弘前肉腫の Mitomycin C に対する耐性獲得機序

臼渕　勇・佐藤　達資・工藤　一
弘前大学医学部第二病理学教室

（昭和 56 年 9 月 28 日受付）

単細胞移植によってつくられた弘前肉腫の 1 系について，腫瘍細胞の 1×10^7 個をラット腹腔内に移植し，移植 48 時間後より全く無効量の 1 μg/kg の Mitomycin C (MMC) を連日腹腔内に投与した。移植動物の腫瘍死前にこの腫瘍細胞の 1×10^7 個を次のラット腹腔内へと移植し，これに対して移植 48 時間後より 1 μg/kg の MMC を連日投与するということを引続いてのラットにおいて反復して行なった。このような間欠投与の過程で，当初から 63 回，111 日においては本来有効量の 100 μg/kg の MMC の連日 5 日間投与に対する耐性化は確認できなかったが，これに移植直後より 1 μg/kg の MMC を投与するという連日投与を追加した場合には 25 回，25 日で耐性化した。原系は当初より 88 回，160 日においても耐性化は確認されなかったが，これに連日投与を追加した場合には 9 回，9 日で耐性化した。当初より間欠投与のみを続けた原系は 109 回，190 日において連日投与に切換えることなく耐性化した。このことは耐性化の過程が漸進的に進行したものであることを示したものと思われる。

このように耐性化した弘前肉腫にはこのあとも間欠投与を続け，当初より 120 回，208 日で投薬を中止した。このあと 6 か月の休薬後に単細胞移植によって樹立された 20 系の弘前肉腫についての耐性試験を行なったところ，すべてが 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性であった。

以上の成績は弘前肉腫が全く無効量の 1 μg/kg の MMC の間欠投与という selection の全く考えられない薬剤と長期間接触している間に，殆んどすべての腫瘍細胞が本来有効量の 100 μg/kg の MMC に対して漸進的に耐性化したことを示すものと思われる。

腫瘍細胞の薬剤耐性に関する研究は多数報告されているが，その耐性獲得機序についての一致した見解は得られていない[1~3]。われわれ[4]はこの機序を明らかにするために単細胞移植による弘前肉腫を腹腔移植されたラットに，全く無効量の 10 μg/kg または 1 μg/kg の MMC を移植直後より連日腹腔内に投与することを代々のラットにおいて反復した。この結果，弘前肉腫は 10 μg/kg の場合は 24 回，1 μg/kg の場合は 44 回の投与で，本来有効量の 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性化したことを報告した。このことは，耐性化の機序を一般に考えられているように mutation and selection によって説明することが困難であることを示すものと思われた。

今回は MMC の作用をさらに弱めても同様の結果が得られるか否かを明らかにするために，1 μg/kg の MMC の腹腔投与を弘前肉腫の腹腔移植 48 時間後より開始し，引続いての代々のラットにおいても同様のことを反復した。この結果，腫瘍細胞は 100 μg/kg の MMC に対して漸進的に耐性化することを確認することができたので，その成績を報告する。

I. 実験材料

実験動物：雌雄両性の岐阜系雑婚ラットの体重 150～180 g のものを使用した。

実験腫瘍：実験に使用した弘前肉腫[5]は岐阜系雑婚ラットのリンパ節に原発したリンパ肉腫であって，長年月に及んで当教室において腹水腫瘍として同種ラットに累代移植されているものである。今回の実験には本腫瘍の単細胞移植によって新に樹立した弘前肉腫の 1 系を使用した。

MMC：協和醗酵社より提供されたもので，ラット腹腔移植弘前肉腫に対する MMC の最小有効量は 50 μg/kg の腹腔内連日投与である[6]。

II. 実験方法と結果

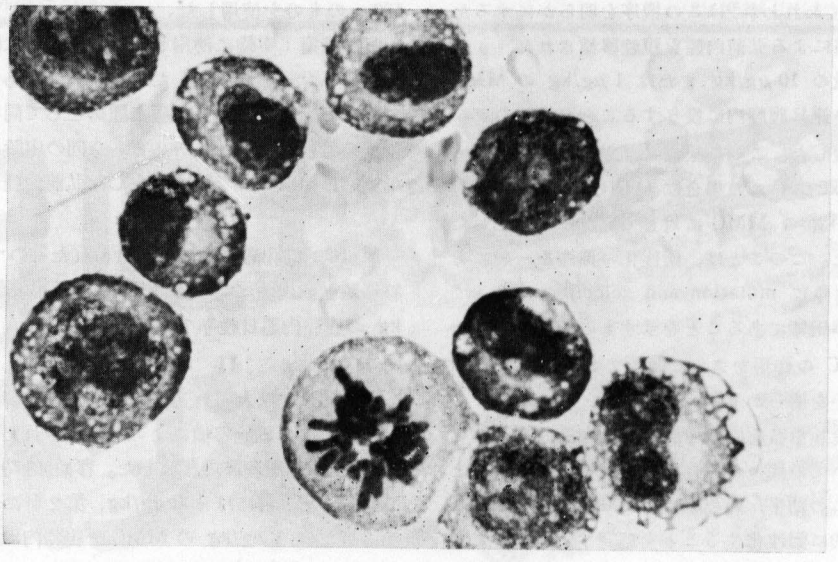
予備実験：それぞれ 10 匹よりなる 4 群のラットに対して，この単細胞移植によって樹立された弘前肉腫細胞の 1×10^7 個を腹腔内移植した。移植 48 時間後より連日 5 日間，第 1 群には 100 μg/kg，第 2 群には 10 μg/kg，第 3 群には 1 μg/kg の MMC を腹腔内に投与した。この結果，100 μg/kg 投与群は腫瘍細胞の特有な多形核

巨細胞形成を特徴とする変性を示して全例が治癒した(Fig. 1)。10 μg/kg および 1 μg/kg 投与群はそれぞれ 6.9±0.6 (Mean±S. D.) 日および 6.8±0.8 日で特有な変性を示すことなく全例腫瘍死した。第4群の対照群は 7.1±1.0 日で全例腫瘍死した。第2, 3, 4群の腫瘍死日数の間には統計学的な有意差はみられなかった。このことは 100 μg/kg の MMC は弘前肉腫に対して確実に有効であるが, 10 μg/kg および 1 μg/kg の MMC, 特に 1 μg/kg の MMC は全く無効であることを示したものと考えられる。以下の本実験における腫瘍細胞耐性化の有無はすべてこの弘前肉腫のラット腹腔移植 48 時間後より 100 μg/kg の MMC の5日間連日腹腔投与の結果によって判定した。

本実験：1) 1×10^7 個の弘前肉腫を腹腔移植されたラ

Fig. 1 MMC-sensitive Hirosaki sarcoma cells treated daily with 100 μg/kg of MMC for 5 days, showing the characteristic degeneration. Giemsa staining. ×1,000

Fig. 2 MMC-resistant Hirosaki sarcoma cells treated daily with 100 μg/kg of MMC for days, without showing the characteristic degeneration. Giemsa staining. ×1,000



ットの腹腔に，移植 48 時間後より 1 μg/kg の MMC を連日投与し，移植ラットが腫瘍死する前に，この腫瘍細胞の同量を次のラットの腹腔に移植した。このラットに移植 48 時間後より同様に 1 μg/kg の MMC を腹腔に投与するという処置を代々のラットについて反復した。この結果，当初より 23 代，63 回（111 日）における検査では 100 μg/kg の MMC に対する耐性化は確認できなかったが（Fig. 1），この腫瘍より樹立された別の 1 系に対して移植直後より 1 μg/kg の MMC の連日投与を追加したところ，6 代，25 回（25 日）で 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性化した（Fig. 2）。

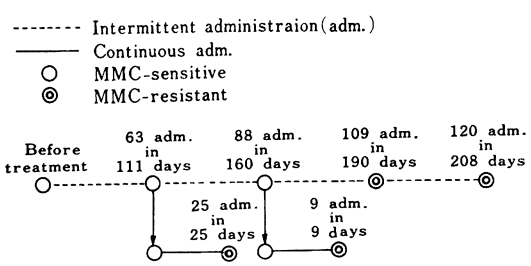
2） もとの間欠投与系に対してさらに 1 μg/kg の MMC の間欠投与を続けたところ，当初より 34 代，88 回（160 日）での検査においても 100 μg/kg の MMC に対する耐性化を確認することはできなかったが，この腫瘍より樹立された別の 1 系に対して移植直後より 1 μg/kg の MMC の連日投与を追加したところ，4 代，9 回（9 日）で 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性化した。

3） もとの間欠投与系に対して，このあとも 1 μg/kg の MMC の間欠投与を続けたところ，当初より 42 代，109 回（190 日）に及んだところで，100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性化し，腫瘍細胞は特有な変性を示すことなく増殖し，ラットはすべて腫瘍死するようになった（Fig. 2）。

4） 耐性化した間欠投与系弘前肉腫はこのあとも間欠投与を続け，46 代，120 回（208 日）で投薬を中止した（Fig. 3）。

5） このあと 6 か月の投薬中止後での腫瘍は 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性であった。さらに，この腫瘍よりの単細胞移植によって樹立した 20 系の弘前肉腫についての耐性試験を行なったところ，すべてが 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性であった。

Fig. 3 Process of the development of resistance to MMC in Hirosaki sarcoma in the course of the intermittent administration of 1 μg/kg/day of MMC



III. 考　　按

われわれ[4]はさきに弘前肉腫細胞が 1 μg/kg の MMC の連日投与を行なうことによって 44 回（44 日）において 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性化することを報告した。今回は 1 μg/kg の MMC を間欠投与という一層弱めた状態で作用させた結果，弘前肉腫の耐性化は漸進的に進行し，109 回（190 日）という連日投与の場合よりは長い期間を経て 100 μg/kg の MMC に対して完全に耐性化することが明らかにされた。このような MMC の間欠投与の過程で，当初より 63 回（111 日）において連日投与に切り換えた場合には 25 回（25 日）で耐性化し，さらに当初より 88 回（160 日）において連日投与に切り換えた場合には 9 回（9 日）で耐性化したことは，耐性化の過程は漸進的に進行したものであることを示したものと思われる。前回の実験[4]における正常の弘前肉腫に 1 μg/kg の MMC の連日投与を行なった場合には耐性化するのに 44 回（44 日）を要したことも，今回の間欠投与における耐性化の漸進的進行を一層確実に裏付けるものと思われる。

今回の実験においては，全く無効量の 1 μg/kg の MMC を間欠投与という一層弱い形で作用させたのであるから，これによって腫瘍細胞の selection が行なわれたと考えることは，前回の連日投与の場合よりも一層困難である。さらに，このように耐性化した弘前肉腫の単細胞移植によって樹立された 20 系のすべてが 100 μg/kg の MMC に対して耐性化していたということは，selection のない状態で弘前肉腫の殆んどすべての細胞が MMC に対して耐性化したことを示すものと思われる。このような耐性化の機序を，腫瘍細胞が薬剤と接している間に mutation によって少数の耐性細胞が生じて，これが selection されて腫瘍の耐性化がおきたものとして説明することは困難である。

今日，細菌学の領域では，plasmid によって薬剤耐性が伝達されることが知られている[7~9]が，高等動物の腫瘍細胞においてはこのような可能性は証明されていないようである。仮に何らかの機序によって細菌におけると同じような耐性の伝達がいくつかの腫瘍細胞においておきたとしても，これによって selection のない状態で大多数の腫瘍細胞が耐性細胞に変ったものと説明することは困難である。もしもこのようなことが可能とすれば，弘前肉腫の日常の累代移植の間に mutation によって少数の MMC 耐性細胞が生じて，長期間の累代移植の間に何らの処置を加えることなくこのような耐性の伝達が進行して結局すべての弘前肉腫細胞が MMC 耐性となるはずであるが，現実にはそのようなことは決しておきてはいないのである。

われわれは，このような現象の機序として，弘前肉腫細胞が全く無効量の 1 μg/kg の MMC と接している間に，その大多数の細胞が次第にこれに適応して遺伝的に変異することによって，有効量の 100 μg/kg の MMC に対する耐性化がおきたものと考えたいと思っている。

（本論文の要旨は 1981 年第 70 回日本病理学会総会において報告した）

文　献

1) HIRONO, I.: Development of resistance to nitrogen mustard N-oxide in the Yoshida sarcoma. Nagoya J. Med. Science 17 : 102～109, 1954
2) OBOSHI, S.: Cross-resistance between mitomycin C and alkylating agents in experimental cancer chemotherapy. Gann 50 : 147～154, 1959
3) SAKURAI, Y.: *In vitro* culture of Yoshida sarcoma cells: Methods for determining acquired resistance to drugs. Nat. Cancer Inst. Monograph. 16 : 207～239, 1964
4) USUBUCHI, I.; T. SATO & H. KUDO: Mechanism of the development of resistance to mitomycin C in Hirosaki sarcoma. Tohoku J. Exp. Med. 132 : 237～238, 1980
5) USUBUCHI, I. & H. ABE: The Hirosaki sarcoma. A lymphosarcomatosis of the rat. Gann 47 : 117～128, 1956
6) USUBUCHI, I.; S. OBOSHI, R. TSUCHIDA & H. TANABE: The effect of mitomycin C on the growth of a variety of rat and mouse tumors. Gann 49 : 209～227, 1958
7) AKIBA, T.; K. KOYAMA, Y. ISHII, S. KOMURA & T. FUKUSHIMA: On the mechanism of the development of multiple-drug-resistant clones of Shigella. Jap. J. Microbiol. 4 : 219～227, 1960
8) MITSUHASHI, S.; K. HARADA & H. HASHIMOTO: Multiple resistance of enteric bacteria and transmission of drug resistance to other strains by mixed cultivation. Jap. J. Exp. Med. 30 : 179～184, 1960
9) WATANABE, T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev. 27 : 87～115, 1963

MECHANISM OF THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE TO MITOMYCIN C IN HIROSAKI SARCOMA

ISAMU USUBUCHI, TATSUSUKE SATO and HAJIME KUDO
Department of Pathology, Hirosaki University School of Medicine

Non-inbred rats of both sexes of Gifu strain, weighing 150～180 g, were used in all experiments. Tumor cells employed were those of Hirosaki sarcoma which had developed in the cervical lymphnode of a non-inbred rat and has been serially transplanted i. p. in non-inbred rats for 30 years in this department. The minimum effective dose of mitomycin C (MMC) to Hirosaki sarcoma *in vivo* is 50 μg/kg/day.

A clonal cell line of Hirosaki sarcoma was established in rats. Forty-eight hr after the i. p. transplantation of 1×10^7 cells of the clonal cell line, the tumor was treated daily with i. p. administration of 1 μg/kg of MMC. Tumor cells treated were serially transplanted to the next passage before the host dies and the similar treatment was repeated in the new host. Although a complete resistance of the tumor to 5 daily administrations of 100 μg/kg of MMC was not recognized after 63 intermittent administrations of 1 μg/kg of MMC in 111 days, the resistance was recognized after 25 continuous administrations in 25 days in the subline of this tumor treated additionally with daily doses of 1 μg/kg of MMC immediately after the i. p. transplantation of tumor cells. Similarly, although a complete resistance of the original line was not recognized after 88 intermittent administrations in 160 days, it was recognized after 9 continuous administrations in 9 days in the subline of this tumor treated additionally with daily doses of 1 μg/kg of MMC immediately after i. p. transplantation of tumor cells. Finally, after 109 intermittent administrations in 190 days, the original line showed a complete resistance to MMC. Thus, the process of the development of resistance to MMC seems to be a gradual one.

The intermittent administration of 1 μg/kg of MMC to the original line was stopped when 120 administrations were done in 208 days. In the examination after 6 months, the tumor showed a complete resistance to 100 μg/kg of MMC. Moreover, each of 20 clonal cell lines derived from this MMC-resistant Hirosaki sarcoma was also resistant to 100 μg/kg of MMC.

These results seem to show that most of Hirosaki sarcoma cells may have gradually acquired a hereditary resistance to MMC in the course of the contact with the ineffective dose of MMC, which did not make the selection.