	3.71	2.87
	250	90	114	2.88	2.25
	500	80	104	1.44	1.28
抵抗性株	0	115	109	3.08	2.65
	50	109	109	2.92	2.55
	250	104	105	2.31	2.07
	500	87	88	1.48	0.80

糖の阻害度は両者の間に著明な差異はない。却つて MC  $500\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度において MC 抵抗性腫瘍細胞は NM 感受性株腫瘍細胞より呼吸及び解糖が多少強く抑制される傾向を認めた。即ち MC は腫瘍細胞の呼吸、解糖の面からいつて NM や NMO とは交叉耐

性を有していないことを認めた。

v) CZ の影響 (第18表, 第8図)

MC と同様腫瘍細胞の解糖は呼吸よりも強く抑制される。呼吸に殆んど影響を及ぼさない CZ 50u/ml の濃度において NM 感受性株, 抵抗性株共, その解糖は対照の80%前後となり, 解糖の強い阻害を認めた。濃度が高まるにつれて腫瘍細胞の呼吸, 解糖共強く抑制されるが両株の間には, それぞれその抑制程度の差異を認めない。即ち CZ は腫瘍細胞の呼吸解糖に関しては, 両株に対して全く同一の阻害態度を示し, 呼吸解糖の面からみて NM, NMO とは交叉耐性を有しないことを窺知し得た。

6. NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫の核酸代謝に及ぼす化学療法剤の影響

i) NM の影響 (第19表, 第9図)

NM 感受性株腫瘍細胞の呼吸解糖に影響しない NM 10<sup>-5</sup>M の濃度を作用させると, 感受性細胞の核酸代

謝は, RNA 代謝77%, DNA 代謝 67% に低下する。更に NM 濃度を10倍宛増加すると核酸代謝もそれに逆比例して低下し, NM 10<sup>-2</sup>M の濃度においては殆んど核酸代謝が認められなくなる。しかも腫瘍細胞の DNA 代謝は RNA 代謝よりも一般にその阻害度は強い。NM 抵抗性腫瘍細胞に NM 10<sup>-4</sup>M 以下の濃度で作用させると, 核酸代謝は殆んど抑制されず, 10<sup>-3</sup>M の濃度においては DNA 代謝は急激に低下するが, RNA 代謝はわずか20%程度低下を示すに過ぎない。しかし NM 10<sup>-2</sup>M の濃度においては腫瘍細胞の DNA, RNA の代謝共, 対照の20%前後まで阻害される。この濃度以下においては抵抗性株の核酸代謝は感受性株のそれよりも常にその阻害度は弱い。DNA 代謝の阻害が RNA 代謝のそれより強いことは感受性株の場合と同様である。

即ち抵抗性株は核酸代謝から窺つて 10<sup>-4</sup>M の NM

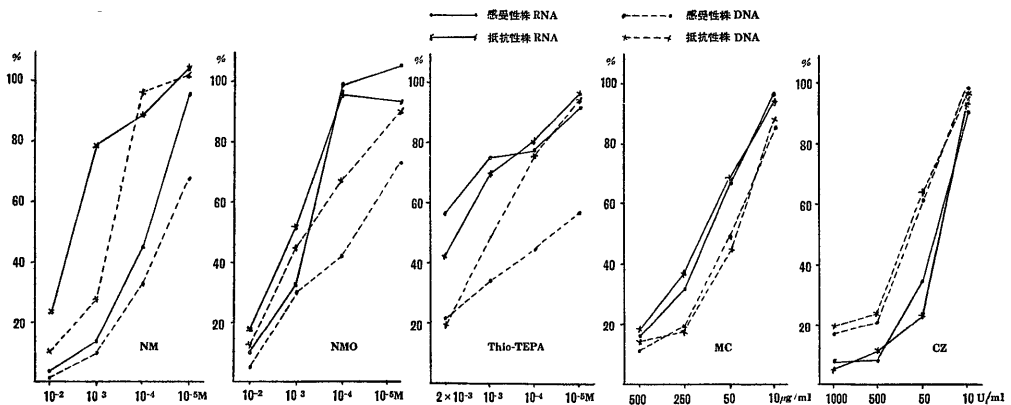
第18表 CZ の内因性呼吸及び嫌気性解糖に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度 u/ml	酸素消費量 μl/120分		乳酸生成量 mg/flask	
感受性株	0	96	132	2.60	4.04
	50	90	128	2.08	3.32
	250	82	106	1.58	2.26
	500	67	103	1.52	2.26
	1000	59	87	1.35	1.93
抵抗性株	0	87	92	2.43	2.68
	50	84	82	1.90	2.01
	250	70	76	1.58	1.66
	500	62	64	1.36	1.56
	1000	50	55	1.22	1.35

第19表 NM の核酸への P<sup>32</sup> incorporation に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度 M	比放射能			
		RNA-P		DNA-P	
感受性株	対照	114.4	126.3	41.4	38.6
	10 <sup>-5</sup>	105.4	109.9	21.8	25.4
	10 <sup>-4</sup>	50.8	53.2	13.9	12.4
	10 <sup>-3</sup>	14.5	19.0	4.46	3.87
	10 <sup>-2</sup>	3.43	2.53	4.14	0.00
	抵抗性株	対照	172.4	159.6	29.8
10 <sup>-5</sup>		186.3	162.8	31.4	40.0
10 <sup>-4</sup>		152.8	143.6	31.8	36.8
10 <sup>-3</sup>		140.0	121.1	8.04	11.6
10 <sup>-2</sup>		48.4	31.9	3.58	3.20

第9図 化学療法剤の腫瘍細胞の核酸代謝に及ぼす影響



濃度において完全耐性を示し、 $10^{-2}M$  の NM 濃度において不完全耐性を示している。

ii) NMO の影響 (第20表, 第9図)

NM 感受性株, 抵抗性株両者の腫瘍細胞に対し, NMO を作用させた場合 DNA 代謝の阻害が RNA 代謝のそれより強く起ることは NM の場合と同様である。しかし NMO の場合は NM に比べその阻害の程度は一般に弱い。これは生体内においては NMO はよく活性の NM に変化するが試験管内においてはこの活性化が充分行なわれないことに基因すると考えられる。

NM感受性, 抵抗性両株に対し,  $10^{-4}M$  以下の濃度で作用させると腫瘍細胞の RNA 代謝は全く阻害を受けないが DNA 代謝は感受性株で対照の42%, 抵抗性株で68%に阻害され両株の間に著明な差を認め

第20表 NMO の核酸への  $P^{32}$  incorporation に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度M	比放射能			
		RNA-P		DNA-P	
感受性株	対照	160.0	150.3	20.7	32.6
	$10^{-5}$	170.0	153.2	14.5	24.1
	$10^{-4}$	156.8	155.1	8.28	14.8
	$10^{-3}$	54.5	45.2	6.83	9.81
	$10^{-2}$	16.0	18.1	1.24	1.39
抵抗性株	対照	112.4	133.5	36.4	37.8
	$10^{-5}$	102.0	128.1	33.0	34.8
	$10^{-4}$	112.3	126.6	24.6	26.1
	$10^{-3}$	58.7	66.9	16.4	16.9
	$10^{-2}$	20.3	26.7	5.46	4.55

第21表 Thio-TEPA の核酸への  $P^{32}$  incorporation に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度M	比放射能			
		RNA-P		DNA-P	
感受性株	対照	154.9	128.8	56.9	44.3
	$10^{-5}$	139.9	118.9	31.8	23.6
	$10^{-4}$	126.1	98.1	27.4	18.6
	$10^{-3}$	122.2	93.0	21.5	14.6
	$2 \times 10^{-3}$	89.2	70.8	13.0	8.91
	抵抗性株	対照	194.9	139.2	36.5
	$10^{-5}$	184.1	135.0	34.4	27.3
	$10^{-4}$	170.4	111.7	29.6	21.7
	$10^{-3}$	137.7	97.3	17.9	14.3
	$2 \times 10^{-3}$	82.2	62.3	7.14	5.73

ている。このことは抵抗性の本体が DNA にあることを示唆するものと考えられる。 $10^{-2}M$  の濃度で作用すると腫瘍細胞の RNA 及び DNA 代謝は著明な低下を示し、この濃度においては両株の間に僅かの差を認めるのみである。即ち NM 抵抗性株は  $10^{-5}M$  の濃度で完全耐性を、 $10^{-3}M$  の濃度で不完全耐性を有し、 $10^{-2}M$  の濃度においては耐性が殆んど示されない。

iii) Thio-TEPA の影響 (第21表, 第9図)

著者の実験の範囲においては, NM 感受性, 抵抗性両株に対し Thio-TEPA を作用させた場合, 腫瘍細胞の核酸代謝の阻害度と Thio-TEPA の濃度とは平行関係にあることが認められた。この際 DNA 代謝は RNA 代謝より著明に抑制されることは NM 系薬剤の場合と同様である。しかし NM 感受性株と抵抗性株との RNA 代謝の阻害度は Thio-TEPA の種々の濃度におい、ほぼ近似値をとり、その間著明な差異はなく、かつ Thio-TEPA  $10^{-5}M$  の濃度において腫瘍細胞の RNA 代謝は殆んど阻害されない。一方腫瘍細胞の DNA 代謝については Thio-TEPA  $2 \times 10^{-3}M$  の濃度で NM 感受性, 抵抗性株における阻害度は等しく 20% であるが, Thio-TEPA の濃度がこれより低くなると両株の阻害度に差を認めるようになる。Thio-TEPA  $10^{-5}M$  の濃度では感受性株の DNA 代謝阻害度は56%, 抵抗性株の DNA 代謝阻害度は94%で著明な差異が生ずる。要するに RNA 代謝は株種に関係なく Thio-TEPA の種々の濃度によつて同程度の阻害を受けるが DNA 代謝は株種によつてその阻害度に有意の差が存する。

即ち核酸代謝殊に DNA 代謝から窺つて Thio-

第22表 MC の核酸への  $P^{32}$  incorporation に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度 $\mu g/ml$	比放射能			
		RNA-P		DNA-P	
感受性株	対照	112.2	148.9	22.2	36.8
	10	110.8	141.8	18.6	32.5
	50	73.2	101.8	11.4	17.7
	250	36.6	44.7	4.22	7.00
	500	17.4	22.3	2.89	3.69
	抵抗性株	対照	168.6	150.2	58.0
10		162.2	142.0	51.7	38.5
50		108.1	106.0	26.2	19.7
250		67.2	52.3	11.4	7.29
500		36.8	25.6	9.28	5.14

第23表 CZ の核酸への P<sup>32</sup> incorporation に及ぼす影響

細胞の種類	薬剤の濃度 u/ml	比放射能			
		RNA-P		DNA-P	
感受性株	対照	158.7	164.8	40.3	42.8
	10	146.4	148.2	39.2	41.1
	50	58.9	54.8	24.6	25.7
	500	10.9	16.6	8.06	9.39
	1000	8.8	14.8	6.05	7.71
抵抗性株	対照	122.6	149.1	14.2	29.9
	10	109.6	139.9	13.4	28.4
	50	28.6	37.3	9.66	17.9
	500	8.58	22.4	3.98	5.99
	1000	6.13	8.91	3.27	4.79

TEPA は NM 系物質との間に交付耐性を示し、かつその耐性の本質は DNA に関係し、その作用機序も DNA 代謝の障害にあるといえる。

#### iv) MC の影響 (第22表, 第9図)

MC を作用させた場合には上述の Alkylating agent を作用させた場合と同様、腫瘍細胞の DNA 代謝の阻害は RNA 代謝のそれよりも強度である。更に MC の種々の濃度で作用させた場合の NM 感受性株と抵抗性株の DNA, RNA 代謝の阻害度を比較すると、ほぼ同程度で著しい差を認めない。腫瘍細胞の呼吸解糖が殆んど抑制されない MC50 $\mu$ g/ml の濃度の作用においては NM 感受性株の DNA 代謝は49%, RNA 代謝は67%抑制され、抵抗性株の DNA 代謝は46%, RNA 代謝は67%抑制される。MC 500 $\mu$ g/ml の濃度の作用においては腫瘍細胞の DNA, RNA 代謝共、対照の15%前後に抑制される。これらの事実は MC が NM 系物質とは交叉耐性を示さず、かつ MC の作用機序は DNA に関係し、MC の高濃度においては核酸の種類に関係なく同様に作用することを示唆する。

#### v) CZ の影響 (第23表, 第9図)

CZ を作用させた場合、NM 感受性株、抵抗性株共、それら腫瘍細胞の RNA 代謝が DNA 代謝より強く阻害を受ける。この点は既述の他の薬剤の場合と全く異なる点である。しかし感受性株と抵抗性株との間で、両核酸代謝の阻害の程度はほぼ同じである。即ち CZ 50 $\mu$ /ml の濃度で作用させると NM 感受性株の DNA 代謝は61%, RNA 代謝は35%に抑制され NM 抵抗性株の DNA 代謝は64%, RNA 代謝は24%に抑制される。両株において RNA 代謝の著明な阻害を認める。その他の CZ 濃度においても、感受性株と抵抗性株との間の核酸代謝の阻害度に有意の差異はな

い。従って核酸代謝の面からみて、NM 抵抗性株は CZ に対して耐性を獲得していないことが認められた。

## V. 総括及び考按

### 1. 実験材料の吟味

実験材料として NM 抵抗性吉田肉腫を使用した理由は、第一にこの NM 抵抗性株は NM 感受性株に対して NM を連続的に作用させて作製したものであるから、抵抗性、感受性両細胞は同一起源を有し、細胞形態学的に同一であることである。第二に腹水中の細胞が全く遊離状態にあつて、数的に定量し得、かつ薬剤を一定濃度で細胞周囲に作用させ得ることである。第三は耐性度が極めて高く諸種の変化を観察するに便利であることである。第四に抵抗性薬剤である NM はその歴史が古く、従って性状等がよく知られており、実験上の使用に好都合であることである。

更にこの実験に使用したラットはすべて雑系ラットであり、吉田肉腫に高い感受性をもつ Donryu-Rat<sup>40</sup> と異なり吉田肉腫に対し個体的に抵抗性をもつラットが含まれている可能性があるが、著者の実験では腹腔内及び皮下に移植した場合、前者では100%、後者では97%移植に成功するので、上述の懸念は殆んど必要がないと考えている。しかし雑系ラットを用い腹腔内累代移植中、殊に抵抗性細胞を移植するに当つて不成功の場合に遭遇した。この際、新たに Donryu-Rat より採取した細胞を用いると雑系ラットに移植してよく成功した。これらの現象は雑系ラットで継代移植を重ねる中、生体の抵抗力が生じ、腫瘍細胞の生物学的活性の減退を惹起したものと解釈される。

### 2. 感受性細胞と抵抗性細胞の諸種相異

一般に薬剤感受性株と抵抗性株との間には細菌や腫瘍細胞を問わず生物学的、生化学的に種々の差異が存在することが認められている<sup>46)47)</sup>。著者の使用した NM 抵抗性吉田肉腫は、腹腔内に移植されたラットの生存日数が延長し、皮下に移植された場合、腫瘍の発育が劣弱であり、腫瘍細胞の呼吸、解糖力の低下があること等の事実からみて、NM 感受性吉田肉腫と比べて生物学的及び生化学的にその活力が低下しているものといえる。吉田<sup>48)</sup>も NMO 抵抗性株は感受性株と比べて細胞形態学的には同一であるが、移植されたラットの生存日数は3~6日延長し、かつ宿主に与える毒性がやや弱いと報告している。しかし腹水肝癌のうち NMO 感受性の AH 130 と抵抗性の AH 7974 とは移植率、腫瘍の発育速度、動物の生存日数、細胞の染色体数等において割合近似しているといわれている<sup>49)</sup>。更にこの二種の腹水肝癌において一定腫瘍細胞中

の核分裂数には殆んど差異が認められていないが<sup>50)</sup>、著者の使用した NM 抵抗性株においても感受性株のそれに比べて腫瘍細胞数及び分裂数に著明な差異がなかった。この点は動物生存日数及び腫瘍の発育度等の条件と必ずしも一致しないところであるが抵抗性株はその担癌動物に及ぼす悪性度—毒性及び転移性などが比較的弱いとも考えられるし或いは宿主の抵抗性株に対する防衛反応が強いとも考えられる。

形態学的にも抵抗性細胞は感受性細胞と差異はなく、組織化学的にも核酸、Alkaline 及び Acid Phosphatase 染色において特別な差異はない。Law<sup>51)</sup>はマウス白血病 L 1210 とその葉酸拮抗剤抵抗性株について、広野<sup>52)</sup>、大星<sup>53)</sup>は NMO 抵抗性吉田肉腫と感受性細胞との間に形態学的な相異はないと報告している。しかし電子顕微鏡的には NMO 抵抗性株においては感受性株に比較して糸粒体の微細構造が粗で、小胞体及び annulate lamellae を認めず Golgi 体の発育も不良である<sup>54)</sup>という。ただ染色体 Pattern は耐性の獲得と無関係であるといわれている<sup>55)</sup>。山本<sup>97)</sup>は Viomycin 抵抗性結核菌の中に低耐性度と高耐性度の株があるが、培地上に生育した Population に差があることから両者の遺伝子に相異があると推論し、Journey<sup>56)</sup>は Actinomycin D 抵抗性 HeLa 細胞においては感受性細胞に比べ細胞質が少なく核小体は大きく濃密であるが、その意義については不明であるとしている。

また薬剤感受性株と抵抗性株との相異を生化学的に追求した研究報告では、塚田<sup>57)</sup>は NMO 抵抗性 Ehrlich 腹水癌について抵抗性の程度と腫瘍細胞の呼吸とは関連性を有し、内部呼吸及び脂肪酸酸化は抵抗性の減弱と共に減少すると述べている。片山<sup>58)</sup>は NMO に感受性の強い AH 130 と弱い AH 7974 腹水肝癌とについて Alkaline phosphatase 活性を調べ、後者においてそれが低いのを認め、解糖力は核分層の嫌気性乳酸産生量を比較して後者において極端に弱いことを報告している。村上<sup>59)</sup>も *Candida albicans* の Pylomycin B 抵抗性株においては原株に比べて糖分解能が低いことを認めている。後藤<sup>60)</sup>は呼吸酵素即ちコハク酸脱水素酵素及び Cytochrome 酸化酵素の活性度について AH 130 と AH 7974 との間で比較し、これらの活性度が解糖力と同様 AH 7947 において弱いと述べている。著者の実験によつても NM 抵抗性腫瘍細胞の呼吸及び解糖は感受性株のそれに比較し 20% 程度減弱していることが知られる。従つてこれら Energy 生成系の活性の程度と腫瘍細胞の NM に対する感受性との間には何等かの相関関係がある如く推定され

る。

薬剤抵抗性腫瘍の核酸の変化についてみるに、近藤等<sup>61)</sup>が吉田肉腫の NMO 耐性化したものにあつては動物血清による DNA 解合力の低下及び腫瘍細胞の DNA 脱磷作用の弱さを認め、かつ腫瘍細胞 DNA の粘着度の著明な上昇を認めている。しかし NMO 感受性の吉田肉腫と NMO 抵抗性の武田肉腫とについて核酸の性状を比較するに上述の結果と全く相反する事象が認められる。従つて DNA の性状の変化をただちに耐性の本体と結びつけて考えることは慎重でなければならない。塚田<sup>57)</sup>は NMO 抵抗性吉田肉腫を用いて検索し抵抗性の程度と核酸量とは無関係であると報じている。片山<sup>62)</sup>も NMO に対する感受性の相異なる二種の腹水肝癌 AH 130 と AH 7974 との Ribo 核酸代謝に著明な差異を認めていない。Davidson<sup>63)</sup>も 6-Mercaptopurine に対する感受性及び抵抗性 L 1210 Leucaemia 細胞を用い、P<sup>32</sup> incorporation によつてそれらの核酸代謝を検索し両者間に殆んど差異を認めないが、Adenine-C<sup>14</sup> 及び Guanine-C<sup>14</sup> を指標とした場合、抵抗性株の核酸代謝は感受性株のそれに比べて数分の一に低下していることを認めた。Heidelberger<sup>64)</sup>も Ehrlich 腹水癌の fluorinated Pyrimidines 抵抗性株を用いて Uracil-2-C<sup>14</sup> 及び Formate-C<sup>14</sup> を指標として検索し同様の成績を得ている。

著者は NM 抵抗性吉田肉腫について、核酸染色によつて核酸量を調べ、P<sup>32</sup> incorporation によつて核酸代謝を検査したが、核酸量に変化なく核酸代謝として RNA 及び DNA の比放射能をみると感受性株においてそれぞれ 141.9 及び 37.8、抵抗性株においてそれぞれ 150.3 及び 35.3 であつて感受性、抵抗性両株の間に大差がない。

一般に悪性腫瘍が化学療法剤に耐性を獲得した場合、原株と比べて生物学的、組織学的及び生化学的に諸種の変化が現われるものと考えられる。それらの変化と耐性の本体とを直接関連づけることは困難であつても耐性の本体の解明に役立ち得るものがある。腫瘍細胞の耐性獲得の機構については諸説が紛々としていて、諸家の説を参考として著者の得た実験成績に基づいて考察するに、薬剤投与によつて作製された抵抗性株はその累代移植によつても容易にその性状を変化することなく安定で非可逆的であり、即ちその性質は遺伝のしくみによつて次々と受けつがれていると考えられる。この遺伝的に重要な役割を果している核の構成成分である DNA は微生物及び腫瘍細胞等において型質転換を惹起する能力があることが最近判明してきている<sup>20)27)</sup>。即ち DNA 自身の中に何か遺伝子的な



要素が含まれているものと考え得る。この生活細胞中の核内の DNA は自己のもつ Code を特殊な RNA の合成を伴いつつそれに伝え、その特殊な RNA が細胞質中へ出て顆粒を形成し、そこで蛋白合成にあたって蛋白の特異性が招来されるという考え方が拾頭してきている<sup>65)</sup>。従つて耐性の獲得は遺伝子の活性を有する DNA に変化を生じその情報が RNA を通じて蛋白合成、Energy 生成等の特異的な生化学的反應を連鎖的に惹起し、その一つの現われとして形態学的及び生物学的な変化が細胞内に惹起されるものと考えられる。

### 3. NM 感受性細胞及び抵抗性細胞の生物学的性状に及ぼす NMO の影響

動物移植腫瘍に対する薬剤の効果の有無を検討する方法として所謂生物学的な研究方法が使用されている。著者は吉田肉腫腹腔内移植ラットの生存日数及び皮下腫瘍の発育を観察すると共に腹水中の腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞数の変動を観察して、NM 感受性株及び抵抗性株の NMO に対する感受性の程度を探索し、この方法によつて腫瘍の薬剤耐性の有無を決定することが出来た。

即ち NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞を腹腔内及び皮下に移植されたラットに種々の濃度の NMO を注射して検した。感受性株においては NMO 0.5mg/kg 以上を与えると動物の生存日数は延長し、皮下腫瘍の縮小を認めた。しかし抵抗性株においては、NMO の大量 10.0mg/kg を与えても延命効果が全く認められず、皮下腫瘍は初回注射時の大きさを維持するのみで縮小が認められない。これらの所見と腹水腫瘍細胞数及び分裂細胞数の変動との相関をみると、感受性株においては、それぞれ相関関係を認め得るが、抵抗性株においては NMO 10.0mg/kg 投与時腹水腫瘍細胞数及び分裂細胞数の減少は認められるが生存日数及び皮下移植腫瘍の発育には著明な変化が認められなかつた。

また感受性株、抵抗性株を問わず NMO 投与によつて腫瘍細胞数及び分裂細胞数の減少を認めた群においては染色体の断裂散乱、凝集、橋の形成など異常分裂像が認められ、腫瘍細胞は異常に大きくなり恐らく多倍数性の細胞に変化してくる。即ち腫瘍細胞の薬剤に対する感受性の変化はこれらと細胞の変化、特に核または染色体の態度によつて窺うことが出来る。なお腫瘍細胞数は対照群においても経時的に減少してくるが、恐らく薬剤による腹膜の刺激による腹水の増加または癌性腹膜炎症状による腹水の滲出に基づくものと思われる。

### 4. 腫瘍細胞の呼吸及び解糖に及ぼす化学療法剤の

### 影響

腫瘍細胞の呼吸及び解糖については O. Warburg 以来多くの研究がなされてきた。腫瘍細胞の旺盛な分裂増殖状態からみて、腫瘍細胞の Energy の供給源に直接関係を有すると思われる呼吸及び解糖に対する化学療法剤の効果を検することは薬剤の作用機序を解明する上に参考となるであろう。著者は NM, NMO, TE-SA, MC, CZ の 5 種の薬剤が腫瘍細胞の呼吸及び解糖(嫌気性)に及ぼす影響を検索した。感受性株及び抵抗性株を問わず一般に腫瘍細胞の解糖は呼吸よりもその活動が旺盛である。解糖活性が薬剤によつて強く障碍される DNA 量と極めて密接な関係にあること<sup>66)</sup>などから当然の結果であると思われる。大原<sup>67)</sup>は子宮腔部癌組織について NM, MC, CZ の呼吸及び解糖に対する影響を観察し、薬剤の種類及び量によつては、呼吸は却つて亢進を来すものがあるが、解糖はすべて種々の程度に抑制されると述べている。海老名<sup>68)</sup>、熊部<sup>69)</sup>は動物腫瘍細胞に CZ を作用させると嫌気性解糖は極めて強く抑制されるが呼吸は殆んど影響されないという成験をあげている。Holze<sup>70)</sup>は Ethyleneimine 系薬剤の腫瘍細胞の呼吸を阻害しない濃度で嫌気性解糖を阻害すると述べている。著者の実験において腫瘍細胞の呼吸を余り阻害しない薬剤の濃度における解糖の阻害度を調べてみると、NM 感受性株においては NM 9%, NMO 15%, TSPA 18%, MC 12%, CZ 19% であり、NM 抵抗性株においては NM 7%, NMO 12%, TSPA 15%, MC 15%, CZ 23% である。両株の間に著明な差異が認められない。即ち呼吸と解糖の阻害度の比は感受性株と抵抗性株の間で、ほぼ同一の値をとるといえる。また濃度が高くなるにつれて呼吸と解糖の阻害度の比に変化を来す薬剤は、NM 感受性株、抵抗性株共、TSPA と MC であり、他の薬剤は濃度の変化があつても呼吸と解糖の阻害度の比に著明な変動を来さない。即ち薬剤の中でも TSPA 及び MC は Energy 生成系に対し、呼吸よりも解糖の抑制に強く作用するものと考えられる。

次に NM 感受性株と NM 抵抗性株との呼吸及び解糖の阻害度の差異を種々の薬剤について観察すると、NM, NMO 及び TSPA を用いた場合、呼吸、解糖の阻害度が両株の間で差があるのを認めるが、MC 及び CZ を用いた場合著明な差はない。このことは前述の如く NM, NMO, TSPA の作用効果を生物学的にみて、NM 感受性株と NM 抵抗性株との間に有意の差を認め、MC, CZ の作用効果は両株の間に殆んど差異を認め得なかつた事実と一致する。即ち腫瘍細胞の呼吸解糖の検索結果によつて腫瘍細胞の薬剤耐性の

有無及びその程度を窺うことが出来、かつ交叉耐性の有無をも窺うことが出来る。しかし呼吸解糖の阻害度から腫瘍細胞の生活力、例えば動物に移植された場合、再び増殖分裂し発育する能力の程度を推定することは困難である。それは腫瘍細胞の呼吸解糖を余り抑制しない薬剤濃度においても、既に細胞が形態学的に変化を起したり<sup>71)</sup>、腫瘍細胞のラッセへの移植能が全く消失していたりする場合があるからである(第5図)。ただ如何なる薬剤を用いる場合も呼吸解糖が10%以上阻害されている時は細胞の生物学的活力は相当阻害されていると考えてよい。即ち Energy 生成系の他に更に高次の生活中枢があり、薬剤もこの中枢に対して特異的に作用し細胞の生活力を阻害するものと考えられる。海老名<sup>68)</sup>によると Sarcoma 180 の Cell level においては CZ は腫瘍細胞の嫌気性解糖を抑制するが、homogenate level においては全く抑制しないので CZ 解糖の抑制は何か二次的な変化に基づくものであろうという。原田<sup>72)</sup>は Ehrlich 腹水癌に諸種薬剤を使用し組織呼吸の低下を来したものに Mitochondria の変形縮小及び空胞化を認めているが、一次的变化か二次的变化か言明出来ず、三浦<sup>73)</sup>は腫瘍細胞の呼吸解糖が全く抑制されない薬剤の濃度で核酸代謝が強く障害されるのを認め、呼吸解糖の抑制は核酸代謝の障害による二次的な反応であるとしている。

##### 5. 腫瘍細胞の核酸代謝に及ぼす化学療法剤の影響

一般に腫瘍組織において核酸含量が正常組織に比べて多量に含まれているという事実<sup>74)</sup>は腫瘍細胞が旺盛な核酸合成を営んでいることを想定せしめる。化学療法剤の作用もこの盛んな代謝機構に影響を及ぼすことは疑うべくもなからう。この核酸の中いう迄もなく DNA は細胞核内に含まれ染色体の重要な構成成分であり、細胞の遺伝、分裂、また核小体、細胞質における蛋白質、RNA の合成に重要な意義<sup>75)</sup>を有するものである。RNA は大部分細胞質に存し一部は細胞核、特に仁に含まれ蛋白合成に関係が深いと考えられている<sup>76)</sup>。著者の使用せる5種の薬剤は共に腫瘍細胞に対し有糸核分裂の抑制、核崩壊、核染色質の異常分布、即ち染色体の粘性、切断転座及び橋形成等の作用を持つものである<sup>30)77)</sup>。従って薬剤の作用は RNA に対するよりもむしろ DNA に対して密接な関係があることは論を俟たない。著者の実験においても CZ を除く他の薬剤はすべて、RNA 代謝よりも DNA 代謝の阻害が強度であることを認めた。CZ に関しては、牧野<sup>78)</sup>は静止期の核を破壊すると共に、細胞質を溶解する効果を有する薬剤であると述べているが、著者の生化学的検索においても DNA 代謝よりも RNA 代謝の阻

害が強いことから核と細胞質の両者にまたがった作用機序を有するものと思われる。Alkylating agent については、NM 抵抗性株は勿論、NM 感受性株においても、比較的低濃度を作用させた場合、RNA 代謝は殆んど抑制されないが、DNA 代謝は程度の差はあるが、何れも抑制されている。抗生物質系の制癌剤については低濃度で RNA 代謝と DNA 代謝との阻害の程度に著明な差異は認められない。岡<sup>79)</sup>は Ehrlich 腹水癌を使用し、核酸への P<sup>32</sup> incorporation によつて薬剤の核酸代謝に及ぼす影響を観察し、著者と同様の結果を得ている。Skipper<sup>80)</sup>は Alkylating agent の作用機序は核酸合成阻害であると述べているが、佐藤<sup>81)</sup>は Ehrlich 腹水癌に NMO 40 $\gamma$ /g を投与し、その核酸への P<sup>32</sup> incorporation の阻害度を測定し、特に DNA-P<sup>32</sup> の著減を認めている。更に Herriot<sup>82)</sup>、Dustin<sup>83)</sup>、日比野<sup>84)</sup>等の研究結果も同様の成績を示している。

一方抗生物質系の抗癌剤として、MC の作用機序について、芝<sup>85)</sup>は Escherichia coli strain B の呼吸、RNA 及び蛋白の合成を阻害しない濃度で、DNA の合成を選択的に阻害すると述べ、CZ について石川等<sup>86)</sup>は、in vitro の実験において相当顕著な両核酸の交替率の低下を報告している。このように一般に DNA の代謝障害はその他の物質代謝の障害に比べて、強く現われることが認められているが、これは薬剤の DNA 合成に対しての一次的な阻害作用によるものか、或いは細胞の他の過程、例えば細胞分裂の障害、或いは未知の特異的な代謝障害<sup>88)</sup>に基づく二次的な結果によるのかは明らかでない。

次にこれらの化学療法剤の核酸代謝に及ぼす影響を NM 感受性細胞と NM 抵抗性細胞との間で比較検討すると、NM、NMO 及び TSPA を作用させた場合には、両株の核酸代謝の阻害度に著明な差異が認められ、殊に NM の作用時 RNA 代謝、DNA 代謝共、両株の間に阻害度の差を示す。しかし NM10<sup>-5</sup>M の濃度においては RNA 代謝は両株共、殆んど阻害されず、DNA 代謝は両株の間に阻害度の差を認める。また NM と TSPA との使用時、RNA 代謝の阻害度は薬剤の一定の濃度で両株の間に、ほぼ同程度であつても、DNA 代謝の阻害は薬剤の 10<sup>-5</sup>M の濃度以下で両株間に著しい差を認めた。即ち核酸代謝からみて NMO と TSPA は NM と交叉耐性のあることが認められ、その作用機序に類似性があり、しかもその耐性は DNA に関係していると考えられる。一方 MC と CZ とを作用させた場合、NM 感受性細胞と NM 抵抗性細胞との間に核酸代謝の阻害度に差異を認めな

い。即ちこれら抗生物質系薬剤は NM と交叉耐性を有せず、作用機序に Alkylating agent と何等かの相異があることが窺われる。折重<sup>89)</sup>は NM に感受性を異にする腹水肝癌 AH 130 と AH 7974 とを使用して核酸代謝に対する NM の影響を調べ、NM の濃度  $2 \times 10^{-5}M$  において前者の DNA 代謝の阻害が著しいが、後者の DNA 代謝は殆んど阻害されない。RNA 代謝は両者共阻害されないと述べている。Actinomycin D 抵抗性 Hela 細胞<sup>90)</sup>や fluorinated pyrimidine 抵抗性 Ehrlich 腹水癌<sup>91)</sup>においても、薬剤による核酸代謝の阻害度は、感受性細胞との間に著しい差異があるのが認められている。

NM 感受性細胞と抵抗性細胞の核酸代謝に対する薬剤の作用の相異は、前述の生物学的及び組織化学的に薬剤感受性の程度を観察した成績と全く一致する。このことは逆に薬剤の核酸代謝の抑制程度の観察によつて、腫瘍細胞の耐性獲得の有無及びその程度を知り得ることを意味する。この際 Alkylating agent を用いて RNA 代謝の阻害を窺う方法では、耐性の有無及び程度の判定は出来ない。従つて DNA 代謝の変化を観察することが必要である。

#### 6. 化学療法剤の所謂増癌作用について

最近、Lapis<sup>92)</sup>や近藤等<sup>93)</sup>は、実験的及び臨床的経験から、化学療法剤はその使用条件の如何によつて却つて腫瘍の増大及び転移の促進を惹起すると報告している。著者の実験において、NM 感受性細胞は NMO 0.05mg/kg 以上を用いる時は、胆癌動物の延命効果を認めるが、NMO 0.01mg/kg の投与によつては却つて対照より腹水腫瘍細胞数及び分裂数の増加を来し、生存日数が短縮し、皮下腫瘍の発育も却つて旺盛になることを認めた。中里等<sup>94)</sup>は腫瘍移植後一定量の NMO, Azan を投与し、剖見により腫瘍の増大及び転移の増加を認め、この際網内系機能亢進剤の併用により、このような現象が起らないところから宿主の腫瘍に対する抵抗力の低下によるものと考えている。著者もこの問題を検討するため試験管内で低濃度 ( $10^{-5}M$ ) の NMO を作用させ、細胞の呼吸、解糖及び核酸代謝の亢進を認めた。この現象の本態の解明には今後の研究に待たねばならないが、少なくとも *in vitro* では低濃度の NMO によつて却つて腫瘍細胞の生物学的活力を増大せしめられたためと考えられる。即ち腫瘍移植動物の生体条件とは一応関係なく、投与される化学療法剤の量がある臨界量より少ない場合に増癌作用の発現をみることに注目すべきである。

ともかく腫瘍に対する化学療法剤の効果は腫瘍の発育力と薬剤による腫瘍破壊作用及び腫瘍に対する宿主

の抵抗力の相対的關係によつて決定されると考え<sup>95)96)</sup>られている以上実際薬剤の使用に際して、その投与量や投与方法等に関して細心の注意が払われるべきであり、誤つた使用法は癌化学療法の意義を消失するものであり予期に反する作用を示し、逆効果をもたらす可能性があることを銘記すべきである。

## V. 結 論

NM 感受性及び NM 抵抗性吉田肉腫について、その性状及び諸種薬剤の影響を生物学的、組織化学的及び生化学的に検索し、次の結果を得た。

1) NM 抵抗性株は NM 感受性株に比べて、移植されたラットの生存日数は延長し、皮下腫瘍の発育は遅延した。更に腫瘍細胞の呼吸及び解糖力は感受性株より減弱しているが、核酸代謝には著明な差異はなかつた。組織化学的にも差異は認めない。

2) 腫瘍移植ラットの生存日数、皮下腫瘍の発育、腹水腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞数を指標として、NM 感受性並びに抵抗性株に対する NMO の有効量を検索し、感受性株に対しては NMO 0.5mg/kg、抵抗性株に対しては NMO 10.0mg/kg 以上であることを認めた。組織化学的にも、ほぼこの事実を裏書きし得た。従つて薬剤の腫瘍に対する効果判定には生物学的、組織化学的検索と共に細胞学的方法も有用である。

3) 腫瘍移植ラットの生存日数及び皮下腫瘍の発育の程度を指標として薬剤の効果を検査し、NM 耐性株は NMO 及び TSPA に交叉耐性を示すが、MC 及び CZ には交叉耐性を示さないことを認めた。

4) NM, NMO, TSPA, MC 及び CZ はすべて試験管内で NM 感受性株及び NM 抵抗性株の腫瘍細胞の解糖作用を呼吸に比べ、より強く抑制し、特に TEPA と MC が腫瘍細胞の解糖力を強く阻害する。

5) 腫瘍細胞の呼吸及び解糖力を抑制する NM, NMO, TSPA の濃度は NM 感受性株と NM 抵抗性株との間に差異がある。腫瘍細胞の呼吸、解糖を抑制する MC 及び CZ の濃度は感受性、抵抗性株間に差異が認められない。従つて呼吸、解糖を検索することによつて薬剤耐性の有無をある程度決定し得る。しかし薬剤による腫瘍細胞の呼吸解糖の阻害度は一般に低いため、腫瘍細胞の薬剤耐性度が弱い場合には、この方法は耐性検査として充分とはいえない。

6) NM, NMO, TSPA 及び MC はすべて試験管内で NM 感受性株、抵抗性株共、腫瘍細胞の DNA 代謝を RNA 代謝に比べ、より強く抑制する。これらの薬剤は腫瘍細胞の核に作用し核分裂に対し強く影響

する。しかし CZ は全く異なつた効果を示し、蛋白合成系を強く阻害する。

7) 一定の濃度の NM, NMO 及び TSPA による腫瘍細胞の DNA 代謝の抑制度は、NM 感受性株と抵抗性株の間に著明な差異を示す。これらの薬剤株に NM を除く他薬剤による腫瘍細胞の RNA 代謝の抑制度は、NM 感受性、抵抗性両株の間に差異を示さない。また MC 及び CZ による腫瘍細胞の核酸代謝の抑制度は NM 感受性、抵抗性両株の間に差異を示さない。従つて薬剤による核酸代謝の阻害度をみて腫瘍細胞の薬剤耐性の有無を推定することが出来る。特に Alkylating agent を使用する時は、一般に DNA 代謝の阻害度を指標とするのが便利である。

8) 試験管内での NM 細胞効果即ち腫瘍細胞の動物移植能を完全に消失せしめる NM 濃度は感受性株に対しては  $10^{-5}M$ , 抵抗性株に対しては  $10^{-3}M$  である。

9) NM の細胞効果を認める濃度において、NM を作用させる時、NM 感受性及び抵抗性株の解糖、呼吸及び RNA 代謝は殆んど影響をうけない。しかし腫瘍細胞の DNA 代謝は阻害される。従つて NM の薬剤効果を決定するためには、DNA 代謝の阻害度を指標とするのが最適である。

編筆するに当り、終始御指導、御校閲を賜つた恩師ト部美代志教授に深甚なる謝意を表すると共に、水上哲次助教以下教室員の諸先生の御助力に対して厚く感謝いたします。さらに実験材料の入手に絶大な御援助を賜つた佐々木研究所分室の桜井欽夫先生、佐藤博先生に衷心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Karnofsky, D. A., Craver, L. F., Rhoads, C. P. & Abels, J. C. : Approaches to Tumor Chemotherapy, Amer. Ass. for Adv. Science, p. 319, 1947. (44) による。
- 2) Stahmann, M. A. & Bergmann, M. : J. Org. Chem., **11**, 586 (1946).
- 3) 石館守三 : 日学士院紀, **27** (9), 493 (1951).
- 4) Burchenal, J. H. : Cancer, **4** (2), 353 (1951).
- 5) 内田正男・高木 弘 : Gann, **48**, 205 (1956).
- 6) Kidder, G. W. : Science, **109**, 551 (1949).
- 7) Umezawa, H. : J. Antibiotics, **6**, 45 (1953).
- 8) Hata, T. : J. Antibiotics, Ser. A., **7**, 107 (1954).
- 9) Hata, T. : J. Antibiotics, Ser. A., **9**, 141 (1956).
- 10) Brockmann, Hackmann, C. H. : Z. Krebsforsch., **58**, 607 (1953).
- 11) 吉田富三 : 日本臨床, **11**, 276 (1953).
- 12) Yoshida, T. : Annals N. Y. Acad. Sciences, **63**, (5), 852 (1956).
- 13) Sugiura, K. : Cancer Res., **15**, 38 (1955).
- 14) 臼淵 勇・大星章一 : Chemotherapy, **6**, 378 (1958).
- 15) 高橋 弘・石川泰子 : Chemotherapy, **6**, 145 (1958).
- 16) 福井光寿・須藤政彦 : Chemotherapy, **4**, 54 (1956).
- 17) Burchenal, J. H. : Science, **111**, 116 (1950).
- 18) Law, L. W. : Nature, **169**, 628 (1952).
- 19) Hirono, I. : Nagoya J. Med. Sci., **17**, 102 (1954).
- 20) 斎藤照智・太田和雄・木村喜代次 : Gann, **47**, 347 (1956).
- 21) Grass, H. S. : Proc. Amer. Ass. Cancer Res., **2**, 209 (1957).
- 22) Law, L. W. : Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **84**, 409 (1953).
- 23) 近藤達平・山内 弘・丸山哲郎・中里博昭 : 日外会誌, **57** (5), 786 (1956).
- 24) 吉田耕 : 日外会誌, **60**, 1911 (1960).
- 25) 西岡久寿 : 日本臨床, **15**, 23 (1957).
- 26) 栗田宗次 : 名古屋医学, **81**, 1156 (1960).
- 27) 日比野進・木村喜代次・太田和雄 : 第一回マイシン研究会報告, No. 13, 1960.
- 28) 吉田富三・佐藤 博・今井弘子 : Gann, **50**, suppl. 18 (1959).
- 29) 吉田富三 : 吉田肉腫, 第2版, 55頁, 東京寧楽書房, 1952.
- 30) 佐藤博 : 外科の領域, **7**, 1101 (1959).
- 31) 青木敏郎 : 奈良医誌, **11**, 60 (1960).
- 32) 山本 正・山岡静三郎・梅沢浜夫・竹内富雄・新田和男 : Gann, **44**, 357 (1953).
- 33) 秦 藤樹 : 最新医学, **13**, 2813 (1958).
- 34) 柄鋤賢一 : Chemotherapy, **7**, 420 (1959).
- 35) 市川 収 : 細胞化学 (改訂増補版), 198頁, 東京, 日本教学出版会社, 1957.
- 36) 市川収 : 細胞化学 (同上), 236頁, 同上, 1957.
- 37) 市川 収 : 細胞化学 (同上), 246頁, 同上, 1957.
- 38) 奥山一也 : Gann, **40**, 134 (1949).
- 39) Warburg, O. : Biochem. Z., **142**, 317 (1923).
- 40) Barker, S. B. & Summerson, W. H. : J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941).
- 41) Sibatani, A. : Exp. Cell Res., **17**, 131 (1959).
- 42) 吉沢康雄 : 生化学, **24**, 219 (1953).
- 43) Fiske, C. H. & Sabbarow, Y. : J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
- 44) 小原辰三・徳山英太郎 : Nitromin の臨床, 第一版22頁, 東京医学書院, 1957.
- 45) 佐藤 博 : 日本臨床, **19**, 136 (1961).
- 46) Middlebrook, G. & Cohn, M. L. : Sci-

- ence, 118, 297 (1953). 47) Fisher, M. W. : Amer. Rev. Tbc., 69, 797 (1954).
- 48) 吉田 耕 : 日外会誌, 60(12), 1911 (1960).
- 49) 吉田富三 : 日病理会誌, 44(3), 407 (1956).
- 50) 高見 薫 : 日医放射会誌, 19, 1717 (1959).
- 51) Law, L. W. : J. Nat. Cancer Inst., 11, 849 (1951). 52) Hirono, I. & Yokoyama, C. : Gann, 45, 496 (1954). 53) 大星章一・青木一夫 : Chemotherapy, 4, 224 (1956).
- 54) 広野 巖 : 第20回日本癌学会総会次第, 33頁, 1961. 55) 広野 巖 : Cytologia, 20 (1), 84 (1955). 56) Journey, L. T. & Goldstein, M. N. : Cancer Res., 21, 929 (1961).
- 57) 塚田英之 : 日本癌学会総会記事, 第16回総会号, 8頁, 1960. 58) 片山 寿 : 日新医学, 44, 646 (1957). 59) 村上精次・宮本薫 : Chemotherapy, 6, 229 (1958). 60) 後藤雅久 : 日新医学, 45, 10 (1958). 61) 近藤達平 : 日本外科学会総会記事, 第56回総会号, 43頁, 1956. 62) 片山 寿 : 日新医学, 45, 708 (1958). 63) Davidson, J. D. : Cancer Res., 20, 225 (1960). 64) Heidelberger, C. : Cancer Res., 20, 908 (1960). 65) 三浦謹一郎 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 5, 19 (1960). 66) Kif, S. & Gross, A. L. : Biochem. Biophys. Acta N. Y., 36, 185 (1959). 67) 大原二男 : 癌の臨床, 6, 308 (1960). 68) 海老名敏明 : Chemotherapy, 8, 527 (1960). 69) 熊部 潔 : Chemotherapy, 8, 360 (1960). 70) Holzer, H., Sedlmayer, G. & Kemniz, A. : Biochem. Zschr., 328, 163 (1956). 71) Ishidate, M., Sakurai, Y. : Chem. Pharm. Bull., 7, 695 (1959). 72) 原田英治 : 順天堂医誌, 5, 229 (1959). 73) 三浦義彰・塚越 茂 : 日新医学, 45, 323 (1959). 74) Schneider, W. C. : Cancer Res., 5, 717 (1945). 75) 江上不二夫編 : 核酸及び核蛋白質, 下巻, 第一版, 121頁, 東京, 共立出版社, 1951. 76) Casperson, T. : Natur. Wiss., 29, 33 (1941). 77) 秦 藤樹 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 4, 97 (1959). 78) 牧野佐二郎 : 日本医誌会雑誌, 38, 590 (1957). 79) 岡 博 : 日本消化機病学会雑誌, 56, 859 (1959). 80) Skipper, H. E. : Cancer, 4, 363 (1951). 81) 佐藤八郎・山上 巖 : 綜合臨床, 8, 34 (1959). 82) Herriot, R. M. : J. Gen. Physiol., 34, 761 (1951). 83) Dustin, P. : J. Radiol. Electrol., 32, 333 (1951). 84) 日比野進 : 日血会誌, 14, 261 (1951). 85) 芝 茂・伊藤一二 : Chemotherapy, 6, 212 (1958). 86) 石川 稔・杉石正司 : Gann, 47, 427 (1956). 87) Rixon, R. H. & Whitfield, J. F. : Exp. Cell Res., 18, 126 (1959). 88) Rutman, R. J., Steele, W. J. & Price, C. C. : Cancer Res., 21, 1134 (1961). 89) 折重菊代 : 日新医学, 49, 711 (1958). 90) Goldstein, M. N., Slotnick, I. J. & Journey, L. T. : Ann. N. Y. Acad. Sc., 89, 474 (1960). 91) Heidelberger, C., Kaldor, G., Mukherjee, K. C. & Danneberg, P. B. : Cancer Res., 20, 903 (1960). 92) Lapis, K. & Brit, J. : Cancer, 10, 719 (1956). 93) Kondo, T. & Tsukui, K. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 102, 384 (1959). 94) 中里博昭・鶴飼典司 : 日外会誌, 61, 1057 (1960). 95) Black, M. M. : Surg. Gyn. Obstetr., 100, 543 (1955). 96) Block, D. P. L. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 84, 341 (1953). 97) 山本精次・宮本 薫 : Chemotherapy, 6, 229 (1958).

## Abstract

From the biological, histochemical and biochemical standpoints, the author studied the characteristics of the nitrogen mustard sensitive and resistant Yoshida sarcoma cells and the effect of several anticancer drugs on tumor cells. The results obtained were as follows:

1) As to the nitrogen mustard resistant strain, the survival time of the tumor-bearing rats was prolonged and the transplanted subcutaneous nodule was less developed in comparison with those in the sensitive strain. Though the endogenous respiration and glycolysis of the resistant strain were less than those of the sensitive strain, there was no remarkable difference in the nucleic acid metabolism between both strains and no different finding was recognized in the histochemical examination between both strains.

2) The changes of the survival time of the tumor-bearing rats, the size of the transplanted

subcutaneous nodule and the number of the ascitic tumor cells and that of mitotic cells were observed and that for an indication to know the effective doses of the nitromin given to the animals. It was determined that the effective doses were 0.5mg/kg for the sensitive strain and more than 10.0mg/kg for the resistant strain. The results with histochemical examination of the transplanted subcutaneous nodule after the administration of the drug gave the same conclusion as the above-mentioned. Therefore cytological, as well as histochemical treatment was valuable to determine the effect of the drug on the tumor.

3) The nitrogen mustard resistant strain showed cross-resistance to nitromin and thio-TEPA.

4) All the anticancer drugs, such as nitrogen mustard, nitromin, thio-TEPA, mitomycin and carzinophilin showed much more inhibitory effect on glycolysis than on the endogenous respiration of tumor cells of the nitrogen mustard sensitive as well as resistant strain.

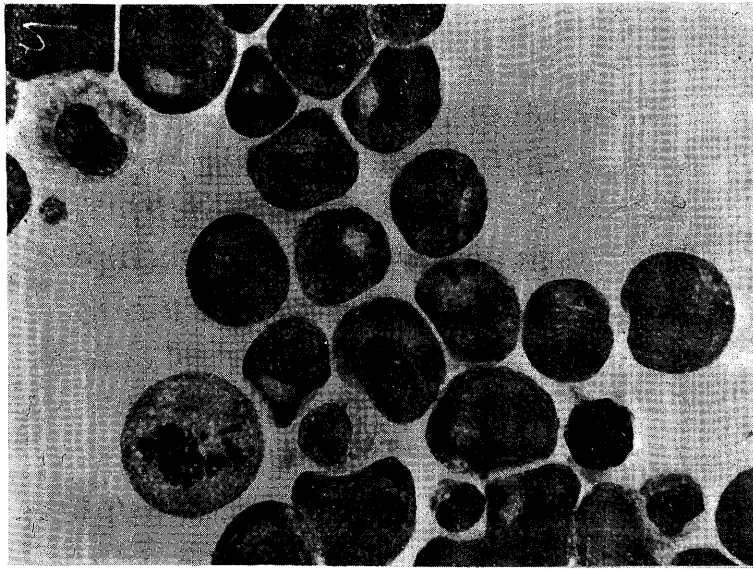
5) The concentration of nitrogen mustard, nitromin or thio-TEPA in which the endogenous respiration and the glycolysis of tumor cells were inhibited, showed a difference between the nitrogen mustard resistant and the sensitive strains, while there was no difference in the concentration of mitomycin or carzinophilin.

6) Nitrogen mustard, nitromin, thio-TEPA or mitomycin showed more inhibitory effect in vitro on the DNA metabolism than on the RNA metabolism of the tumor cells of both the sensitive and the resistant strains. These anti-cancer drugs have an effect on the nucleic mitosis of the tumor cells, while carzinophilin showed an inhibitory effect on the biosynthesis of the protein in the cell-body.

7) Nitrogen mustard, nitromin or thio-TEPA showed a different inhibitory effect on DNA metabolism of the tumor cells between the nitrogen mustard resistant and the sensitive strains, while the inhibition of RNA metabolism of the tumor cells by these drugs except for nitrogen mustard was almost the same on both the resistant and the sensitive strains. Mitomycin or carzinophilin had not any difference between the resistant and the sensitive strains regarding inhibitory effect on both DNA and RNA metabolisms.

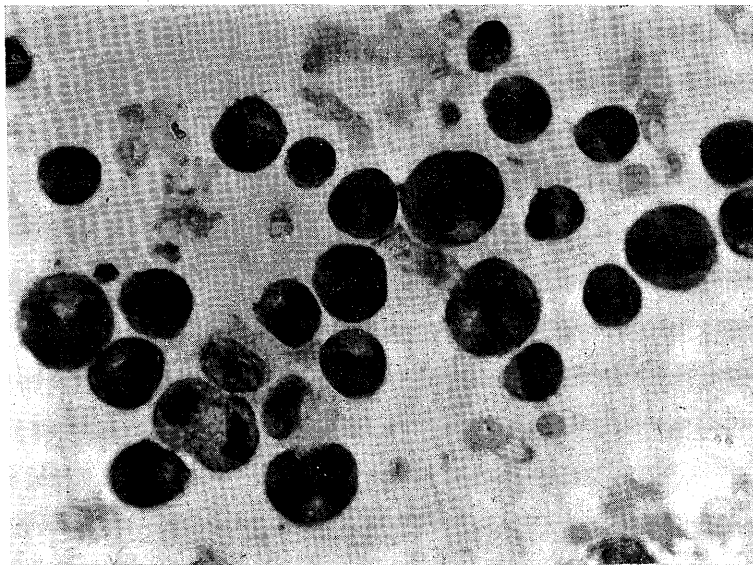
8) The concentration of nitrogen mustard, was  $10^{-5}$ M for the sensitive strain and  $10^{-3}$  M for the resistant strain: if in this medium the tumor cells were treated in vitro, they lost completely their transplantability to the animal.

9) When the tumor cells were exposed to the nitrogen mustard in the sufficient concentration where the cytological effect was obtainable, glycolysis, endogenous respiration, and RNA metabolism of the tumor cells of both resistant and sensitive strains proceeded without change, while DNA metabolism of the tumor cells was strongly inhibited.



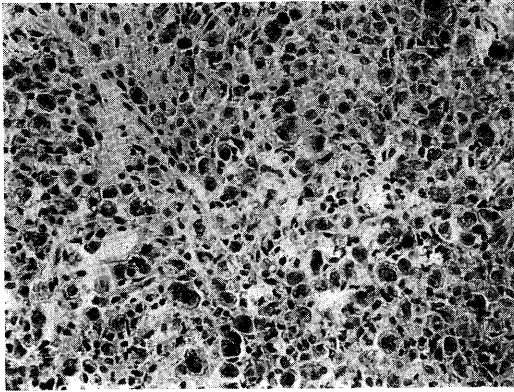
第10図 NM感受性細胞. NMO1.0mg/kg 腹腔内注射24時間後の腹水腫瘍細胞. 染色体の凝集, 油滴状核, 細胞体の膨化を認める.

Giemsa 染色 × 690



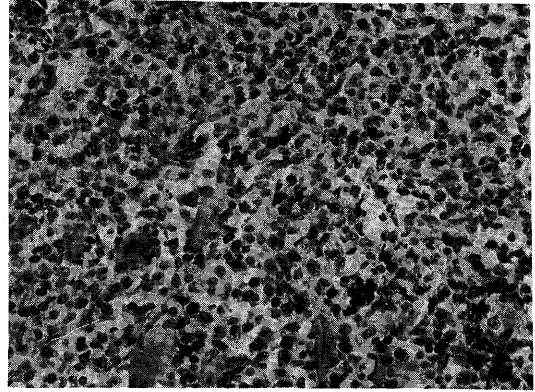
第11図 NM抵抗性細胞. NMO1.0mg/kg腹腔内注射後24時間後の腹水腫瘍細胞. 正常有糸核分裂像を認め, 変性像を認めず.

Giemsa 染色 × 690



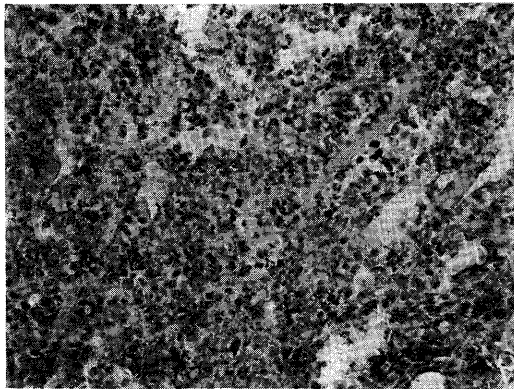
第12図 NM感受性細胞. NMO 1.0mg/kg 6日間腹腔内注射後の皮下腫瘍細胞. 細胞の膨化著明で細胞の崩壊も認める.

H.E. 染色 × 300



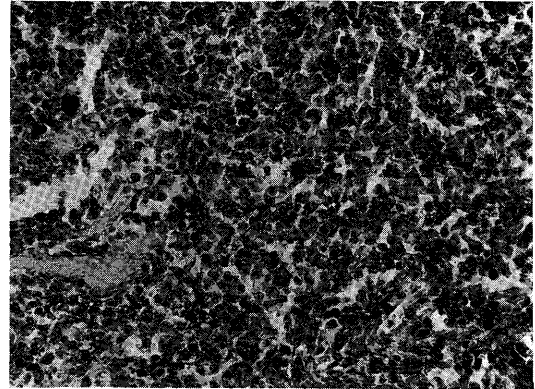
第13図 NM抵抗性細胞. NMO 1.0mg/kg 6日間腹腔内注射後の皮下腫瘍細胞. 細胞の増殖を認め, 変性像はない.

H.E. 染色 × 300



第14図 NM感受性細胞. NMO 0.5mg/kg 6日間腹腔内注射後皮下腫瘍細胞. 核及び細胞質の被染色性の低下を認める.

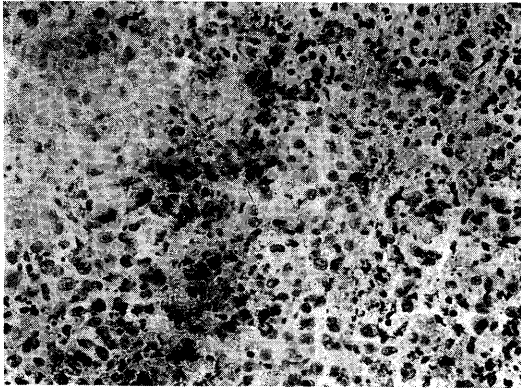
Pyronin-Methylgreen 染色 × 300



第15図 NM抵抗性細胞. NMO 0.5mg/kg 6日間腹腔内注射後皮下腫瘍細胞. 核及び細胞質の被染色性の著明なるを認める.

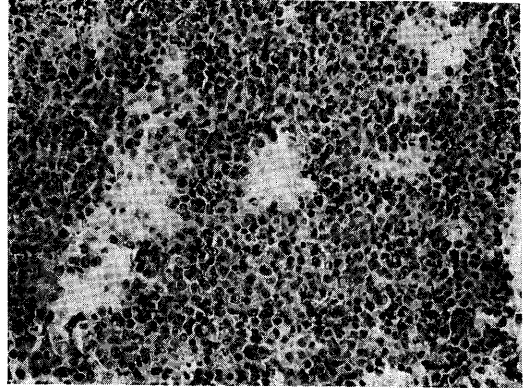
Pyronin-Methylgreen 染色 × 300





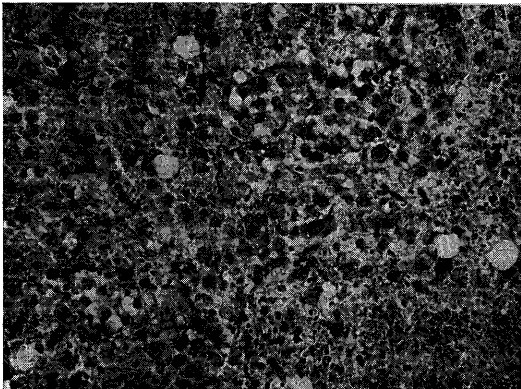
第16図 NM感受性細胞. NMO1.0mg/kg 6日間腹腔内注射後の皮下腫瘍細胞. 被染色体の増加, 細胞の鬆疎, 膨化を認める.

Alkaline Phosphatase 染色 × 300  
(後染色施行)



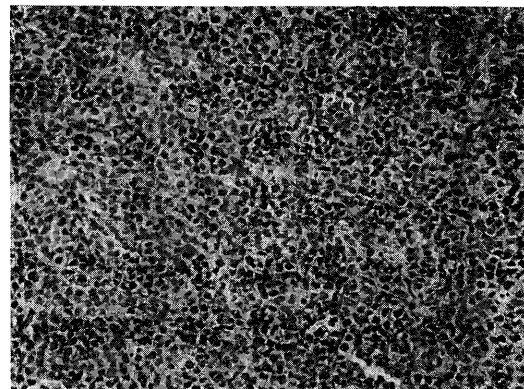
第17図 NM抵抗性細胞. NMO1.0mg/kg 6日間腹腔内注射後の皮下腫瘍細胞. 被染色体少なく, 細胞密集し, 変性像を認めず.

Alkaline Phosphatase 染色 × 300  
(後染色施行)



第18図 NM感受性細胞. NMO1.0mg/kg 6日間腹腔内注射後の皮下腫瘍細胞. 細胞の鬆疎, 膨化と共に被染色性の増加を認める.

Acid Phosphatase 染色 × 300  
(後染色施行)



第19図 NM抵抗性細胞. NMO1.0mg/kg 6日間腹腔内注射後の皮下腫瘍細胞. 細胞は密集し被染色性は認められない.

Acid Phosphatase 染色(後染色施行)×300