

## 悪性腫瘍の化学療法に関する研究

### 第2編 Nitrogen mustard 抵抗性吉田肉腫を使用せる 腫瘍細胞の型質転換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 ト部美代志教授)

綱 村 史 郎

(昭和37年1月31日受付)

本論文の要旨は、昭和36年10月第20回日本癌学会総会において報告した。

最近、悪性腫瘍に対して多数の化学療法剤が、実験的、臨床的に広く使用されてきたが悪性腫瘍に対する化学療法剤を選択するに当つて、その適応を決定するのに細菌感染の場合の如き感受性を知るべきよい検査法が現在のところない、また腫瘍細胞の薬剤耐性についても薬剤の効果が使用直後から認められないような所謂先天的薬剤耐性の存在や、或いは有効と目される薬剤を使用したとしても、腫瘍が二次的に耐性を獲得した所謂後天的薬剤耐性の出現が考慮されて、ようやく精細な研究が進められようとしている。

事実、先天的な薬剤耐性<sup>1)2)</sup>及び薬剤投与による後天的薬剤耐性<sup>3)-7)</sup>を有する悪性腫瘍が動物実験的にも臨床的<sup>8)9)</sup>にも多数報告されている。

特に悪性腫瘍の化学療法剤使用による二次的な耐性獲得の問題は、細菌の化学療法の場合と同様重要な意義を有するものであつて最近特に一般の注目を浴びているところである。

化学療法剤のかかる耐性獲得の機構に関しては、諸家の説が発表されているが<sup>10)-15)</sup>、Wheeler<sup>15)</sup>はそれは全く複雑であり、しかもすべてに共通の耐性発現の機構は存しないと述べている如く、未だ定説を見出せない状況である。この機構を解明することは、ひとり耐性の問題にとどまらず、悪性腫瘍の化学療法の作用機序の解明、ひいては化学療法の発展進歩を促進するものと確信する。

最近、この問題の研究方法の一環として、薬剤耐性細胞についての型質転換に関する業績が多数発表されてきているが、それらの研究の端緒となつたのは、

Griffith<sup>16)</sup>による肺炎双球菌についての成績であり、かつ Mc Carty<sup>17)18)</sup>等によつて、かかる型質転換を惹起する因子が Deoxyribonucleic acid (DNA) であることが明らかにされ、更にその他諸種の細菌、例えば Haemophilus influenzae<sup>19)</sup>、Escherichia coli<sup>20)</sup>や脳脊髄膜炎菌<sup>21)</sup>などでもかかる現象が起り得ることが判明した。またこれら細菌類のみならず Trichomonas<sup>26)</sup>、Trypanosoma<sup>27)</sup>についても同様な現象が報告されている。一方栗田<sup>28)29)</sup>等によつて吉田肉腫の化学療法剤の抵抗性株について型質転換が起り得ることが発表されているが、Benoit<sup>22)</sup>、Leuchtenberger<sup>23)</sup>及び Perry<sup>24)等25)</sup>によつて試みられたこれに関する実験はすべて失敗に終つている。

著者は、腫瘍細胞株に吉田肉腫細胞の化学療法剤に対する耐性獲得機構の一端を解明する目的で、佐々木研究所分室にて作製された Nitrogen mustard (以下 NM と略記) 抵抗性吉田肉腫を使用して、型質転換に関する実験を行なつたので、その成績について報告する。

#### I. 実験材料

使用に供した NM 抵抗性吉田肉腫は、第1編におけると同様、佐々木研究所分室にて NM 感受性吉田肉腫に対して NM を連続処理することによつて作製されたものであり、その抵抗性の程度は、有効薬剤濃度を指標として比較され、感受性株の1万倍という高耐性度を有するものである<sup>30)</sup>。

NM 感受性吉田肉腫も、同研究所にて累代移植され

Studies on the Chemotherapy of Malignant Tumors. Part II Experimental Studies on the Transformation of Tumor Cells Using Nitrogen Mustard Resistant Yoshida Sarcoma Shiro Tsuamura. Department of Surgery (Director : Prof. Miyoshi Urabe), School of Medicine, University of Kanazawa

ているもので、NM 抵抗性株の母株にあたるものである。

なお、この二種の吉田肉腫を移植実験する動物として、雑系の雌のラッテを使用した。

## II. 実験方法

### 1) 吉田肉腫細胞からの DNA 抽出法

NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞を、体重約 100 g の雑系ラッテの腹腔内に移植し、移植 6~7 日目に、この腹腔内の腫瘍細胞のみを 0.01M Na citrate を加えた冷生理的食塩水（以下生食水と略記）に集め、遠沈後 Mirsky-Pollister<sup>31)</sup> 及び Kay, Simmons, Dounce<sup>32)</sup> の方法に従って、Deoxyribose 核蛋白を抽出し、Duponol を用いて除蛋白し、DNA を分離した。即ち 3000 rpm. 5 分間遠沈せる腫瘍細胞を 150ml の 0.01M Na-Citrate で作った 0.14M NaCl に浮遊し、Homoblender にて 1 分間 homogenize 後、2 層のガーゼを通し、その濾出液を 8000rpm. 10 分間遠沈し、その沈渣を 150ml の 0.01M Na citrate で作製した 0.14M NaCl で 4 回洗滌した。この沈渣に 400 ml の 0.01M Na citrate で作った 0.14M NaCl を加え、再び 30 秒間 homogenize した。これに 45% Ethanol で溶解した 5% Duponol を 80ml 加え、室温で 3 時間攪拌後、1M の濃度になるように NaCl を加え、更に 10 分間攪拌した。この粘稠な液を 13000 r.p.m. 1 時間遠心しその上澄みに 2 倍量の 95% Ethanol を加え、線維状の DNA を析出せしめ得た。この DNA を Ethanol 及び Aceton で脱水し、decicator で乾燥した後、0.01M Na citrate で作った生食水に溶解し、更にこの生食水を外液として 18 時間以上透析を行なった。これらの操作は、Duponol 処理を除きすべて冷凍室内（4°C）で行なった。

この NM 感受性及び抵抗性細胞より抽出した DNA の資料は、紫外部吸収曲線及び Diphenylamine 反応<sup>33)</sup>をもつて分析し、濃度は紫外部吸収（波長 260m $\mu$ ）により測定した。

2) DNA を以つて処置せる吉田肉腫の移植後の態度を、次の方法によつて観察した。

NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞を、雑系ラッテの腹腔内に移植後 7 日目に Heparin 加生食水を腹腔内に注入して腹水を採取した。この感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞にそれぞれ抵抗性及び感受性細胞より抽出した DNA 溶液を 1mg/ml になるように添加した。この時の細胞数は、最終的には感受性細胞 2150 万個/ml, 抵抗性細胞 2200 万個/ml とした。この DNA を混じた細胞浮遊液を恒温槽で 37°C, 2 時間緩除震盪

しながら Incubation を行なつた。その後、腫瘍細胞 1000 万個宛をラッテの腹腔内及び皮下に移植した。対照として DNA 溶液の代りに生食水を混じ、同様の操作を行なつたものを用いた。これらのラッテについて生存日数、腹腔内腫瘍細胞数及び有糸核分裂数と、皮下腫瘍発育の変化を対照と比較しつつ検索した。

3) NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる NM 感受性細胞の型質転換について、次の方法によつて検索した。NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞より、上述の方法によつて DNA を抽出し、移植 7 日目の NM 感受性吉田肉腫細胞の Heparin 加生食水浮遊液へ一定の濃度の DNA を添加し、一定時間、一定温度で緩除震盪しながら Incubation を行なつた。この最終時の細胞数は 2150 万個/ml である。この細胞の 1000 万個宛をラッテの皮下及び腹腔内へ移植し、皮下移植の場合は 6~7 日目腫瘍が発育しているのを確かめた上、一定量の NM を皮下に連日 5 日間注射し、その 2 日後腫瘍を剔出してその大きさ及び重量を測定した。腹腔内移植の場合は、6 日目に腹水の存在を確かめ得たものについて同様に一定量の NM 投与後 12 時間、24 時間、48 時間後に腹腔内腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞数を測定した。NM の注射は 24 時間後に再注射し、合計 2 回皮下注射を行ない、対照には腫瘍の発育に無関係である生食水を同量注射した。

4) NM 感受性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる NM 抵抗性吉田肉腫細胞の型質転換については、NM 抵抗性株が高耐性を有しているため in vivo では NM の効果が判定出来ないので、次の方法によつて検索を行なつた。

NM 感受性吉田肉腫細胞より DNA を抽出し、3) と同様の操作で NM 抵抗性吉田肉腫細胞に混じ Incubation を行なつた。この時の最終細胞数は 2300 万個/ml である。この DNA にて処置せる NM 抵抗性細胞を 1000 万個宛ラッテの腹腔内に移植し、6 日目純培養になつたところで、Heparin 加生食水を注入して腹水を採取した。この細胞浮遊液に最終濃度  $10^{-2}M$ ,  $5 \times 10^{-3}M$ ,  $10^{-3}M$ ,  $5 \times 10^{-4}M$ ,  $10^{-4}M$  の NM を添加し、37°C 1 時間緩除震盪して Incubation を行ない、最終細胞数は 2360 万個/ml である。この細胞を 1200 万個宛ラッテの背部皮下に移植し、8 日目に腫瘍を剔出し、その大きさ及び重量を測定した。同時に無処置の NM 抵抗性細胞についても同様に NM を作用させ、その効果を検索し比較した。

### 5) 組織学的検索法

吉田肉腫細胞をラッテの腹腔内及び皮下に移植し、

腫瘍の発育を確認し一定量の NM を皮下注射し、腹水及び皮下腫瘍を採取し、それぞれ Giemsa 染色及び Hematoxylin-Eosin 染色によつて、腫瘍細胞の退行変性像の有無もしくはその程度について組織学的観察を行ない、これを指標として、DNA による腫瘍細胞の NM に対する耐性化の有無を検討した。

Ⅲ. 実験成績

1) NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞より抽出せる DNA 量及びその性状

NM 感受性及び抵抗性細胞より抽出せる DNA 量は第 1 表の如くである。感受性株においては  $7.7 \times 10^9$  個の細胞より 90.2mg、抵抗性株においては  $7.1 \times 10^9$  個及び  $14.6 \times 10^9$  個の細胞より 84.6mg 及び 171.7mg を得た。これを細胞 1 個当りの DNA 量に換算するとそれぞれ  $1.17 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ 、 $1.19 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  及び  $1.13 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  となる。この両者の DNA は Diphenylamine 反応陽性であり紫外部吸収曲線で検するに、何れも  $260\text{m}\mu$  で最大吸収、 $230\text{m}\mu$  で最小吸収を示す典型的な核酸の Spectrum を得、両者の間に著明な差異は認められない。(第 1 図)

2) DNA を以つて処置せる吉田肉腫の移植後の態度

抵抗性細胞より抽出した DNA を以つて処置せる感受性細胞と未処置の感受性細胞をそれぞれラットの腹腔内及び皮下に移植し、その生存日数及び皮下腫瘍の発育を比較したが、何等差異がない。また感受性細胞より抽出した DNA を以つて処置せる抵抗性細胞の場合も未処置の抵抗性細胞と比べて生存日数及び皮下腫瘍の発育について相違を認めない。更に腹腔内移植の場合において、腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞の推移を比較したが、DNA 処置群と未処置群の間には著明な差を認めることが出来ない。即ち DNA を吉田肉腫細胞に作用させても何等吉田肉腫の増殖、発育に影響

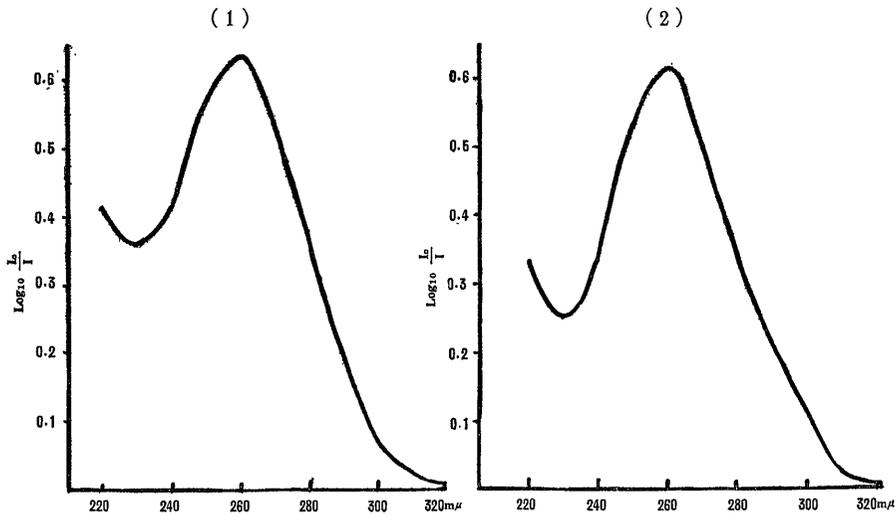
第 2 表 DNA 処置せる吉田肉腫の腹腔内移植ラットの生存日数

| DNA   | 腫瘍細胞 | 生存日数 |    |    |    |    |    |
|-------|------|------|----|----|----|----|----|
|       |      | 9    | 9  | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 抵抗性なし | 感受性  | 9    | 9  | 10 | 10 | 10 | 10 |
|       | 感受性  | 9    | 9  | 9  | 10 | 10 | 10 |
| 感受性なし | 抵抗性  | 9    | 10 | 10 | 10 | 10 | 11 |
|       | 抵抗性  | 9    | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

第 1 表 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞より抽出された DNA 量

| 細胞  | ラット数 | 移植日数 | 全細胞数                 | 全 DNA 量 | 細胞 1 個当りの DNA 量                   |
|-----|------|------|----------------------|---------|-----------------------------------|
| 感受性 | 20 匹 | 7 日目 | $7.7 \times 10^9$ 個  | 90.2mg  | $1.17 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ |
| 抵抗性 | 18 匹 | 6 日目 | $7.1 \times 10^9$ 個  | 84.6mg  | $1.19 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ |
| 抵抗性 | 39 匹 | 7 日目 | $14.6 \times 10^9$ 個 | 171.7mg | $1.13 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ |

第 1 図 NM 抵抗性及び感受性吉田肉腫細胞より抽出せる DNA の紫外部吸収曲線



(1) 抵抗性株の DNA

(2) 感受性株の DNA

第3表 DNA 処置せる吉田肉腫の皮下移植腫瘍の発育

| DNA | 腫瘍細胞 | 腫瘍の大きさ及び重量 |            |            |            |            |              | 平均           |
|-----|------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|--------------|
|     |      | 1.9<br>1.4 | 1.6<br>1.1 | 1.5<br>1.1 | 1.5<br>1.0 | 1.5<br>1.0 | 1.4*<br>0.9+ |              |
| 抵抗性 | 感受性  | 1.6<br>1.2 | 1.6<br>1.1 | 1.6<br>1.0 | 1.5<br>0.9 | 1.4<br>0.9 | 1.3<br>0.8   | 1.57<br>1.08 |
| なし  | 感受性  | 1.6<br>1.0 | 1.5<br>1.0 | 1.5<br>0.9 | 1.4<br>0.9 | 1.4<br>0.9 | 1.1<br>0.7   | 1.42<br>0.90 |
| 感受性 | 抵抗性  | 1.6<br>1.0 | 1.6<br>0.9 | 1.5<br>0.9 | 1.4<br>0.8 | 1.3<br>0.8 | 1.0<br>0.7   | 1.48<br>0.85 |
| なし  | 抵抗性  |            |            |            |            |            |              |              |

\* 腫瘍の長径と短径の相加平均, 単位 cm

+ 腫瘍の重量, 単位 g.

を及ぼさない。(第2表, 第3表, 第4表)

第4表 DNAを以つて処置せる吉田肉腫の腹腔内移植腫瘍の細胞数及び有糸分裂数の変化

(1) 腫瘍細胞数 (単位100個/mm<sup>3</sup>)

| DNA   | 腫瘍細胞 | 移植  | 6日目  | 8日目  | 10日目 |
|-------|------|-----|------|------|------|
|       |      | 4日目 |      |      |      |
| 抵抗性なし | 感受性  | 254 | 1498 | 1821 | 1502 |
|       | 感受性  | 396 | 1546 | 1664 | 1360 |
| 感受性なし | 抵抗性  | 232 | 1405 | 1599 | 1482 |
|       | 抵抗性  | 198 | 1352 | 1562 | 1500 |

(2) 有糸核分裂数 (腫瘍細胞1000個中の数)

| DNA   | 腫瘍細胞 | 移植  | 6日目 | 8日目 | 10日目 |
|-------|------|-----|-----|-----|------|
|       |      | 4日目 |     |     |      |
| 抵抗性なし | 感受性  | 19  | 15  | 11  | 13   |
|       | 感受性  | 18  | 16  | 14  | 14   |
| 感受性なし | 抵抗性  | 17  | 15  | 11  | 16   |
|       | 抵抗性  | 18  | 13  | 9   | 14   |

3) NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる NM 感受性細胞の型質転換について

i) NM 抵抗性吉田肉腫より抽出した DNA 処置により獲得せられた耐性の程度

a) 皮下移植腫瘍

NM 抵抗性細胞から抽出した DNA を以つて処置した NM 感受性細胞の皮下移植腫瘍を有するラットに, 第2図に示す如く, NM 0.1 及び 0.2mg/kg を投与した群においては腫瘍の発育は全く阻害されず却つて対照より増大する傾向を認めた. 組織学的にも全く細胞の退化変性はない. NM の注射量が 0.35mg/kg に増量されると初めて対照より47%腫瘍の発育は抑制され, NM 0.65mg/kg を投与すると著明な抑制を認め組織像においても腫瘍細胞の変性を認めた. しかしに第3図の如く, 同一のラットの腹腔内より採取した未処置の感受性細胞の場合, NM 0.1mg/kg を投与して

第2図 NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる感受性吉田肉腫皮下腫瘍の発育に及ぼす諸種濃度の NM の影響

| NM mg/kg | 動物番号 |   |   |   |     |   | 平均重量g   | 発育率% |     |
|----------|------|---|---|---|-----|---|---------|------|-----|
|          | 1    | 2 | 3 | 4 | 5   | 6 |         |      |     |
| 対照       |      |   |   |   |     |   | 1.08    |      |     |
| 0.10     |      |   |   |   |     |   | 1.10    | -2   |     |
| 0.20     |      |   |   |   |     |   | 移植3日目死亡 | 1.24 | -17 |
| 0.35     |      |   |   |   |     |   | 0.57    | 47   |     |
| 0.60     |      |   |   |   |     |   | 0.43    | 60   |     |
| 0.65     |      |   |   |   | (-) |   | 移植7日目死亡 | 0.18 | 83  |

既に74%腫瘍の発育は抑制され著明な細胞変性像を認め, NM 0.35mg/kg 以上を与えると殆んど腫瘍は消失する.

即ち感受性細胞は, 抵抗性細胞より抽出した DNA によつて NM 耐性を獲得し 所謂薬剤耐性を表現形式とした形質転換が生じたことを意味する. この場合その耐性の程度は, NM 0.2mg/kg に完全耐性を, NM 0.5mg/kg に不完全耐性を, 獲得したと考えられる. なお本来の抵抗性細胞はこの実験の NM 使用法におけるラットの最大耐量である NM 0.65mg/kg を投与しても全く腫瘍の発育は阻害されない. 即ち NM 0.65mg/kg で完全耐性を有している. 従つて獲得された耐性の程度は本来の抵抗性細胞の耐性のほぼ1/2以

第3図 NM 感受性吉田肉腫皮下腫瘍の  
発育に及ぼす諸種濃度の NM の影響

| NM <sub>2</sub> mg/kg | 動物番号 |     |     |     |     |                 | 平均<br>重量<br>g | 腫瘍度<br>% |
|-----------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----------------|---------------|----------|
|                       | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6               |               |          |
| 対照                    |      |     |     |     |     |                 | 0.88          |          |
| 0.10                  |      |     |     |     |     |                 | 0.26          | 74       |
| 0.20                  |      |     |     |     | (-) | (-)             | 0.20          | 80       |
| 0.35                  |      |     | (-) | (-) | (-) | (-)             | 0.03          | 97       |
| 0.50                  |      |     |     | (-) | (-) | 移植<br>8日目<br>死亡 | 0.03          | 97       |
| 0.65                  |      | (-) | (-) | (-) | (-) | 移植<br>7日目<br>死亡 | 0.01          | 98       |

下といえる。

b) 腹腔内移植腫瘍

NM 抵抗性吉田肉腫から抽出した DNA を以て処置した感受性細胞の腹水腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞数は第4図及び第5図に示す如く、NM 0.2mg/kg 以下の量を投与した場合、殆んど減少は認められず、細胞の変性像はなく NM 0.5mg/kg 以下の量を与えて軽度の現象を認め、NM 0.65mg/kg の量を投与す

るに至つて始めて著明な減少を認めた。一方未処置の感受性細胞の場合、既に NM 0.1mg/kg を与えることによつて細胞数及び核分裂細胞数の減少を認め得る。

即ち皮下腫瘍の場合と同様、NM 0.2mg/kg に完全耐性を、NM 0.5mg/kg に不完全耐性を獲得したものと考えられる。

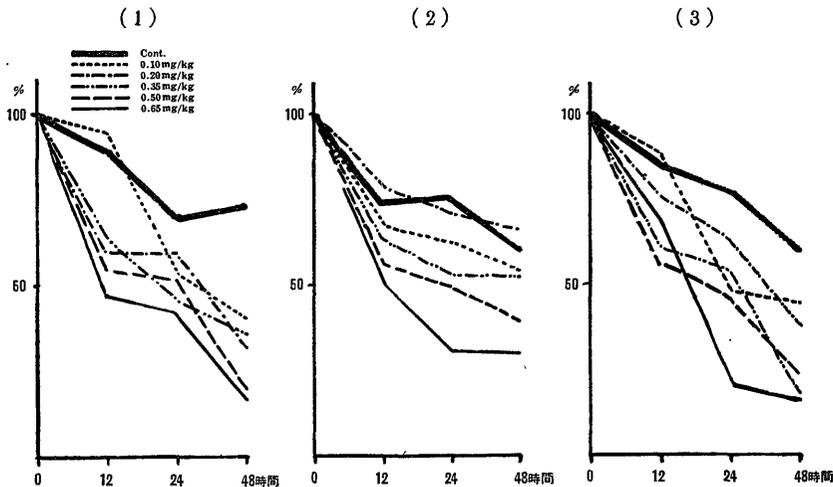
ii) 型質転換要素である DNA 活性に及ぼす Deoxyribonuclease (DNase) 及び Ribonuclease (RNase) の影響

NM 抵抗性吉田肉腫から抽出した DNA 2mg/ml の溶液に対してそれぞれ DNase 0.7mg/ml、または RNase 0.3mg/ml を添加し、37°C、20分間放置後、前述の如く、これらの DNA を以て感受性細胞を Incubation した後、ラットの背部皮下へ移植し、7日目より連日5日間 NM 0.2mg/kg を皮下注射した。

その結果第6図の如く DNase を作用させた DNA を用いた場合、皮下腫瘍は NM によつて著しく発育を抑制され、腫瘍細胞の変性も強度で耐性を認めないが、RNase を作用させた DNA を用いた場合、腫瘍は NM によつて殆んど影響されず、細胞の変性像もなく耐性を認めた。

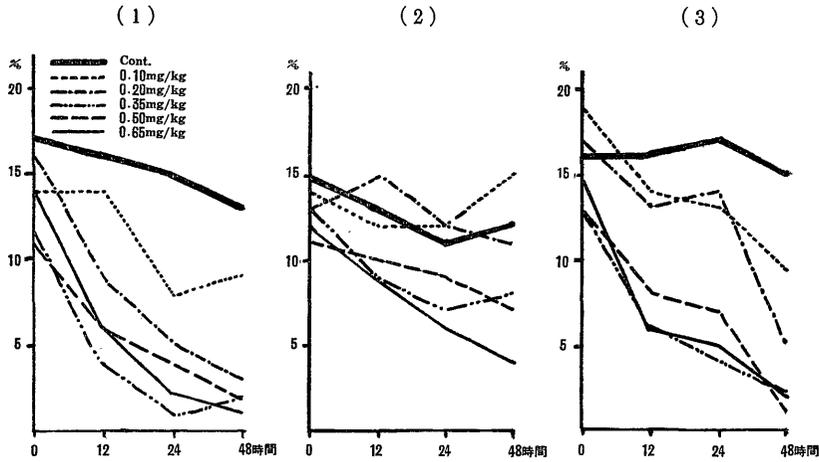
即ち型質転換を惹起する因子である DNA は DNase によつて不活性化され、その能力を消失したことを示し、かつ RNA は型質転換には全く無関係であることを知り得た。

第4図 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫より抽出した DNA を以て処置せる  
感受性吉田肉腫の腹水腫瘍細胞数に及ぼす NM の影響



(1) 感受性吉田肉腫群 (2) 抵抗性 DNA を処置せる感受性吉田肉腫群 (3) 感受性 DNA を処置せる感受性吉田肉腫群

第5図 NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫より抽出した DNA を以て処置せる感受性吉田肉腫の腹水腫瘍細胞の有糸核分裂数に及ぼす諸種濃度の NM の影響



(1) 感受性吉田肉腫群 (2) 抵抗性 DNA を処置せる感受性吉田肉腫群 (3) 感受性 DNA を処置せる感受性吉田肉腫群

第6図 NM抵抗性吉田肉腫細胞より抽出せる DNA 活性に及ぼす DNase 及び RNase の影響

| 群 名<br>NM mg/kg | 動物 番 号 |   |   |   |   |     | 平均重量 g | 阻害率 % |
|-----------------|--------|---|---|---|---|-----|--------|-------|
|                 | 1      | 2 | 3 | 4 | 5 | 6   |        |       |
| D Nase 対照       |        |   |   |   |   |     | 2.24   |       |
| D Nase 0.2      |        |   |   |   |   | (-) | 0.48   | 88    |
| R Nase 対照       |        |   |   |   |   |     | 2.37   |       |
| 0.2             |        |   |   |   |   |     | 2.16   | 9     |

iii) 試験管内 DNA の濃度

NM 抵抗性吉田肉腫から抽出した DNA の最終濃度を 0.1, 0.3, 0.5, 1.0mg/ml の4段階にわけ、これらに感受性細胞を加え、2時間、37°C、Incubationし、皮下移植後7日目より NM 0.2mg/kg を連日5日間皮下注射した。その成績は第7図の如くである。即ち DNA 濃度 0.1 及び 0.3mg/ml の群においては皮下腫瘍の発育は、72及び73%抑制され、細胞の変性像が認められるが、DNA 濃度 0.5 及び 1.0mg/ml の2群においては腫瘍の発育は殆んど抑制されず、組織像は対照と全く等しい。換言すれば 0.3mg/ml 以下の濃度の DNA を作用させても NM 耐性を獲得しないが 0.5mg/ml 以上の濃度の DNA を用いる時は耐性を獲得し、型質転換が成立したといえる。即ち DNA

が型質転換を惹起するに必要な最低濃度は 0.5mg/ml である。

これらの DNA の濃度を細胞1個当りの量に換算すると、それぞれ  $0.48 \times 10^{-5}$ ,  $1.43 \times 10^{-5}$ ,  $2.38 \times 10^{-5}$ ,  $4.76 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  となる。抵抗性細胞より抽出した DNA 量は細胞1個当たり  $1.13 \sim 1.19 \times 10^{-5} \mu\text{g}$  であることから考えると、ほぼ細胞2個分の DNA が1個の細胞の周囲に存在すれば型質転換が生じ得ると考えられる。

第7図 NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出した諸種濃度の DNA を以て処置せる NM 感受性吉田肉腫皮下腫瘍の発育に及ぼす NM の影響

| DNA mg/ml | 動物 番 号 |   |   |   |   |     | 平均重量 g | 阻害率 % |
|-----------|--------|---|---|---|---|-----|--------|-------|
|           | 1      | 2 | 3 | 4 | 5 | 6   |        |       |
| 対照        |        |   |   |   |   |     | 2.20   |       |
| 0.1       |        |   |   |   |   |     | 0.61   | 72    |
| 0.3       |        |   |   |   |   | (-) | 0.58   | 73    |
| 0.5       |        |   |   |   |   |     | 2.08   | 6     |
| 1.0       |        |   |   |   |   |     | 2.14   | 5     |

\* 移植6日目の腫瘍 1cm

iv) 試験管内 Incubation の時間

型質転換が確実に起る耐性 DNA 濃度 1.0mg/ml を使用し感受性細胞に加え、37°C の温度において、Incubation する。その時間を0分、30分、60分、120分の4段階に区別し、感受性細胞と Incubation を行なった後ラットの皮下に移植し、前述の如く NM を皮下注射した。その結果0分、30分の Incubation をしたのものにおいては腫瘍の発育は抑制され、腫瘍重量は対照のものより80%及び70%減少し、腫瘍細胞の変性が惹起され NM の効果が認められた。しかし60分 Incubation したのものにおいては腫瘍の発育が軽度に抑制されるのみであり、腫瘍重量も対照より14%程度減少されるのみである。120分 Incubation したものにおいては、腫瘍の発育及び組織像は対照と同様であり、腫瘍重量は却つて対照より9%増加した。即ち0分、30分、60分 Incubation した場合は、感受性細胞は耐性 DNA により耐性を獲得せず、60分、120分 Incubation する時、始めて耐性が獲得される。しかも60分 Incubation の場合は120分 Incubation の場合に比べて耐性の程度が多少弱いようである。

従つて感受性細胞が抵抗性細胞より抽出した DNA によつて型質転換が起り得るには、少なくとも60分以上の Incubation 時間を必要とする。(第8図)

第8図 NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて諸種時間で処置せる NM 感受性吉田肉腫皮下腫瘍の発育に及ぼす NM の影響

| 時間 (分) | 動物番号 |   |   |   |   |     | 平均重量 g | 腫瘍率 % |
|--------|------|---|---|---|---|-----|--------|-------|
|        | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6   |        |       |
| 対照     |      |   |   |   |   |     | 2.35   |       |
| 0      |      |   |   |   |   | (-) | 0.68   | 80    |
| 30     |      |   |   |   |   |     | 0.70   | 74    |
| 60     |      |   |   |   |   |     | 2.02   | 14    |
| 120    |      |   |   |   |   |     | 2.57   | -9    |

v) 試験管内 Incubation 時の温度

感受性細胞の腹水浮遊液に NM 抵抗性吉田肉腫から抽出した DNA を 1mg/ml の濃度で混和し 10°, 20°, 30°C 37°C の4段階の温度で2時間 Incubation を行ない、それぞれをラットの皮下に移植し、前述同

第9図 NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて諸種温度で処置せる NM 感受性吉田肉腫皮下腫瘍の発育に及ぼす NM の影響

| 温度   | NM mg/kg | 動物番号 |   |   |   |   |     | 平均重量 g | 腫瘍率 % |
|------|----------|------|---|---|---|---|-----|--------|-------|
|      |          | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6   |        |       |
| 10°C | 対照       |      |   |   |   |   |     | 2.21   |       |
|      | 0.2      |      |   |   |   |   | (-) | 0.60   | 73    |
| 20°C | 対照       |      |   |   |   |   |     | 2.18   |       |
|      | 0.2      |      |   |   |   |   |     | 0.72   | 62    |
| 30°C | 対照       |      |   |   |   |   |     | 2.29   |       |
|      | 0.2      |      |   |   |   |   |     | 1.28   | 44    |

様の方法で NM を注射し腫瘍の発育の状態を観察した。

第9図に示す如く 10°C 及び 20°C の温度で Incubation を行なった場合、NM によつて腫瘍の発育は相当抑制され、腫瘍重量は対照よりそれぞれ 73% 及び 62%減少し、著明な細胞の変性を認められた。しかし 30°C の温度で Incubation が行なった場合には腫瘍の発育の抑制は軽度であり、腫瘍重量は 44% 減少する。第8図に示す如く 37°C (120分)の温度で Incubation した場合、腫瘍の発育は全く抑制されず、腫瘍重量は対照より却つて増大した。(第8図と第9図は同時に同一の細胞にて行なった実験成績である)

即ち 20°C 以下の温度の下に耐性 DNA を作用させても耐性の転換は起らない。30°C の温度の下に作用させると軽度ながら耐性転換が起り、37°C の温度の下に作用させると完全なる耐性転換が行なわれることを知るのである。

従つて感受性細胞が NM 抵抗性細胞より抽出した DNA によつて型質転換を生ずるためには少なくとも 30°C 以上の温度の下に Incubation することが必要であり、かつ至適温度は 37°C である。

vi) 試験管内 Incubation 時の腹水の影響

抵抗性細胞より抽出した DNA を感受性細胞と混じて Incubation を行なう際、感受性細胞を腹腔より採取したままの腹水浮遊細胞を用う場合とその細胞を生食水で2回洗滌し腹水を除去した生食水浮遊細胞を用う場合とを区別し、型質転換を観察した結果は第

第10図 NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出せる DNA を用いての型質転換時の腹水の影響

| 腹水の有無<br>NM mg/kg | 動物番号 |   |   |   |   |   | 平均重量<br>g | 阻害度<br>% |
|-------------------|------|---|---|---|---|---|-----------|----------|
|                   | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |           |          |
| 腹水有<br>対照         |      |   |   |   |   |   | 2.32      |          |
| 腹水有<br>0.2        |      |   |   |   |   |   | 2.10      | 10       |
| 腹水無<br>対照         |      |   |   |   |   |   | 2.18      | 移植不成功    |
| 腹水無<br>0.2        |      |   |   |   |   |   | 0.85      | 61       |

10図に示される。この場合の条件は DNA 濃度 1.0 mg/ml, 温度は 37°C とした。即ち腹水の存在する場合 0.2mg/ml の NM をラットに注射しても殆んど皮下腫瘍はその発育を抑制されず組織像にも異常を認めないが、腹水の存在しない場合においては、腫瘍重量を指標とした発育が61%抑制され軽度の細胞変性像を認めた。しかしこの発育の阻害度は感受性細胞と耐性 DNA とを混合直後に移植した場合の発育阻害度に比べて低い。従つてこの際軽度の耐性は獲得されたといひ得る。

即ち感受性細胞の耐性への型質転換にあつて腹水の存在することはその反応を促進するものと考えられるが、存在しない場合その反応が全く起らないとはいへない。

vii) 累代移植時の耐性維持について

感受性細胞を NM 抵抗性細胞より抽出した DNA を以つて 1.0mg/ml, 37°C 2時間の条件で処理し前述の如く、ラット腹腔内及び皮下に移植し、NM 注射による腫瘍の発育の変化を検討し、感受性細胞に型質転換の生じたことを認め、これを第1代とした。

次いで6~7日目毎にラット腹腔内へ累代移植を行なつた。この4代目の吉田肉腫細胞を腹腔内より採取しラットの皮下へ1000万個宛移植し、7日目より種々の濃度の NM を皮下注射した。その結果 第11図の如く NM 0.1 及び 0.2mg/kg 投与群においては、腫瘍の発育は対照の重量の2及び8%抑制されたにすぎず、組織学的には殆んど変化はなく、NM に抵抗性を認める。0.3mg/kg 以上の NM を投与した場合は第1代と比較しても発育阻害度に殆んど差異を認めない。即ち型質転換によつて獲得された NM 抵抗性は累代移植によつても依然としてその性質を維持し安定であり遺伝される。

第11図 型質転換による NM 抵抗性吉田肉腫 (第4代) 皮下腫瘍の発育に及ぼす NM の影響

| NM mg/kg | 動物番号 |   |   |   |   |   | 平均重量<br>g | 阻害度<br>% |    |
|----------|------|---|---|---|---|---|-----------|----------|----|
|          | 1    | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |           |          |    |
| 対照       |      |   |   |   |   |   | 移植 3日目死亡  | 1.13     |    |
| 0.10     |      |   |   |   |   |   |           | 1.11     | 2  |
| 0.20     |      |   |   |   |   |   |           | 1.04     | 8  |
| 0.25     |      |   |   |   |   |   | 移植 4日目死亡  | 0.60     | 66 |
| 0.50     |      |   |   |   |   |   | (-)       | 0.38     | 16 |
| 0.65     |      |   |   |   |   |   | 移植 6日目死亡  | 0.12     | 89 |

1cm

4) NM 感受性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる感受性細胞の型質転換に対する態度について

NM 感受性細胞より抽出した DNA を以つて感受性細胞を処置し、これをラットに移植し、NM を投与した場合第12図の如く NM 0.1mg/ml 投与群において皮下腫瘍の発育は強く抑制され、腫瘍重量は対照より

第12図 NM 感受性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる感受性吉田肉腫皮下腫瘍の発育に及ぼす諸濃度の NM の影響

| NM mg/kg | 動物番号 |     |     |     |          |          | 平均重量<br>g | 阻害度<br>% |
|----------|------|-----|-----|-----|----------|----------|-----------|----------|
|          | 1    | 2   | 3   | 4   | 5        | 6        |           |          |
| 対照       |      |     |     |     |          |          | 1.80      |          |
| 0.10     |      |     |     |     |          |          | 0.60      | 67       |
| 0.20     |      |     |     | (-) | (-)      | (-)      | 0.28      | 85       |
| 0.35     |      | (-) | (-) | (-) | (-)      | (-)      | 0.05      | 98       |
| 0.50     |      |     | (-) | (-) | (-)      | (-)      | 0.02      | 89       |
| 0.65     | (-)  | (-) | (-) | (-) | 移植 7日目死亡 | 移植 7日目死亡 | 0         | 100      |

67% 減少し、著明な腫瘍細胞の変性を認めた。NM 0.2mg/ml 投与群においては更に著明な効果を認め腫瘍重量は85%減少し、NM 0.35mg/ml 以上を投与した群においては殆んど腫瘍の消失を認めた。この NM の腫瘍に対する効果は第3図の如く DNA 未処置の感受性細胞の場合と比較し、著明な差異を認めない。更に感受性 DNA を以つて処置せる感受性細胞を腹腔内に移植し、腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞数に及ぼす NM の影響を観察したが、第4図及び第5図の如く、未処置の感受性細胞の場合と比べて差異がなく、NM 0.1mg/kg 投与群において既に細胞数の減少を認め、薬剤効果のあることを知った。

即ち感受性細胞より抽出した DNA を以つて感受性細胞を処置してもその細胞の NM に対する感受性については何ら認むべき変化がなく、型質転換は生じないことを認めた。

5) NM 感受性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置した NM 抵抗性細胞の型質転換に対する態度について

NM 感受性細胞より抽出した DNA を以つて NM 抵抗性細胞を処理し、これに諸種濃度の NM を *in vitro* で作用させた後、この細胞へのラッセへの移植能を検索した。その結果は第13図で示す如くである。

第13図 NM 感受性吉田肉腫細胞より抽出した DNA を以つて処置せる抵抗性吉田肉腫に及ぼす NM の影響 (*in vitro-in vivo* 法による)

| NM M               | 動物番号 |     |     |     |     |     | 平均重量g   | 移植度%  |
|--------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-------|
|                    | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |         |       |
| 対照                 |      |     |     |     |     |     | 2.8     |       |
| 10 <sup>-4</sup>   |      |     |     |     |     |     | 移植2日目死亡 | 17    |
| 5×10 <sup>-4</sup> |      |     |     |     |     |     | 0.57    | 74    |
| 10 <sup>-3</sup>   |      |     |     |     | (-) | (-) | 0.08    | 96    |
| 5×10 <sup>-3</sup> |      |     | (-) | (-) | (-) | (-) | 0.02    | 99    |
| 10 <sup>-2</sup>   | (-)  | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 移植4日目死亡 | 0 100 |

1cm

即ち NM 10<sup>-4</sup>M の濃度を作用させた場合、腫瘍の発生は対照と大差なく薬剤の効果が認められないが、

5×10<sup>-4</sup>M 以上の濃度においては腫瘍の発育は著明に抑制され、10<sup>-2</sup>M の濃度に至ると全く腫瘍の発育は認められず移植能は失なわれた。

一方 NM 感受性細胞より抽出した DNA 未処置の NM 抵抗性細胞についても同様の検索を行なつたところ、やはり NM 5×10<sup>-4</sup>M 以上の濃度で作用させると著明な腫瘍の発育抑制が認められた。(第14図)、即ち感受性 DNA を以つて処置した NM 抵抗性細胞と処置しない NM 抵抗性細胞の間には NM に対する感受性について差異がないものと思われる。従つて NM 抵抗性細胞に感受性細胞より抽出した DNA を以つて処置しても型質転換現象が全く起らないといひ得る。

第14図 NM 抵抗性吉田肉腫に及ぼす NM の影響 (*in vitro-in vivo* 法による)

| NM M               | 動物番号 |     |     |     |     |     | 平均重量g   | 移植度%    |
|--------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|---------|
|                    | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   |         |         |
| 対照                 |      |     |     |     |     |     | 2.13    |         |
| 10 <sup>-4</sup>   |      |     |     |     |     |     | 1.62    | 24      |
| 5×10 <sup>-4</sup> |      |     |     |     |     | (-) | 0.55    | 75      |
| 10 <sup>-3</sup>   |      |     |     |     | (-) | (-) | 0.05    | 98      |
| 5×10 <sup>-3</sup> |      | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 移植5日目死亡 | 0.02 99 |
| 10 <sup>-2</sup>   | (-)  | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | 0       | 100     |

IV. 総括及び考按

細胞分裂の頻度と標識した核酸前駆物質の DNA への転入の量とが比例し<sup>34)35)</sup>、かつ細胞核の DNA 含量は染色体数と密接な関連を有していることなどから<sup>36)</sup>、DNA は生活細胞の遺伝的要素に重要な役割を演じていることが推定されている。DNA が細胞の遺伝に重要な役割を演じていると考えられる根拠は主として細菌等の型質転換因子の研究結果<sup>20)37)~39)</sup>に基づくものである。即ち1928年に Griffith<sup>16)</sup> は肺炎双球菌のうち Capsel を持たない生菌と、Capsel を持つⅢ型の死菌とを混合してマウスの生体に注入し一定時間後マウスから取り出されたものは、生きている有毒なⅢ型の Capsel を持つ肺炎菌であることを認めた。

更に 1944年 Mc Carty<sup>17)</sup> は、この肺炎菌Ⅲ型より取り出した DNA をカプセルを持たない細菌と共に培養液中に加えると完全にカプセルを持つⅢ型に変化することから型質転換に必要な要素は DNA であることを明らかにした。このような型質転換は、肺炎双球菌の莢膜の変化だけにとどまらず、Colony の形態<sup>40)</sup>、酵素<sup>41)</sup>及び抗原の性状<sup>42)</sup>などについても起ることが証明されている。また薬剤耐性に関する型質転換に関する研究は、肺炎双球菌の Penicillin<sup>43)</sup>、Streptomycin<sup>44)</sup>、及び Sulphonylamide 耐性菌及び Haemophilus influenzae の Streptomycin 耐性菌<sup>45)</sup>、結核菌の Streptomycin 耐性菌等<sup>46)</sup>についてなされている。かかる研究を契機として腫瘍細胞の型質転換については、吉田肉腫の Alanin-NM 及び Mitomycin 抵抗性株を対象とする研究報告が最近行なわれている<sup>28)47)</sup>。

著者は NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞より Mirsky-Pollister の方法で Deoxyribose 核蛋白を抽出し Kay, Simmons, Dounce の方法にて Duponol を用いて除蛋白し、それぞれ DNA を分離し、これらの DNA を用いて型質転換に関する実験を行なった。これらの DNA は何れも Diphenylaminae 反応陽性で紫外部吸収曲線は典型的な核酸の Spectrum を呈した。この 2種の DNA を以つてそれぞれ NM 感受性及び NM 抵抗性細胞を処置した結果、型質転換の成立を認め得たのは第 5 表に示す如く、抵抗性細胞より

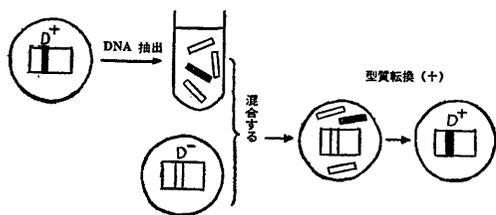
第 5 表 DNA の種類による型質転換成立の有無

| 実験  | DNAの種類 | 細胞の種類 | 型質転換の成否 |
|-----|--------|-------|---------|
| I   | 抵抗性    | 感受性   | 成功      |
| II  | 感受性    | 感受性   | 不成功     |
| III | 感受性    | 抵抗性   | 不成功     |

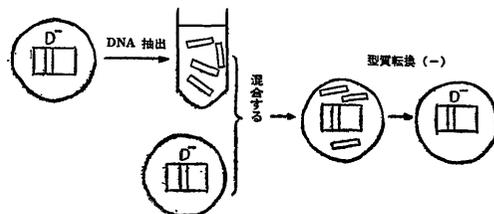
抽出せる DNA を以つて感受性細胞を処置した場合のみであつた。更にこれを模式化して表わすと第 15 図の如くなる。即ち第 I 実験は抵抗性細胞より抽出した DNA のうち特殊な遺伝子を有する DNA の一分子は

第 15 図 型質転換現象の模式図

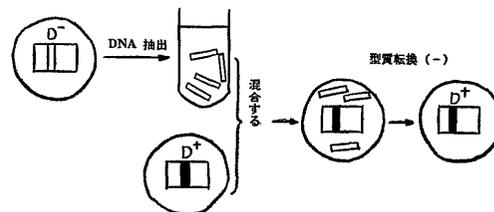
(1) 抵抗性 DNA + 感受性細胞



(2) 感受性 DNA + 感受性細胞



(3) 感受性 DNA + 抵抗性細胞



感受性細胞の DNA の構成中にとり入れられ、その結果その細胞は新しい型質を表現してくることを暗示し、第 II 実験はこの特殊な遺伝子を含有する DNA 分子が存在しない限り型質転換が起らないことを意味し、第 III 実験はこの特殊な遺伝子が DNA 中に構成されると、たとえ感受性細胞より抽出した DNA を作用せしめてもその DNA の構成は安定であつて攪乱されないことを示している。Sinai<sup>48)</sup> は大腸菌の Proflavine 耐性に関する型質転換現象の実験において、薬剤耐性菌より抽出した核酸分画によると型質転換の現象が起るが、薬剤感受性菌から得た核酸によつては起らないと述べているが著者の第 II 実験と一致した成績である。しかしこの 2種の DNA が、細胞 1 個当りに含まれる量は、ほぼ同程度であり、更に紫外部吸収曲線においても、著明な差異は認められない。

さてこの型質転換によつて新に生ずる耐性の程度をみると次の如くである。本来の NM 抵抗性株は連日注射可能な NM の 0.65mg/kg を担瘤ラツテに投与しても腫瘍に対して全く効果を認めないが、NM 抵抗性細胞から抽出した DNA を感受性細胞に作用させて獲得された NM 耐性の程度を、腹水腫瘍細胞数及び有糸核分裂数の変化、皮下腫瘍の発育及びその組織学的所見などから制定すると、NM 0.2mg/kg 以下の投与により効果を認めず、完全耐性を意味し、0.5mg/kg の投与により多少の効果を認め、不完全耐性を意味し、0.65mg/kg 投与によつてかなりの効果を認める。即ち抵抗性 DNA の処理により得られた耐性は DNA の抽出源である本来の抵抗性株の耐性のほぼ 1/8 以下に相当する。Alexander<sup>49)</sup> 及び Hotchikiss<sup>44)</sup> は Stre-

ptomycin に耐性を有する *Haemophilus influenzae* 及び肺炎菌より抽出した DNA の附加培養によつて、感受性株に生ずる耐性の程度は、DNA を抽出した菌と同様の耐性を有していることを報告している。しかし Penicillin 耐性肺炎双球菌より抽出した DNA によつて得られた耐性の程度は、この元の耐性株のそれよりも、かなり低いことが指摘されている<sup>47)</sup>。日比野<sup>47)</sup>、栗田<sup>28)</sup>によると MC 及び Alanin-NM 抵抗性吉田肉腫細胞より抽出された DNA によつて感受性細胞が獲得する耐性の程度は、DNA を抽出した抵抗性細胞の 3/5~2/5 であるとされている。前述の如く型質転換の型を獲得された耐性の程度によつて分類すると、所謂 Streptomycin 型と Penicillin 型になるが、著者の実験の成績では Penicillin 型に属するものであると考えられる。

一方型質転換を惹起する NM 抵抗性株より抽出した DNA は、DNase の添加によつて、その活性を消失する。この酵素は DNA の Polynucleotides 鎖を Oligonucleotides の程度の大きさに分解するのであるから、型質転換の活性を有する DNA は高重合の DNA であるといひ得る。Fox<sup>49)</sup> は Streptomycin 抵抗性肺炎双球菌より抽出した DNA が同様 DNase の 40 $\gamma$ /ml, 37°C, 30分の作用によつて活性を失うことを認め、Lerman<sup>60)</sup> は 0.1mg/ml の量によつて DNA の生物学的活性を失うとし、Sinai<sup>48)</sup> は Proflavin 抵抗性大腸菌に関する型質転換時にも、同様な活性消失を認めている。斎藤<sup>51)</sup>は枯草菌の Marburg 株における型質転換の実験において、RNase を作用させても全然影響のないことを報告している。著者も DNA と RNA とが混在せる懸念を除くために RNase を作用させて実験を行なつたが、型質転換には RNA の関連性を認めなかつた。従つて RNA は型質転換因子より全く除外することが出来る。また型質転換要素は蛋白質分解酵素によつても活性を失わず、更にその要素の加水分解物中に含まれている唯一の Amino 酸は Adenine の分解で生ずる Glycin だけであるといわれている点<sup>52)</sup>などから型質転換に必要な要素は DNA であると考えて間違ひなからう。

しかし型質転換が成立するためには、一定濃度以上の DNA が必要であると考えられるが、著者の成績によると、細胞浮遊液中の DNA 濃度が、0.5mg/ml 以上であれば、型質転換の起り得ることが認められた。これを細胞 1 個当たりの DNA 量に換算すると、 $2.38 \times 10^{-6} \mu\text{g}$  となり、細胞 2 個分の DNA 量に相当する。このうち実際型質転換に必要な DNA 分画の量については、今後の研究に待たねばならないが、Beiser<sup>53)</sup>

は肺炎双球菌の型質転換能をもつ DNA を、FCTEOLA Chromatography で分画し、Streptomycin 耐性の型質転換の活性が、5 倍に高められる peak (分劃) を得たと報告している。Samenhof<sup>56)</sup>等は、*Haemophilus influenzae* の型特異性の型質転換は b 型及び c 型で DNA の量は異なり、それぞれ 0.0004 及び 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の低濃度で型質転換が成立し得ると述べ、勝沼等<sup>46)</sup>は、Streptomycin 耐性結核菌について DNA 量 10~1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を使用して型質転換実験を行ない、濃度が高くなるにつれて型質転換度が高く、即ち耐性菌の出現率が増加すると報告している。栗田<sup>28)</sup>は Alanin-NM 抵抗性吉田肉腫を使用せる型質転換の実験において型質転換を成立させるためには抵抗性 DNA 量 0.25mg/ml 以上が必要であると述べている。

更に著者は有効耐性 DNA 濃度において、その作用時間の型質転換に及ぼす影響を検索したところ、60分以上試験管内で、感受性細胞と耐性 DNA との Incubation を行なう必要があることを認めた。Alexander 等<sup>45)</sup>は *Haemophilus influenzae* の型特異性の型質転換は 5 分以内で発生するが、Streptomycin 抵抗性への型質転換には更に 1 時間以上培養する必要があることを報告している。栗田<sup>28)</sup>は吉田肉腫細胞を Alanin-NM 抵抗性へ型質転換させるには、1 時間以上の Incubation を要し、30分以内では型質転換は起らないと述べている。杉山<sup>54)</sup>は結核菌が Streptomycin 抵抗性菌の DNA によつて、抵抗性を獲得するのは、結核菌が DNA と 6 時間以上接触後、一度 Sauton agar 培地に接種され 1 代増殖して初めて認められ、単に接触しただけでは型質転換は起らないと報告している。著者の実験によれば、60分間以上試験管内で細胞と DNA とを incubate した後、それをそのままラットの腹腔内及び皮下に移植し 4~6 日目になつて NM を投与して型質転換の有無を検したのであるから、試験管内だけで型質転換が完成したかどうかについては言明出来ない。ただ試験管内での反応についていえることは、細胞と DNA がまず可逆的な吸着状態となり、次にこの細胞-DNA complex が徐々に不可逆的な結合状態に達するのに 30分間以下では不能で 60分間以上要するということである。もしこの状態で感受性細胞の耐性化即ち型質転換が完全に惹起されていないとしても、腫瘍細胞の生体移植後に初めてそれが発現する可能性が充分考えられる。それは移植された腫瘍細胞の代謝、分裂及び増殖等によつて腫瘍細胞内にとり入れられた DNA が型質転換を示す遺伝子として活性化することに基因するものと推定される。

Hotchkiss<sup>44)</sup>は肺炎双球菌の Streptomycin 抵抗性

への型質転換に牛血清 Albumin を加えた Neopeptone 培地を使用し、阿部<sup>55)</sup>は肺炎菌型質転換反応時に Glucose, 磷酸, Amino 酸混合物の必要性を述べている。このことは DNA の細胞内へのとり込みの促進ということだけでなく細胞染色体の一構成としてその特異な性質を發揮するのに DNA 以外の物質が必要であることを意味する。著者はこの点を考慮して試験管内 Incubation 時に、細胞を充分洗滌し腹水を全く除去した場合、型質転換の起り方に相異があるかどうかを試した。その結果腹水の存在しない場合、型質転換によつて得られる抵抗性の程度が、極めて低いことを認めた。

このことは核酸への P<sup>32</sup> incorporation が腹水の存在がない場合、著しく少なくないことを<sup>57)</sup>考え合せると、核酸代謝の低下によつて DNA の細胞へのとり込みが非常に減少するのみならず、同時にその DNA と細胞染色体の DNA との結合が充分行なわれないことに基づくものと思われる。

このように型質転換の成立は細胞自身の代謝の程度によつて強く左右されるが、この細胞の代謝に密接な関連性を有する温度が型質転換現象に如何なる影響を及ぼすかについて検索した著者の成績によると、20°C 以下の温度の下に、感受性細胞に耐性 DNA を処置した場合、NM 投与によつて60~70%の腫瘍の縮小を認め、30°C の温度の下に処置した場合44%腫瘍の発育が抑制され、この時耐性の程度は弱く、不完全耐性を意味した。37°C の温度の下に耐性 DNA と感受性細胞とを処置した場合は、NM 投与によつて腫瘍の発育は殆んど抑制されないうで完全耐性の発生を意味した。このことから型質転換のための至適温度は 37°C であると考えられる。著者の他の実験において、腫瘍細胞の呼吸解糖活性は 42°C まで温度の上昇に従つて亢進するが、核酸代謝が最も盛んとなる所謂至適温度が 37°C であることと一致するところである。型質転換反応と核酸代謝が何等かの関連性を有していることを示唆している。阿部等<sup>55)</sup>は肺炎菌の型質転換反応の至適温度は 37°C であるといひ、杉山等<sup>54)</sup>は結核菌の Streptomycin 抵抗性株に関する型質転換は 0°C では認められず、37°C で発生することを認め、Lerman<sup>50)</sup>は型質転換による Streptomycin 抵抗性肺炎双球菌の出現度は 32°C で最高で、それより温度の上昇または下降によつて減少することを報告している。

一方著者は型質転換によつて獲得した NM 抵抗性吉田肉腫細胞をラットの腹腔内に累代移植し、第4代にその抵抗性の程度を検索したところ、第1代と殆んど差異を認めず、安定で遺伝的であることを認めた。

このことは一般に腫瘍細胞に化学療法剤を投与して獲得される所謂薬剤抵抗性細胞の場合と同様である。また耐性 DNA によつて作製された抵抗性細胞と薬剤使用によつて発生したそれとは、生物学的性格は全く同一であるという報告<sup>54)</sup>もあるが、著者の成績によると、生存日数や腫瘍発育を指標とした生物学的性状は、多少異なることを認めた。これは耐性 DNA によつて獲得された抵抗性の程度が低いことに基因していると思われる。

さて以上の実験成績より推測されることは細胞の遺伝子の突然変異にしる、作用された DNA による遺伝子の構成の変換にしる、細胞内の遺伝物質 (DNA) の変化が、型質転換現象に重要な影響を与えているということである。このことは Streptomycin 抵抗性肺炎菌の P<sup>32</sup>で labell された DNA によつて処置された感受性細胞の DNA の中に P<sup>32</sup> が存在し、かつこの P<sup>32</sup> incorporation は抵抗性菌の発現度と全く平行関係にある点<sup>50)</sup>からも推定に難くない。

しかしこの DNA 変化がどのような過程または機構で細胞全体に遺伝的な情報の伝達を行ない、細胞の型質を表現するのかは今後の研究に待たねばならない。

## V. 結 論

NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞を使用して、型質転換に関する実験を行ない、次の如き結論を得た。

- 1) NM 感受性及び抵抗性吉田肉腫細胞よりの抽出物は両者共 Diphenylamine 反応陽性で 260m $\mu$  に最大紫外部吸収度を有し、明らかに DNA であり、両者の間に単位細胞当りの抽出量及びその性状の著明な差異はない。
- 2) NM 感受性及び抵抗性細胞より抽出した DNA を以つて、それぞれ抵抗性及び感受性細胞を処置した後、ラッテに移植した場合生存日数、腹水腫瘍細胞数及び有糸核分裂細胞数の変化及び皮下腫瘍の発育には、未処置の細胞を移植した場合と比べて著明な差異がない。
- 3) NM 抵抗性細胞より抽出した DNA と感受性細胞とを混合し Incubation すると、この腫瘍細胞は 0.5mg/kg に不完全耐性を、0.2mg/kg に完全耐性を獲得し、その耐性の程度は本来の NM 抵抗性株のその 1/2 以下である。
- 4) この型質転換に必要な条件として腫瘍細胞と共存する腹水のあることである。またその時使用する抵抗性 DNA 濃度 0.5mg/ml (細胞1個当りの DNA 量  $2.38 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ ) 以上であること、Incubation の時間は60分以上であること、この際の至適温度 37°C であ

ることである。

5) 累代移植 (第4代) を行なつても型質転換によつて獲得された抵抗性の程度は不変で、遺伝的である。

6) NM 感受性細胞より抽出した DNA と感受性細胞を混合し Incubation しても型質転換の現象は起らない。

7) NM 感受性細胞より抽出した DNA と NM 抵抗性細胞とを混合し、Incubation しても NM 抵抗性細胞の抵抗性の程度に全く変化を認めず、NM によつて獲得された抵抗性は非可逆的である。

執筆するに当たり、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜つた恩師ト部美代志教授に対して、衷心より感謝の意を捧げると共に、生化学教室及び当教室の諸先生の御援助に対して厚く感謝いたします。

### 文 献

- 1) Sugiura, K. & Stock, C. C. : *Cancer*, **5**, 382 (1952).
- 2) Sugiura, K. : *Cancer Res.*, **15**, 38 (1955).
- 3) Burchenal, J. H. : *Science*, **111**, 116 (1950).
- 4) Law, L. W. : *Nature*, **169**, 628 (1952).
- 5) Law, L. W. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **60**, 244 (1954).
- 6) Hirono, I. : *Nagoya J. Med. sci.*, **17**, 102 (1954).
- 7) 齋藤照智 : *Gann*, **47**, 347 (1956).
- 8) Law, L. W. : *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **84**, 409 (1953).
- 9) 近藤達平・山内 弘・丸山哲郎・中里博昭 : *日外会誌*, **57**, 786 (1956).
- 10) 白淵勇・大星章一 : *Chemotherapy*, **6**, 378 (1958).
- 11) Nichol, C. A. : *J. Biol. Chem.*, **207**, 725 (1954).
- 12) Broquist, H. P. & Kohler, A. R. : *J. Biol. Chem.*, **202**, 59 (1953).
- 13) Hutchison, R. D. : *Proc. Amer. Ass. Cancer Res.*, **1**, 26 (1953).
- 14) 半田司郎・高橋康之助 : *Chemotherapy*, **1**, 62 (1953).
- 15) Wheeler, O. : *Third National Cancer Conf. Proc.*, p. 421 (1956).
- 16) Griffith, F. : *J. Hyg. (London)*, **27**, 113 (1928).
- 17) Mc Carty, M. : *J. Exper. Med.*, **78**, 137 (1944).
- 18) Mc Carty, M. : *J. Exper. Med.*, **83**, 89 (1946).
- 19) Alexander, H. E. : *J. Exper. Med.*, **93**, 345 (1951).
- 20) Boivin, A. : *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **12**, 7 (1947).
- 21) Alexander, H. E. & Redman, W. : *J. Exper. Med.*, **97**, 797 (1953).
- 22) Benoit, J. : *Compt. Reud.*, **244**, 2321 (1957).
- 23) Leuchtenberger, C. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 700 (1958).
- 24) Perry, J. L. : *Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y.*, **99**, 719 (1958).
- 25) Kirby, K. S. : *Exper. Cell Res.*, **17**, 547 (1959).
- 26) Honigberg, B. M. : *Science*, **131**, 352 (1960).
- 27) 猪木正三 : *Biken's Journal*, **3**, 101 (1960).
- 28) 栗田宗次 : *名医学*, **81**, 1156 (1960).
- 29) 栗田宗次・竹村知多男・星野 章・木村喜代次 : *Gann*, **49**, suppl. 66 (1958).
- 30) 吉田富三・佐藤博・今井 弘子・森脇 絢子・今村 博・桜井 欽夫・石館守之 : *Gann*, **50**, suppl. 18 (1959).
- 31) Mirsky, A. E. & Pollister, A. W. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **28**, 344 (1942).
- 32) Kay, E. R. M., Simmons, N. S. & Dounce, A. L. : *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1924 (1952).
- 33) Dische, Z. : *Mikrochemie*, **8**, 4 (1934).
- 34) Hevesy, G. & Ottesen, J. : *Acta physiol. Scand.*, **10**, 257 (1945).
- 35) Smellie, R. M. S., Humphrey, G. F., Kay, E. R. M. & Davidson, J. N. : *Biochem. J.*, **60**, 177 (1955).
- 36) Richards, B. M., Walker, P. B. M. & Deeley, E. M. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **63**, 931 (1956).
- 37) Hotchkiss, R. D. : *Harvey Lectures*, **49**, 124 (1955).
- 38) Brown, G. L. & Watson, M. : *Nature*, **172**, 339 (1953).
- 39) Ephrussi-Taylor, H. : *Exper. Cell Res.*, **2**, 589 (1951).
- 40) Ephrussi-Taylor, H. : *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **16**, 445 (1951).
- 41) Hotchkiss, R. D. & Marmur, J. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **40**, 55 (1954).
- 42) Ephrussi-Taylor, H. : *J. Exper. Med.*, **89**, 399 (1949).
- 43) Hotchkiss, R. D. : *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.*, **16**, 457 (1961).
- 44) Hotchkiss, R. D. : *Proc. nat Acad. Sci., U. S.*, **40**, 49 (1954).
- 45) Alexander, H. E. & Leidy, G. : *J. Exper. Med.*, **97**, 17 (1953).
- 46) 勝沼信彦・中里博昭 : *結核*, **29**, 19 (1954).
- 47) 日比野進・木村喜代次・太田和雄 : 第1回マイトマイシン研究報告, No. 13, 1960.
- 48) Sinai, S. & Yudkin, J. : *J. Gen. Microbiol., (London)*, **20**, 400 (1959).
- 49) Fox, M. S. : *Biochem. Biophysica Acta, N. Y.*, **26**, 83 (1957).

- 50) Lerman, L. S. & Tolmach, L. J. : Biochem. Biophysica Acta, N. Y., : 26, 68 (1957).  
 51) 斎藤日向・小橋山政経 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 5, 58 (1960).  
 52) Davidson, J. N. : The Biochemistry of the Nucleic Acids, 第1版, 225頁, 東京共立出版, 1959.  
 53) Beiser, B. & Pohl, H. : Biochem, biophysica Acta, 34, 497 (1959).  
 54) 杉山正雄・田中伸一 : 結核, 29, 445 (1954).  
 55) 阿部美穂子・水野伝一 : 蛋白質, 核酸, 酵素, 5, 59 (1960).  
 56) Samenhof, S., Leidy, G. & Alexander, H. E. : Arch. Biochem. Biophys., 40, 50 (1952).  
 57) 片山 寿 : 日新医学, 45, 708 (1958).

## Abstract

In order to clarify the mechanism of the occurrence of resistance in the tumor cells to the drug, the author performed the experimental studies on the transformation of the sensitive cells into the resistant ones using the nitrogen mustard sensitive and resistant Yoshida sarcoma. The results obtained were as follow:

1) The extracts from both nitrogen mustard sensitive and resistant Yoshida sarcoma cells showed a positive diphenylamine reaction, having the largest absorption in the ultraviolet region in  $260m\mu$ , which represents the definite pattern of DNA.

2) After DNA derived from the nitrogen mustard sensitive or resistant cells was given to contact with the nitrogen mustard resistant or sensitive cells, these cells were transplanted into the rats. On this occasion, there were no remarkable differences in the survival days of the tumor-bearing rats, the number of ascitic cells, and that of mitotic cells, and the growth of the transplanted subcutaneous nodule in comparison with those of the rats transplanted with untreated cells.

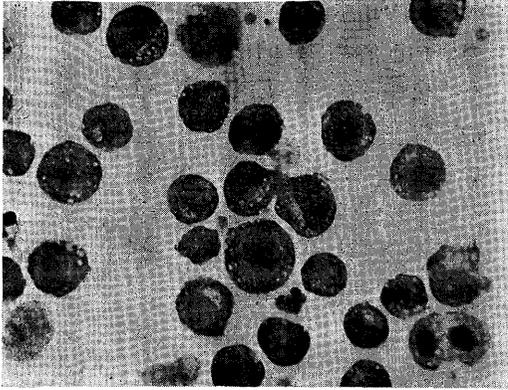
3) When DNA derived from nitrogen mustard resistant cells was given to contact with the sensitive cells and was incubated, the latter tumor cells obtained an incomplete resistance to 0.5 mg/kg of nitrogen mustard and a complete resistance to 0.2 mg/kg of nitrogen mustard. The degree of the resistance was below one third of that of the primary nitrogen mustard resistant strain.

4) As the important factors of this transformation, it is necessary that ascites coexists with the tumor cells at the incubation. Furthermore, it is necessary that the resistant DNA has contact with the sensitive cells in concentration more than 0.5 mg/ml (DNA amount corresponding to one cell was  $2.38 \times 10^{-5} \mu\text{g}$ ) : incubation time was more than 60 minutes : the optimal temperature was  $37^\circ\text{C}$  at the incubation.

5) Even by the transplantation of successive generations (the fourth generation), the degree of resistance obtained by the transformation was invariable and inheritable.

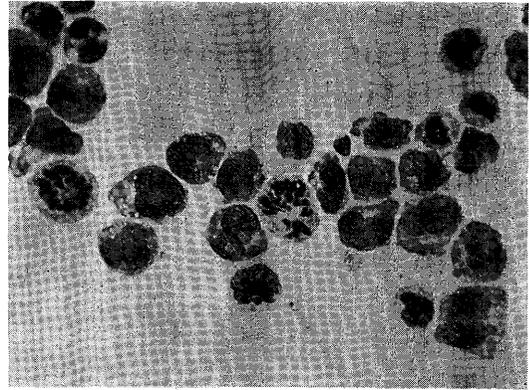
6) When DNA derived from the nitrogen mustard sensitive cells was intermingled with the sensitive cells and was incubated, there occurred no transformation.

7) When DNA derived from the nitrogen mustard sensitive cells was intermingled with the nitrogen mustard resistant cells and was incubated, there occurred no changes in the degree of the resistance of the nitrogen mustard resistant cells and the resistance obtained, was irreversible.



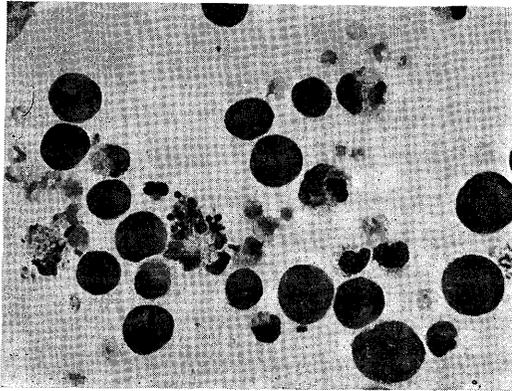
第16図 対照群(NM感受性細胞) 正常有糸核分裂像を認む。

Giemsa 染色 × 690



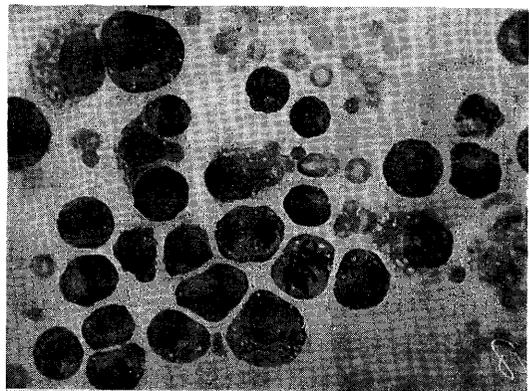
第17図 NM抵抗性細胞より抽出したDNAを以つて処置せる群(感受性細胞)正常分裂像を認める。

Giemsa 染色 × 690

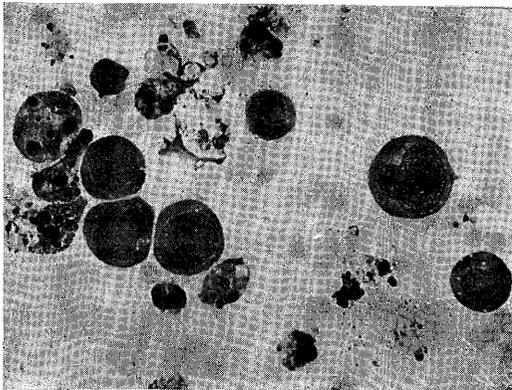


第18図 対照群(NM感受性細胞)NM0.2mg/kg投与。細胞の崩壊、油滴状核等を認める。

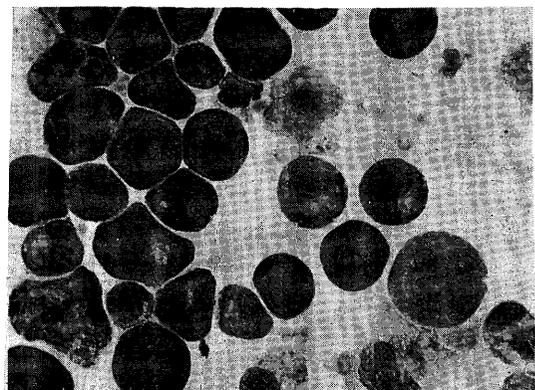
Giemsa 染色 × 690



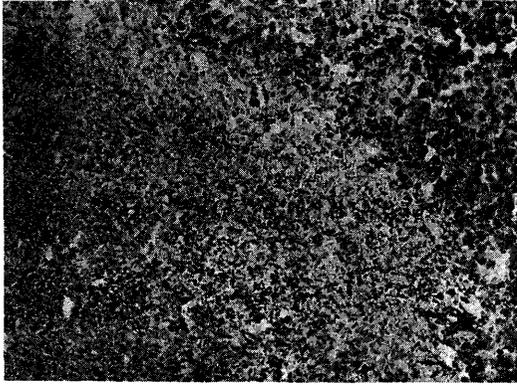
第19図 NM抵抗性細胞より抽出したDNAを以つて処置せる群。0.2mg/kg投与。正常有糸核分裂像を認める。Giemsa 染色 × 690



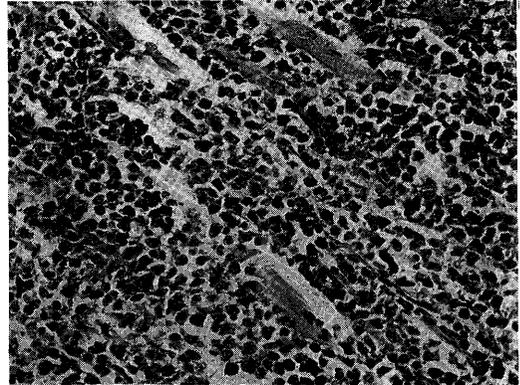
第20図 対照群(NMの感受性細胞) NM0.5mg/kg投与。細胞の崩壊が著しく油滴状核を多数にみる。Giemsa 染色 × 690



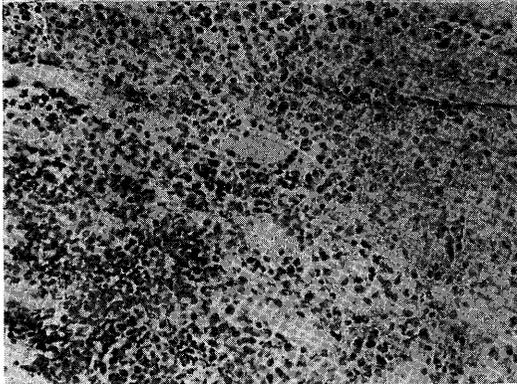
第21図 NM抵抗性細胞より抽出した DNA を以つて処置せる群。(感受性細胞) 0.5mg/kg投与。油滴状核、細胞の膨化等を中等度に認める。Giemsa 染色 × 690



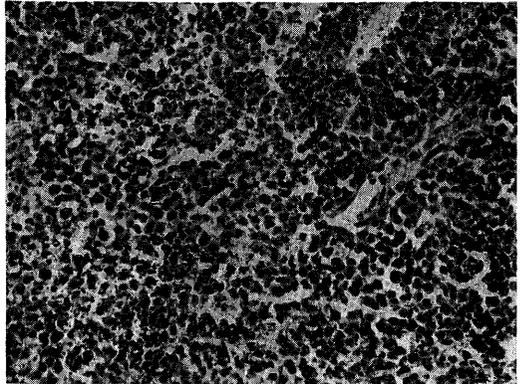
第22図 対照群(NM感受性細胞)  
NM 0.2mg/kg 投与. 腫瘍組織の壊死, 崩壊を認め, 小円形細胞の浸潤を伴う.  
H.E. 染色 × 300



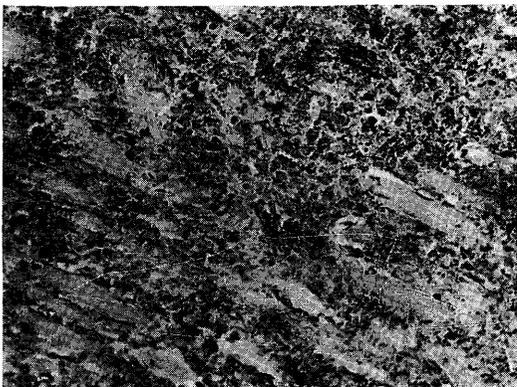
第23図 NM抵抗性細胞より抽出したDNAを以つて処置せる群.(感受性細胞) NM 0.2mg/kg投与. 腫瘍細胞の浸潤性増殖が著しく, 変性像を認めず. H.E. 染色 × 300



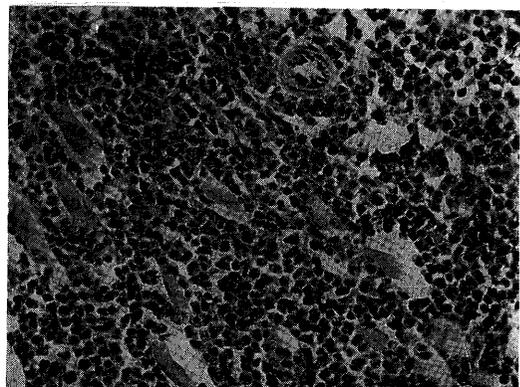
第24図 NM抵抗性細胞より抽出した DNA0.1 mg/mlを以つて処置せる群.(感受性細胞) NM 0.2mg/kg 投与. 腫瘍細胞の鬆疎化, 被染色性の低下を認める. H.E. 染色 × 300



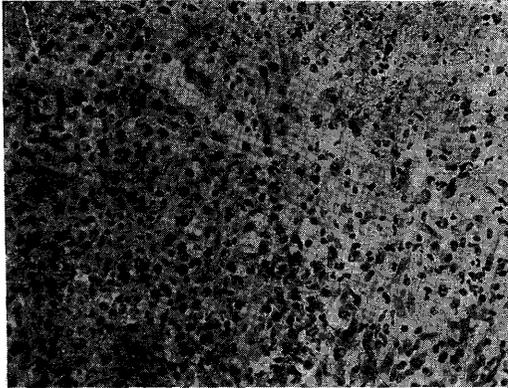
第25図 NM抵抗性細胞より抽出した DNA0.5 mg/mlを以つて処置せる群.(感受性細胞) NM 0.2mg/kg 投与. 腫瘍細胞は密集し, 変性像は全く認められない. H.E. 染色 × 300



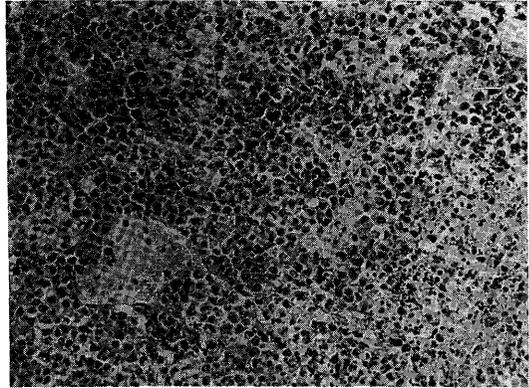
第26図 DNaseを作用したNM抵抗性細胞抽出DNAを以つて処置した群.(感受性細胞) NM0.2 mg/kg 投与. 腫瘍細胞の崩壊, 膨化, 被染色性の低下を認める. H.E. 染色 × 300



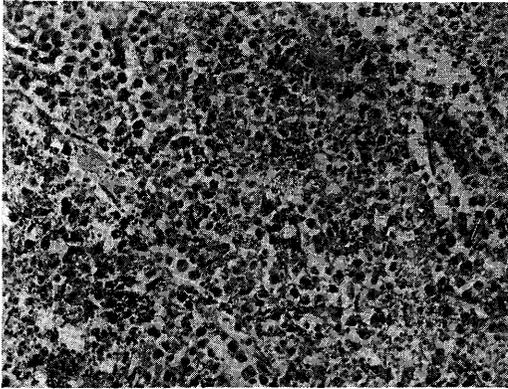
第27図 RNaseを作用したNM抵抗性細胞抽出DNAを以つて処置した群.(感受性細胞) NM0.2 mg/kg 投与. 腫瘍細胞の増加が旺盛で, 変性像を認めず. H.E. 染色 × 300



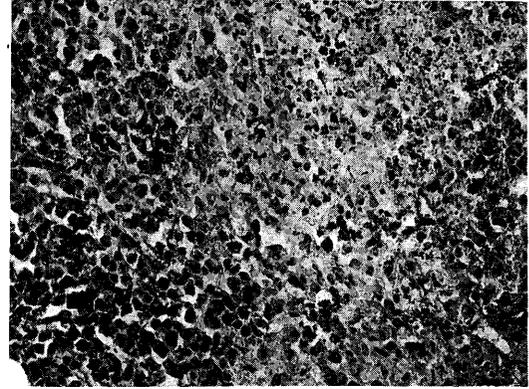
第28図 30分間、NM抵抗性細胞より抽出したDNAを以つて処置せる群。(感受性細胞) NM0.2 mg/kg 投与。細胞の膨化と共に腫瘍組織の崩壊、壊死像を認める。H.E. 染色 × 300



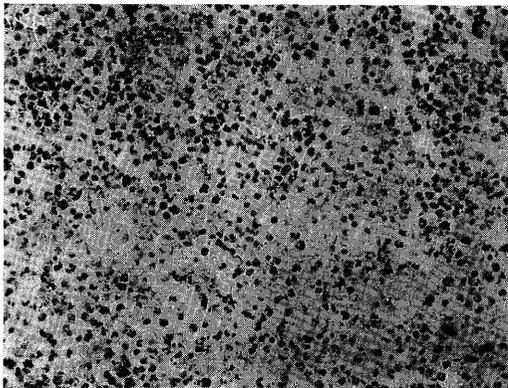
第29図 60分間、NM抵抗性細胞より抽出したDNAを以つて処置せる群。(感受性細胞) NM0.2 mg/kg 投与。腫瘍細胞の変性像ほとんど認めず。H.E. 染色 × 300



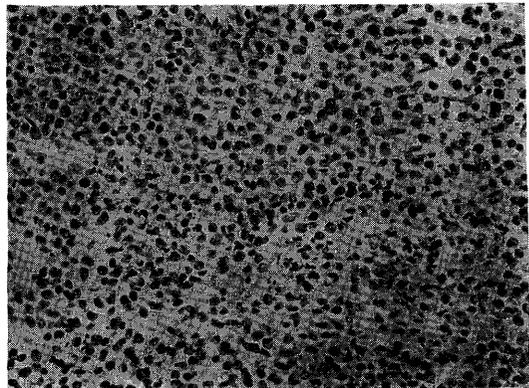
第30図 10°Cにて NM抵抗性細胞抽出 DNAを以つて処置せる群。(感受性細胞) NM0.2mg/kg 投与。腫瘍性細胞の鬆疎化、崩壊、小円形細胞の浸潤等を認める。H.E. 染色 × 300



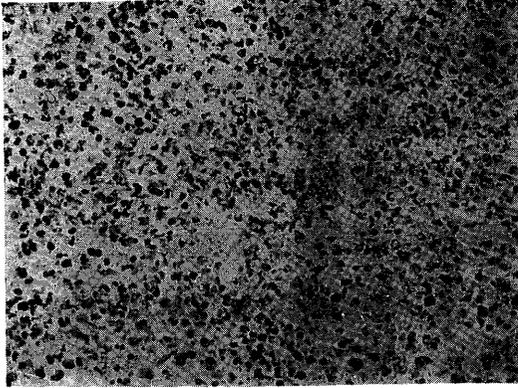
第31図 30°Cにて NM抵抗性細胞抽出 DNAを以つて処置せる群。(感受性細胞) NM0.2mg/kg 投与。腫瘍組織の壊死巣と、増殖巣の交錯する像を認める。H.E. 染色 × 300



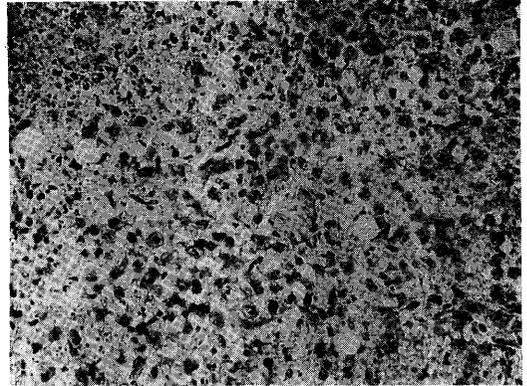
第32図 腹水無添加でNM抵抗性細胞抽出DNAを以つて処置せる群。(感受性細胞) NM0.2mg/kg 投与。腫瘍細胞の減少、崩壊像を認める。H.E. 染色 × 300



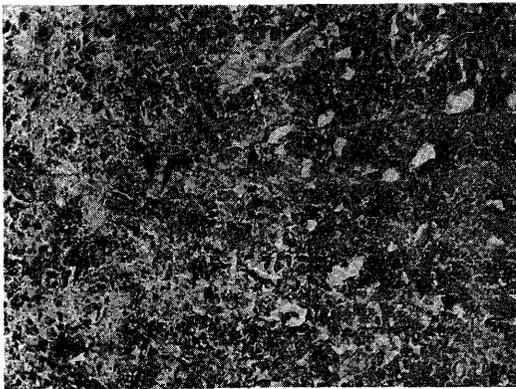
第33図 腹水添加で NM抵抗性細胞抽出 DNAを以つて処置せる群。(感受性細胞) NM0.2mg/kg 投与。腫瘍細胞の変性なく、分裂像を散見する。H.E. 染色 × 300



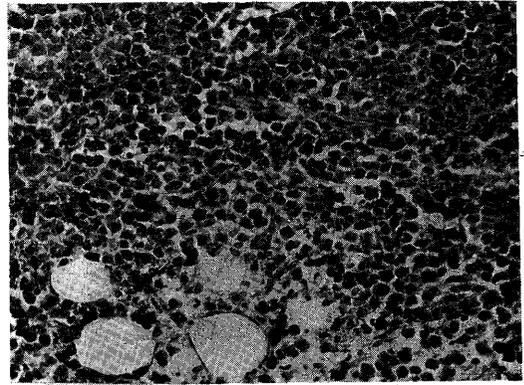
第34図 対照群(NM感受性細胞)  
NM 0.2mg/kg 投与. 腫瘍細胞の崩壊, 減少が著明である.  
H.E. 染色 × 300



第35図 NM感受性細胞より抽出したDNAを以つて処置せる群. (NM感受性細胞)NM0.2mg/kg 投与. 腫瘍細胞の崩壊, 膨化と共に基質の増加が認められる. H.E. 染色 × 300



第36図 型質転換第4代細胞に NM0.65mg/kg 投与した群. 腫瘍細胞の崩壊, 消失が著明に認められる.  
H.E. 染色 × 300



第37図 型質転換第4代細胞に NM0.2mg/kg 投与した群. 腫瘍細胞の増殖著明で, 変性像は認めない.  
H.E. 染色 × 300