

核 酸 関 連 化 合 物 の 抗 腫 瘍 性 の 研 究 (IV)

6-Mercaptopurine の 腫 瘍 特 異 性 と 細 胞 内 へ の と り 込 み 効 率 と の 関 連

永 沼 真 理 子 ・ 豊 島 滋

慶 応 義 塾 大 学 医 学 部 薬 化 学 研 究 所 化 学 療 法 部 門

(昭 和 46 年 8 月 17 日 受 付)

前報において¹⁾我々は、数種のプリン誘導体の核酸合成に及ぼす影響を各種の cell-lines について検討し、6-Mercaptopurine (6-MP), 6-Mercaptopurine riboside (6-MPR), Thioguanosine (TG) および 6-MPR の Bis 体は、Hep. No.2 細胞, HeLa 細胞のようながん由来の細胞, 或いは L 細胞のように本来は非悪性腫瘍組織由来の細胞であるが、永く継代され十分に株化を受けてすでに悪性腫瘍化しつつあると言える細胞の DNA および RNA 合成は著明に抑制するが, chick embryo fibroblast (CEF), mouse embryo fibroblast (MEF) または rat embryo fibroblast (REF) のような非悪性腫瘍細胞あるいは MDBK 細胞のように株化はされていても、まだそれほど永い株化歴を有していない細胞においては、それほど著しい核酸合成阻止を来さないことを見出した。このような核酸合成阻止における腫瘍特異性がどのようにして生ずるのかを検討する第 1 段階として、我々はまずこれらの実験に使用した各種の細胞の間で、薬物のとり込みの効率が異なるものかどうかを検討したので、その結果について報告する。

実験材料および実験方法

細胞: 実験に使用した細胞は、がん由来細胞として Hep. No.2 細胞, 株化の進んだ非がん由来の細胞として L 細胞, 株化のそれほど進んでいない非がん由来の細胞として MDBK 細胞, 正常細胞として CEF を使用した。

培地: 増殖培地として 10% 牛血清加 YLA 培地を、維持培地として EAGLE 培地を使用した。

薬物: ¹⁴C-6-MP を使用した。

実験の具体的操作は実験結果の項で記述する。

実験結果ならびに考察

(1) ¹⁴C-6-MP の細胞内とり込み測定法の検討

まず本実験の開始に先立つて必要であるのは、細胞浮游液と ¹⁴C-6-MP を接触させたのち、細胞内にとり込まれた radioactivity を測定するに当つて、どんなに十分な精度と効率で薬物の細胞内とり込みを測定するかという点である。

この点を検討するため下記のような実験を行なった。従来、標識化合物の細胞内とり込みを見るためには、

化合物と細胞を一定条件で接触させ、次いで、細胞を充分洗浄後に凍結融解した後に遠心し、その上清をとつて radioactivity を測定する方法がよく用いられている。しかし、本法による時は原理的には細胞のほとんど総てが破壊されるものであるが、操作の実際条件によつては未破壊の細胞が残存する可能性もある。我々はそので、より完全に細胞を消化する方法としてメタノール・苛性カリ溶液による細胞の液化を行なう方法を並行して検討し、いずれの方法がより本研究の目的に沿うものかどうかを検討した。

実験は次のように行なつた。

500 万の Hep. No.2 細胞を HANKS の溶液に浮遊させ、¹⁴C-6-MP を 2 μ ci 加える。37°C, 30 min. 振盪して incubate した。1,000 rpm で遠心後 3 回細胞を洗浄し、この洗液と遠心上清とを合せる。細胞を均等に 2 部分に分け、第 1 部分をアセトン・ドライアイスで 5 回凍結融解し、2,000 rpm で遠心上清の radioactivity を測定する。第 2 部分は 2N-メタノール性苛性カリを加え、70°C, 30 min. 液化し、トルエン系シンチレーターを加えて radioactivity を測定した。

実験の結果を表 1 に示す。

表 1 で明かなとおり、加えた全アイソトープ量に対する細胞内にとり込まれた ¹⁴C-6-MP に起因する radioactivity は液化法では 5.5% に対し、凍結融解法では

表 1 薬物の細胞内とり込み測定に当つての凍結融解法と液化法の比較

分画名	分画の内容	dPM	回収率 (%)	とり込み率 (%)
I	加えた全アイソトープ量	44.4 × 10 ⁵	—	—
II	最初の洗浄液	41.4 × 10 ⁵	—	—
III	液化液による細胞内放射活性	1.22 × 10 ⁵	—	5.5
IV	凍結融解法による細胞内放射活性	0.40 × 10 ⁵	—	1.8
V	液化法により測られる全量 (V = II + 2 × III)	43.8 × 10 ⁵	98.7	—
VI	凍結融解法により測られる全量 (VI = II + 2 × IV)	42.2 × 10 ⁵	95.0	—

1.8% にすぎない。回収率も液化法は 98.7% に対して凍結融解法では 95.0% であった。以上の結果から液化法を用いて本実験の検討を行なった。

(2) ^{14}C -6-MP の各種細胞系におけるとり込み

以上の検討の結果、各種の細胞の 500 万を HANKS 溶液に浮遊し、これに ^{14}C -6-MP を加えて、 37°C に incubate し、以後 5 min., 10 min. および 30 min. と時間経過と共にぬきとり、液化法によりその細胞内とり込みを測定した。実験の結果を図 1 に示した。

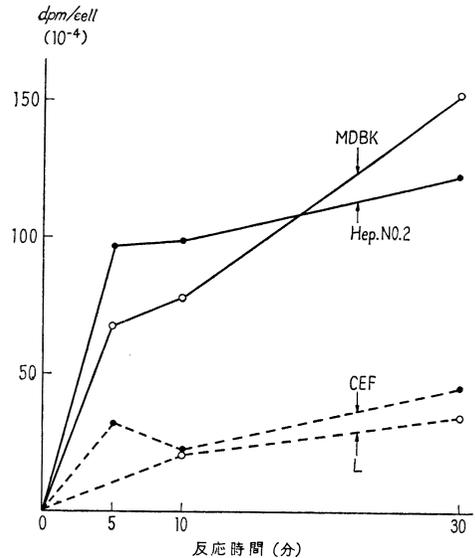
図 1 に見られるとおり、Hep. No. 2 細胞と MDBK 細胞はほぼ等程度に速く且つ多く細胞内 radioactivity を増加し、これに対して、L 細胞と CEF では細胞内 radioactivity の増加は前 2 者に比し遙かにおそかつた。この結果を前報¹⁾ で得た各種の細胞での核酸合成阻止と比較検討すると、がん由来の Hep. No. 2 細胞と正常細胞である CEF とでは、やはり核酸合成阻止作用と同じように、薬物のとり込みにおいても劇然とした差を示していることが明らかである。このことは膜透過性という観点からみると、がん細胞と正常細胞の膜構造の差が薬物のとり込み感受性に反映するが、本来正常細胞であるものが継代と共に株化して行く場合には、継代・株化の条件の規定がより複雑であるため結果の一律的な把握が困難となるように思われる。

この問題の解決には継代・株化の条件を同一に調節した細胞系を作成して始めて明確に結論づけられるものであろう。

要 約

^{14}C -6-Mercaptopurine の細胞内とり込みを検討した。核酸合成を 6-MP で著明に抑制される Hep. No. 2 細胞

図 1. 各種の細胞における ^{14}C -6-Mercaptopurine の細胞内とり込み



は、それほど著明な核酸合成阻止を受けない chick embryo fibroblast より明らかに多量の radioactivity の細胞内とり込みを示す。本来は正常細胞由来である L 細胞と MDBK 細胞では、MDBK 細胞の細胞内 radioactivity が L 細胞におけるより高く、6-MP の L 細胞および MDBK 細胞での核酸合成阻止と相反する結果がえられた。

文 献

- 1) 戸根木尚子, 永沼真理子, 豊島 滋: Chemotherapy 20(2): 291 (1972)

ANTITUMOR EFFECT OF NUCLEIC ACID ANALOGUES (IV)

The Relationship between the Tumor-specificity of 6-Mercaptopurine and its Penetration into Cells

MARIKO NAGANUMA and SHIGESHI TOYOSHIMA

Division of Chemotherapy, Pharmaceutical Institute, School of Medicine, Keio University

The penetration of ^{14}C -6-Mercaptopurine (6-MP) into cells was investigated. In Hep. No. 2 cells, the penetration rate of 6-MP was remarkably higher than that in chick embryo fibroblast cells. The nucleic acid synthesis of the former cells was more sensitive on 6-MP than that of the latter cells. Between the passaged and strained cells tested, the penetration rate in MDBK cells was higher than that in L cells.