

## 核酸と蛋白の生合成に対する抑制効果を指標とする 制癌剤感受性試験の基礎的研究

貴 島 幸 彦

大阪大学医学部外科学第二教室 (主任 陣内傳之助教授)

(昭和 41 年 6 月 10 日受付)

臨床的に経験する悪性腫瘍の制癌剤に対する感受性の度あいは、個々の症例によつてかなり差異があり、たとえ腫瘍の組織学的所見が同じ構造であつても、制癌剤に対する感受性はまちまちであることがよく知られている。今日一般には、制癌剤を使用して一定期間を経た後にはじめて、その臨床的效果の上から、その制癌剤がその腫瘍に適合していたか否かを知るのが現状である。そこで腫瘍の制癌剤に対する感受性の有無をあらかじめ知ることによつて、これまでのような盲目的使用をあらため、最も有効な薬剤を個々の悪性腫瘍患者に投与して適確な臨床的治療効果をあげるとともに、非適合制癌剤の投与によつてもたらされる副作用を避けるようにすることがもつとも大切なことである。

数年前から制癌剤感受性試験として、腫瘍組織の dehydrogenase 活性に対する制癌剤の影響を指標とする方法<sup>1,2,3)</sup>が考案されているが、しかしその成績は一応の参考とされている程度にすぎない。なぜならばこの方法における制癌剤の作用濃度は、臨床投与の場合の体重あたりに換算した濃度、あるいは、血中濃度等にくらべて、かけ離れて高い濃度である。そこで私は、現在用いられている制癌剤のほとんどが、核酸・蛋白の生合成に対し直接の侵襲点を有していると考えられることに着目して、腫瘍組織の合成系に対する薬剤の抑制効果を指標とする新しい制癌剤感受性試験の考案を企て、以下にのべるような基礎的研究を行なつた。

### 材 料

#### 1. 腫瘍細胞および腫瘍組織

ラット腹水肝癌 AH 13, AH 13 R, AH 130 および AH 7974 細胞を、生後約 6 週間、体重約 100 g の雄のドンリュウラットに移植して、4 または 5 日後に採取し、遠沈洗浄したものを用いた。また、これら腹水肝癌細胞を同じくドンリュウラットの背部皮下に移植して得られた結節腫瘍を用いた。

#### 2. 制 癌 剤

Nitromin (nitrogen mustard N-oxide, HN<sub>2</sub>-O) は吉富製薬より、mitomycin C (MMC) は協和発酵より提供されたそれぞれの注射薬を用いた。

#### 3. 放射性前駆物質

放射性同位元素協会より購入した leucine-C<sup>14</sup> (170 mc/mM) および formate-C<sup>14</sup> (13.2 mc/mM) を、生理的食塩水で必要な濃度に稀釈して用いた。

#### 4. 培 養 液

牛血清は阪大微生物病研究会より購入し、56°C で 30 分間 incubate して非働化した。TC 199 は千葉県血清研究所製のものを用いた。

### 方 法

#### 1. 蛋白合成抑制に関する実験

Warburg フラスコの主室に、腹水肝癌細胞  $3 \times 10^7$  コを浮遊させた 0.1% glucose Krebs-Ringer 磷酸緩衝液 1.7 cc, 非働化牛血清 0.3 ml, これに生理的食塩水に溶解した各濃度の薬剤溶液 0.5 ml を加え、37.5°C で 4 時間振盪作用させた後、側室より leucine-C<sup>14</sup> 溶液 0.5 ml (0.3  $\mu$ c) を添加し、さらに 1 時間 incubate した。細胞を集め、SCHNEIDER の方法<sup>4)</sup>に従つて、酸可溶性分画・脂質・核酸分画を除き、得られた蛋白分画を acetone powder とし、25% ethanol 溶液に混和し、0.5 cc ずつ試料皿に分割し、赤外線ランプで乾燥させ、無限薄で、gas flow counter (Nuclear Chicago) により放射活性を測定した。一方、micro-Kjeldahl 法<sup>5)</sup>により窒素量を測定し、specific activity を算出した。

#### 2. RNA, DNA および蛋白合成抑制に関する実験

Medium として 0.1% glucose Krebs-Ringer 磷酸緩衝液 (0.3 cc の非働化牛血清のあとで加える)、または TC 199 (非働化牛血清を 20% の割合で混ぜたもの) を用い、これに被検材料として腹水肝癌細胞  $3 \times 10^7$  コ、または結節腫瘍切片 200 mg (Stadie-Riggs の slicer により厚さ 500  $\mu$  の外観上全く均一な組織切片を作つた) を浮遊させ、medium に被検材料を加えた量を 2.0 ml として、Warburg フラスコの主室内に入れた。これに生理的食塩水に溶解した各濃度の薬剤溶液 0.5 ml を加え、37.5°C で 4 時間振盪作用させた後、側室より formate-C<sup>14</sup> 液 0.5 ml (1.5  $\mu$ c) を添加し、さらに 1 時間 incubate した。被検材料をとり出し、SCHMIDT-THANNHAUSER 法<sup>6)</sup>により RNA・DNA・蛋白の各分画を得た。RNA・DNA 各溶液 0.5 ml ずつを試料皿に入れ、赤外線ランプで乾燥させ、無限薄で、gas flow counter (Nuclear

Chicago) により放射活性を測定した。RNA は orcinol により, DNA は diphenylamine により発色させ, 日立分光光度計 (EPU-2 A 型) で定量した。また蛋白分画の放射活性および窒素量は 1. と同じ方法で測定し, RNA・DNA・蛋白それぞれについて, specific activity を算出した。

### 3. 腹水肝癌移植ラットに対する制癌剤の効果に関する実験

#### a) 腹水肝癌腹水型腫瘍

腹水肝癌細胞  $5 \times 10^6$  コを, 約 100 g の雄のドンリュールラットの腹腔内に注入し, 3日後に  $\text{HN}_2\text{-O}$  溶液 40 mg/kg 体重, または MMC 溶液 1.5 mg/kg 体重を腹腔内に注入した (それぞれを生理的食塩水に溶かし, 濃度は  $\text{HN}_2\text{-O}$  4 mg/ml, MMC 0.15 mg/ml とした。投与量はいずれも  $\text{LD}_{50}$  の半分量である)。対照群には生理的食塩水 10 ml/kg 体重を注入した。各群を 10 匹ずつとして, その後の経過を追って各ラットの生存日数をしらべた。

#### b) 腹水肝癌結節腫瘍

腹水肝癌細胞  $1 \times 10^7$  コをラット背部皮下に移植し, 7日後に, 形成した腫瘍結節の長径および短径を計測し, 同時に a) の場合と同量の  $\text{HN}_2\text{-O}$ , MMC または

生理的食塩水を腹腔内に注入した。各群を 10 匹ずつとし, 制癌剤注入後 3日目および8日目に結節の長径および短径を計測した。

## 結果

### 1. 蛋白合成に対する制癌剤の影響

基礎実験として, AH 130 浮遊細胞を用いて, 0.1% glucose Krebs-Ringer 磷酸緩衝液と牛血清とを混じた medium における leucine- $\text{C}^{14}$  の蛋白へのとりこみをみたところ, 対照では図 1 実線に示すように, incubation 開始後 30分, 1時間, 2時間および4時間後に leucine- $\text{C}^{14}$  を添加し, さらに1時間 incubate した場合, それぞれに差がなく, 全く時間的経過による減衰をみない。ところが AH 130 浮遊細胞に終濃度 8 mcg/ml の  $\text{HN}_2\text{-O}$  を作用させた場合には, 図 1 点線に示すように, 1時間の作用後では leucine- $\text{C}^{14}$  のとりこみに影響がみられないが, 2時間の作用後では軽度, 4時間の作用後では著明なとりこみの抑制をみる事ができた。このように, leucine- $\text{C}^{14}$  の蛋白へのとりこみに対する抑制効果を明確にみるには, 4時間の薬剤作用の後に leucine- $\text{C}^{14}$  を添加することが適当であることを知ったので, 以後の実験をこの方法で行なった。図 2 は, AH 13, AH 13R, AH 130, AH 7974 の浮遊細胞それぞれについて, 各濃

度の  $\text{NH}_2\text{-O}$  を4時間作用させた後の, leucine- $\text{C}^{14}$  の蛋白へのとりこみを示したものである。すなわち, AH 13, AH 130 では, 終濃度 8 mcg/ml で著明な抑制がみられるが, AH 13R, AH 7974 では 8 mcg/ml で全く抑制がみられず, 40 mcg/ml, 200 mcg/ml で軽度の抑制がみられるのみであった。

次に, MMC による各種腹水肝癌細胞の蛋白合成に対する影響を, これと同じ方法で検索したが, AH 13, AH 130 浮遊細胞についても終濃度 25 mcg/ml で抑制効果が全くみられなかったため, MMC の腹水肝癌細胞に対する *in vitro* での影響は次に述べる方法により検索することとした。

### 2. RNA, DNA および蛋白合成に対する制癌剤の影響

RNA・DNA・蛋白への formate- $\text{C}^{14}$  のとりこみに対する制癌剤の抑制効果を指標とする方法は, medium として 0.1% glucose Krebs-Ringer 磷酸緩衝液と牛血清とを混じたもので一応その目的を達することができる。しかしこの medium

図1 AH130浮遊細胞の蛋白合成に対するNitrominの経時的抑制効果

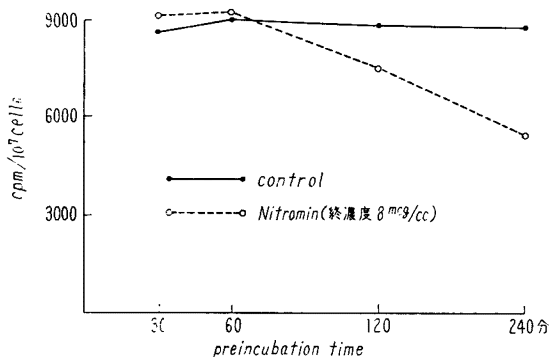
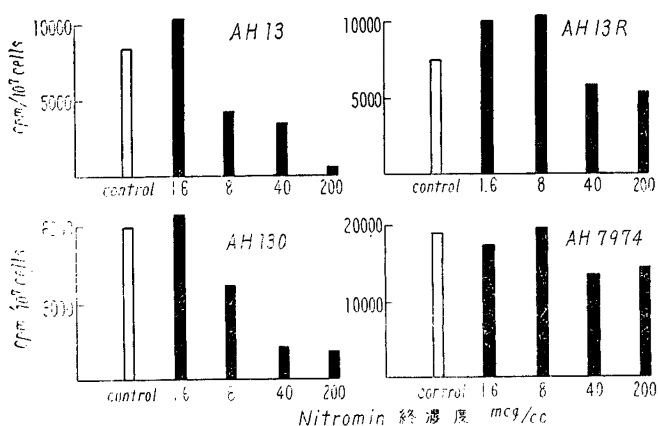


図2 腹水肝癌細胞の蛋白合成に対するNitrominの影響

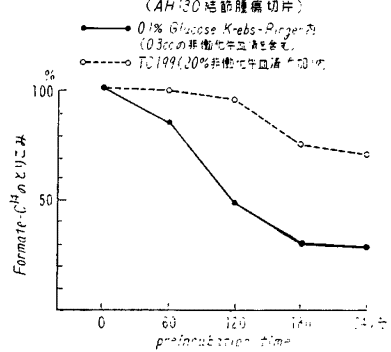


においては、AH 130 結節腫瘍切片を用いた基礎実験 (図 3 実線) に示すように、formate-C<sup>14</sup> を incubation 開始直後に添加した場合の、DNA へのとりこみにくらべて、1, 2, 3 および 4 時間後の incubation 後に formate-C<sup>14</sup> を添加した場合には、その時間的経過にしたがつて、DNA へのとりこみの減衰が著るしい。ところが、medium を TC 199 (非働化牛血清を 20% の割合で混じたもの) とすると (図 3 点線)、時間的経過による減衰があまりおこらない。したがって以後の実験で結節腫瘍切片の場合はすべて、TC 199 に 20% の割合で非働化牛血清を混じたものを用いた。

a) 腹水肝癌腹水型腫瘍細胞

実験成績をのべると、表 1 に示すように、AH 130 浮遊細胞では、HN<sub>2</sub>-O 終濃度 8 mcg/ml で、RNA・DNA・

図 3 Formate-C<sup>14</sup> の DNA へのとりこみの経時的観察 (AH 130 結節腫瘍切片)



蛋白 3 者への formate-C<sup>14</sup> のとりこみの抑制をみる。MMC では終濃度 1 mcg/ml, 5 mcg/ml で DNA への

表 1 核酸, 蛋白の生合成に対する制癌剤の抑制効果

		Nitromin (mcg/ml)			Mitomycin C (mcg/ml)			
		1.6	8.0	40.0	0.2	1.0	5.0	25.0
AH 130 浮遊細胞	RNA	92	72	11	114	106	102	54
	DNA	103	58	4	90	75	54	32
	蛋白	94	67	14	119	108	105	60
AH 7974 浮遊細胞	RNA	105	108	80		103	99	50
	DNA	110	91	28		89	97	33
	蛋白	121	100	62		106	102	55
AH 7974 (S) 浮遊細胞	RNA	103	94	74	102	100	100	72
	DNA	112	92	18	95	69	28	
	蛋白	93	105	58	109	95	56	

註: 結果は対照を 100 とした場合の比率であらわした

表 2 核酸, 蛋白の生合成に対する制癌剤の抑制効果

		Nitromin (mcg/ml)			Mitomycin C (mcg/ml)			
		1.6	8.0	40.0	0.2	1.0	5.0	25.0
AH 13 結節腫瘍	RNA	73	65	8	84	54	45	
	DNA	49	42	3	80	51	35	
	蛋白	81	74	7	105	77	65	
AH 13 R 結節腫瘍	RNA	96	108	26	95	106	113	48
	DNA	115	94	17	90	111	69	19
	蛋白	94	100	25	103	102	102	35
AH 130 結節腫瘍	RNA	77	70	10	103	110	80	
	DNA	60	33	4	83	76	23	
	蛋白	84	80	10	94	105	79	
AH 7974 結節腫瘍	RNA	124	94	30	107	112	114	
	DNA	99	91	10	100	90	88	
	蛋白	97	96	24	98	105	101	

註: 結果は対照を 100 とした場合の比率であらわした

とりこみだけが抑制され、RNA・蛋白へのとりこみは抑制されない。AH 7974 浮遊細胞では、HN<sub>2</sub>-O 終濃度 8 mcg/ml で、また MMC 終濃度 1 mcg/ml, 5 mcg/ml で RNA・DNA 蛋白 3 者へのとりこみが全く抑制されない。また、この研究の進行中において、継代移植を行なっていた AH 7974 が MMC に *in vivo* で感受性を示すようになり、いま仮りにこれを AH 7974 (S) と呼んでいるが (図 4)、この浮遊細胞では MMC 終濃度 1 mcg/ml, 5 mcg/ml で、DNA へのとりこみの抑制がみられた。AH 13, AH 13 R の浮遊細胞では、medium として 0.1% glucose Krebs-Ringer 磷酸緩衝液、TC 199 のどちらを用いても、薬剤非添加の場合において時間的経過による RNA・DNA・蛋白への formate-C<sup>14</sup> のとりこみの減衰が著るしく、*in vitro* における制癌剤の効果の検討を行なうことができなかつた。

b) 腹水肝癌結節腫瘍

表 2 に示すように、AH 13 結節腫瘍切片では、HN<sub>2</sub>-O 終濃度 1.6 mcg/ml で、DNA への formate-C<sup>14</sup> のとりこみが抑制され、8 mcg/ml で RNA・DNA・蛋白 3 者へのとりこみが抑制された。また MMC 終濃度 1 mcg/ml で RNA・DNA・蛋白 3 者へのとりこみの抑制がみられた。AH 13 R 結節腫瘍では、HN<sub>2</sub>-O 終濃度 8 mcg/ml

ml で RNA・DNA・蛋白 3 者への formate-C<sup>14</sup> のとりこみ抑制が全くみられない。MMC 終濃度 1 mcg/ml で DNA へのとりこみの抑制がみられず、5 mcg/ml で抑制がみられた。AH 130 結節腫瘍、AH 7974 結節腫瘍では、それぞれの浮遊細胞の場合とほぼ同じで、AH 130 結節腫瘍については、HN<sub>2</sub>-O 1.6 mcg/ml で RNA・DNA の合成抑制、8 mcg/ml で RNA・DNA・蛋白の合成抑制がみられ、MMC 1 mcg/ml で DNA 合成の抑制がみられた。AH 7974 結節腫瘍については、HN<sub>2</sub>-O 8 mcg/ml で RNA・DNA・蛋白合成の抑制がみられず、また MMC 1 mcg/ml、5 mcg/ml で DNA 合成の抑制がみられなかった。

3. 腹水肝癌移植ラットに対する制癌剤の効果

a) 腹水肝癌腹水型腫瘍

各種腹水肝癌移植ラットに対する HN<sub>2</sub>-O および MMC の腹腔内投与の効果は、図 4 に示すとおりで、その生存率曲線からみて、AH 13 は HN<sub>2</sub>-O および MMC に対して高度の感受性を、AH 13 R は HN<sub>2</sub>-O に対して耐性を、MMC に対してやや感受性を、AH 130 は両薬剤に対して感受性を、AH 7974 は両薬剤に対して耐性を、AH 7974 (S) は HN<sub>2</sub>-O に対して耐性を、MMC に対してやや感受性をもつという成績が得られた。

b) 腹水肝癌結節腫瘍

各種腹水肝癌結節腫瘍に対する制癌剤の腹腔内投与の効果は図 5 に示すとおりで、AH 13 は HN<sub>2</sub>-O および MMC に対して感受性、AH 13 R は両薬剤に対して耐性、AH 130 は両薬剤に対して感受性、AH 7974 は両薬剤に対して耐性という成績が得られた。

小 括

各種腹水肝癌浮遊細胞ならびに結節腫瘍についての感受性試験の成績を、*in vivo* における制癌剤の効果と対比して総括すると、表 3 に示すとおりである。すなわち、HN<sub>2</sub>-O については 8 mcg/ml における RNA・DNA・蛋白 3 者の合成抑制の有無、MMC については 1 mcg/ml における DNA 合成抑制の有無をもって感受性試験判定の基準とすれば、それぞれの腹水肝癌の腹水型および結節腫瘍の *in vivo* における制癌剤効果とよく一致することがわかる。

考 察

今日まで、Alkyl 化剤についてはもちろん、MMC をはじめとする種々の制癌抗生物質についてもそれらの作用機序に關して多くの研究がなされており、また

図 4 各種腹水肝癌移植ラットの制癌剤処置による生存率

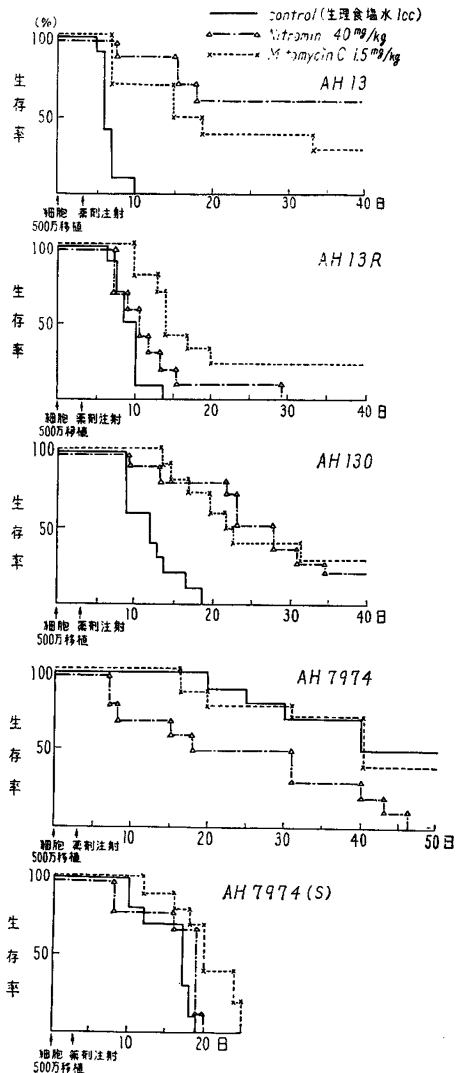
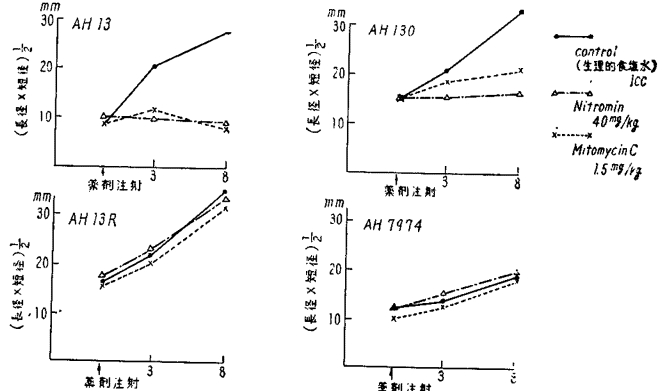


図 5 各種腹水肝癌結節腫瘍の増殖に対する制癌剤の抑制効果



(注: 腹水肝癌細胞 10<sup>7</sup>個を背筋皮下に移植して7日目に薬剤を腹腔内に注入した) 各群を10匹ずつとしてその平均値を記載した

表3 各種腹水肝癌における *in vitro* の感受性試験の成績と *in vivo* の制癌剤効果の対比

		感受性試験		<i>in vivo</i> の効果	
		HN <sub>2</sub> -O	MMC	HN <sub>2</sub> -O	MMC
AH 13	浮遊細胞	+*		++	++
	結節腫瘍	+	+	++	++
AH 13 R	浮遊細胞	-*		-	+
	結節腫瘍	-	-	-	-
AH 130	浮遊細胞	+	+	++	++
	結節腫瘍	+	+	++	+
AH 7974	浮遊細胞	-	-	-	-
	結節腫瘍	-	-	-	-
AH7974(S)	浮遊細胞	-	+	-	+

注：\*はRNA・DNA 合成についての実験を含まない

一方、多くの臨床医より制癌剤の正確な感受性試験についての要望が日増しにたかまつているにもかかわらず、制癌剤の作用機序と直接結びつけて行なつた制癌剤感受性試験の研究<sup>7,8)</sup>は少なく、未だ充分な成果をあげていない。

制癌剤の作用機序については、腫瘍細胞の営むさまざまな生化学的生活機能のうち、まず、ある特定の環が制癌剤によつて障害をうけ、それにひき続いて生活機能の破綻が全体におよんでゆくものと考えられる。MMCがDNA合成を特異的に阻害することは、細菌細胞<sup>9,10)</sup>動物細胞<sup>11)</sup>の両者についてすでに証明されている。さらに最近、教室の土井<sup>12)</sup>、谷口<sup>13,14)</sup>はMMCのHeLa細胞に対する増殖抑制作用を、DNA合成抑制と形態学的にひきおこされる細胞障害との関連において詳細に観察している。Alkyl化剤についても多くの研究<sup>15,16,17,18)</sup>がなされ、その直接の侵襲点としては、RNA・DNA・蛋白の生合成に対する阻害が証明されている。

制癌剤の感受性試験を行なう場合、その観測点としては、感受性腫瘍とそうでない腫瘍との微細な生化学的差異に直結する現象を直接とらえることが重要である。また、感受性試験としては、*in vitro* で限られた短時間内に結果を出すことが要求される。腫瘍細胞に対する制癌剤の*in vitro*での効果として、これまでのように直接の侵襲点より離れているところでとらえようとするならば、われわれが臨床的に使用する制癌剤投与量を体重あたりに換算した濃度にくらべてかけ離れて高い濃度で腫瘍細胞に作用させなければならない。たとえば、dehydrogenase活性の低下を指標とする場合<sup>2)</sup>、その作用濃度は私の使用した濃度にくらべて10倍または10数倍高い。また、酸素消費に対する抑制について私の行なつ

た実験では、AH 130に対してHN<sub>2</sub>-O 200 mcg/mlでもよく抑制がみられ、MMCの場合は100 mcg/mlでもなお抑制がみられなかった。また、azure II染色では、AH 130に対して、HN<sub>2</sub>-O 40 mcg/ml、MMC 125 mcg/ml以上で、わずかに染色率の増加をみるに過ぎなかった。

*In vivo*において制癌剤が腫瘍組織に対して影響を与えるのと、よく似た様式を*in vitro*において再現して、合成系に対する抑制効果の有無を適確にみるためには、制癌剤を作用させはじめてから数時間後に、放射性前駆物質を入れ、そのとりこみをみなければならない。すなわち、図1にみられるようにAH 130浮遊細胞の蛋白合成に対するHN<sub>2</sub>-O (8 mcg/ml)の抑制効果は、4時間の薬剤作用後にleucine-C<sup>14</sup>を添加した場合にはじめて明確にみることができるのである。核酸合成に対する抑制効果を見る場合に、薬剤作用開始と同時に、またはその1時間後に放射性前駆物質を添加するならば、W. H. WOLBERG<sup>7)</sup>およびI. J. BICKIS<sup>8)</sup>の報告にみられるように、薬剤作用濃度は非常に高くなければならない。一方、紺谷<sup>11)</sup>が、Ehrlich腹水癌細胞について、MMC (50 mcg/mouse)腹腔内投与後3時間目以後において、thymidine-H<sup>3</sup>のDNAへのとりこみが阻害されることを立証した。また、土井<sup>12)</sup>の、HeLa細胞のDNA合成に対するMMCの影響についての実験で示されているように、MMC (1 mcg/ml, 1時間)を作用させた場合、直後ではthymidine-H<sup>3</sup>のDNAへのとりこみに対する影響がみられないが、3時間後になつて抑制があらわれはじめ、6時間後に最も著明にとりこみが抑制される。このように*in vivo*においてはdosis medicamentosa, *in vitro*においては*in vivo*のそれに相当する低い濃度の制癌剤では、作用後3時間以上経過してはじめて、その核酸あるいは蛋白合成に対する抑制効果が著明となるのである。したがつて私は感受性試験において、薬剤作用後4時間目に放射性前駆物質を添加することを原則とした。

ところで、*in vitro*における感受性試験においてこの原則を適用するには、反応系におけるmediumが極めて重要である。私は、薬剤非添加の場合において、できるだけ長時間、細胞または組織の、核酸・蛋白生合成のactivityを保持させるため、mediumをいろいろと吟味検討したのであるが、一般に0.1% glucose Krebs-Ringer 磷酸緩衝液単独よりも、それに15%余の非働化牛血清を加えたほうがよく、また結節腫瘍切片の場合は、20%の割合で非働化牛血清を混じたTC 199がよいという結論に達した。これらをmediumとした場合、AH 13, AH 13 Rの浮遊細胞では、薬剤非添加の場合

でも, formate-C<sup>14</sup> の RNA・DNA・蛋白へのとりこみの時間的経過による減衰が著るしく, 目的を達することができなかつたが, 結節腫瘍については, 20% の割合で非働化牛血清を混じた TC 199 を用いて, 時間的経過による減衰が軽度で, 感受性試験を行なうことができた。Medium については今後, 人の悪性腫瘍に普遍的に応用できるよう, たえず検討改善すべきであろう。

Alkyl 化剤およびその他の制癌剤に対する耐性発現の機構については, なお不明の点が多い。HN<sub>2</sub>-O に対する自然耐性株 AH 7974 の耐性発現については, 細胞膜の透過性が, HN<sub>2</sub>-O によつて影響をうけない点を重視する報告<sup>19,20)</sup>があり, 一方, 後天的な耐性株の耐性発現については膜透過性の問題と関係がないと推論させる報告<sup>21)</sup>もある。いずれにせよ, 核酸・蛋白の生合成に対する抑制効果を指標とする限り, HN<sub>2</sub>-O に対して, 自然耐性株 AH 7974 と後天的耐性株 AH 13 R とはともに同じ反応を示し, この試験の目的によく合致した。

現在, わが国において, 白血病を除くすべての悪性腫瘍に対して最も普遍的に使用されているのは MMC と cyclophosphamide である。Cyclophosphamide はそれ自体 transport form で, *in vitro* では不活性であり, 生体内で活性化されて active form となることが認められており, 本研究のような *in vitro* での感受性試験を行なうことは不可能である。しかし, cyclophosphamide は HN<sub>2</sub>-O と同じ作用基をもっていることから, その感受性試験は一応 HN<sub>2</sub>-O の成績をもつて代用することができると考えられる。

現在, 私はラットの結節腫瘍についての成功を基礎として, 人の悪性腫瘍についての感受性試験を進めている。また, 患者個体の制癌剤による副作用発現の度あいも個々の症例によつてかなりまちまちであるので, それをあらかじめ知る方法として, 正常組織, とくに骨髓細胞についての感受性試験をも, 本方法と同じ考えをもつて検討中である。

### 結 論

各種のラット腹水肝癌について, *in vivo* における制癌剤効果の実験と平行して, *in vitro* における核酸・蛋白の生合成に対する抑制効果を指標とする制癌剤感受性試験を行ない, その成績を対比した結果, 次の結論を得た。

1. ラット腹水肝癌の浮遊細胞, 結節腫瘍の両者について, Nitromin の場合は 8 mcg/ml における RNA・DNA・蛋白 3 者の合成に対する抑制効果を指標とする方法で, Mitomycin C の場合は 1 mcg/ml における DNA 合成に対する抑制効果を指標とする方法で, 感受性腫瘍と耐性腫瘍とをよく判別することができた。

2. この方法により, Nitromin に感受性の反応を示したのは, AH 13, AH 130 の浮遊細胞および結節腫瘍であり, 耐性の反応を示したのは AH 13 R, AH 7974 の浮遊細胞および結節腫瘍, ならびに AH 7974 (S) の浮遊細胞であつた。Mitomycin C に感受性の反応を示したのは, AH 13 の結節腫瘍, AH 130 の浮遊細胞および結節腫瘍, ならびに AH 7974 (S) の浮遊細胞であり, 耐性の反応を示したのは AH 13 R の結節腫瘍, AH 7974 の浮遊細胞および結節腫瘍であつた。これらの結果はすべて, *in vivo* の薬剤効果とよく一致した。

本論文の要旨は, 第 23 回, 第 24 回日本癌学会総会, 第 14 回日本化学療法学会総会に報告した。

本研究は, 陣内傳之助教授の御指導と, 東弘講師のたえまぬ御援助によるものであり, ここに謹んで感謝の意を表明します。

### 文 献

- 1) 西岡久寿弥, 他: 人の悪性腫瘍の制癌性ウイルス及び化学療法剤に対する感受性試験のこころみ。日本臨床, 15, 1937~1948, 1957.
- 2) 近藤達平: 制癌剤の適応——感受性試験。最新医学, 19, 2304~2311, 1964.
- 3) DI PAOLO, J. A. & MOORE, G. E.: An evaluation of ascites tumor cell plating for screening chemotherapeutic agents. Antibiotics and Chemother., 7, 465~470, 1957.
- 4) SCHNEIDER, W. C.: Phosphorous compound in animal tissues I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. J. Biol. Chem., 161, 293~303, 1945.
- 5) KIRK, P. L.: Kjeldahl method for total nitrogen. Annal. Chem., 22, 354~358, 1950.
- 6) SCHMIDT, G. & THANNHAUSER, S. J.: A method for the detection of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem. 161, 83~89, 1945.
- 7) WOLBERG, W. H. & BROWN, R. R.: Autoradiographic studies of *in vivo* incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. Cancer Res., 22, 1113~1119, 1962.
- 8) BICKIS, I. J. *etc.*: Biochemical studies of human tumors II. *In vivo* estimation of individual tumor sensitivity of anticancer agents. Cancer. 19, 103~113, 1966.
- 9) SHIBA, S. *etc.*: Studies on the effect of mitomycin C in *Escherichia coli* strain B. Biken J., 1, 179~193, 1958.
- 10) 寺脇朝治: Mitomycin C の作用機構に関する研究。大阪大学医学雑誌, 12, 905~916, 1960.
- 11) KONTANI, H.: Effect of mitomycin C on nucleic acid biosynthesis in Ehrlich ascitic tumor cells. Biken J., 7, 9~20, 1964.
- 12) 土井 修: マイトマイシン C の HeLa 細胞増殖

- 抑制機序の解析。大阪大学医学雑誌, 16, 221~231, 1964.
- 13) 谷口健三, 他: マイトマイシンCの HeLa 細胞に及ぼす影響Ⅱ。映画的手法による解析。日本癌学会総会記事第 23 回総会, 昭和 39 年 11 月, 117~118 頁
- 14) 谷口健三, 他: マイトマイシンC(MMC)の HeLa 細胞に及ぼす影響Ⅲ。映画的手法及びオートラジオグラフィーによる解析。日本癌学会総会記事第 24 回総会, 昭和 40 年 10 月, 302~303 頁
- 15) WHEELER, G. P. & ALEXANDER, J. A. : Studies with mustards IV. Effects of alkylating agents upon nucleic acid synthesis in bilaterally grown sensitive and resistant tumors. *Cancer Res.* 24, 1337~1346, 1964.
- 16) WHEELER, G. P. & BOWDEN, B. J. : Some effects of 1,3--bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea upon the synthesis of protein and nucleic acids *in vivo* and *in vitro*. *Cancer Res.* 25, 1770~1778, 1965.
- 17) 中原和郎編, 癌の生化学 (医学書院) 1960 年, 248~261.
- 18) LAYDE, J. P. & BASERGA, R. : The effect of nitrogen mustard on the life cycle of Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. *Exp. Cell Res.* 39, 150~158, 1964.
- 19) MIURA, Y., RAPHAELLE, S. & KATAYAMA, H. : Studies on the metabolism of rat ascites tumor with nitrogen mustard sensitive and resistant strains V. P<sup>32</sup>-incorporation into ribonucleic acid *in vitro*. *J. Biochem.*, 50, 355~361, 1961.
- 20) MIURA, Y. & MORIYAMA, A. Studies on the metabolism of rat ascites tumor with nitrogen mustard sensitive and resistant strains VI. Inhibition of the *in vitro* incorporation of C<sup>14</sup>-orotic acid into nucleic acids by nitrogen mustard. *J. Biochem.*, 50, 362~366, 1961.
- 21) YAMADA, T. & IWANAMI, Y. : The transport of nitrogen mustard N-oxide through cellular membrane and its cytological effect in rat ascites hepatoma. *Gann*, 53, 225~233, 1962.