

第 22 回日本化学療法学会東日本支部総会 シンポジウム

癌化学療法の新しい研究法

司会 宮村 定男 (新大細菌)

杉村 隆 (国立がんセンター)

司会の言葉

新大細菌 宮村 定男
国立がんセンター 杉村 隆

化学療法は感染症に対し赫々たる成果をあげた。しかし、癌に対しては未だ一般の期待にそえる段階に到っていない。これは癌という疾患の多様性と特殊性に基づくものであるが、さらに制癌物質の効果の判定があらかじめ人の癌に直接結びついている再現性のある方法によらないことにも原因していると考えられる。実験過程にある制癌物質は決して少いものではないが、人に試みる前に、この点で躊躇されている。さらに、制癌物質の開発は、制癌作用測定の簡便性が要求される。それが臨床に応用されるまでには、分離、抽出、精製等で多数の試料が測定をうけなければならないからである。ペニシリンという偶然の発見につづいた抗菌性抗生物質の探索には、過去ならびに現在においても系統的に膨大な数の微生物がとりあげられている。これにくらべると制癌抗生物質に対する試料数は、スクリーニングの困難さのために、極めて少いといえる。そして、これが有用な制癌物質の出現を遅らせているのである。

癌化学療法における新しい研究法の開発は、それが癌に有効な物質の発見にみちびかれ、残された人類最大の疾患の撲滅に最も近い道であることを意識しながら、このシンポジウムを進めたいと思う。

1. 制癌物質の *in vitro* screening落合 宏
新大細菌

癌化学療法剤の探求に際し、その制癌作用を試験管内で測定する方法を見出すことは、以前から大きな課題であった。これまで開発された制癌剤の多くは、抗菌性を有し、それを利用することによって、培養、抽出、精製の過程で生ずる膨大な試料中の有効物質の濃度測定が行なわれた。

人の癌に対する有効性と直接相関する *in vitro* 測定法の研究は、この意味で多くの研究者により行なわれて

きた。制癌抗生物質の作用機構が、大部分 DNA 合成、修復阻害にあるところから、逆にそれらを指標として screening する方法、また変異誘起性を利用する方法、最近では、梅沢氏らにより酵素活性阻害を指標とする方法が採用され、それらの制癌剤探索への有用性が報告されている。

私共は約 20 年前から、癌細胞を接種した寒天平板拡散法について実験してきた。この方法は、抗菌性抗生物質の screening と全く同じ発想からでたもので、検定菌の細菌を癌細胞に代えたものである。癌細胞の増殖は、細菌に比すると極めて弱いので、その阻害は、癌細胞の酵素活性を酸化還元色素の脱色反応でみることにより判定された。もし、癌に対し化学療法が有効であるものであれば、その作用機転が如何なるものであろうとも、その薬剤による癌細胞の増殖阻害が現われるであろう。そしてこのことは、動物癌による *in vivo* test の成績が極めて多くの要因により影響されることを考えると、むしろ基本的にまさるものではないかと考えられる。問題は検定に用いられる細胞であるが、最近の癌細胞培養の進歩は、この方法に新しい転機をもたらしているように思える。ここで、すでに確立された培養細胞系 HeLa, KB, HEp-2 細胞に、新しく本学大星章一教授から分与された各種人癌細胞 4 種、すなわち Burkitt リンパ腫由来の P₃HR-1, BT-1 細胞、肺癌転移リンパ節由来の OAT 細胞および膀胱癌由来の Ku-1 細胞、さらに対照となる正常細胞として FL 細胞を使用して Bleomycin, Mitomycin C, Carzinophilin, Chromomycin A₃ および Adriamycin の 5 剤に対する感受性を測定した。その結果、供試細胞は増殖形態が上皮様、および浮遊状と区別されるが、それらをそれぞれ重層法、混釈法を使い分けることにより、いづれの増殖形態でも測定可能とすることができた。本法による測定可能な濃度を基準として感受性の順位を求めると、各供試薬剤に高感受性を示したものは KB 細胞であり、中等度感受性細胞群は HeLa, HEp-2, BT-1 および OAT 細胞で、低感受性細胞群には P₃HR-1 および Ku-1 細胞に分類され、正常細胞由来の FL 細胞が最も感受性が弱かった。さらに抗菌性を有する Bleomycin, Mitomycin C, Chromomycin A₃ および Adriamycin の 4 剤について、抗菌

力と抗細胞性について測定可能濃度を比較した結果、Chromomycin A₃ では本法による抗細胞性のほうが低濃度まで測定でき、Adriamycin では同程度であり、Bleomycin, Mitomycin C では抗菌力のほうが数段すぐれていた。

これらの結果から本方法が制癌物質探求のための screening 法として応用できるものと考えられる。なお実際の癌化学療法に際しては、個々の癌細胞に対しての感受性試験を行なうことも必要のこととなるが、本方法は或る程度の癌細胞さえ得られれば、細胞の増殖形態を問わず、1回に多数の薬剤について、比較的短時間で判定しうる点で、従来の感受性テストと同様の方式として、臨床の要求を満足するものと考えられる。

質問 梅沢 浜夫 (微生物化学研)

In vitro の Cylinder plate 法は重要な方法である。しかし、制癌物質のスクリーニングで、エールリッヒ癌細胞を用いた Cylinder plate はしばしばエールリッヒ癌に有効な物質をあたえなかった。なおKB細胞のBleomycinのMICは250 µg/mlというスライドがあったが、通常の培養法でしらべると、より低濃度で阻害を示すと思う。Cylinder plate 法と通常の細胞培養を用いるスクリーニング法と比較してみられたことがあるか。

答 落合 宏

稀釈法による細胞培養法と拡散法とのMICの比較は、他の実験で行なっておるが、ご指摘のように、前者が一般に低い値を示す。これには、培地の組成、細胞数、薬剤の拡散性などが大きく影響しているように思われる。

2. Nude mouse と制癌物質の *in vivo* screening

新井 正
千葉大生物活性研

人がんに対する化学療法剤スクリーニングの困難の1つは、感染症の場合と異なってヒトと同一の寄生体を使用する動物実験が著しく労力と時間を要する点にあることは、言うまでもない。Nude mouse の導入とこれに対する人がんの移植実験の結果は、この系が他の人がん異種移植の系よりも、スクリーニング系としては、はるかに簡易であることを立証した。

我々も、1973年、Charles River Breeding Lab. から BALB/c nude mouse の分与を受け *in vivo* スクリーニング系への応用を検討してきた。いっぽう HeLa 細胞は永らく我国において開発された制癌物質の試験管内効果判定に広く好んで使用されてきた培養樹立細胞株であり、生体内で HeLa 細胞がこれらの制癌物質にどのよ

うな感受性を示すかという点も興味もたれた。そこで先づ HeLa 細胞について実験を行なってきた。

このような培養樹立株の nude mouse への移植は、極めて簡単であり、細胞数を一定にし、手技を標準化することはすこぶる容易である。また、新たに移植された人がんに比して発育は急速でこれまでの報告や我々の経験から、癌細胞周囲の細胞浸潤、転移は人がんの移植例ではみられず培養樹立細胞の移植についてだけ顕著であるとされている。

Nude mouse に移植された HeLa 細胞は、2相性の増殖曲線を示し、重量の個体差は少なく、ほぼ従来使用されてきた実験動物腫瘍と同様に取扱うことができ、これまで使用した薬剤に関する限り、臨床効果のある程度反映するように思われた。これらの成績、および移植人がんとの比較として、同じく nude mouse に移植された子宮頸癌(角化型扁平上皮癌)の制癌物質に対する感受性ならびに試験管内 HeLa 細胞の感受性と比較検討した。

HeLa 細胞腫瘍はヌードマウス中において、その増殖が実験動物腫瘍のうち、EHRlich 癌や、S-180 肉腫の結節型と同じく比較的急速な発育曲線で増殖したのに対し、子宮頸癌腫瘍は LEWIS lung carcinoma のような緩慢な増殖曲線を描いて増殖し、ほぼ直線的な成長曲線を示した。薬剤投与後の腫瘍の変化としては HeLa 細胞腫瘍が一過性の退縮をみせるのに対し、子宮頸癌腫瘍は縮少することなく一定の大きさを保つことが多い。

各薬剤の効果を、HeLa 細胞腫瘍に対し、縮少効果を示したものを； \pm 、一定の大きさを維持したものを； $+$ 、判定できないものを； \pm 、全く効果のみられないものを； $-$ 、子宮頸癌腫瘍については、一定の大きさを維持したものを； \pm 、増殖抑制効果のあるものを； $+$ 、判定できないものを； \pm としてまとめたものが下表である。

薬剤名	投与量(mg/kg) ×回数	HeLa 細胞	子宮 頸癌
Mitomycin C (MMC)	2×5	+	\pm
	4×3	\pm	\pm
Bleomycin (BLM)	50×5	+	\pm
	4×4	\pm	\pm
Daunomycin	4×5	\pm	NT
Endoxan	100×5	\pm	\pm
	60×2	\pm	\pm
5-FU	40×3	+	\pm
	700×4	NT	+
Cyclo C ara C	200×5	-	NT

NT=not tested.

さらに個々の例について病理学的検討を加えたところ、HeLa 細胞腫瘍では、いずれも細胞の空胞化、壊死

部の増加などが、共通の変化として観察されたが、子宮頸癌腫瘍については、各薬剤について反応に特色が見られ、とりわけ、MMC では角化層の減少と分裂像の増加、BLM では全面的に壊死に陥っている像がみられた。以上の実験からヌードマウスに異種移植された人がんを用いる制癌剤の生体内効果の測定はよく臨床効果を反映するようであるが、効果の判定は、たんなる腫瘍の増殖抑制や縮小だけでなく、病理学的検索が必須であると考えられる。

質問 梅沢 浜夫 (微生物化学研)

人の子宮頸癌の細胞をヌードマウスにつけた研究を報告されたが、これは扁平上皮癌であると思う。扁平上皮癌以外の人癌をヌードマウスにつけて成功しているか。松田、吉岡 (日本化工) は、人の胃癌の細胞をヌードマウスの皮下にうえると、薬剤の種類に対する感受性が化学発癌による場合と異なることをみているが、人の癌を人の癌の状態でヌードマウスに再現している例は扁平上皮癌以外にあるか。

質問 宮村 定男

私共は HeLa 細胞を制がん物質スクリーニングに使っており、培養をつづけたものはがん細胞の性質を失っており、試験細胞としては不相当とよくいわれるが、ヌードマウスによる実験の上からは如何であるか。

答 新井 正

梅沢氏へ：

現在までに我々の制癌剤テストを行なったのは、HeLa 細胞腫瘍、子宮頸癌の 2 例であり、新しい制癌剤の場合には数種の異種移植系が必要と考える。

宮村氏へ：

HeLa 細胞腫瘍は病理学者によれば、良く original な性状を保持しているという。In vitro のスクリーニング系には有用と考える。

3-A. 動物実験モデルと癌化学療法

—胃癌と大腸癌—

河内 卓

国立がんセンター生化

実験発癌研究の最近の進歩は、発癌剤の種類、投与方法を変えることで、ほとんどすべての器官に選択的に癌を作ることができるようになった。実験胃癌、実験大腸癌も、発癌条件の検討の時期を過ぎ疾患モデルとして積極的に利用されることを待っている状態である。

実験胃癌を癌の化学療法に応用する場合、ラットを使う方法と犬を使う方法がある。ラットは多数の動物の飼育が可能であり、犬は同一の動物で追跡検索ができる点

が有利である。

N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(MNNG) 水溶液 83 $\mu\text{g/ml}$ を飲料水として、6~7カ月投与し、14~15カ月に屠殺すれば、80~90%のラットに胃癌を生じる。約 10% には転移を認める。胃癌が発生するのは 8~10カ月からであるから、MNNG 投与中止後から薬剤を投与すれば胃癌に対する効果がわかる。効果は発生した胃癌の数、大きさ、悪性度等を指標として判定する。著者らはロイペプチン、ペプスタチン、PSK、キダマイン等の効果を検討した。梅沢らはプレオマイシンの誘導体について検索して成果をあげている。

犬に N-エチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(ENNG) 150 $\mu\text{g/ml}$ を飲料水として投与するか、ENNG に 2% Tween 60 を添加して固型飼料に注いで 8~9カ月投与すれば、投与中止後 8~12カ月で胃癌が発生する。転移もみられる。レントゲン、内視鏡、生検で、追跡検索しながら薬剤を投与し、その効果をみる事ができる。

実験大腸癌はラットに MNNG を肛門から注腸する方法や、メチルアゾキシメタンノール、ジメチルヒドラジン、アゾキシメタン等を投与する方法で作ることができる。胆道鏡を用いラットの肛門から大腸癌の発生を追跡することができる。この方法を用いれば、薬剤投与の効果を追跡検索が可能である。

松島らはアゾキシメタンをラットに皮下注射し、同時にロイペプチンを飼料に加えて投与した。30週後に屠殺剖検して大腸癌の発生を検討してロイペプチンの効果をみている。

質問 秦 藤 樹 (北里大微生物)

胃癌を MNNG で発生させることができることはすばらしいことであるが、少なくとも 1 年以上を必要するというがもっと早く胃癌をつくる方法はないか。

答 松田 明 (日本化薬研)

ラットの胃癌化学療法に用いた薬剤はエールリッヒ癌(腹水、固型)、HeLa 細胞等に対して一定の抗腫瘍性を有したものを臓器内分布の特異性、肺毒性等の検討を行なって選種した物質を用いている。薬剤 A-C はプレオマイシン誘導体、D は対照薬代謝拮抗物質である。

追加 梅沢 浜夫 (微生物化学研)

15 年前と違って、現在では、精製に使う資材も進歩し、精製して速かにその構造を決めることができる。そこで、簡単な方法で Cytotoxic antibiotics をとり、構造をきめて、この研究をつづけることができる。そして、そのあと、人癌のモデルにあてて人のある癌にきくかどうか推定することになる。これは現在の化学療法の正攻法ともいえるかもしれない。しかし、秦博士が述べ

たように、人癌モデルについて抗生物質の研究者が試験することは不可能ともいえる。そこで、癌化学療法のための進歩のために、人癌モデルについて試験してもらえる機関が設立されることを希望する。それは癌化学療法の進歩に最も必要なことである。

3-B. 動物実験モデルと癌化学療法

—扁平上皮癌（食道癌、皮膚癌）の発癌実験
とこれに及ぼすプレオマイシンの影響—

竹内 富雄
微生物化学研

プレオマイシンがヒトの扁平上皮癌に著効を呈することは、市川博士らの発表以来、臨床各方面で認められている。また現在我々は、微生物の利用や化学的変換により数多くのプレオマイシンを手にしており、これらのプレオマイシンの中から扁平上皮癌に対しより有効な誘導体をスクリーニングするとともに、プレオマイシンの扁平上皮癌に対する選択的効果を実験的に確認する目的で、化学発癌剤を用いてラットに食道癌を、また 20-メチルコラントレンを用いてマウスに扁平上皮癌および肉腫を誘発させ、これらについて治療ならびに予防実験を行なっている。すなわち食道癌（扁平上皮癌）の誘発は 0.005% ジエチルニトロソアミン水溶液を飲料水として 36 週間、毎日自由に摂取させることにより行なった。その結果、対照群においては食道癌は 23 匹中 6 匹に認められ発癌率は 26%、食道乳頭腫 48%、肝癌 74% であった。また肝癌からの肺転移が 10 匹中 3 匹に認められた。

プレオマイシン投与群においては、食道癌は 1 例も認められず、乳頭腫は 60%、肝癌は 61%、肝癌が肺に転移したものが 12 匹中 3 匹に認められた。以上の結果、食道癌はプレオマイシンの投与で顕著に阻止された。しかし、食道乳頭腫、肝癌および肝癌の肺転移は対照群および投与群とも類似した発癌率であり、プレオマイシンによる阻止効果は認められなかった。

これらの結果はすでに癌治療学会等において、共同研究者である東京第一病院の市川博士、大橋博士、微生物化学研究所の梅沢博士、堀学士等により発表されたものであるが、今回はとくに我々の行なった化学発癌の方法について述べた。

質問 菅野 晴夫（癌研）

Bleo 投与で扁平上皮癌が 0% であるのは、出来た癌が Bleo のためつぶされたものか、或いは発癌が押えられたためか、いづれか。

質問 秦 藤樹（北里大微生物）

発癌実験によって BLM は扁平上皮癌の発生を抑える

が、乳頭腫の発生は阻止しないということは乳頭腫にはきかないということの意味していることか。または乳頭腫の産生する不活性化酵素によってきかないか。

答 竹内 富雄

菅野先生へ：

扁平上皮癌の発癌過程の半ばから投与した化学予防的実験である。

秦先生へ：

乳頭腫には無効と考えている。その理由は分解酵素量と関係を有効と考えている。

追加 河内 卓（国立がんセンター生化学）

N-メチルベンジルアミンと亜硝酸ソーダをラットに投与する方法でラットに食道癌を作成することができ、この方法によればレントゲン撮影が可能で follow up study ができるので、プレオマイシンができた扁平上皮癌に有効なのか、扁平上皮癌の生成に有効なのかを識ることができる。

3-C. 動物実験モデルと癌化学療法 C. 白血病

小田 嶋 成 和
国立衛試薬品病理部

担白血病動物の作り方は原則として、I. 可移植性白血病を正常動物に移植する場合と、II. 白血病誘発能を有する化合物を正常動物に与え、白血病を新生させる場合とに大別される。前者の利点は、同一の性状を有する担白血病動物を簡単な手段で短期間に多数作りうることにあり、その再現性は極めて高い。しかしそれを人間の白血病患者のモデルとして見た場合、いくつかの相異点が存在することは否定できない。①各種人白血病のそれぞれを網羅するほどの可移植性白血病は存在しない。②可移植性白血病の場合、一般的には正常動物が宿主として用いられる。原発白血病個体の場合は癌原性因子による各種病的状態が標的細胞の癌化に先行しあるいは平行して宿主個体に引きおこされ、そのような場に於いて癌性増殖が営まれる。従って厳密な意味では腫瘍細胞の増殖態度も、それに対する宿主動物の反応態度も、移植癌を用いた場合と異なることが想像される。

癌原性因子を正常動物に与え、腫瘍を新たに発生させた場合、概念的には上記の相異点は多少解消される。しかし欠点も多い。比較的長期間を要すること、一時期に多数の担癌動物をそろえにくいこと、およびかなり毒性の強い化合物を用いるため癌化と平行して起る宿主動物の変調も人癌発生の場に於ける変調とは趣きを異にしているものと考えられる。従って理想的には癌化標的細胞

の種類が限局され、毒性が弱く、癌原性の強い多数の化合物が用意されることが望ましい。

人骨髄性白血病のモデル疾患確立の手段として近年各種 N-ニトロソ尿素系化合物が注目されて来た。中でも 1-エチル-1-ニトロソ尿素 (ENU), 1-ブチル-1-ニトロソ尿素 (BNU), 1-プロピル-1-ニトロソ尿素 (PNU) はその名々を飲料水に混ぜ継続的に白ネズミに投与すると赤芽球性、骨髄芽球性、および骨髄球性白血病を選択的に発生させることが判明してきた。すなわち ENU 400 p. p. m. 水溶液投与では、10~12 週前後で赤芽球性、BNU 400 p. p. m. 水溶液投与では 17~20 週で骨髄芽球性、PNU 600 p. p. m. 水溶液投与では 25 週前後で骨髄性白血病を発生させる。それらの実験方法と実験結果を詳述し、かつ白血病化学療法の研究手段としての利点、および欠点を考察する。

質問 梅沢 浜夫 (微生物化学研)

1) Ethyl, Propyl, Butyl の相違でそれぞれ形態的に違った細胞の白血病ができるというお話を伺ったが、それは Target cell に対する Permeability の相違によるものであるか。

2) Permeability の相違によるとすると、この構造の相違は化学療法剤の構造を考えると利用できないかということを考えさせる。

答 小田嶋成和 (国立衛試)

各化合物について、多少の標的細胞特異性がある。

4. Autochthonous tumor と癌化学療法

徳善 玲子

国立がんセンター研

現在までの抗癌剤の効果判定実験は、移植腫瘍-宿主の系で行なわれている。しかし、人癌患者は、自家 (autochthonous) 腫瘍宿主の系であるから、動物実験でも自家腫瘍-宿主の系を用いて検討することが、人癌の化学療法に対する、より確実な予言性を有すると考えられる。

移植腫瘍における腫瘍免疫と自家腫瘍免疫との間には大きな違いがある。前者で顕著な効果をあげることの比較的容易なのに反し、後者では人癌患者におけると同様に困難である。とくに癌の免疫療法を考える場合、どうしても自家腫瘍-宿主の系で実験をすることが必要である。

方法: 乳癌多発系マウス Swiss albino ♀ の自然発生乳癌を用いた。乳癌が拇指頭大になった頃、外科的に出来るだけ完全に摘出した。

1) 摘出した腫瘍 1mm³ を autograft として、その摘出個所にもどし、手術個所で対照群が 100% 再発する

ようにした。対照群のそのままとし、治療群は cyclo-c を術後 24 時間から 500 mg/kg 週 3 回計 20 回、週 4 回計 20 回腹腔内投与した。判定は毎週 1 回触診により手術部位の再発日数、延命日数等を比較した。

2) Autograft を手術個所とは別の所に、局所免疫を利用し、Swiss 系に histoincompatible な同種腫瘍である L 1210, BDF₁, マウスの正常組織、菌体成分である *Nocardia rubra*-CWS, BCG-CWS 等とまぜて自家移植した。判定は、毎週 1 回触診し、腫瘍自家移植の消長を検討した。同様の実験を MC-induced sarcoma に関しても行なった。

結果

1)

	control	cyclo-c 週 3 回	cyclo-c 週 4 回
総数	94	8	15
術後平均再発日数	23.6	30.6	34.3
術後平均延命日数	51.4	82.8	73.7

Cyclo-c 投与群では、再発遅延、延命が認められたが、完全治癒例はなかった。

2)

Spontaneous mammary tumor	mice with tumor / total No. of mice	%
Autograft mixed with L 1210	6/21	29.0
Autograft mixed with BDF ₁ spleen	7/7	100
Autograft mixed with <i>Nocardia rubra</i> -CWS	7/13	53.8
Autograft mixed with BCG-CWS	15/17	88.2
Autograft alone MC-induced sarcoma	26/26	100
Autograft mixed with L 1210	0/5	0
Autograft mixed with <i>Nocardia rubra</i> -CWS	10/14	71.4
Autograft mixed with BCG-CWS	11/17	64.7
Autograft alone	28/40	95.0

Autochthonous tumor graft を local immunity によって抑制することが出来たが、いまだ systemic immunity therapy という段階に到っていない。今後いかにして、autochthonous tumor-host において systemic immunity を誘導するかが我々の大きな研究課題である。

質問 梅沢 浜夫 (微生物化学研)

L 1210 が autograft を阻止しているが、L 1210 細胞から阻止物質がとれる見込みがあるか。

答 徳善 玲子 (国立がんセンター)

Cytotoxic factor のようなものを予想し、その実験を試みたが、私共ではまだ物質レベルでは得られていない。

5. 癌細胞の再分化と癌化学療法

菅野 晴夫
癌 研

薬物で癌細胞を分化させてその悪性度を低下させることができれば広義の癌化学療法に入れてもよいであろう。白血病細胞を薬物で処理すると白血病細胞が分化（あるいは成熟）をおこし、増殖率が低下し、造腫瘍性が低下する。すなわち、悪性度の低い状態、脱癌の状態にさせることができるからである。

例えば、培養フレンド白血病細胞を DMSO などの薬物を加えた液で培養すると細胞は小型の赤芽球様細胞となり、ヘモグロビンの合成が顕著で、膜表面の性状も平滑となり成熟赤血球に類似して来る。すなわち分化成熟してくる。また、このように分化を誘導した白血病細胞をマウスの腹腔に移入してみるとその造腫瘍性が低下していることが知られる。

この時の癌細胞の分化成熟とは正常状態に戻ることを意味するのか、それとも癌の枠の中における分化成熟であるのかは重大な問題であろうが、癌を遺伝子発現の変化の差として把える立場からすると、この分化成熟が癌の枠内か否かはさしあたり問題とならないであろう。むしろ問題は処理細胞の全部を再分化に導くことが困難なことである。

腫瘍における分化の研究は緒についたばかりであるが、これは癌細胞の調節機構の解明と共に癌化学療法にも基礎的データを提供するものと思われる。

質問 穂積本男（埼玉がんセンター研）

Friend 白血病細胞の DMSO による分化の過程で、この DMSO の作用に対して resistant になる mechanism について、これは細胞自体の性質の差によるのか、ウイルス側の問題なのか教示されたい。

答 菅野晴夫（癌研）

分化し易い細胞系としにくい細胞系では細胞膜構造が異なっておりようである。例えば分化しにくい系では microvilli の発達が良いが分化し易い系では villi の発達が悪い。Lectin receptor なども異なる。本白血病細胞は Friend leukemia virus を carry している。その態度についてはなかなか興味あるが、今日は全部 cut した。結論的に virus と分化は直接的関係はうすいようである。

質問 小松 喬（東大医科研内科）

培養フレンド白血病細胞が DMSO 等で培養すると

Hb を産生し分化してくるとのお話であるが、この Hb 産生は例えばヘパトマのアルブミンと α -フェトプロティンのような関係、つまり分化課程と Hb の adult あるいは fetal type などの関係があるかどうかについてお聞きしたい。

答 菅野晴夫（癌研）

Fetal や変なヘモグロビンであると面白いのであるが OSTERTAG らの仕事で正常のものと同様であることが明らかになった。

6. 発癌過程の阻止と化学療法

穂積本男

埼玉県立がんセンター研化学療法部

発癌過程や、癌細胞の増殖過程にある種のプロテアーゼが関与しており、プロテアーゼ阻害剤の処理により発癌や、癌細胞の増殖が抑制されることが明らかにされている。癌化学療法の1つの新しい研究方法として、このようなプロテアーゼ阻害剤による発癌抑制に関する最近の研究成果を述べる。

近年、梅沢らは放線菌からいろいろなプロテアーゼの特異的な阻害剤を単離している。なかんずく、ロイペプチン [N-acetyl(N-propionyl)-L-leucyl-L-leucyl-L-argininal, LP] は細胞毒作用がほとんどなく、種々なプロテアーゼを強く阻害する。主として、この LP を用いて実験動物の発癌過程に対する抑制効果を検討した。

1) 皮膚癌：ICR マウス（雌）の背部皮膚に 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene およびクロトン油塗布後、LP を塗布し、皮膚癌発生に対する LP の効果を調べた。LP は、皮膚癌形成を著しく抑制した。なお、LP は、クロトン油処理後、増加した皮膚プロテアーゼ活性も阻害した。いっぽう、プラスミンの特異的な阻害剤 trans-4-aminomethylcyclohexanecarboxylic acid も、LP と同様にこの皮膚癌発生を抑制した。

2) 大腸癌：呑舌ラット（雄）の皮下に azoxymethane を注射して大腸癌を誘発した。この発癌実験でラットに LP を含む飼料を与え、LP の効果を調べた。LP は大腸癌発生を顕著に抑制した。

3) 白血病：ICR マウス（雌）に N-nitrosobutylurea (NBU) を含む飲料水を与え、白血病を誘発した。NBU を投与終了後に LP を含む飼料を与え LP の効果を調べたが、白血病発生の抑制は認められなかった。しかし、NBU と同時に LP を与えた場合には、抑制の傾向が認められたので、さらに LP の効果を検討中である。

以上のような化学発癌の他に、種々な腫瘍ウイルスによる発癌過程にもプロテアーゼが関与し、この過程もプロテアーゼ阻害剤で阻止される例が知られている。これ

らの発癌過程におけるプロテアーゼの役割と、プロテアーゼ阻害剤による発癌抑制の機作について考察し、癌化学療法における新しい研究領域の将来を展望する。

質問 新井 正 (千葉大生物活性研)

我々の研究所においても故宮木高明教授らが DHA, AF-2 が DAB 肝癌の発生阻止について研究をしておられたが癌の治療というよりは発癌の機構解明の途を指向していたようである、Proteinase の阻害剤は発癌の promotion step を解除しているのか、僅かに発生してくる癌を抑制しているのでしょうか。

答 穂積本男

ロイペプチンは発癌の Promotion process を抑制している。しかし癌細胞の増殖に protease が関与しており、protease 阻害剤が癌細胞の増殖を阻止することも考えられる。

7. 転移阻害と化学療法

松島泰次郎
東大医科研

転移の阻害は癌の治療によって重要な課題である。放線菌の産生するプロテアーゼ阻害剤が血行性転移を抑制したので報告する。血行性転移の場合には癌細胞が、1) 原発腫瘍から遊離し、2) 血管中に侵入し、3) 血管中を転移臓器まで移動し、4) その組織の毛細血管部に定着し、5) 血管外に遊出し、6) その局所で増殖して、転移巣が形成される。癌細胞を静脈中に注入移植した場合には、上記の転移の第3段階からあとの過程を実験的に再現することができる。

吉田腹水肝癌 AH 7974 細胞を 1×10^6 個、体重 80~100 g のドンリュウ系雌ラットの尾静脈から注入する。3週間後に動物を殺し、肺への転移巣の数を調べる。黒インクを気管から肺に注入することにより、正常部分が黒くなり、白く残った転移巣を数える。大部分の転移巣は表面に存在しているので、外部から転移巣の数を調べることによって、転移の動態を知ることができる。

この実験系を用いて、梅沢博士らによって分離された、放線菌の産生するプロテアーゼ阻害剤、ロイペプチンの転移に対する効果を調べた。ロイペプチンは飼料に 0.1% 濃度に混ぜ合して投与するか、または 10 mg/ml に緩衝化生理食塩水に溶解して、体重 1 kg 当り 50 mg を 1 日 2 回朝夕腹腔内に注射して投与した。共に転移を抑制した。また別の微生物の産生するプロテアーゼ阻害剤であるアンチバインも 0.1% 含有飼料で投与したときに、ロイペプチン同様に血行性転移を抑制した。

癌細胞が毛細血管部に定着し、血管外に遊出するときに、毛細血管部での癌細胞による栓塞形成および毛細血

管壁の透過性亢進などが起る。これに種々のプロテアーゼが関与しており、これらがプロテアーゼ阻害剤により阻害されるために転移が抑制されたと考える。

質問 菅野晴夫 (癌研)

ロイペプチンを投与したラットの血液成分の違いは如何。また化学療法剤と組合わせた実験のご経験は。

答 松島泰次郎 (東大医科研)

1) 調べていない。ただ吉田腹水肝癌細胞には種々の凝固線容活性を示すものがある。AH 7974 細胞の凝固線容活性は中間的な値を示している。

2) まだ調べていない。検討したいと思う。

8. 癌化学療法—抗生物質の探究の将来

梅沢 浜夫
微生物化学研

1951年に制癌抗生物質の研究をはじめ、約15年後に扁平上皮癌の治療に有効なプレオマイシンに到達した。この種の癌にはプレオマイシン不活化酵素が少ないことがその重要な要因である。また、プレオマイシンはDNAを切断するので、その修復能を欠く癌細胞には極めて少量の連続投与でその癌に治療効果を発揮する筈である。岡西ら(予防抗生物質部)が明らかにしたように、抗生物質の生合成の特徴的部分はプラスミドの支配をうけるが、プラスミドの種類が無数であるため、無数の抗生物質がつくられると思われる。今後も、従来のスクリーニング法で諸種の制癌物質が得られるが、プレオマイシンと同種の方法で、その中から人の特定の癌の治療薬が今後速かに開発されるであろう。さらにこの進歩の間において、容易に使うことのできるそれぞれの人癌のモデルが発達するならば、それぞれの人癌に有効な物質がより見つけやすくなることは当然である。

しかし、それぞれの人癌のモデルの完成をまたずに、或いは癌の生物学、生化学が化学療法に正攻法の基礎となるほど進歩するのをまたずに、これらの進歩と平行して微生物生産物の面からどのように研究を進めるべきであるかが現在の当面する問題であるし、またここに将来の発展を予想することができる。筆者は現在の酵素活性測定法が阻害物質の精度の定量法であり、この方法を適用して酵素阻害物質を発見し、精製できることを示した。人癌の生化学的知見に基づいて、この種の方法で癌治療薬を得ることも不可能ではない。例えば、竹内富雄とともに計画した方法で Glyoxalase 阻害物質をとり制癌効果を見ることができた。また、微生物は CAMP の Phosphodiesterase の阻害物質をとることもできた。

以上の諸問題について筆者らの研究を述べ、将来発展すべき方向について論じた。