



Title	ヒト扁平上皮癌培養細胞のブレオマイシン耐性獲得機構に関する研究
Author(s)	杉, 政和
Citation	大阪大学, 1984, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/34725">https://hdl.handle.net/11094/34725</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

原著

原稿総紙数 109枚 (本文68枚, 文献17枚,  
欧文抄録4枚, 図説明19枚,  
表題脚注1枚)

図 9枚 (図2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11)

表 9枚

写真 12枚 (図1, 3)

別刷数 100部

連絡先 杉 政和

大阪大学歯学部口腔外科学第  
一講座 内線 2257

表題 ヒト扁平上皮癌培養細胞のブ  
レオマイシン耐性獲得機構に  
関する研究

所属 大阪大学歯学部口腔外科学第  
一講座

著者名 杉 政和

ヒト扁平上皮癌培養細胞のブレオマイ  
イン耐性獲得機構に関する研究

杉 政和

## 緒言

口腔領域に発生する悪性腫瘍の約70%は、扁平上皮癌であり、この腫瘍に対する抗癌剤として、抗癌性抗生物質であるブレオマイシン(BLM)が選択的に著効を示すことはよく知られている<sup>1,2)</sup>。しかし臨床的には、一次治療後に再発した扁平上皮癌に対して、BLMを再び投与しても無効のことが多く経験される。この事実は、再発癌にはBLMに耐性を示す細胞が存在する可能性を、強く示唆するものと考えられる。

口腔癌に限らず、一般に癌の化学療法において、抗癌剤に対する薬剤耐性の問題は、治療成績を左右する大きな要因の一つで<sup>3-5)</sup>、抗癌剤の耐性機構を明らかにし、その耐性を克服することができれば、それは癌化学療法にとって一つの曙光といえよう。

このような意味から、近年、癌細胞の薬剤耐性に関する報告が数多くなされている<sup>4,6,7)</sup>ものの、ヒト腫瘍細胞に関するものは少なく



なかでも BLM の耐性細胞は、いずれもラット、ハムスター、マウスなどの哺乳動物細胞から数種類が分離されているにすぎない<sup>8~12)</sup>。

ゆえに著者は、口腔癌治療において頻用されている抗癌剤の一つである BLM に対する、ヒト扁平上皮癌細胞の耐性獲得機構に関して解析を加えるため、一連の研究を進めてきた。すなわち、3種類のヒト扁平上皮癌培養細胞から、BLM 耐性細胞をそれぞれ分離することを試み、その樹立に成功した。さらに、これら3種の耐性細胞は、それぞれ分離・樹立過程ばかりか生物学的特性も異にしていることを明らかにし、耐性機構の一部とともに、すでに報告した<sup>13~16)</sup>。そこで本研究では、3種の BLM 耐性ヒト扁平上皮癌培養細胞を用いて、より詳細な生物学的特性を探索するとともに、3種の耐性細胞が獲得した BLM 耐性機構の比較検討を行った。さらに数種の変異原を用いて、変異原処理を行うことにより、耐性細胞の出現頻度がどのように変化するか、

またこれら耐性細胞に対する抗癌剤の効果増強に関する解析も併せて検討し、耐性克服の可能性について考察を加えた。

## 実験材料ならびに実験方法

## 1. 培養細胞および培養法

子宮頸部扁平上皮癌由来の株化細胞である HeLa 細胞<sup>17)</sup>、口腔底扁平上皮癌由来の株化細胞である KB 細胞<sup>18)</sup>、および舌扁平上皮癌組織より当教室において分離した、Hepd 細胞 (現在 150 代継代中) の 3 種類のヒト扁平上皮癌培養細胞と、それぞれ BLM 耐性細胞である HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞<sup>13)</sup>、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞<sup>16)</sup>、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞<sup>16)</sup> を実験に用いた。3 種類の BLM 耐性ヒト扁平上皮癌細胞の分離および樹立過程<sup>16)</sup> を表 1 に示す。すなわち、耐性細胞の分離にはイーグルの最少必須培地<sup>19)</sup> (MEM, ニッスイ製薬, 東京) に 10% 仔牛血清 (阪大微生物病研究会製, 大阪) と 2 mM L-グルタミン (和光純薬, 大阪) を加えた増殖培養液中に、常時 BLM (日本化薬, 東京) を添加し、その濃度を順次上げて細胞を培養馴化する多段階選択法<sup>20, 21)</sup> を用いた。この方法により、HeLa 細胞からは約 4 ヶ月、KB 細胞からは約 1 ヶ月で、

0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BLM 存在下でも増殖を示す細胞が得られたため、BLM 濃度を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に上げて同様に培養馴化すると、両細胞とも約 1 ヶ月で 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BLM 濃度にも耐性を示す、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および KB-BLM<sup>r</sup> 細胞を分離することができた。一方、Hepd 細胞は 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BLM 濃度では、約 4 ヶ月後に全ての細胞が死滅し、耐性細胞を分離することができなかつたので、変異原処理として紫外線照射を行つたところ、約 2 ヶ月後に 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BLM 存在下でも増殖する細胞が得られた。そこで BLM 濃度を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に上げることにより、約 1 ヶ月後に 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BLM に耐性を示す、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞を分離し得た。

3 種の耐性細胞の形態を図 1 に示す。なお、図 1 HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞は樹立以来現在まで 24 ヶ月、140 代、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞は 22 ヶ月、130 代、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞は 24 ヶ月、140 代にわたつて、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度の BLM を含む増殖培養液を用いて、37 °C の 5% 炭酸ガス培養器中で継代培養されてゐる。細胞の継代は 4 ~ 5 日ごとくに、最終濃度

0.08% トリアミン (阪大微生物病研究会製, 大阪) および 0.14% エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA) (石津製薬, 大阪) を含む  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  脱リン酸緩衝液 (PBS (-), pH 7.2) で単層培養細胞を分散し, 増殖培養液に浮遊させたのち, ガラスペトリ皿にまき培養した。

これらの BLM 耐性細胞の, 生物学的諸性質を以下に述べる。BLM 耐性細胞の BLM に対する感受性は, 図 2 に示すように 3 つの親株細胞 (図 2) 細胞に比べ著しく低く, HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞では  $5 \mu\text{g/ml}$ , KB-BLM<sup>r</sup> 細胞および Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では  $2 \mu\text{g/ml}$  でも全く増殖抑制を受けなかった<sup>(13,16)</sup>。50% 増殖抑制濃度 ( $\text{ID}_{50}$ ) を親株細胞と比較することにより, 耐性度を求めると, HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞で 20 倍, KB-BLM<sup>r</sup> 細胞で 11.6 倍, Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞で 185 倍の BLM 耐性を示した<sup>(13,16)</sup>。この BLM 耐性という表現形質の安定性は, HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では, BLM を含まない増殖培養液中で, 各耐性細胞を 30 代継代しても安定に保持させていたのに対し, KB-BLM<sup>r</sup> 細胞で

は、BLM 無添加培養液での継代3代前後でBLM 耐性を喪失した<sup>16)</sup>。またこれらの耐性細胞を、ヌードマウスに接種した場合に形成される腫瘍は、組織学的にそれぞれの親株細胞と同じで、いずれも未分化癌であった(図3)<sup>13)</sup> 図3

さらに、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞ではヌードマウスに形成された腫瘍は、HeLa 細胞による腫瘍に比べ有意にBLM 低感受性であった( $P < 0.01$ )<sup>14)</sup>。

## 2. 細胞増殖測定法

細胞を  $1 \times 10^5$  個/ml の密度で、24穴ティッシュカルチャークラスター (Costar, MA, USA) に 1 ml ずつまき、37°C の5%炭酸ガス培養器中で培養した。以後、経日的に EDTA - トリプシン溶液を加えて細胞を分散し、ニグロシン排除テスト<sup>22)</sup> により、Bürker-Türk 型血球計算板で生細胞数を算定した。

## 3. BLM の細胞内取り込みの測定

放射性標識化合物入手の都合上、BLM の誘

導体である  $^3\text{H}$  標識 ペプロマイシン ( $^3\text{H-PEP}$ , Sp. Act. 0.78 Ci/m mol, 日本化薬より分与) を用いて実験を行った。  $1 \times 10^5$  個/ml の密度の細胞浮遊液を, 24穴ティッシュカルチャークラスターに 1 ml ずつまき,  $37^\circ\text{C}$  で 48 時間, 5% 炭酸ガス培養器中で培養後,  $^3\text{H-PEP}$  を  $\mu\text{Ci}$  あたり, 1, 2.5, 5,  $10 \times 10^3$  M (約 1,000 cpm ~ 10,000 cpm) 加え,  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間培養した。その後 MEM で 3 回洗浄し, 細胞内に取り込まれていない  $^3\text{H-PEP}$  を除去した後, 0.1 ml の 1 N 水酸化ナトリウムを加えて細胞を溶解した。さらに 0.1 ml の 1 N 無水酢酸を加えて中和し, 燐光の影響を除いたうえで, 全量をキシレン系液体シンチレーターに溶解し, Aloka 液体シンチレーションカウンター (LSC-673 型, 日本無線医理学研究所, 東京) により, 放射活性を測定した。

#### 4. BLM の細胞外放出の測定

細胞を  $1 \times 10^5$  個/ml の密度で, 24穴ティッシュ

カルチャーフラスターにまき、 $37^{\circ}\text{C}$ で48時間培養後、ウエルあたり  $1 \times 10^7$  M の  $^3\text{H-PEP}$  (Sp. Act.  $0.68 \text{ mCi/mg}$ ,  $10,000 \text{ cpm}$ ) で60分間ラベルした。その後培養液を除去し、 $^3\text{H-PEP}$  を含まない増殖培養液を加え、0分、15分、30分、60分、120分、240分間培養後に、前項と同様にして細胞内放射活性を測定し、0分値との差を求めた。

#### 5. BLM 不活化活性測定法

BLM 不活化活性の測定は、Akiyama らの方法<sup>10)</sup> に準じて行、た。すなわち、90 mm 径ガラスペトリ皿に密に増殖した単層培養細胞を、EDTA-トリプシン溶液で処理し、Dulbecco's PBS<sup>23)</sup> (D-PBS, pH 7.2) で  $5 \times 10^6$  個/ml の細胞浮遊液に調整した後、Dounce 型ホモジナイザーで氷冷しながら、800 ~ 1,000 rpm で20ストロークすることによりホモジネートとした。十分に細胞が破壊されていることを光学顕微鏡下で確認した後、3,000 rpm で10分間遠心した上清を



細胞抽出液とした。この抽出液中に含まれる蛋白質量を Lowry らの方法<sup>24)</sup>により測定した後、蛋白質量 0.5 mg となるよう調整した抽出液 1 ml に BLM 1  $\mu$ g を加え、37°C で 60 分間反応させた。対照としては、① D-PBS のみ、② 同じ蛋白質量を含む抽出液のみ、③ BLM 1  $\mu$ g を含む D-PBS を同様に反応させた。反応後の BLM 活性を測定するため、試験菌として  $1 \times 10^7$  個/ml の密度の *B. subtilis* PCI 219 株<sup>25)</sup> (日本化薬薬品研究所生物研究室より分与) を反応液にそれぞれ 0.1 ml ずつ加え、37°C で 90 分間振とうしながらインキュベートした。反応混液を D-PBS に 10 倍階段希釈し、その 0.1 ml を最終濃度 0.8% の Bacto Agar (Difco, Mich, USA) を含む Tryptic soy broth (Difco, Mich, USA) 15 ml に混入し、90 mm 径プラスチックペトリ皿にまき、37°C の恒温器中で 24 時間培養した。BLM により失活されていない菌により形成されたコロニー数をかぞえ、BLM 不活化活性を算定した。不活化活性は、細胞抽出液のみと反応後に形成されたコロニー数

に対する，細胞抽出液で前処理された BLM と菌液を反応後に形成されたコロニー数の比，すなわち菌の生存率により表わした。

### 6. 紫外線照射による細胞の不活化

60 mm 径プラスチックペトリ皿 ( Corning , NY, USA ) に細胞を 500 個まき，37°C で 24 時間培養後，培養液を除き紫外線 (UV) 照射を行った。すなわち，15 W UV 殺菌灯 (東芝，東京) を 30 cm の距離から 3 erg/cm<sup>2</sup> の強さで一定時間照射した。再び増殖培養液を加え，37°C で 7 日間培養後，生残した細胞により形成されたコロニーを，メタノール固定し，ギムザ染色を施してかぞえた。細胞の生残率は，次の式で算定した。

細胞生残率 =  $\log_{10}$

$$\frac{\text{UV照射したペトリ皿に形成された細胞コロニー数}}{\text{UV照射しないペトリ皿に形成された細胞コロニー数}}$$

## 7. 変異原処理方法

60 mm 径プラスチックペトリ皿に、HeLa 細胞を 2000 個まき、37°C で 24 時間培養後、変異原処理を行った。変異原としては UV、放射線、マイトマイシン C (MMC) を用いた。UV 照射は、15 W の UV 殺菌灯を 30 cm の距離から、 $3 \text{ erg/cm}^2$  の強さで 10 秒、20 秒、30 秒間行った。放射線照射は、日立実験用小動物 X 線照射装置 MBR 1505 R (日立 x デイコ、東京) を用い、IONEX 線量計 (Type 2500/3) に連結した指頭型電離箱を設置し、線量をモニターしながら、50 rad、100 rad、200 rad の照射を行った。MMC による前処理は、最終濃度  $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 、 $1 \mu\text{g/ml}$  の MMC を含む培養液で、37°C 2 時間培養した。以上の変異原処理の後、BLM を含む培養液と含まない培養液の 2 群に分けて、37°C で培養した。変異原処理後の細胞生存率は、7 日間培養後に形成された細胞コロニーを、メタノール固定後ギムザ染色を施してかそ之、2 群のコロニーの比から求めた。

## 8. 交叉耐性測定法

BLM の誘導体であるペプロマイシン (PEP) および抗癌性抗生物質のアクリノマイシン D (ACD), アドリアマイシン (ADM), マイトマイシン C (MMC), 白金の錯塩であるシスプラチン (CPDD), 代謝拮抗剤の 5-フルオロウラシル (5-FU), メソトレキセート (MTX), 植物アルカロイドのビンクリスチン (VCR) の計 8 種類の抗癌剤に対する交叉耐性を検討した。各薬剤を一定濃度で含む増殖培養液にて, 親株細胞および耐性細胞を, それぞれ  $1 \times 10^5$  個/ml の密度で 24 穴テイスユカルチャークラスターに 1 ml ずつまき,  $37^\circ\text{C}$  で 6 日間培養し, 薬剤で処理していない対照細胞に対する生存率を求めた。すなわち BLM および PEP は  $0.5 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ , 5-FU と CPDD では  $0.1 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ , ADM および MTX で  $0.01 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ , ADM, MMC および VCR では  $0.001 \sim 0.01 \mu\text{g/ml}$  の各薬剤濃度を用い, 交叉耐性は各薬剤の  $\text{ID}_{50}$  を求め, 親株細胞の  $\text{ID}_{50}$  値に対する, 耐性細胞の  $\text{ID}_{50}$  値の比で表わした。

## 9. その他の薬剤

細胞膜修飾物質として使用した小ポリエーテル系抗生物質であるフィリピン ( Filipin, Upjohn, Mich, USA ) は, 大分医科大学医学部生化学教室, 桑野信彦教授より恵与を受けた。また, カルシウム拮抗剤であるベラパミル (Verapamil ) は, エーザイ (東京) より分与を受けた。

ポリ ADP リボース合成阻害剤として, ニコチン酸アミド (和光純薬, 大阪) を用いた。

## 結 果

## 1. BLM 耐性細胞の BLM 耐性機構

BLM は細胞の DNA に作用し、DNA の単鎖切断を引きおこすことにより殺細胞効果をもたらすが<sup>26,27)</sup>、BLM 感受性に関与すると考えらる因子として、①細胞膜の BLM 透過性<sup>9-11)</sup>、②細胞内の BLM 不活化酵素活性<sup>10,28)</sup>、③細胞の障害 DNA 修復能<sup>9)</sup>などが挙げられてきた。そこで以上の3つの観点から、ヒト扁平上皮癌培養細胞である、HeLa、KB、Hepd の各細胞から分離された BLM 耐性細胞、すなわち HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞、KB-BLM<sup>r</sup>細胞、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞が獲得した BLM 耐性機構について解析を加えた。ただし細胞膜透過性のみを正確に測定することは非常に困難であるため、<sup>3</sup>H-PEP の細胞内取り込みと細胞外放出の2つの現象について検索することにより、BLM 透過性を考察した。

1) <sup>3</sup>H-PEP の細胞内への取り込み

$10^{-6} \sim 10^{-7}$  M の濃度の <sup>3</sup>H-PEP を、37°C で60分

間、標的細胞に反応させた後の細胞内への取り込みを測定した。各親株細胞および耐性細胞の取り込み曲線は図4のごとくで、HeLa細胞に比べ HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞は、 $10^{-6}$  M の濃度 (22,000 cpm/ml) で 52.2% の取り込みしか示さず、KB細胞と KB-BLM<sup>r</sup> 細胞の間でも同様に、耐性細胞は親株細胞の 67.0% に取り込みが低下していた。一方、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞は、BLM 無添加培地で30代継代培養すると、BLM 耐性を失い、親株細胞 KB と同じく BLM 感受性細胞となっていた<sup>16)</sup>。

この BLM 感受性となった KB-BLM<sup>r</sup> 細胞の <sup>3</sup>H-PEP の取り込みを検討したところ、KB細胞の 91.2% の取り込みを示し、親株細胞と同程度の膜透過性を回復していることが示唆された。また Hepd 細胞と Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では取り込みの差は認められなかったが、 $10^{-6}$  M の <sup>3</sup>H-PEP 濃度においても、HeLa 細胞や KB 細胞の約 1/2 しか <sup>3</sup>H-PEP を取り込まなかった。

図4

2)  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出

$10^{-6}$  M 濃度の  $^3\text{H-PEP}$  を 60 分間反応させ、 $^3\text{H-PEP}$  を取り込ませた標的細胞を、 $^3\text{H-PEP}$  を含まない培養液で、0, 15, 30, 60, 120, 240 分間培養した後、細胞を溶解し、細胞内に残存する放射活性を測定することにより  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出を検討した。それぞれの細胞の細胞内  $^3\text{H-PEP}$  を 0 分値に対する百分率で表わしたものが図 5 である。HeLa-BLM<sup>r</sup> および Hepd-

図 5

uvBLM<sup>r</sup> 細胞では、培養 60 分までは、明らかにその親株細胞より速やかに  $^3\text{H-PEP}$  を放出していた。すなわち、30 分～60 分間で、親株細胞の  $\frac{1}{2}$ ～ $\frac{1}{3}$  しか細胞内に  $^3\text{H-PEP}$  が残存してはいなかった。一方、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では他の二者と異なり、親株細胞と同様の細胞内残存曲線を示した。KB 細胞、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では培養 60 分までに、その他の細胞においても培養 120 分までは、90% 以上の細胞内  $^3\text{H-PEP}$  が放出された。



## 3) 細胞抽出液中の BLM 不活化活性

現在までに知られている BLM 耐性機構のうちで、最もよく検索されているのが BLM 不活化酵素 ( BLM hydrolase ) 活性である。そこで、B. subtilis PCI 219 株を試験菌として、これから細胞抽出液中の BLM 不活化活性を測定した。すなわち、BLM と各細胞抽出液を反応後に、残存する BLM 活性を試験菌の不活化から求めた。表 2 に示すように、HeLa-BLM<sup>r</sup> および KB-BLM<sup>r</sup> 表 2 細胞では、親株細胞に比べてそれぞれ 1.6 倍、1.9 倍の値を示したが、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では、親株細胞と差を認めなかった。

## 4) UV 照射に対する細胞 DNA 修復能

UV は、細胞 DNA に作用して、ピリミジンダイマー (主にチミジンダイマー) を形成することにより、DNA に障害を与える<sup>29)</sup> が、除去修復により細胞を回復させることは、宿主回復 (Host cell reactivation)<sup>30)</sup> としてよく知られた現象である。そこで、UV を用いて、照射後

の細胞生存率を測定することにより、各細胞の障害 DNA 修復能を調べた。

図6に示すように、HeLa-BLM<sup>r</sup> および Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞は、親株細胞に比べ著しく UV 感受性を示した。すなわち HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞では、60秒照射時と比較すると、親株細胞の24.5倍、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では、45秒照射時で93.5倍低感受性であった。しかし、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞は、親株細胞と同じ不活化曲線を示した。

### 5) BLM 耐性機構のまとめ

3種の BLM 耐性細胞の BLM 耐性機構を表3表3にまとめた。

HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞は、<sup>3</sup>H-PEP の取り込みの低下、細胞外放出の亢進、DNA 修復能の上昇に加えて、BLM 不活化活性は HeLa 細胞の1.6倍であった。KB-BLM<sup>r</sup> 細胞は、<sup>3</sup>H-PEP の取り込みの低下がみられ他に、BLM 不活化活性は1.9倍を示した。しかし <sup>3</sup>H-PEP の細胞外放出および DNA 修復能は、親株細胞と比べて差を認めなかつ

た。Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞では、DNA修復能の著明な上昇と<sup>3</sup>H-PEPの細胞外放出の亢進がみられるが、<sup>3</sup>H-PEPの取り込みおよびBLM不活化活性には、親株細胞との間で差異はみられなかった。

## 2. 変異原処理によるBLM耐性細胞出現頻度の増大

BLM耐性細胞であるHeLa-BLM<sup>r</sup>細胞、KB-BLM<sup>r</sup>細胞、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞の樹立過程が、それぞれ異なっていることは先に述べた(表1)。Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞を分離する際、多段階選択法では分離できなかったのに対して、変異原の一つであるUVを照射することにより、比較的容易に耐性細胞を分離できたことから、変異原処理によってBLM耐性細胞の出現率が上昇する可能性が考えられる。

そこで、UV、放射線あるいはMMCを変異原としてHeLa細胞を処理した場合のBLM耐性細胞の出現頻度を求めた。すなわち、UVを $3 \text{ erg/cm}^2$

の強さで10~30秒間照射後に、BLMを含まない増殖培養液中で2週間培養した場合、形成された細胞のコロニー数は表4のごとくで、表4  
 コロニー形成率は60.8%、UV照射による細胞生存率は63.0~83.4%であった。この条件下で、2 $\mu$ g/mlのBLMを含む選択培地で1ヶ月間培養後に形成されたコロニー数は215.5~295個で、播種細胞数2,000に対するBLM耐性細胞出現率を求めると、 $1.08 \sim 1.48 \times 10^{-1}$ となった。  
 同様にして、放射線を50~200 rad照射した場合の出現率を算定すると、 $5.40 \times 10^{-2} \sim 1.31 \times 10^{-1}$ となった。さらに実験IIでは、HeLa細胞のコロニー形成率は33.6%と低かったが、MMCを0.1~1 $\mu$ g/mlの濃度で2時間処理した場合、BLM耐性細胞のコロニー数は312.5~508個で、3者の中では最も多く、出現率は $1.56 \sim 2.54 \times 10^{-1}$ であった。なお、HeLa細胞から変異原処理を行わずに、多段階選択法によってBLM耐性細胞が得られる頻度は、 $10^6$ 個の播種細胞数中に平均5個の耐性細胞コロ

二一がみられたことから、BLM 耐性細胞の出現率は  $5 \times 10^{-6}$  であり、変異原処理により BLM 耐性細胞の出現率は、 $10^4 \sim 5 \times 10^4$  倍に著明に上昇したと考えられるが、dose response は明らかでなかった。

### 3. 変異原処理による分離された BLM 耐性細胞の解析

現在、臨床においては BLM を単独で使用することは少なく、他療法すなわち放射線療法や、MMC などの他種抗癌剤との併用療法<sup>31)</sup>が多く行われている。ゆえに、変異原として放射線や MMC を用いた場合に出現した BLM 耐性細胞が、いかなる性質を有するかについては臨床的にも非常に興味ある点である。そこで、200 rad の放射線を照射し、 $1 \mu\text{g/ml}$  の BLM 存在下で 1 ヶ月間培養後に形成された HeLa 細胞のコロニーから 11 個のクローン（以下、HeLa-radBLM<sup>r</sup> 細胞 Cl. 1 ~ 11 と略す）を、また  $1 \mu\text{g/ml}$  の MMC で 2 時間前処理し、同様にして形成さ

した HeLa 細胞のコロニーから 12 個のクローン  
(以下, HeLa-mmcBLM<sup>r</sup> 細胞 cl. 1 ~ 12 と略す) を  
無作為に分離し, 各クローンの BLM 耐性度な  
らびに BLM 耐性機構を解析した。

### 1) BLM 耐性度

前述のように, ID<sub>50</sub> を親株細胞と比較する  
ことにより耐性度を算定した。放射線照射後  
に形成された 11 個の細胞クローンの BLM 耐性  
度は, 表 5 に示すように 6.4 ~ 21.0 倍であり表 5  
, 変異原処理をせずに分離された HeLa-BLM<sup>r</sup> 細  
胞の耐性度 20 倍と比較して, 著明な差はみら  
れなかつた。一方, MMC 処理後に分離された  
12 個のクローンも, 13.8 ~ 25.2 倍の BLM 耐性  
度を示し, HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞に比べて著しく高い  
耐性度を示すものはみられなかつた。

### 2) BLM 耐性機構

放射線処理後に分離された 11 個の細胞クロ  
ーンのうち, 最も高い 21 倍の耐性度を示した

cl.7と、中等度の11.4倍耐性のcl.4、最も低い6.4倍耐性のcl.8、およびMMC処理後に分離された12個のクローンのうち、最も高い25.2倍の耐性度がみられたcl.2の計4個のクローンについて、多段階選択法により分離された

HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞と耐性機構に相異があるか否かを検討した。まず、HeLa-radBLM<sup>r</sup>細胞のcl.4、cl.7、cl.8について検討した(表6, 図7)。表6  
図7

cl.7とcl.4では、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞と同様に、<sup>3</sup>H-PEPの細胞内への取り込みが低下し、細胞外放出が亢進し(図7)、BLM不活化活性もHeLa細胞の1.5倍を示したが、DNA修復能はHeLa-BLM<sup>r</sup>細胞に比べさらに著しく上昇していた。一方

、cl.8では<sup>3</sup>H-PEPの細胞内取り込みの低下、細胞外放出の亢進はみられず、BLM不活化活性が1.6倍を示し、DNA修復能の著しい上昇がみられた。こゝろ3クローンを比べた限りでは、BLM耐性度は、こゝろ因子の強弱、とくにDNA修復能に比例しているようにみえる。

同様に、HeLa-mmcBLM<sup>r</sup>細胞cl.2では、やはりDNA

修復能の著しい上昇がみられることを含めて、  
HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞と同じ耐性機序を示した。

#### 4. BLM耐性細胞の他種抗癌剤に対する交叉耐性

Ling ら<sup>32)</sup> は、CHO細胞から、多段階選択法あるいはエチルメタンサルホン酸(EMS)による変異原処理により分離させた、数種のコルヒチン耐性細胞が、コルヒチンのみならずコルセミド、ビンブラスチン、ACDといった薬剤にも交叉耐性を示すことを明らかにするとともに、変異原を用いて得られた耐性細胞の方が、強い交叉耐性を有するという興味深い結果を報告している。ゆえに、BLMに116~185倍の耐性を示すこれらのBLM耐性細胞が、他の抗癌剤に対していかなる感受性を有しているかを検討し、さらに変異原処理の有無によって、他の薬剤に対してどのような感受性の変化をきたしているかを探索した。

「実験方法」で述べたように、BLM以外の



8種の抗癌剤をそれぞれ一定濃度加之，6日間培養して，得られた生存曲線から親株細胞および耐性細胞の  $ID_{50}$  を求め，その比で耐性度を表わした（表7）。その結果，BLM に20表7  
 倍の耐性を示す HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞は，BLM の誘導  
 体である PEP にも10.7倍の耐性を示した。さ  
 らに ACD に2.7倍，ADM に3.8倍，VCR に2.0  
 倍の低感受性を示したが，CPDD に対しては，  
 逆に親株細胞よりも3.1倍感受性が增大して  
 いた。MMC，5-FU，MTX については交叉耐性  
 がみられなかつた。KB-BLM<sup>r</sup> 細胞は，BLM に11.6  
 倍，PEP に12倍とほぼ同じ耐性度を示し，5-FU  
 に2.0倍，MTX に2.1倍の低感受性を示した  
 が，それ以外では2倍以上の差は認められな  
 かつた。Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では，BLM に185倍，  
 PEP に45倍，ACD に10倍，ADM に2.4倍，5-FU  
 に12.8倍，MTX に4.7倍の感受性の低下がみ  
 られた。また MMC，CPDD，VCR では感受性の  
 低下は認められなかつた。

放射線処理後に得られた HeLa 細胞由来の BLM

耐性細胞の中で、最も高い21.0倍の BLM 耐性を有する Cl.7 では、PEP に10.8倍、ADM に6.1倍、CPDD に4.3倍、5-FU に2.3倍、VCR に3.8倍の感受性の低下を示した。MMC 処理後に得られた25.2倍の BLM 耐性を有する Cl.2 においては、PEP に11.9倍、ACD に2.2倍、ADM に4.6倍、MMC に4.2倍、CPDD に3.3倍、MTX に2.0倍、VCR に3.2倍の感受性の低下を示し、変異原として用いた MMC に対しては4.2倍低感受性であった。

以上の結果から、2倍以上の薬剤低感受性を有するものを交叉耐性と考<sup>33)</sup>え、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞は4剤、KB-BLM<sup>r</sup>細胞は3剤、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞は5剤、HeLa-radBLM<sup>r</sup>細胞 Cl.7 は5剤、HeLa-mmcBLM<sup>r</sup>細胞 Cl.2 は7剤に対して交叉耐性を有することになる。

### 5. BLM 耐性細胞に対する BLM の効果増強

BLM に耐性を示し、かつ他の数種の抗癌剤に対しても耐性を有する HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞、KB-BLM<sup>r</sup>

細胞, Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞に対して, より低濃度の BLM によつて致死効果を増強できれば, 耐性細胞に対する化学療法あるいは, 少ない副作用で有効な化学療法を行う上での重要な資料を供するであろう。

これまでの実験結果から, BLM 耐性機構として, 特に①細胞内への取り込みの低下, ②細胞外放出の亢進, ③DNA修復能の著しい上昇が強く関与していると考えられる。したがって, これらの耐性機構を阻害すれば, 耐性が克服される可能性が推測される。そこで, ①細胞内への取り込みを促進させる方法として, BLM の細胞膜透過性を亢進させることが知られている小ホリエン系抗生物質<sup>34)</sup>の併用, ②細胞外放出を抑制する方法として, active efflux を阻害することにより, 抗癌剤の細胞内濃度を高めるといわれているカルシウム拮抗剤<sup>35)</sup>の併用, ③DNA修復能を低下させる方法として, DNA修復能に関与するといわれているポリ ADP リボース合成酵素に対する

阻害剤<sup>36,37)</sup>の併用により、BLMの殺細胞効果を  
を增強することが可能かと検討した。

### 1) BLMの細胞膜透過性とBLMの殺細胞効果に 対する小ポリエン系抗生物質の影響

HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞、KB-BLM<sup>r</sup>細胞、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞  
とこれらの親株細胞に<sup>3</sup>H-PEPを作用させると  
、表8に示すように30分、60分後の細胞内へ表8  
の取り込みは、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞とKB-BLM<sup>r</sup>細胞で  
は、親株細胞に比べて約40%低下しており、  
Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞では親株細胞と差がないという  
図4と同様の結果が得られた。この場合、小  
ポリエン系抗生物質の一つであるフィリピン  
を、10 µg/mlで2時間前処理すると、60分後の  
<sup>3</sup>H-PEPの細胞内への取り込みは、3種の耐性  
細胞とこれらの親株細胞とともに1.3倍~4.4倍  
増加したが、その増加率は耐性細胞で大きい  
傾向を示した。

そこで、耐性細胞に対しては全く増殖抑制  
をきたさず、親株細胞に対しては73%~83%

の増殖抑制を示す  $2 \mu\text{g/ml}$  の濃度の BLM と、 $2$ 、 $5$ 、 $10 \mu\text{g/ml}$  のフィリピンを同時に増殖培養液に加えて 6 日間培養することにより、フィリピンが BLM の殺細胞効果を増強するか否かを検討した。図 8 に示すように、 $10 \mu\text{g/ml}$  の濃度のフィリピン自体は、ほとんど細胞毒性を示さなかったが、 $2 \mu\text{g/ml}$  の BLM の殺細胞効果は、フィリピンの濃度に依存して著明に増大した。すなわち、 $10 \mu\text{g/ml}$  のフィリピンと  $2 \mu\text{g/ml}$  の BLM を併用すると、細胞生存率は、HeLa 細胞、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞、KB 細胞、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞で 3~10%、Hepd 細胞で 17%、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞でやや多い 62% であった。

## 2) BLM の細胞外放出と BLM の殺細胞効果に対するカルシウム拮抗剤の影響

Tsuruo ら<sup>38)</sup> は、ADM および VCR 耐性マウス白血球細胞を用いた実験で、カルシウム拮抗剤が抗癌剤の細胞外放出を阻害することにより、耐性細胞内の抗癌剤濃度を高め、殺細胞

効果を増強すると報告している。ゆえに、カルシウム拮抗剤が、 $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出にどのように影響をおよぼし、BLM耐性細胞においても、BLMによる殺細胞効果を増強しうるかどうかを、カルシウム拮抗剤の一つであるベラパミルを用いて検索した。

まず、3種のBLM耐性細胞およびそのらの親株細胞で、ベラパミルにより、 $^3\text{H-PEP}$  の細胞内への取り込みが影響さるかを調べた。ウエルあたり  $10^{-6}$  M の  $^3\text{H-PEP}$  と  $10 \mu\text{g/ml}$  のベラパミルを同時に添加し、60分間作用させた場合の  $^3\text{H-PEP}$  の取り込みは、全ての細胞においてベラパミルを添加しない場合より約10%上昇したが、耐性細胞は親株細胞より  $^3\text{H-PEP}$  取り込みが低いという傾向は同様であった。

そこで、3種の耐性細胞およびそのらの親株細胞において、ベラパミルが  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出にどのように影響するかを検討した。

その結果、図9に示すように、3種の耐性細胞<sup>図9</sup> および親株細胞ともに、 $10 \mu\text{g/ml}$  のベラパミ

ル添加により明らかに $^3\text{H-PEP}$ の細胞外放出は抑制された。とくに、HeLa細胞、HeLa- $\text{BLM}^{\text{r}}$ 細胞、Hepd-uv $\text{BLM}^{\text{r}}$ 細胞で著しく、60分間までに2~6倍抑制された。その他の細胞においても、1.1~3倍の抑制がみられた。この抑制率は、耐性細胞の方が、親株細胞より大きい傾向を示した。

以上のことから、ベラパミルが $^3\text{H-PEP}$ の細胞外放出を抑制することが明らかとなったので、次に、ベラパミルとBLMの併用により、BLMの殺細胞効果が増強されるか検討した。すなわち、 $2\mu\text{g/ml}$ のBLMに1~ $10\mu\text{g/ml}$ のベラパミルを同時に培養液に加えて、5日間、 $37^\circ\text{C}$ で培養後の細胞生存率を測定した。図10に示すように、HeLa細胞、HeLa- $\text{BLM}^{\text{r}}$ 細胞では、全く細胞毒性を示さない $10\mu\text{g/ml}$ のベラパミル併用により、それぞれ細胞生存率は、34%、17%に抑制された。この場合、 $2\mu\text{g/ml}$ のBLM単独では、HeLa細胞で約50%の細胞増殖抑制を認めたとが、HeLa- $\text{BLM}^{\text{r}}$ 細胞では全く増殖抑制を

認めなかった。

同様に、Hepd 細胞、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では、ベラパミル併用により、それぞれ細胞生存率は46%と37%に抑制されたが、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では65%、KB 細胞では80%でベラパミルによる殺細胞効果の増強は弱かった。この殺細胞効果の増強は、ベラパミルの濃度に依存しており、耐性細胞でより大きく、<sup>3</sup>H-PEP の細胞外放出の抑制率の大きいほど、殺細胞効果も大きい傾向を示した。

### 3) BLM の殺細胞効果に対するポリ ADP リボース合成阻害剤の影響

ポリアデノシンジホスホリボース (ポリADP リボース) は、DNA 修復促進作用をもつと報告されており<sup>39)</sup>、その合成を阻害する物質、すなわちニコチン酸アミドや m-アミノベンズアミドなどで細胞を処理することにより、細胞の DNA 修復が阻害され、また BLM のような DNA 障害をきたす抗癌剤の効果が増強され



るといわれている<sup>(40~43)</sup>。

そこで、DNA修復能が上昇しているHeLa-BLM<sup>r</sup>

細胞あるいはHepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞とDNA修復能が親

株細胞と同じであつたKB-BLM<sup>r</sup>細胞において、

ポリADPリボース合成阻害剤であるニコチン

酸アミドが、BLMの殺細胞効果を増強するか

否かを検討した。その結果、図11に示すよう

に、ほとんど細胞毒性を示さない1 $\mu$ g/mlのニ

コチン酸アミドを、2 $\mu$ g/mlのBLMと同時に培

養液に添加すると、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>

細胞では、細胞生存率がそれぞれ23%、32%

に抑制されたのに対し、KB-BLM<sup>r</sup>細胞では90%

生存した。また親株細胞に対しても同様に、

HeLa細胞、Hepd細胞では、それぞれ57%、41%

に細胞生存率が低下し、ニコチン酸アミド

併用によるBLMの効果増強が認められたが、

KB細胞では細胞生存率が93%あり、BLMの効

果増強はみられなかった。

この結果は、耐性細胞においてはそれらの

も、DNA修復能とよく一致した結果であつた。

が、親株細胞では必ずしも一致しない(四六)ことから、ニコチン酸アミドによる BLM の効果増強が、細胞のもつ DNA 修復能だけでなく、それ以外の細胞側因子にも影響を及ぼしている可能性を示唆するものと思われる。しかし、小ポリエン系抗生物質、カルシウム拮抗剤とともに、ポリ ADP リボース合成阻害剤も、BLM の効果増強に關して、今後期待のをもたらす薬剤であると言えよう。

## 考 察

## I. BLM 耐性細胞および耐性形質について

体細胞における変異株の樹立は、微生物遺伝学の理論と方法を基盤として進められ、1960年代よりまず薬剤耐性株が、ついで栄養要求株、温度感受性株、さらに放射線感受性株や薬剤感受性株などが続々と分離され、今や、体細胞遺伝学という新たな領域が確立されつつある。なかでも薬剤耐性株は、変異株全体の1/2を占め、用いられた薬剤は多種をきわめているが、BLM についての報告は未だ少ない。

BLM は、Streptomyces verticillus から得られる塩基性グリコペプチド抗生物質で、臨床に使用されている BLM は、 $A_2$  (55~70%)、 $B_2$  (25~35%) を主成分とする脱銅体の混合物であり、扁平上皮癌や悪性リンパ腫に特に有効とされている<sup>44~46)</sup>。その作用機転は、細胞内あるいは核内で  $Fe(II)$  と結合して  $BLM-Fe(II)$  となり、これに酸素分子が結合して  $BLM-Fe(III)^{2-}-O_2$

の活性型となる。この活性型 BLM から発生する $O_2$ ラジカルにより、DNA の塩基と塩基を結ぶグリコシド結合が切断され、さらに DNA の骨格をなすデオキシリボースリン酸を結ぶホスホジエステル結合が切断されて、DNA の単鎖切断がおこるとされている<sup>45)</sup>。しかし DNA の二重鎖切断をおこす場合も、単鎖切断の $1/10$ 程度は存在すると言われている<sup>47)</sup>。

一方、今日の癌化学療法において最も重要視されているものの1つに、抗癌剤に対する薬剤耐性の問題がある。近年における癌化学療法の進歩はめざましく、急性白血病やある種の固型癌では、化学療法のみでも完全緩解をみるに至っている<sup>48,49)</sup>。しかしながら、このような感受性の高い腫瘍においてすら、再発したものは先行化学療法に用いた薬剤が、効果を示さない場合も多くみられ、治療上の大きな隘路となっている。

したがって、ヒト体細胞、なかでも扁平上皮癌由来の細胞から、その腫瘍に頻用される若

効を示す BLM の耐性細胞を分離することはできず、口腔癌治療における BLM 耐性を解析する上での、きわめて有用な実験系となりうる。このような観点から著者は、すでに HeLa 細胞、KB 細胞、Hepd 細胞の 3 種のヒト扁平上皮癌培養細胞から、それぞれ BLM 耐性細胞を初めて分離し、モデル実験系を樹立した<sup>13-16)</sup>。

抗癌剤を含めた薬剤耐性株の分離および耐性機構の解析には、前述したように微生物遺伝学の理論や手法が用いられてきた。細菌における抗生物質耐性機構として Davis と Mass<sup>50)</sup> は、以下の 6 つの機構を提起している。すなわち、i) 薬剤の細胞膜透過性の低下、ii) 薬剤を不活化する酵素の上昇、または標的物質の上昇、あるいは薬剤を活性化する酵素活性の減少、iii) 阻害をうける酵素、または標的物質の上昇、iv) 阻害剤と結合する親和性の弱い変異酵素の産生、v) 阻害反応を迂回する、代替りの代謝経路の活性化、vi) 阻害をうける代謝経路の欠失、を挙げているが、これらのうち

のいくつかは、そのまま体細胞における抗癌剤耐性株にもあてはまる。これまで報告されてきた抗癌剤耐性株を大別して表9に示す。表9

さて、現在までに分離された BLM 耐性細胞において知られている BLM 耐性機構としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) から分離された低濃度 BLM 耐性細胞<sup>12)</sup> やマウスリンパ芽腫由来の L5178Y 細胞の BLM 耐性細胞<sup>11)</sup> では、BLM の細胞膜透過性が変化していることが示されている。また BLM 耐性ラット腹水肝癌細胞<sup>9)</sup> では、膜透過性に差異はみられないが、BLM 不活化酵素活性が感受性細胞より3.5倍上昇しているという報告もある。さらにこの細胞では、BLM による DNA の単鎖切断に対する修復能の上昇もみられている<sup>9)</sup>。このように、BLM の細胞膜透過性、BLM 不活化酵素活性、DNA 修復能の少なくとも3つの機構が BLM 耐性に関与していると考えられるため、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞において、これらの機構が存在するか検討

を加えた。

まず、細胞膜透過性についてであるが、現在のところ、透過性のみを正確に測定することは困難で、多くは一定時間薬剤を作用させた場合の細胞内薬剤濃度（細胞内取り込み）により表現されている。 $^3\text{H-PEP}$  を作用させた場合、細胞内取り込みは作用時間と PEP 濃度に比例して増加するが、細胞により一様ではなく、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および KB-BLM<sup>r</sup> 細胞は、親株細胞より明らかに低い取り込みを示したのに対し、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では親株との間に差を認めなかった。しかし、BLM 耐性を失った KB-BLM<sup>r</sup> 細胞の取り込みが、親株細胞のそれに回復した事実は、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞や HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞の BLM 耐性が、BLM の細胞内蓄積に強く影響していることを示している。一方、 $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出を調べると、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出の亢進がみられ、60分以内に  $^3\text{H-PEP}$  の細胞内残存は 10% 以下となったが、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では親株細

胞と同じく急速な細胞外放出がみられた。本来、短時間でみた細胞内薬剤濃度は、薬剤の細胞膜透過性と細胞外放出の相対的速度によって決定されると考えられるが、実際には単純な加除計算では表わさず、次に述べるBLM不活化酵素活性などの因子と複雑に関係しあっていると思われる。いずれにせよ、本実験に用いた条件下で検討する限り、BLM耐性細胞は、BLM耐性に関して親株細胞より明らかに有利な性格を有していた。

抗癌剤耐性と細胞膜透過性の低下の関係について、いくつかの興味深い報告がみられる。すなわち、ダウノルビシンとビンクリスチンに耐性を示すチャイニーズハムスター細胞<sup>6)</sup>では、薬剤の膜透過性が低下しており、その細胞膜には、耐性をもたない親株細胞に比べ分子量15万の糖蛋白が増加しているが、耐性を失うとこの糖蛋白が減少し、親株細胞と同じ分子量10万の糖蛋白が増加していた。また、コルヒチンの細胞膜透過性の減少により



、コルヒチン耐性となったチャイニーズハムスター卵巣細胞<sup>62)</sup>は、ビンブラスチンとアクリノマイシン<sup>D</sup>に対しても耐性を示すが、この細胞膜においても分子量17万の糖蛋白質が検出され、耐性度の増加とともにこの糖蛋白質も増加し、耐性を失うとほとんど消失するといふものである。このような細胞膜の変化が、BLM耐性細胞においても存在するかどうかは今後の研究課題と考えられる。

耐性細胞における抗癌剤の細胞外放出の亢進に関しては、エネルギー依存性の "active efflux" 系が、感受性細胞では抗癌剤の作用により阻害されるため、細胞内薬剤濃度が上昇してくるのに対し、耐性細胞では、この阻害が見られず、阻害されるためにはより高濃度の抗癌剤を必要とすると考えられているが、なお仮説の域を出ない<sup>63)</sup>。

細胞内に入ったBLMは、細胞内に存在するBLM不活化酵素により、多かれ少なかれ不活化される。BLMは、血中においてCu(II)と結合

し安定した錯塩を作り、細胞に達した後、細胞内で BLM-Cu(I) に還元されるが、Cu(II) と結合していない BLM は、BLM 不活化酵素である BLM 加水分解酵素により、アミド部分が加水分解され desamido BLM となる。この酵素活性は、生体内では皮膚、肺に少ないため、BLM 投与による皮膚の硬化や肺線維症などの副作用が出現しやすい反面、皮膚癌や頭頸部癌には著効を示すゆえんとされている。このことは、20-メチルコラントレンでマウスに誘発された扁平上皮癌は、同様にして誘発された肉腫に比べ、BLM の細胞内への取り込みが3倍高く、しかも BLM 不活化酵素活性が有意に低いことから、扁平上皮癌に取り込まれた BLM の70% は活性型であるのに対し、肉腫では活性型が10% 以下であるという報告<sup>64)</sup>によっても裏付けられる。ゆえに、BLM 不活化酵素活性はその細胞の BLM 感受性を左右する要因の一つと考えられる。この酵素活性は、BLM 耐性ラット腹水肝癌細胞<sup>9)</sup>で、親株細胞の35倍、

チャイニーズハムスター細胞の BLM 耐性株においても 3~4 倍上昇していることが報告された<sup>10)</sup>、これらの細胞では、BLM の膜透過性に差がないため、本酵素活性の上昇が主たる耐性機序であると結論されている。一方、軟寒天中でのコロニー形成能を有するヒト腫瘍細胞においては、コロニー形成率で調べた BLM 感受性と、BLM 不活化酵素活性の間には相関関係がないという報告もみられる<sup>15)</sup>。

B. subtilis PCI 219 株を用いた bioassay で BLM 不活化活性を測定した本実験では、Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞を除くいずれの耐性細胞も、親株細胞の 1.5~1.9 倍の値を示したが、有意の上昇とは断定できなかった。しかし、すでに報告した<sup>15)</sup> ように、低い活性とはいえ、不活化活性が蛋白濃度に比例して増加し、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞が HeLa 細胞より常に上まわった値を示したことから、本活性が、BLM 耐性に関与していることが示唆される。ちなみに、臨床的にもまた in vitro においても、BLM に感受性の低い唾液腺

癌や悪性黒色腫由来の細胞が、HeLa 細胞や KB 細胞に比べ 3~6 倍高い不活化活性を示したことを付記しておく<sup>66)</sup>。BLM 不活化活性を測定するために bioassay を用いたが、検出感度の点からいえば、高速液体クロマトグラフィーによる不活型 desamido BLM 測定法も考慮すべき問題と考えられる。

このようにして、細胞膜透過性、細胞内 BLM 不活化酵素という 2 つの関内を通過した BLM は、核内に入り DNA に作用するのであるが、Miyaki ら<sup>67)</sup>によれば、ラット腹水肝癌細胞では細胞内に取り込まれた BLM のうち、核内に移行するものは 15~30%、DNA と実際に結合するのは 1% 以下であるという。BLM による DNA 鎖切断により、DNA 複製が妨げられる結果、細胞に致死的效果が与えられるが、BLM によって生じた DNA 障害が修復されれば、その細胞は生存しうる。哺乳動物細胞の DNA 修復機構は、細菌のそれと比べて未だ不明な点が多いが、現在のところは、少なくとも除去修復（

excision repair) と複製後修復 (postreplication repair) の二つの機構が存在するといわれている<sup>68)</sup>。すなわち除去修復過程は、UV照射により生じたピリミジンダイマーの修復に代表され、①エンドヌクレアーゼによるダイマーの切り出し、②DNAポリメラーゼによる新たなDNA鎖の合成、③DNAリガーゼによる再接合により修復が完了する。ヒトでは、除去修復過程におけるエンドヌクレアーゼ欠損をもつ遺伝病として、色素性乾皮症 (Xeroderma pigmentosum) があり、UVをうけることにより高率に皮膚癌が発生することがよく知られている。この酵素は、BLMによるDNA鎖切断の際にも活性化されることが報告されている<sup>69)</sup>。複製後修復は、組み換え、複製、誘導性、DNA修復などを含む複雑な過程から成り、主として二重鎖切断の修復に関与していると考えられている。色素性乾皮症の亜型について、同修復過程の欠損であることが報告されているが、未だ十分に明らかではない<sup>69)</sup>。したがって、

細胞の DNA 修復能を検討する1実験系として、UV照射による細胞の不活化がよく用いられてきた。本研究においても、同様にして BLM 耐性細胞の UV に対する DNA 修復能を調べた。その結果、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞において、著しい DNA 修復能の上昇がみられた。Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞は、その分離過程において UV 照射後に樹立された耐性細胞であるので、この上昇も容易に理解しうるが、多段階選択法によって樹立された HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞の場合にも、上昇がみられたことは興味深い。BLM は DNA 修復に関与する DNA リガーゼ活性を阻害することから、ラット肝癌細胞で認められている<sup>70)</sup>が、耐性細胞においてこの DNA リガーゼの量あるいは質が変化しているのか、あるいは DNA ポリメラーゼ活性が上昇しているのかなど今後明らかにしなければならない。

以上の結果から、表3にまとめたように、BLM 耐性機構には BLM の細胞内への取り込み(細胞膜透過性)と細胞外放出、BLM 不活化

活性，DNA修復能が複数で関与していることが明らかとなったが，組織学的に同じ扁平上皮癌由来の細胞であっても，3種の耐性細胞は，それぞれ異なる耐性機構を有していた。このことを臨床的な観点で見た場合，耐性細胞に対する化学療法がいかに困難であることを表わしているように思われる。

緒言でも述べたように，多段階選択法によつて，幸いにも2種のBLM耐性細胞を得ることができたが，一般的には薬剤耐性株を効率よく分離するために，変異原処理が用いられている<sup>21)</sup>。変異原として，UVの他にN-メチル

-N'-ニトロ-N'-ニトロソグアニジン(MNNG)，エチルメタンサルホン酸(EMS)などの化学物質がよく知られているが，放射線やMMC，ADMなどの抗癌剤<sup>22)</sup>もその中に含まれている。癌治療においては，抗癌剤を単独で使用するよりはむしろ少なく，放射線療法やBM療法<sup>31)</sup>などの多剤併用療法が行われている現状を考へ合わせると，ある条件下では生体内において

も高率に薬剤耐性細胞を誘発している可能性も全く否定することはできない。

そこで、UV、放射線、MMCの3種の変異原を用いて、HeLa細胞におけるBLM耐性細胞の出現率を検索した(表4)。驚くべきことに、3種の変異原処理により、BLM耐性細胞は容易に分離されるばかりでなく、多段階選択法に比べて1万倍~5万倍の著しい出現率の増大を認められた。しかし、いずれの変異原処理によっても、耐性細胞の出現率はほとんど同じオーダーで、dose responseも明らかでなかった。さらに、変異原処理によって誘発されたBLM耐性細胞を、無作為に分離してBLM耐性度を検討したが、特に高い耐性度を示すものではなく、多段階選択法で分離したHeLa-BLM<sup>r</sup>細胞と同程度であった。加えて、これらのうちから代表的な4クローンについてBLM耐性機構を調べると、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞のそれと同じ傾向を示した。ただ、いずれの耐性細胞もDNA修復能については、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞よりもさら



に著しい修復能の増大がみられた。UV照射後に分離した Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞と同様に、放射線、および放射線類似作用物質である MMC を用いたため、DNA 修復能の著しい増大がみられたとも考えられるが、逆に DNA 修復能の高い細胞が BLM 耐性細胞として選択されたとも考えられる。HeLa-radBLM<sup>r</sup> 細胞の 3 クロソンの耐性度が、DNA 修復能の強さに伴って上昇していた結果は興味深い。

そのほか、これらの BLM 耐性細胞は、そのほかの親株細胞から、はたして突然変異 (mutation) によって分離されたものであろうか、あるいは後成的変異 (epigenetic change) のような非遺伝的変異をうけた後の適応 (selection) により分離されたものであろうか。桑野らは、体細胞系で異常な表現形質を示す株が、その形質を安定に世代をくり返す限り、広義の突然変異株と考えてよいと述べている<sup>7)</sup>。現在のところ、このような説が主流となっているが、この説にしたがえば、30代以上の BLM 無添

加培養においても耐性形質を保持している HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞と Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞は、突然変異によつて生じたものと考えてよいかもしれない。しかしながら、耐性形質が不安定で、継代により容易に野生株にもどったり、自然突然変異率が異常に高かったり、耐性細胞の出現率が細胞の倍数性に無関係におこるような薬剤耐性株は、その耐性形質が遺伝的变化によるというより、むしろ後成的変化によると考えられている<sup>73-78)</sup>。継代により容易に野生株にもどるといふ点では、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞の BLM 耐性形質は、後成的変化によると考えられる。ただ、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞の BLM 耐性が遺伝的变化であるとしても、染色体数モードを変える程、大きな変異でないことは、すでに報告した<sup>14)</sup>。同様のことを、UV、放射線、MMC 処理により高率に誘発された BLM 耐性細胞 (表 4) についても考察してみると、誘発突然変異率が異常に高いこと、変異原処理に対する dose response がみられないこと、DNA に対する作用機作の

異なるいずれの変異原によっても耐性細胞出現率が同一のオーダーで見られることから、突然変異によるというよりむしろ後成的変異によると考えた方が合理的と思われれるが、これを確定するためにはさらに詳細な解析を必要とする。

さて、ある薬剤に耐性となった細胞は、その化学構造や作用機作が類似している他の薬剤に対しても、交叉耐性を示すことがあるが、また逆に交叉耐性が成立すれば、これらの薬剤間の化学構造や作用機作が、きわめて近い関係にあると考えられる。実験的に、これまで分離された抗癌剤耐性細胞においては、耐性を誘導した薬剤とは別の薬剤に対して、逆にその感受性が増大するいわゆる附随感受性が存在することも指摘されてきた<sup>4)</sup>。しかしこの現象はむしろ少数で、臨床的にもある特定の薬剤にほとんど感受性を失った腫瘍に対して、化学構造や作用機作の異なる抗癌剤を投与しても、これらの薬剤に対してさ之

抵抗性を示す場合が多く経験される。このよ  
うな予めて理解の困難な現象に対して、Bi-  
edler らは ACD 耐性チャイニーズハムスター線  
維芽細胞を用いて、in vitro における交叉耐性  
を検討し、ACD とは異った作用機構をもつ Mi-  
thramycin, VLB, VCR, Puromycin, DAU, Deme-  
colin, MMC の各薬剤にも交叉耐性が存在する  
ことを示した<sup>51)</sup>。その後同様の報告は相つき  
32, 79-81), 特に Johnson ら<sup>82)</sup> は、ADR 耐性 P388 細  
胞 (マウス白血病細胞) において、73 種の各  
種抗癌剤の交叉耐性を in vivo で解析し、ADR  
と同じ DNA 合成阻害剤はもちろんで、蛋白合成  
阻害剤や有糸分裂阻害剤にいたる 42 種もの広  
範な薬剤に対して、耐性を示すことを明らか  
にした。また Shoemaker らは、強力な併用化学  
療法を行ってヒト肺小細胞癌から分離した細  
胞においても、9 種の他薬剤に対して広範な  
交叉耐性が存在することを報告している<sup>83)</sup>。  
本実験における、BLM 耐性細胞も同様に、3  
種から 7 種の抗癌剤に対して 2 倍以上の交叉

耐性がみられた。これらの耐性細胞では、交叉耐性を示す薬剤の数は、変異原処理を行ったものほど多かった。交叉耐性を示す抗癌剤の中で、PEPのみが同系統の抗癌剤であったが、それ以外のDNA合成阻害剤（ACD，ADM，MMC，CPDD），代謝拮抗剤（5-FU，MTX），有糸分裂阻害剤（VCR）にも耐性がみられた。これらの中で最も交叉耐性の少なかったのはMMCで、HeLa-mmcBLM<sup>F</sup>細胞Cl.2のみが耐性を示した。化学構造や作用機作の全く異なる抗癌剤のみならず、非抗癌剤にもおよぶ広範な薬剤に対する交叉耐性を示す機序として、稲葉<sup>63)</sup>は、耐性細胞では前述した active efflux 系の阻害をうけにくく、エネルギー依存性に放出される薬剤に対しては、非特異的に細胞外放出が行われるためであるという説を提起している。

## II. BLM 耐性細胞に対する, BLM の効果増強について

緒言でも述べたように, 抗癌剤に対する耐性を克服する方法を開発することは, とりもなおさず癌化学療法 of 改善と患者の予後に直結する重大な課題といえる。現在までの解析の結果, 細胞膜透過性および DNA 修復能が, BLM 耐性機構として大きな位置を占めることが明らかとなった。ゆえに, これらの耐性機構を阻害することができれば, BLM 耐性細胞は BLM に再び感受性を示し, 耐性が克服される可能性も考えられる。そこで, i) BLM の細胞内への取り込みを促進する小ポリエン系抗生物質であるフィリピン, ii) VCR, ADM などの細胞外放出を抑制することが知られているカルシウム拮抗剤であるベラパミル, iii) DNA 修復能に関与すると考えられているポリ ADP リボース合成酵素の阻害剤であるニコチン酸アミドについて, BLM の殺細胞効果に対する影響を検討した。

BLM は、細胞内外に生ずる濃度差により、細胞膜に存在する channel や pore を介して、受動的に細胞内へ移行するとされている<sup>84)</sup>。この膜輸送を変化させる薬剤の一つとして、抗真菌抗生物質である小ホリエン系抗生物質があり、フィリピン、ピマリシン、ペンタマイシンが知られている<sup>85)</sup>。ちなみに、アンホテリシン B や ナイスタチン などの大ホリエン系抗生物質は、5-FU、BCNU や 6-MP などの抗癌剤の膜透過性を亢進させることが明らかにされている<sup>86)</sup>。これらの薬剤は、細胞膜中のステロールと特異的に複合体を形成し、細胞膜にいわゆる pit や pore をつくと報告されている<sup>86, 87)</sup>。事実、in vitro において 5-FU とアンホテリシン B との併用により、それぞれ単独では全く殺細胞効果のない濃度で、マウス白血病細胞 L5178Y の増殖が著しく阻害される<sup>88)</sup>し、in vivo においても、ニトロソウレア系抗癌剤である BCNU や CCNU とアンホテリシン B との併用は、AKR 白血病やマウス脳腫瘍の増殖を抑

之、延命相乗効果を示すことが報告されてい  
 る<sup>89,90)</sup>。同様に、チャイニーズハムスター細胞  
 V79において、フィリピンやピマリシンがBLMの  
 細胞内取り込みを促進することにより、殺細  
 胞効果を増強し<sup>34)</sup>、またベンタマイシンとBLM  
 の併用に於り in vitro でラット線維芽細胞<sup>91)</sup>が  
 、ピマリシンとBLMの併用によって in vivo で  
 マウスエールリツヒ腹水癌<sup>92)</sup>が、それぞれ著  
 明に増殖抑制をうけることが示されている。

本研究においても、3種のBLM耐性細胞への  
<sup>3</sup>H-PEPの取り込みは、フィリピンの添加によ  
 り2-4倍増加し、単独では全く増殖抑制を  
 示さない2 $\mu$ g/mlのBLMによって、フィリピン  
 の濃度に依存した著しい増殖抑制が認められ  
 た。<sup>3</sup>H-PEPの細胞内取り込みでみたフィリピ  
 ンの増強効果は、耐性細胞で高い傾向を示し  
 たが、増殖抑制効果は、BLM高感受性の親株  
 においても認められた。これらの結果から、  
 ヒト扁平上皮癌細胞およびそのBLM耐性  
 細胞に対しても、フィリピンがBLMの殺細胞



効果を増強することが明らかとなった。

次に、カルシウム拮抗剤で、冠状動脈拡張として循環器疾患治療に頻用されているベラパミルとの併用効果であるが、Tsuruo らは、カルシウム拮抗剤や、細胞内のカルシウム受容蛋白であるカルモデュリン阻害剤が、VCR および ADM 耐性マウス白血病細胞 P388 の細胞内 VCR や ADM 濃度を高めることにより、in vitro および in vivo における殺細胞効果を増強することを示した<sup>35,38)</sup>。ベラパミルは、シゼルピンやリドカインなどと同様、active efflux 阻害剤<sup>63)</sup> の一つであることから、active efflux にカルシウムが関与している可能性が示唆されている<sup>63)</sup>。BLM 耐性細胞においても、同様にベラパミル添加により <sup>3</sup>H-PEP の細胞外放出が抑制されるということが明らかとなったが、各々の親株細胞における放出も抑制されていた。しかし、HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では、耐性細胞の方が親株細胞よりも、より強い放出の抑制をうけるという興味ある結果を得た

。この結果は、ベラパミルを添加した条件下での細胞増殖抑制効果とよく一致していた。

最後に、ポリ ADP リボース合成酵素阻害剤であるニコチン酸アミドとの併用に因してであるが、クロマチン結合蛋白であるポリ ADP リボース合成酵素は、 $\text{NAD}^+$  からポリ ADP リボースが生成される過程を触媒する酵素で、DNA 損傷や DNA 鎖の切断などがおきると、この酵素活性は上昇するといわれ、しかもその上昇は、不定期 DNA 合成や DNA 修復の上昇とよく一致することが知られている<sup>36, 39~41</sup>。また

た Xeroderma pigmentosum の細胞と Micrococcus luteus の UV endonuclease を用いた実験で、UV 照射後の DNA 修復にポリ ADP リボース合成が必要であることも示されている<sup>(40)</sup>。ニコチン酸アミドやその類似物質は、ポリ ADP リボース合成酵素を阻害することにより、DNA 修復過程を妨害したり、ニトロソウレアのような DNA に傷害を与える薬剤の効果を増強することが報告されている<sup>36, 37, 39~43</sup>。一方、この酵

素の活性は、ヒトの癌細胞では上昇しており、放射線、UV、BLM やアルキル化剤の処理によつて切断された DNA 鎖の修復に、ホリ ADP リボースが働いているとの報告もある<sup>93)</sup>。もしホリ ADP リボース合成が、DNA 修復の過程にとって必須のものであれば、ホリ ADP リボース合成酵素の活性を低下させることにより、DNA 修復は阻害されるであろうし、その結果、DNA 損傷をもたらすような抗癌剤の効果を増強することになると推察される。

このような観点から、ホリ ADP リボース合成酵素活性阻害剤のニコチン酸アミドを培養液に添加し、BLM 耐性細胞に対する BLM の増殖抑制効果を検討したところ、DNA 修復能が親株細胞よりそれぞれ 24.5 倍、93.5 倍上昇している HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞と Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞においては、ニコチン酸アミド添加により著しい増殖抑制がみられ、DNA 修復能の著明な低下がうかがわれた。また DNA 修復能の上昇がみられない KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では、ニコチン酸アミド添加

によ、ても増殖抑制はみられず、DNA修復にはホリADPリボース合成が強く関与していることが示された。しかし、親株細胞については、図6に示したようにHeLa、KB、Hepdの順にUV感受性であったのに対し、ニコチン酸アミドの併用効果はHepdとHeLa細胞でみられたものの、KB細胞ではみられなかったことから、DNA修復能に関しても、ホリADPリボース合成酵素のみでは理解しがたい点は残されている。

さて、以上の3種の薬剤とBLMの併用により、BLMの殺細胞効果は著しく増強され、少なくとも in vitro においてはBLM耐性が克服しうるように思われる。これらの基礎的な知見から、一部については臨床応用が試みられている。すなわち、上顎癌患者に対してベンタマイシンとBLMを混合した軟膏の局所塗布<sup>94)</sup>が行われたり、再発性非ホジキンリンパ腫に対するvinca alkaloidとCa拮抗剤のNicardipineの併用<sup>95)</sup>や、Vindesine sulfate (VDS)とCPDDに抵抗性の

食道扁平上皮癌に、VDS、CPDD と Ca 拮抗剤の Nicardipine を併用する試み<sup>96)</sup>がなされ、部分的にはあるが、効果増強が可能であることが示されている。軟膏の局所塗布については、腫瘍深部への到達が困難であったり、全身投与では腎機能低下などの強い副作用があるため、なお臨床応用には、解決すべき問題が多く残されている。しかし、これらの試みは、より少ない副作用で効率よく癌細胞を死滅させ、抗癌剤耐性をも克服するという点から、癌化学療法の実進には必須であると考えられる。本研究において明らかにされたヒト扁平上皮癌培養細胞の BLM 耐性機構と耐性克服についての試みも、今後さらに *in vivo* での検討を加え、臨床応用への可能性を追求することにより、癌化学療法の改善に必ずや寄与するものと考えられる。

## 結 論

ヒト扁平上皮癌培養細胞から、さきに分離・樹立した3種類の BLM 耐性ヒト扁平上皮癌細胞 ( HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞, KB-BLM<sup>r</sup> 細胞, Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞 ) を用いて, BLM 耐性機構の比較検討ならびに BLM 耐性細胞出現におよぼす変異原処理の影響を検索するとともに, BLM 耐性細胞に対する抗癌剤の効果増強についての解析を試み, 以下の結果を得た.

1) BLM 誘導体である <sup>3</sup>H-PEP の細胞内への取り込みは, 親株細胞に比べて, HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では約40%低下していたが, Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では差はみられなかった。

2) 細胞内に取り込まれた <sup>3</sup>H-PEP の細胞外放出は, HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞と Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞において, 親株細胞よりも速やかな <sup>3</sup>H-PEP 放出がみられたが, KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では放出の差異はみられなかった。

3) B. subtilis PCI 219 株を用いた bioassay より,

細胞内不活化活性を検討したところ、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞、KB-BLM<sup>r</sup>細胞は、親株細胞の1.6倍および1.9倍の活性値を示したが、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞では0.9倍であった。

4) DNA修復能の指標としてUV照射後の細胞生残率を求め、親株細胞と比較すると、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞は60秒照射時で24.5倍、Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞は45秒照射時で93.5倍の細胞生残率の上昇を示したが、KB-BLM<sup>r</sup>細胞では差は小さかった。

5) HeLa細胞に変異原処理を行い、BLMを加えて培養したところ、BLM耐性細胞出現率はUV照射により約2万倍、放射線照射により1~2万倍、さらにMMC処理では3~5万倍上昇した。

6) HeLa細胞を放射線およびMMC処理し、BLM存在下で培養後、無作為に分離した237クローンのBLM耐性度は、放射線照射で6.4~21.0倍、MMC処理で13.8~25.2倍であった。これらのうちの代表的な47クローンのBLM耐性

機構は、一部の例外はみられたものの HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞のそれとほぼ同様であった。

7) いずれの BLM 耐性細胞も、BLM 誘導体の PEP には 10 倍以上の耐性を示したほか、2-6 剤の他種抗癌剤に対しても 2 倍以上低感受性を有していた。この場合、変異原処理後に分離された耐性細胞ほど多剤耐性を示したが、抗癌剤の種類に特異性はみられなかった。

8) ファイリピン添加により、各耐性細胞の <sup>3</sup>H-PEP 取り込みは 2-4 倍上昇し、さらに BLM とファイリピンをともに加えて培養すると、各耐性細胞は著しい増殖抑制をうけた。

9) ベラパミル処理によって各耐性細胞は、いずれも <sup>3</sup>H-PEP の取り込みが上昇し、かつ BLM とベラパミルの併用によって HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞と Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞では、親株細胞に比して著明な増殖抑制がみられたが、KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では親株細胞と差はなかった。

10) ニコチン酸アミドと BLM を同時に添加して



培養すると、HeLa-BLM<sup>r</sup>細胞と Hepd-uvBLM<sup>r</sup>細胞は、著しくその増殖が抑制されたが、KB-BLM<sup>r</sup>細胞では抑制がみられなかった。

以上の結果から次のことが結論されよう。

- 1) BLM 耐性ヒト扁平上皮癌培養細胞における BLM 耐性機構は、BLM 膜透過性、BLM 不活性化活性、DNA 修復能の3つの機構が、程度の差はあるものの単独あるいは複数で関与していることが明らかになった。
- 2) 変異原処理により、BLM 耐性細胞の出現頻度が著しく上昇することが示された。
- 3) 細胞膜修飾物質や DNA 修復阻害物質の併用によつて、in vitroにおいて BLM 耐性が克服される可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えら  
れご指導を賜った宮崎 正教授、本研究の実  
施に際し、終始かゆらぬご指導をいただいた  
口腔外科学第一講座浦出雅裕博士に心から謝  
意を表します。ご校閲と適切なご助言をいた  
だいた口腔外科学第二講座作田正義教授に深  
謝致します。また、研究の円滑な進展のため  
に特別のご配慮をいただいた口腔外科学第一  
講座の教室員の方々に深謝致します。

なお、本研究は恩師宮崎 正教授の停年退  
官（1986年）記念研究計画の一環として行  
ったものである。

Study on the Mechanism of Bleomycin Resistance  
Acquired in Cultured Human Epidermoid  
Carcinoma Cells

Masakazu SUGI

The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery  
Osaka University Faculty of Dentistry  
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: Human epidermoid carcinoma cells  
BLM resistant sublines  
Resistant mechanism  
Overcoming of resistance

Three kinds of BLM resistant strains from human epidermoid carcinoma cell lines were established in vitro by a multistep selection with increasing concentrations of BLM (0.1-1  $\mu\text{g/ml}$ ). These strains were designated as HeLa-BLM<sup>r</sup>, KB-BLM<sup>r</sup> and Hepd-uvBLM<sup>r</sup>, respectively, and were investigated to elucidate the possible mechanisms of BLM resistance: i) membrane permeability of BLM, which was examined as the uptake and efflux of <sup>3</sup>H-PEP, a new BLM derivative, ii) BLM-inactivating activity of cell extracts by bioassay for antibacterial activity with B. subtilis PCI 219 strain, and iii) DNA repair activity after UV irradiation.

Consequently, HeLa-BLM<sup>r</sup> and KB-BLM<sup>r</sup> cells showed about 40 % reduction in <sup>3</sup>H-PEP uptake, and HeLa-BLM<sup>r</sup> and Hepd-uvBLM<sup>r</sup> cells showed the elevated level of <sup>3</sup>H-PEP efflux as compared to the parental cells. KB-BLM<sup>r</sup> cells, which had lost BLM resistance by 30 cell passages in BLM-free medium, demonstrated the recovered uptake of <sup>3</sup>H-PEP to the same extent as that of the parental cells. Assay for BLM-inactivating activity of cell extracts revealed that HeLa-BLM<sup>r</sup> and KB-BLM<sup>r</sup> cells contained 1.6 to 1.9-fold higher activity than did their parental cells. Further, HeLa-BLM<sup>r</sup> and Hepd-uvBLM<sup>r</sup> cells were found to be much more resistant to UV irradiation than their parental cells, indicating that these two resistant cells carry the high DNA repair activity.

From these findings, it was indicated that above three factors at least were involved in the BLM resistance.

When effect of treatment of HeLa cells by mutagens such as UV, X-ray and mitomycin C (MMC) on the frequency of emergence of BLM-resistant cells was examined, it resulted in the tremendous enhancement of 10,000-30,000 fold as compared with the frequency by a multi-step selection. Twenty three BLM-resistant clones (HeLa-radBLM<sup>r</sup>, HeLa-mmcBLM<sup>r</sup>) isolated from the colonies formed after X-ray and MMC treatment exhibited 6.4 to 25.2-fold degree of BLM resistance, comparable to that of HeLa-BLM<sup>r</sup> cells. Typical few clones of HeLa-radBLM<sup>r</sup> and HeLa-mmcBLM<sup>r</sup> cells examined demonstrated the same mechanisms of BLM resistance as those of HeLa-BLM<sup>r</sup> cells.

Cross resistance of these BLM-resistant cells against eight kinds of antitumor agents was examined. As a result, all of five resistant cells examined carried the cross resistance against three to seven agents when estimated for those with more than two-fold degree of resistance.

To attempt the overcoming of BLM resistance in vitro, combined effect of non-antitumor agents with BLM was tested. Filipin, an antifungal polyene antibiotic, and Verapamil, a calcium antagonist, stimulated <sup>3</sup>H-PEP uptake and efflux, respectively, and promoted cytocidal effect of BLM to three BLM-resistant cells markedly. Furthermore, nicotinamide,

an inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, enhanced the cell killing by BLM of HeLa-BLM<sup>r</sup> and Hepd-uvBLM<sup>r</sup>, which carried the high DNA repair activity, but not of KB-BLM<sup>r</sup> cells.

## 文 献

- 1) 市川篤二 (1969): 新しい制癌剤ブレオマイシン—扁平上皮癌に対する特効について—。  
日本臨床, 27, 1618-1626, 昭和44.
- 2) Ichikawa, T., Matsuda, A., Yamamoto, K., Tsubosaki, M.,  
Kaihara, T., Sakamoto, K. and Umezawa, H. (1967): Biological  
studies on Bleomycin A. J. Antibiotics, Ser. A 20, 149-155.
- 3) 塚越 茂 (1980): 癌化学療法における基礎的  
問題; 癌化学療法の基礎と臨床 (古江 尚,  
太田和雄, 田口鉄男, 藤田 浩, 塚越 茂  
編). 初版, 蟹書房, 東京, 45-52, 昭和  
52.
- 4) 田中 信男 (1980): 抗癌抗生物質の耐性機構。  
癌と化学療法, 7, 1889-1899, 昭和55.
- 5) 櫻井 欽夫 (1983): 制癌剤の開発の回顧と反省。  
癌と化学療法, 10, 1087-1093, 昭和58.
- 6) 瀬野 悌二 (1982): 体細胞変異株一覽。蛋白質,  
核酸 酵素. 27, 1069-1083, 昭和57.
- 7) 桑野 信彦, 秋山 伸一, 池崎 清信, 益田 明典,  
樋高 克彦, 小野 真弓 (1982): 薬剤耐性変異株

と栄養要求変異株。蛋白質，核酸，酵素

27, 1325-1341, 昭和57.

8) 木村英一，加納永一(1972): 培養マウスL細胞におけるブレオマイシン耐性誘導の研究  
最新医学, 27, 1452-1454, 昭和47.

9) Miyaki, M., Morohashi, S. and Ono, T. (1973) : Single strand scission and repair of DNA in Bleomycin-sensitive and resistant rat ascites hepatoma cells. J. Antibiotics., 26, 369-373.

10) Akiyama, S. and Kuwano, M. (1981) : Isolation and preliminary characterization of Bleomycin-resistant mutants from Chinese hamster ovary cells. J. Cell. Physiol., 107, 147-153.

11) Suzuki, H., Nishimura, T. and Tanaka, N. (1981): Drug sensitivity and some characteristics of a Bleomycin-resistant subline of mouse lymphoblastoma L5178Y cells. J. Antibiotics., 34, 1210-1212.

12) Brabbs, S. and Warr, J.R. (1979): Isolation and characterization of bleomycin-resistant clones of CHO cells. Genet. Res. Camb., 34, 269-279.

13) 杉 政和，浦出雅裕，白砂兼光，白井 誠，  
決田 傑，宮崎 正 (1982): ヒト扁平上皮癌



細胞のブレオマイシン耐性獲得に関する研究。第1報。ブレオマイシン耐性 HeLa 細胞の樹立。日口外誌, 28, 1905-1908, 昭和57.

14) 杉 政和, 浦出雅裕, 白砂兼光, 臼井 誠, 浜田 傑, 宮崎 正 (1983): ヒト扁平上皮癌細胞のブレオマイシン (BLM) 耐性獲得に関する研究。第2報。BLM 耐性 HeLa 細胞によりヌードマウスに形成させた腫瘍の BLM 感受性と耐性形質の安定性。日口外誌, 29, 653-657, 昭和58.

15) 浦出雅裕, 杉 政和, 白砂兼光, 臼井 誠, 浜田 傑, 宮崎 正 (1983): ヒト扁平上皮癌細胞のブレオマイシン (BLM) 耐性獲得に関する研究。第3報。BLM 耐性 HeLa 細胞の BLM 耐性機序。日口外誌, 29, 860-864, 昭和58.

16) 杉 政和, 浦出雅裕, 浜田 傑, 宮崎 正 (1983): ヒト扁平上皮癌細胞のブレオマイシン (BLM) 耐性獲得に関する研究。第4報。ヒト口腔癌培養細胞からの BLM 耐性細胞の樹立。日口外誌, 29, 1549-1554, 昭和58.

- 17) Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T. (1952):  
Tissue culture studies of the proliferative capacity  
of cervical and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12,  
264-265.
- 18) Eagle, H. (1955): Propagation in a medium of a human  
epidermoid carcinoma, strain KB. *Proc. Soc. Exp. Biol.  
Med.*, 89, 362-364.
- 19) Eagle, H. (1955): Amino acid metabolism in mammalian  
cell cultures. *Science*, 130, 432-437.
- 20) Ohnoshi, T., Ohnuma, T., Takahashi, I., Scanlon, K.,  
Kamen, B.A. and Holland, J.F. (1982): Establishment  
of methotrexate-resistant human acute lymphoblastic  
leukemia cells in culture and effects of folate  
antagonists. *Cancer Res.*, 42, 1655-1660.
- 21) 小山秀機 (1982): 培養体細胞の突然変異株樹  
立法. 蛋白質, 核酸, 酵素, 27, 1174-1186,  
昭和 57.
- 22) Kaltenbach, J.P., Kaltenbach, M.H. and Lyons, W.B. (1958):  
Nigrosin as a dye for differentiating live and dead  
ascites cells. *Exp. Cell. Res.*, 15, 112-117.
- 23) Dulbecco, R. and Vogt, M. (1954): Plaque formation and  
isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.  
*J. Exp. Med.*, 99, 167-182.

- 24) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 25) 海老原和雄, 浴本久雄, 一町田裕子, 毎部史紀, 井上博, 青柳祥子, 山下巧, 小結明子, 高橋克俊, 吉岡修, 松田明.  
(1978): 硫酸ペプトレオマイシン(NK631)の抗菌性, 抗腫瘍性, および肺線維化能に関する基礎的研究. *Jap. J. Antibiotics*, 31, 872-885.  
昭和53.
- 26) Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N. and Umezawa, H. (1969): On the mechanism of action of Bleomycin: Scission of DNA strands in vitro and in vivo. *J. Antibiotics*, 22, 446-448.
- 27) Iqubal, Z.M., Kohn, K.W., Ewing, R.A.G. and Fornace, J.Jr. (1976): Single-strand scission and repair of DNA in mammalian cells by bleomycin. *Cancer Res.*, 36, 3834-3838.
- 28) Akiyama, S., Ikezaki, K., Kuramochi, H., Takahashi, K. and Kuwano, M. (1981): Bleomycin-resistant cells contain increased bleomycin-hydrolase activities. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 101, 55-60.

- 29) Setlow, R.B. and Setlow, J.K. (1962): Evidence that ultraviolet-induced thymidine dimers in DNA cause biological damage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 48, 1250-1257.
- 30) 武部 啓 (1983): 宿主細胞回復; DNA 修復。初版, 東京大学出版会, 東京, 101-102, 昭和 58。
- 31) Miyamoto, T., Takebe, Y., Watanabe, M. and Terashima, T. (1978): Effectiveness of a sequential combination of bleomycin and mitomycin-C on an advanced cervical cancer. Cancer, 41, 403-414.
- 32) Ling, V. and Thompson, L.H. (1983): Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. J. Cell. Physiol., 83, 103-116.
- 33) Gupta, R.S. (1983): Genetic, biological and cross-resistance studies with mutants of Chinese hamster ovary cells resistant to the anticancer drugs, VM-26 and VP16-213. Cancer Res., 43, 1568-1574.
- 34) Akiyama, S., Hidaka, K., Komiyama, S. and Kuwano, M. (1979): Control of permeation of bleomycin A<sub>2</sub> by polyene antibiotics in cultured Chinese hamster cells. Cancer Res., 39, 5150-5154.

- 35) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y.  
(1981): Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. Cancer Res., 41, 1967-1972.
- 36) Berger, N.A., Sikorski, G.W., Petzold, S.J. and Kurohara, K. (1979): Association of poly(adenosine diphosphoribose) synthesis with DNA damage and repair in normal human lymphocytes. J. Clin. Invest., 63, 1164-1171.
- 37) 福島和典, 加藤武俊, 太田和雄 (1983): ADP リボース合成阻害剤による DNA 障害性抗腫瘍剤の効果増強, 日本癌学会記事, 21, 昭和 58.
- 38) Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagohsi, S. and Sakurai, Y.  
(1982): Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P388 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Res., 42, 4730-4733.
- 39) Durkacz, B.W., Omidiji, O., Gray, D.A. and Shall, S.  
(1980): (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair. Nature, 283, 593-596.

- 40) Berger, N.A. and Sikorski, G.W. (1981): Poly(adenosine diphosphoribose) synthesis in ultraviolet-induced xeroderma pigmentosum cells reconstituted with Micrococcus luteus UV endonuclease. *Biochemistry*, 20, 3610-3614.
- 41) Smulson, M.E., Schein, P., Mullins, D.W. and Sudhakar, S. (1977): A putative role for nicotinamide adenine dinucleotide-promoted nuclear protien modification in the antitumor activity of N-methyl-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, 37, 3006-3012.
- 42) Nduka, N., Skidmore, C.J. and Shall, S. (1980): The enhancement of cytotoxicity of N-methyl-N-nitrosourea and  $\gamma$ radiation by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Eur. J. Biochem.*, 105, 525-530.
- 43) Berger, N.A., Catino, D.M. and Vietti, T.T. (1982): Synergistic antileukemic effect of 6-aminonicotinamide and 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea on L1210 cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 42, 4382-4386.
- 44) Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T. and Okami, Y. (1966): New antibiotics, Bleomycin A and B. *J. Antibiotics, Ser A*. 19, 200-215.

45) 梅沢 決夫, 竹内 富雄 (1983): 制癌抗生物質.  
*Oncologia*, 7, 20-44. 昭和 58.

- 46) Umezawa, H., Ishizuka, Y., Maeda, K. and Takeuchi, T. (1967): Studies on Bleomycin. *Cancer*, 20, 891-895.
- 47) Terashima, T., Yasukawa, M. and Umezawa, H. (1970): Breaks and rejoining of DNA in cultured mammalian cells treated with bleomycin. *Gann*, 61, 513-516.
- 48) 山田一正 (1983): 造血器腫瘍における化学療法の結果 — 新抗癌物質の臨床成績を中心として —, *癌と化学療法*, 10, 1030-1040, 昭和58.
- 49) 齊藤達雄 (1979): 癌化学療法と副作用; 癌の科学, 第5巻, 癌の制圧 (太田邦夫, 山本正, 杉村隆, 菅野晴夫編), 初版, 南江堂, 東京, 193-232. 昭和54.
- 50) Davis, D.B. and Mass, W.K. (1952): Analysis of the biological mechanism of drug resistance certain bacterial mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 38, 775-785.
- 51) Biedler, J.L. and Riehm, H. (1970): Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro; cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.*, 30, 1174-1184.

- 52) Inaba, M. and Johnson, R.K. (1977): Decreased retention of actinomycin D as the basis for cross-resistance in anthracycline-resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.*, 37, 4629-4634.
- 53) Inaba, M. and Johnson, R.K. (1978): Uptake and retention of adryamicin and daunomycin by sensitive and anthracycline-resistant sublines of P388 leukemia. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2123-2130.
- 54) Inaba, M. and Sakurai, Y. (1979): Enhanced efflux of actinomycin D, vincristine and vinblastine in adriamycin-resistant subline of P388 leukemia. *Cancer Lett.*, 8, 111-115.
- 55) Inaba M., Kobayashi, H., Sakurai, Y. and Johnson, R.K. (1979): Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res.*, 39, 2200-2203.
- 56) Flintoff, W.F., Davidson, S.V. and Siminovitch, L. (1976): Isolation and partial characterization of three methotrexate-resistant phenotypes from Chinese hamster ovary cells. *Somat. Cell Genet.*, 2, 245-261.
- 57) Schimke, R.T., Kaufman, R.J., Alt, F.W. and Kellems, R. (1978): Gene amplification and drug resistance in cultured murine cells. *Science*, 202, 1051-1055.



- 58) Levinson, B.B., Ullmann, B., Martin, D.W.Jr. (1979):  
Pyrimidine pathway variants of cultured mouse lymphoma  
cells with altered levels of both orotate phosphoribosyl-  
transferase and orotidylate decarboxylase. J. Biol.  
Chem., 254, 4396-4401.
- 59) Mulkins, M.A. and Heidelberger, C. (1982): Isolation  
of fluoropyrimidine-resistant murine leukemic cell  
lines by one-step mutation and selection. Cancer Res.,  
42, 956-964.
- 60) Mulkins, M.A. and Heidelberger, C. (1982): Biochemical  
characterization of fluoropyrimidine-resistant murine  
leukemic cell lines. Cancer Res., 42, 965-973.
- 61) Peterson, R.H.F., Meyers, M.B., Spengler, B.A. and  
Biedler, J.L. (1983): Alteration of plasma membrane  
glycopeptides and gangliosides of Chinese hamster cells  
accompanying development of resistance to daunorubicin  
and vincristine. Cancer Res., 43, 222-228.
- 62) Juliano, R.L. and Ling, V. (1976): A surface glycoprotein  
modulating drug permeability in Chinese hamster ovary  
cell mutants. Biochem. Biophys. Acta, 455, 152-162.
- 63) 稲葉 実 (1983): 癌細胞の薬剤耐性機序.  
Oncologia, 7, 79-91. 昭和 58.

- 64) Umezawa, H., Takeuchi, T., Hori, S., Sawa, T. and Ishizuka, M. (1972): Studies on the mechanism of anti-tumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *J. Antibiotics*, 25, 409-420.
- 65) Lazo, J.S., Boland, C.J. and Schwartz, P.E. (1982): Bleomycin hydrolase activity and cytotoxicity in human tumors. *Cancer Res.*, 42, 4026-4031.
- 66) 浦出雅裕, 杉 政和, 白砂兼光, 杉山 勝, 宮崎 正 (1983): ヒト培養腫瘍細胞のブレオマイシン(BLM)感受性とそれに関与する因子の解析. *癌と化学療法*, 10, 2382-2388. 昭和58.
- 67) Miyaki, M., Ono, T., Hori, S. and Umezawa, H. (1975): Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and -resistant rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res.*, 35, 2015-2019.
- 68) 近藤宗平 (1972): DNA 修復; 分子放射線生物学. 初版, 学会出版センター, 東京, 98-102. 昭和47.
- 69) 武部 啓 (1983): ヒトの DNA 修復; DNA 修復. 初版, 東京大学出版会, 東京, 58-77. 昭和58.

- 70) Miyaki, M., Ono, T. and Umezawa, H. (1971): Inhibition of ligase reaction by bleomycin. *J. Antibiotics*, 24, 587-592.
- 71) 中村 典 (1981): 薬剤抵抗性突然変異細胞の形成法; 培養細胞遺伝学実験法 (黒田行昭編). 初版, 共立出版, 東京, 190-195. 昭和56.
- 72) Benedict, W.F., Baker, M.S., Haroun, L., Choi, E. and Ames, B.N. (1977): Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella / Microsome test. *Cancer Res.*, 37, 2209-2213.
- 73) Morrow, J. (1970): Genetic analysis of azaguanine resistance in an established mouse cell line. *Genetics*, 65, 279-287.
- 74) Mezger-Freed, L. (1971): Puromycin resistance in haploid and heteroploid frog cells: Gene or membrane determined? *J. Cell. Biol.*, 51, 742-751.
- 75) Orkin, S.H. and Littlefield, J.W. (1971): Mutagenesis to aminopterin resistance in cultured hamster cells. *Exp. Cell Res.*, 69, 174-180.
- 76) Harris, M. (1971): Mutation rates in cells at different ploidy levels. *J. Cell. Physiol.*, 78, 177-184.

- 77) Harris, M. (1973): Anomalous patterns of mutation in cultured mammalian cells. *Genetics, suppl.*, 73, 181-185.
- 78) Mezger-Freed, L. (1972): Effect of ploidy and mutagens on bromodeoxyuridine resistance in haploid and diploid frog cells. *Nature New Biol.*, 235, 245-246.
- 79) Bech-Hansen, N.T., Till, J.E. and Ling, V. (1976): Pleiotropic phenotype of colchicine-resistant CHO cells; Cross-resistance and collateral sensitivity. *J. Cell. Physiol.*, 88, 23-32.
- 80) Wilkoff, L.J. and Dulmage, E.A. (1978): Resistance and cross-resistance of cultured leukemia P388 cells to vincristine, adryamicin, adryamicin analogs and actinomycin D. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61, 1521-1524.
- 81) Hill, B.T. and Whelan, R.D.H. (1982): Establishment of vincristine-resistant and vindesine-resistant lines of murine lymphoblasts in vitro and characterization of their patterns of cross-resistance and drug sensitivities. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 8, 163-169.
- 82) Johnson, R.K., Chitnis, M.P., Embrey, W.M. and Gregory, E.B. (1978): In vivo characteristics of resistance and cross-resistance of an adriamycin-resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Treat. Rep.*, 62, 1535-1547.
- 83) Shoemaker, R.H., Curt, G.A. and Carnery, D.N. (1983): Evidence for multidrug-resistant cells in human tumor cell populations. *Cancer Treat. Rep.*, 67, 883-894.

- 84) 官本忠昭, 寺島東洋三 (1983): ブレオマイシンの細胞致死作用と腫瘍治療. *Oncologia*, 7, 61-78. 昭和 58.
- 85) 桑野信彦 (1981): ホリエン系抗生剤と制がん剤との併用増強の試み. *癌と化学療法*, 8, 681-688. 昭和 56.
- 86) Kinsky, S.C., Luse, S.A., Zopf, D., VanDeenen, L.L.M. and Haxby, J. (1967): Interaction of filipin and derivatives with erythrocyte membranes and lipid dispersions: Electron microscopic observations. *Biochem. Biophys. Acta*, 135, 844-861.
- 87) Derkruiff, B., Gerritsen, W.J., Oerlemans, A., Demel, R.A. and VanDeenen, L.L.M. (1974): Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of Acholeplasma Laidlawii cells and lecithin liposomes. I. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochem. Biophys. Acta*, 339, 30-43.
- 88) Kuwano, M., Komiya, T., Endo, H. and Komiyama, S. (1973): Potentiation of 5-fluorouracil, chromomycin A3, and bleomycin by amphotericin B or polymixin B in transformed fibroblastic cells. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 3, 580-584.

- 89) Medoff, G., Valeriote, F., Lynch, R.G., Schlessinger, D. and Kobayashi, G.S. (1974): Synergistic effect of amphotericin B and 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea against a transplantable AKR leukemia. *Cancer Res.*, 34, 974-978.
- 90) Laurent, G., Atassi, G. and Hildebrand, J. (1976): Potentiation of 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea by amphotericin B in murine ependymoblastoma. *Cancer Res.*, 36, 4069-4073.
- 91) Nakashima, T., Kuwano, M., Matsui, K., Komiyama, S., Hiroto, I. and Endo, H. (1974): Potentiation of bleomycin by an antifungal polyene, pentamycin, in transformed animal cells. *Cancer Res.*, 34, 3258-3261.
- 92) Komiyama, K., Umezawa, I., Kuwano, M. and Komiyama, S. (1983): Pimaricin potentiation of bleomycin activity against murine tumors. *Gann*, 74, 602-606.
- 93) Fukushima, M., Kuzuya, K., Ota, K. and Ikai, K. (1981): Poly(ADP-ribose) synthesis in human cervical cancer cell — Diagnostic cytological usefulness. *Cancer Lett.*, 14, 227-236.

- 94) 中島 格, 牧島和見, 小宮山莊太郎, 竹田和夫, 益田明典, 野上兼一郎, 広戸幾一郎, 桑野信彦 (1980): ペンタマイシン添加ブレオマイシン軟膏 (ブレオーペンタ軟膏) による頭頸部領域悪性腫瘍の治療. 癌と化学療法, 7, 1208-1214. 昭和55.
- 95) 本多利雄, 三比和美, 服部理男 (1983): 多剤耐性となった再発性非ホジキンリンパ腫に対する Nicardipine と Vinca Alkaloid の併用による治療の試み. 癌と化学療法, 10, 2330-2334. 昭和58.
- 96) 赤沢修吾, 本多利雄, 三比和美, ニッ木浩一 (1984): カルシウム拮抗剤の併用を試みた Vindesine sulfate, Cis-diammine dichloroplatinum(II) の治療抵抗性食道癌の2症例. 癌と化学療法, 11, 943-947. 昭和59.

## 表題脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第一講座  
(主任: 宮崎 正教授)

本論文の要旨は、第79回大阪大学歯学会例会(昭和57年6月、大阪)、第27回日本口腔外科学会総会(昭和57年9月、大阪)、第37回日本口腔科学会総会(昭和58年4月、大阪)、第7回日本頭頸部腫瘍学会(昭和58年6月、千葉)、第28回日本口腔外科学会総会(昭和58年9月、東京)、第42回日本癌学会総会(昭和58年10月、名古屋)、第8回日本頭頸部腫瘍学会(昭和59年6月、久留米)において一部発表した。



## 附圖説明

A	B
C	D
E	F

図 1

A : HeLa 細胞

B : HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞

C : KB 細胞

D : KB-BLM<sup>r</sup> 細胞

E : Hepd 細胞

F : Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞

(いずれも倍率 100 倍)

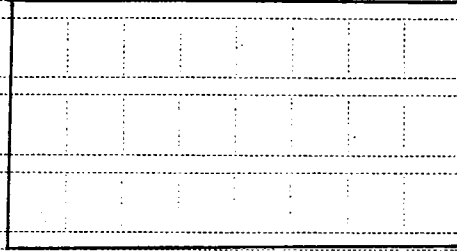


図 2

BLM 耐性細胞および各親株細胞の

BLM 感受性

16 mm 径ウエルあたり  $10^5$  個の細胞を、各種濃度の BLM を含む増殖培養液で、 $37^\circ\text{C}$ 、6 日間培養後、生細胞数を測定し細胞生存率を算定した。

A	B
C	D
E	F

## 図 3

マウスに形成された腫瘍の組織像  
(H-E 染色, 倍率 100倍)

- A : HeLa 細胞  
B : HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞  
C : KB 細胞  
D : KB-BLM<sup>r</sup> 細胞  
E : Hepd 細胞  
F : Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞

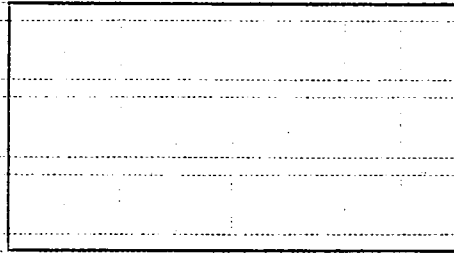


図 4

BLM 耐性細胞および各親株細胞における  
 $^3\text{H-PEP}$  の取り込み

16 mm 径ウエルあたり  $10^5$  個の細胞を、 $37^\circ\text{C}$  で 24 時間培養後、 $^3\text{H-PEP}$  を  $10^{-7} \sim 10^{-6}$  M の濃度で 60 分間作用させた。細胞を洗浄後、1 N 水酸化ナトリウムで細胞を溶解し、細胞内の放射活性を測定した。なお、 $\text{KB-BLM}^{\text{r}*}$  細胞は、 $\text{KB-BLM}^{\text{r}}$  細胞を BLM を含まない増殖培養液で 30 代継代後、BLM 耐性を失った細胞を示す。

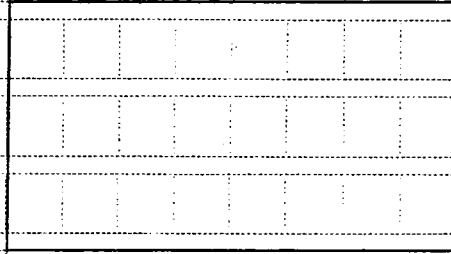
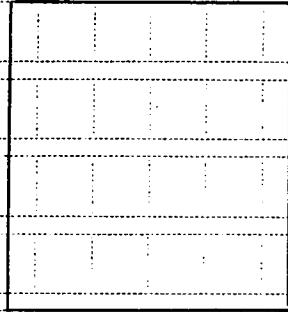


図 5

BLM 耐性細胞および各親株細胞における  
 $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出

$10^{-6}$  M の  $^3\text{H-PEP}$  を  $37^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させ、取り込ませた  $10^5$  個の細胞を、 $^3\text{H-PEP}$  を含まない増殖培養液で 0 ~ 240 分間培養し、細胞内に残存する放射活性を測定することにより、 $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出を検索した。



## 図 6

BLM 耐性細胞および各親株細胞の UV 照射  
による不活化

500 個の細胞を、60 mm 径プラスチックペ  
トリ皿にまき、37°C で 24 時間培養後、培養  
液を除去し 30 cm の距離から  $3 \text{ erg/cm}^2$  の強さ  
で一定時間 UV 照射した。その後培養液を再  
び加えて、さらに 7 日間培養し、生残する  
細胞により形成されたコロニー数から、細  
胞生残率を求めた。

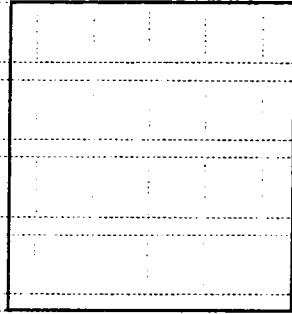


図 7

変異原処理後に分離された BLM 耐性

HeLa 細胞の  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出能

図 5 の方法と同様に、 $^3\text{H-PEP}$  の細胞内  
残存量を測定することにより、細胞外放  
出を求めた。

●---● HeLa 細胞

○---○ HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞

▲---▲ HeLa-radBLM<sup>r</sup> 細胞  
Cl. 4

□---□ HeLa-radBLM<sup>r</sup> 細胞  
Cl. 7

△---△ HeLa-radBLM<sup>r</sup> 細胞  
Cl. 8

■---■ HeLa-mmcBLM<sup>r</sup> 細胞  
Cl. 2

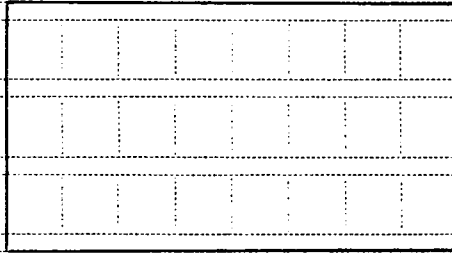


図 8

フィリピンによる BLM 感受性の増大

16 mm 径ウエルあたり  $10^5$  個の BLM 耐性細胞と各親株細胞を、最終濃度 2, 5, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のフィリピンを含む増殖培養液で  $37^\circ\text{C}$ , 6 日間培養し、生細胞数を測定した。破線はフィリピンのみを含む場合、実線はフィリピンと 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の BLM を含む場合を示す。



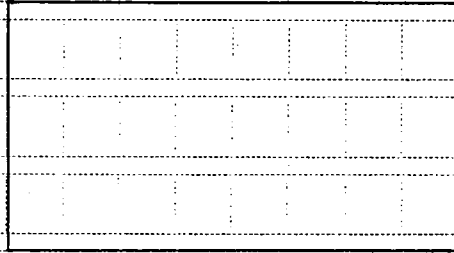
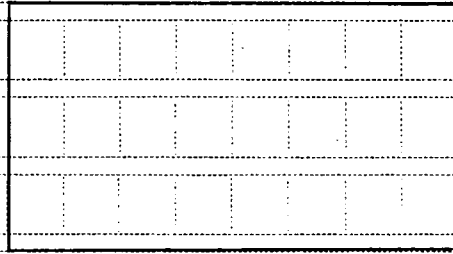


図 9

ベラパミルによる  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出の抑制

図5で述べた  $^3\text{H-PEP}$  の細胞外放出の測定において、最終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  のベラパミルを同時に加えて60分間培養した場合の、細胞内に残存する放射活性を経時的に測定した。



## 図 10

ベラパミルによる BLM 感受性の増大

16 mm 径ウエルあたり  $10^5$  個の BLM 耐性細胞と各親株細胞を、最終濃度 1, 2, 5, 10  $\mu\text{g/ml}$  のベラパミルを含む増殖培養液で、 $37^\circ\text{C}$ 、6 日間培養し生細胞数を測定した。破線はベラパミルのみを含む場合、実線はベラパミルと 2  $\mu\text{g/ml}$  の BLM を含む場合を示す。

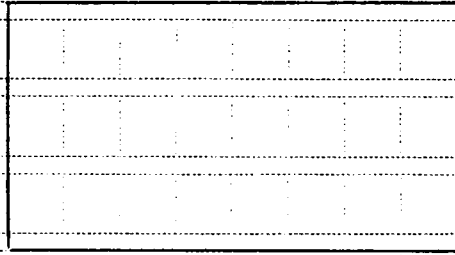


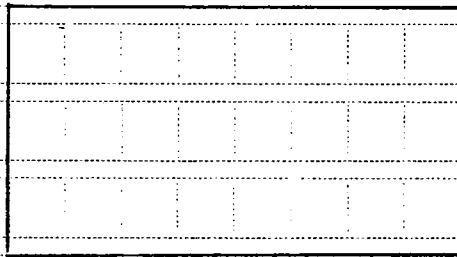
図 11

ニコチン酸アミドによる BLM 感受性の変化

16 mm 径 ウェル あたり  $10^5$  個の BLM 耐性細胞と各親株細胞を、最終濃度 0.1, 0.2, 0.5, 1  $\mu\text{g/ml}$  のニコチン酸アミドを含む増殖培養液で、 $37^\circ\text{C}$ 、6 日間培養し生細胞数を測定した。破線はニコチン酸アミドのみを含む場合、実線はニコチン酸アミドと  $2\mu\text{g/ml}$  の BLM を含む場合を示す。

表 1

3種の BLM 耐性ヒト扁平上皮癌細胞の樹立経過



「実験方法」に述べたように、多段階選抜法あるいは UV 照射 ( $3 \text{ erg/cm}^2$ , 20 秒) を変異原として併用した方法による耐性細胞樹立過程を示す。

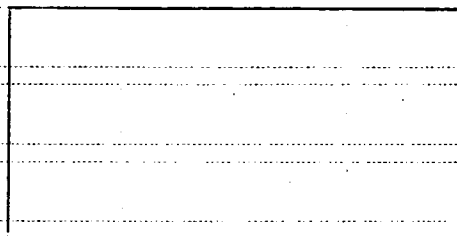
## 表 2

BLM 耐性細胞および各親株細胞の細胞  
抽出液中の BLM 不活性化活性


0.5 mg の蛋白 E 含む細胞抽出液に、10 µg/ml の BLM を 0.1 ml 加え、37 °C、60 分間反応後、 $10^7$  個/ml の B. subtilis PCI 219 株を 0.1 ml 加え、振とうし、それから 90 分間 37 °C で反応させた。この反応混液を 10 倍階段希釈し、その 0.1 ml を寒天培地に混ぜ、37 °C で培養した。24 時間後に形成された細菌集落数を、対照と比較することにより、BLM 不活性化率を算定した。

## 表 3

3種 の BLM 耐性細胞における BLM 耐性機  
構のまとめ



a)  $^3\text{H-PEP}$  ( $10^{-6}\text{M}$ ) , 60分作用後の細胞内放  
射活性

b)  $^3\text{H-PEP}$  を取り込んだ各細胞の経時的な細  
胞内残存放射活性

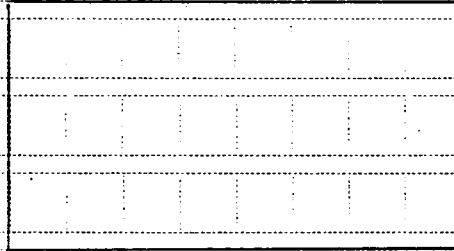
c) 蛋白量 0.5 mg の細胞抽出液中に存在する B.  
subtilis PCI 219 株不活化活性

d) HeLa-BLM<sup>r</sup> 細胞および KB-BLM<sup>r</sup> 細胞では、紫  
外線  $3 \text{ erg/cm}^2$  , 60秒, Hepd-uvBLM<sup>r</sup> 細胞で  
は紫外線  $3 \text{ erg/cm}^2$  , 45秒後の細胞生存  
率

を、おのおのの親株細胞との比で表わした。

表4

変異原処理による BLM 耐性細胞出現頻度  
の上昇



60 mm 径プラスチックペトリ皿に HeLa 細胞  
を 2000 個まき、24 時間培養後、変異原とし  
て UV ( $3 \text{ erg/cm}^2$ )、放射線、MMC (2 時間)  
をそれぞれ処理し、2  $\mu\text{g/ml}$  の BLM を含む培  
養液と含まない培養液で約 1 ヶ月間培養し  
た。その後形成された細胞コロニー数より  
、変異原処理によって誘発された BLM 耐性  
形質出現率 ( BLM 耐性細胞集落数 / 播種細  
胞数 ) を算定した。なお、生存率は変異原  
処理後、BLM を含まない培養液で 7 日間培  
養して形成された細胞集落数より算定した。  
値は各々 2 枚ずつのペトリ皿の平均を示す。

## 表 5

放射線照射あるいは MMC 処理後に HeLa 細胞から得られた BLM 耐性クローンの BLM 耐性度


変異原処理後に形成された BLM 耐性細胞コロニーから上記細胞クローンを分離した。これらの細胞  $10^5$  個を 16 mm 径ウエルにまき、各種濃度の BLM を含む増殖培養液で、 $37^\circ\text{C}$ 、6 日間培養後、生細胞数を求めた。細胞生残率曲線から、それぞれの細胞の BLM に対する  $\text{ID}_{50}$  値を求め、親株細胞 HeLa の  $\text{ID}_{50}$  値に対する比で耐性度を表わした。



## 表 6

変異原処理後に分離された HeLa 細胞由来  
の BLM 耐性細胞クローンにおける BLM 耐  
性機構

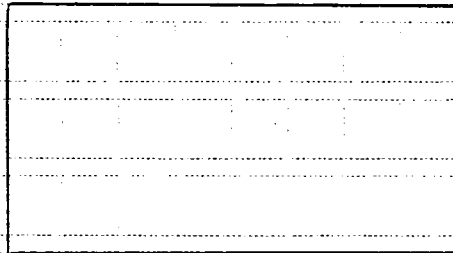


表 3 と同様に、細胞内への  $^3\text{H-PEP}$  の取り  
込みおよび放出、さらに BLM 不活化活性、  
DNA 修復能を表わした。ただし、DNA 修復  
能は、UV を  $3 \text{ erg/cm}^2$  の強さで 60 秒照射した  
時のものを示す。

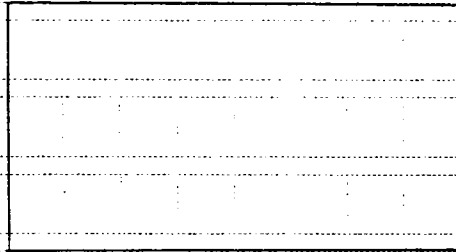
## 表 7

他の抗癌剤に対する各 BLM 耐性細胞の感受性


各 BLM 耐性細胞に BLM 以外の 8 種の抗癌剤を一定濃度加之， $37^{\circ}\text{C}$  で 6 日間培養し生細胞数を測定した。得られた各薬剤に対する細胞生残曲線から，それぞれ  $\text{ID}_{50}$  を求め，おのおのの親株細胞の  $\text{ID}_{50}$  値に対する比で上記の耐性度を表わし，交叉耐性の有無を検討した。

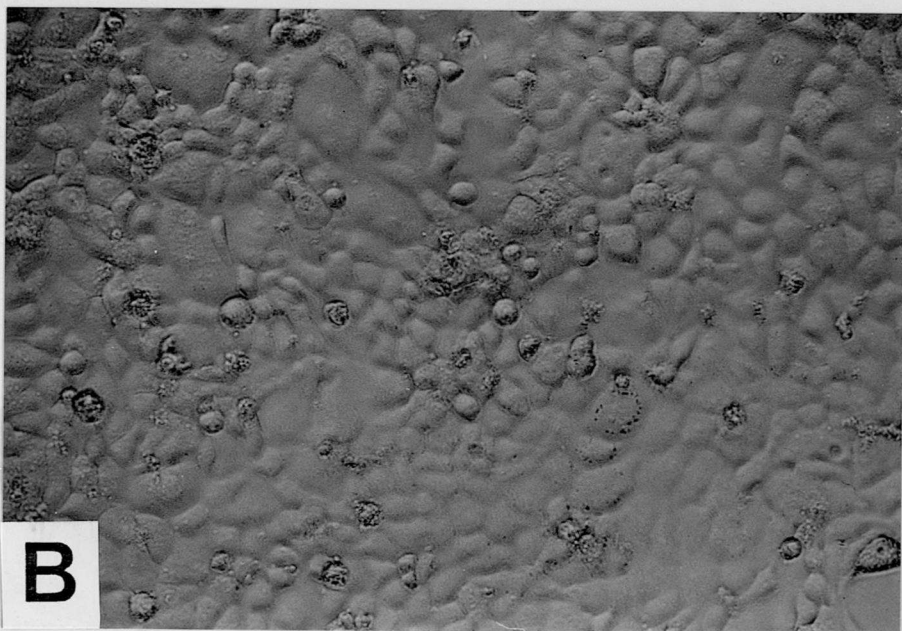
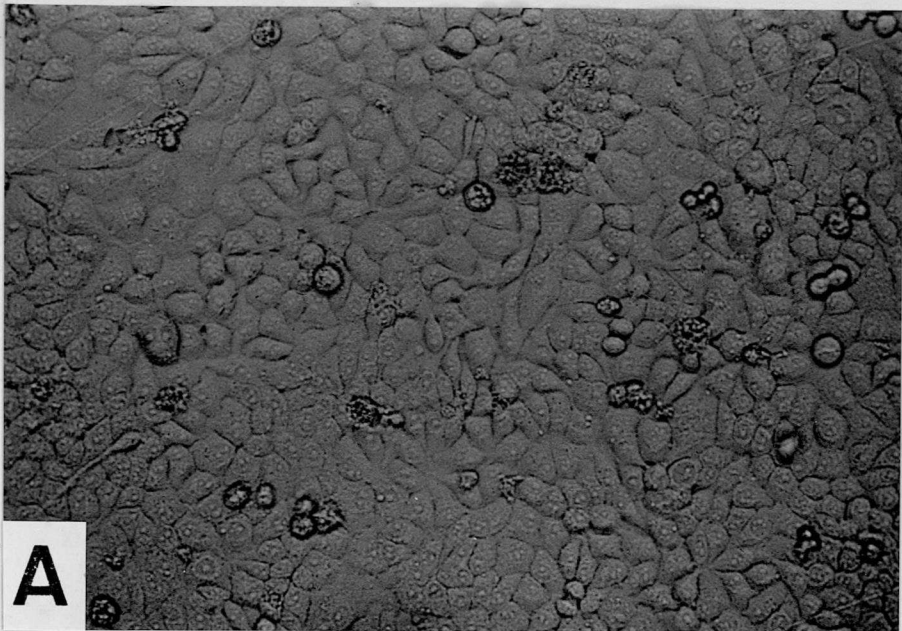
## 表 8

$^3\text{H-PEP}$  の取り込みに対するフィリピンの影響

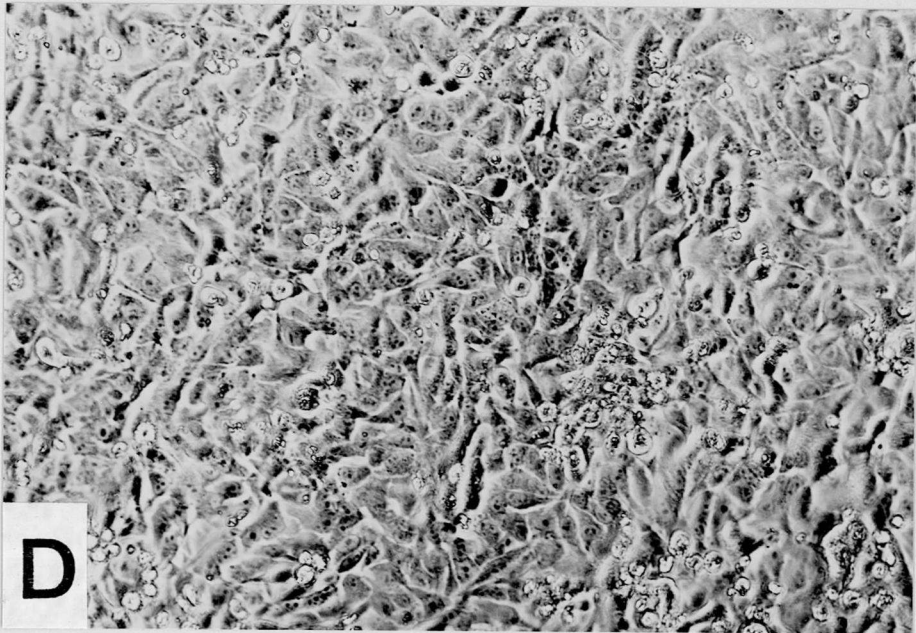
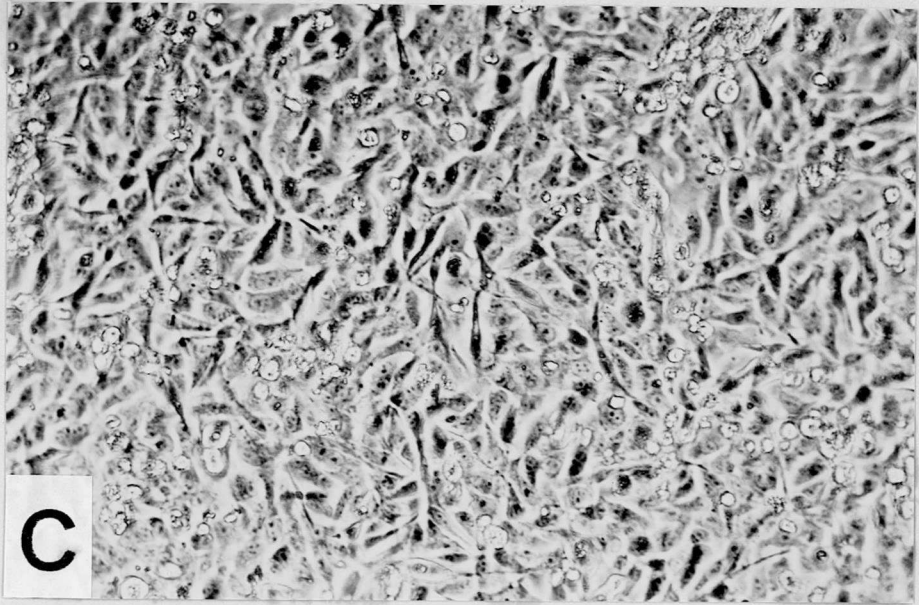


16 mm 径ウエルあたり  $10^5$  個の細胞を  $37^\circ\text{C}$  で 48 時間培養後、約 5,000 cpm ( $5 \times 10^7 \text{ M}$ ) の  $^3\text{H-PEP}$  を、30 分および 60 分間反応させ、 $^3\text{H-PEP}$  の細胞内取り込みを測定した。さらに最終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$  のフィリピンを  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間前処理後に、 $^3\text{H-PEP}$  を 60 分間作用させた場合の取り込みも同様に検討した。

四 /

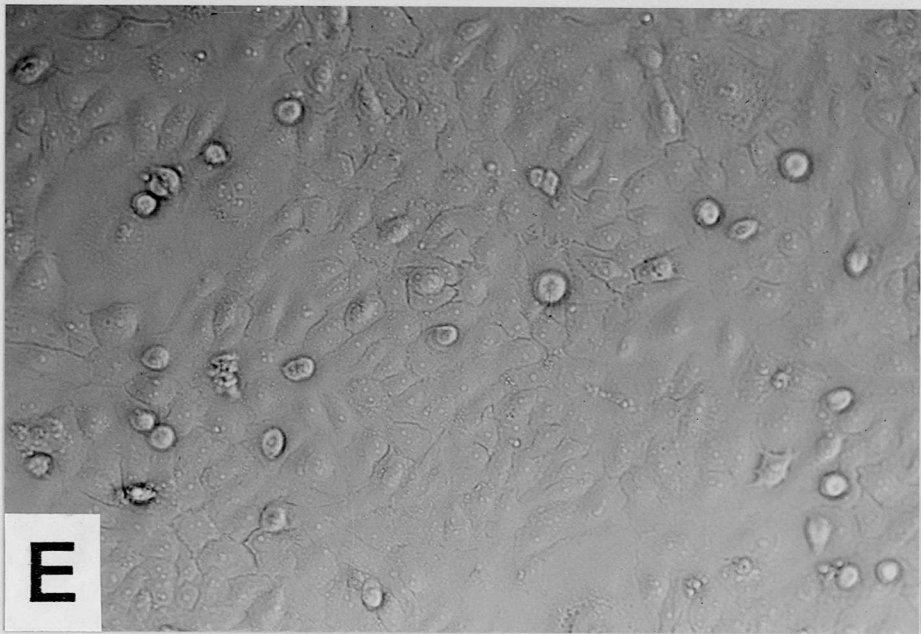


四 /





四 /



2

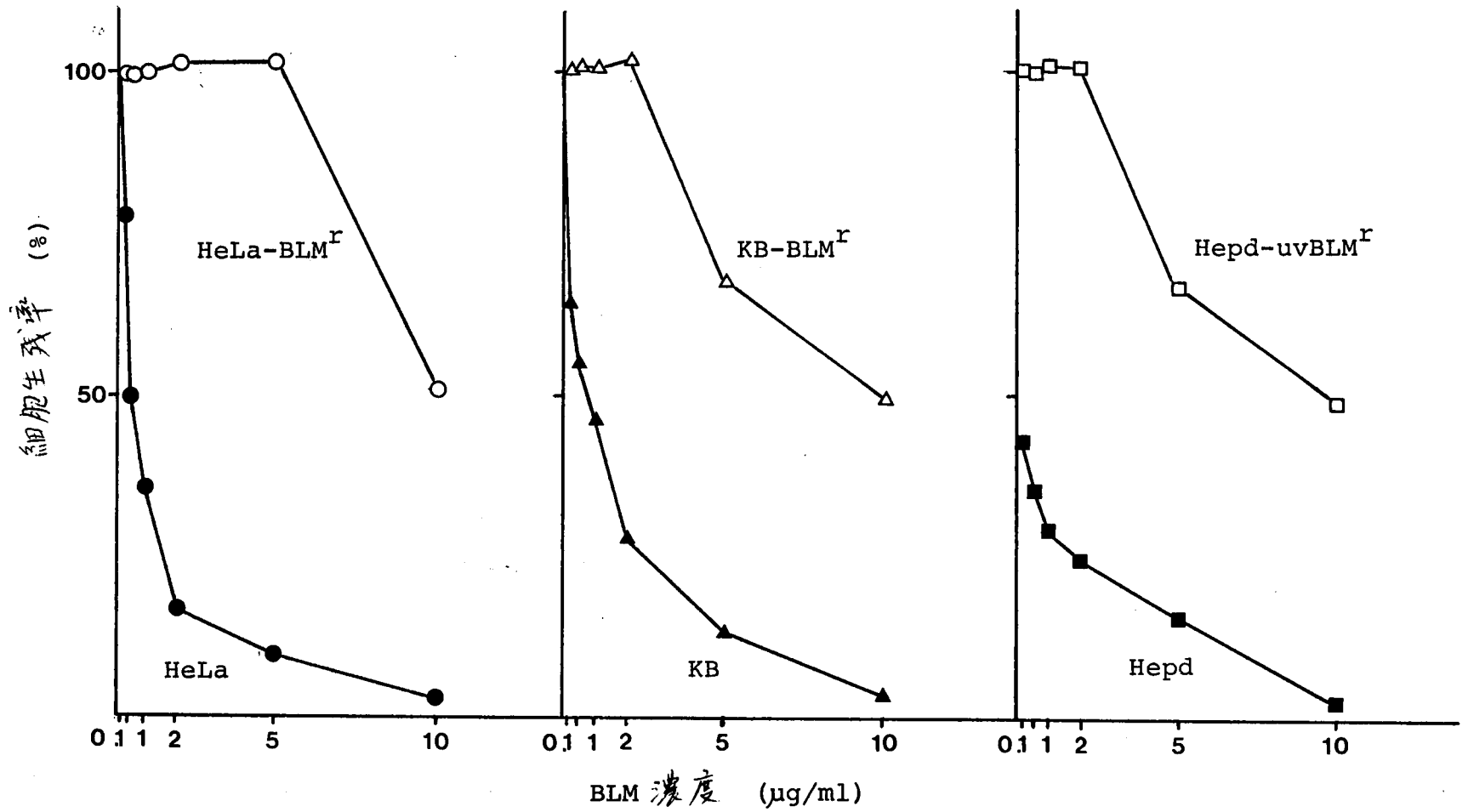
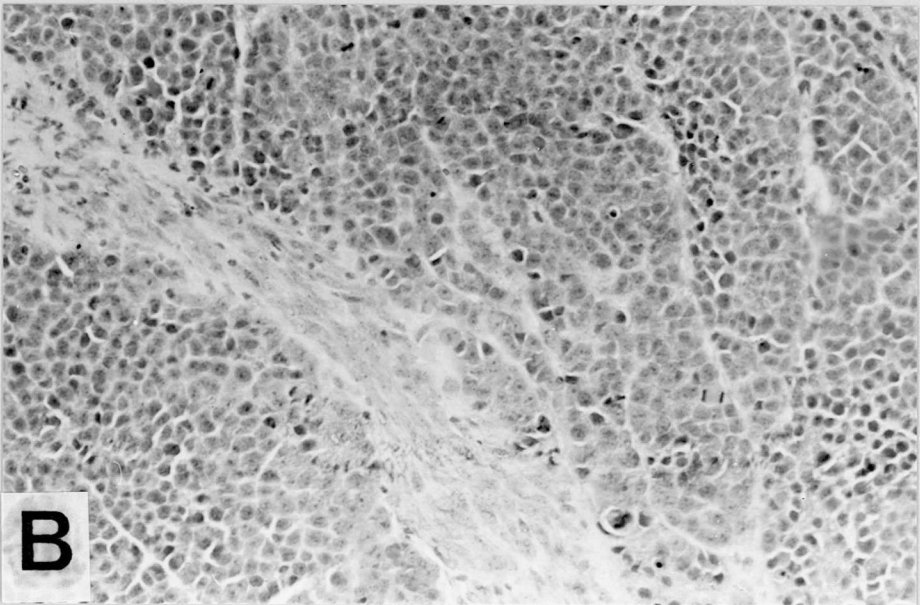
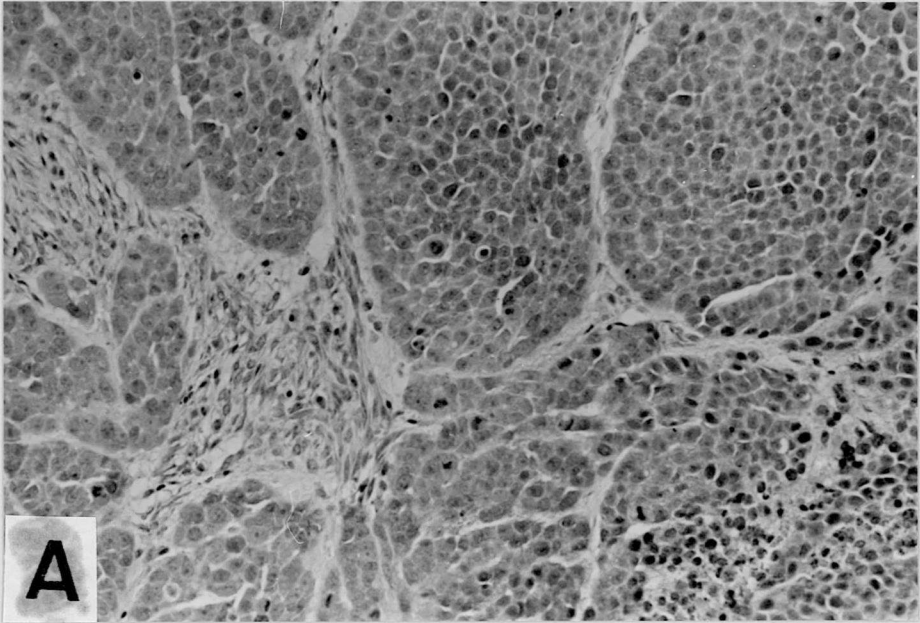


图 3





143

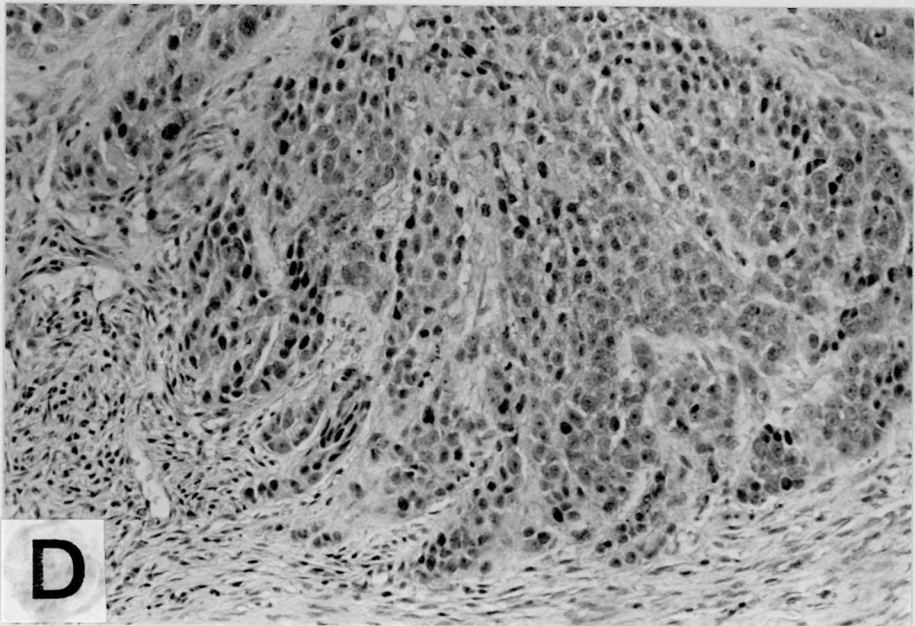
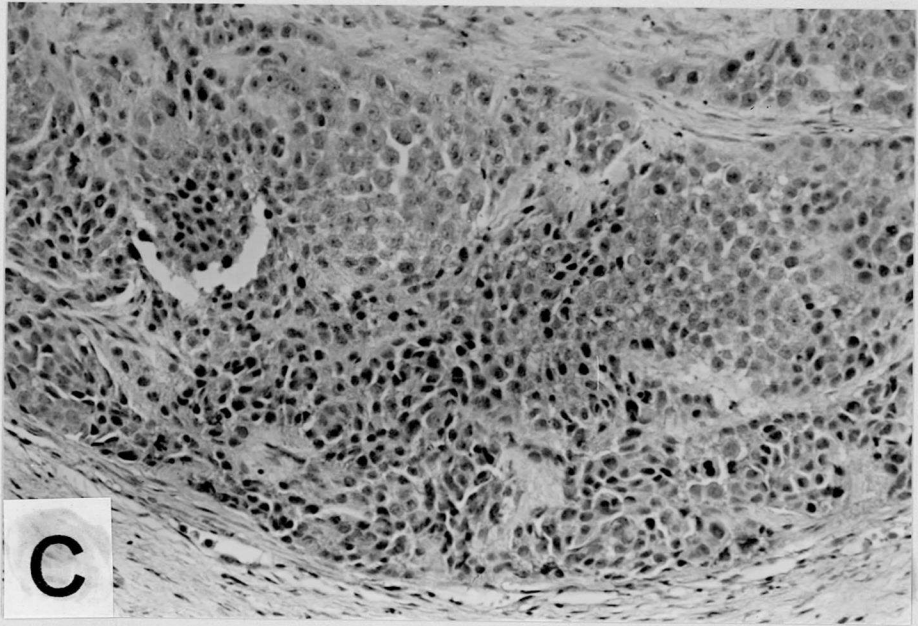


图 3

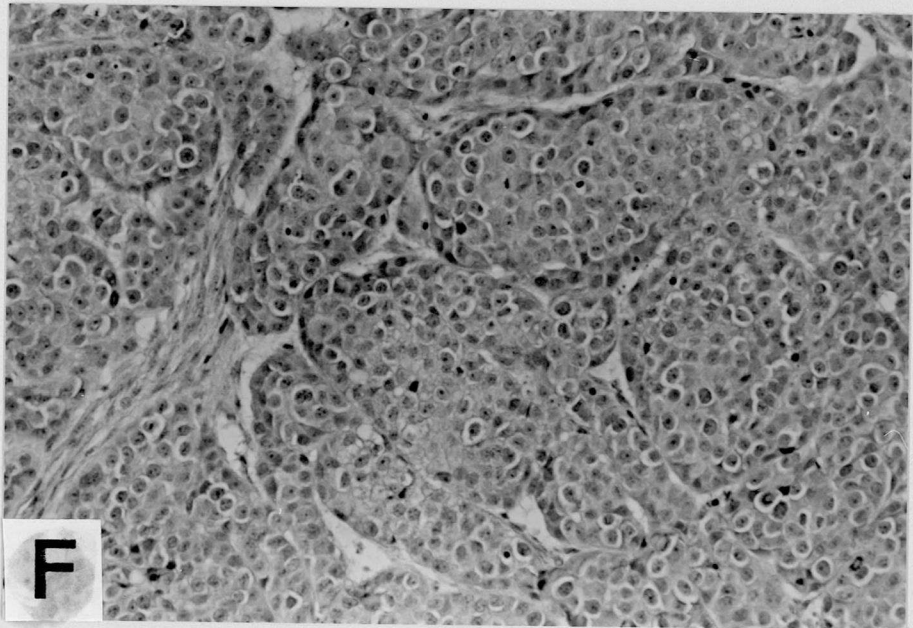
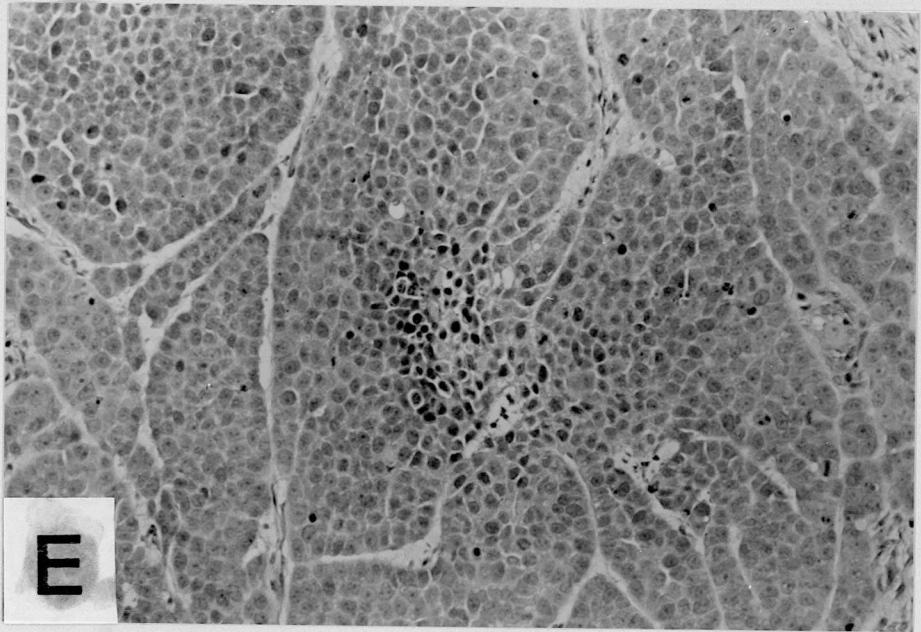


図4

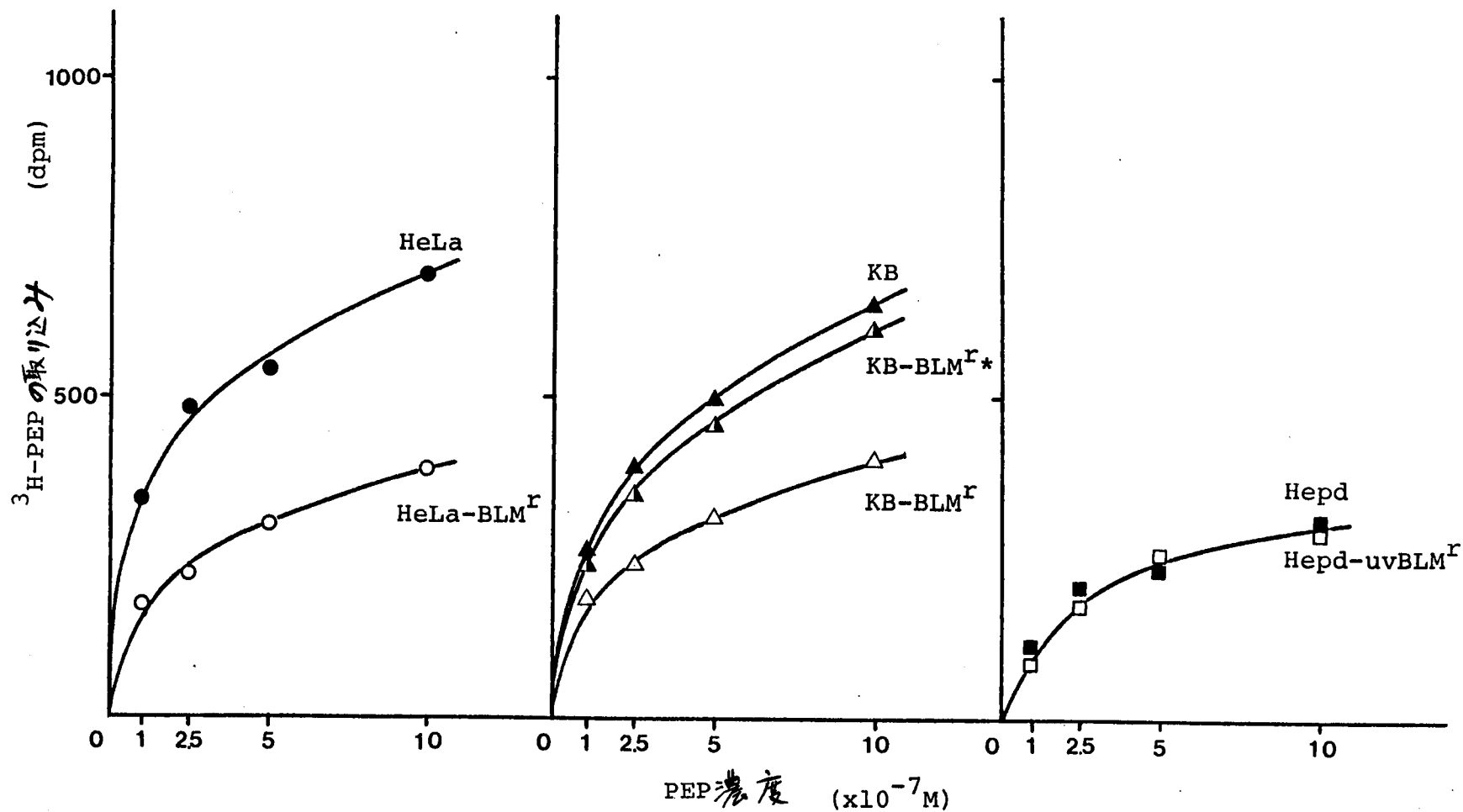


圖5

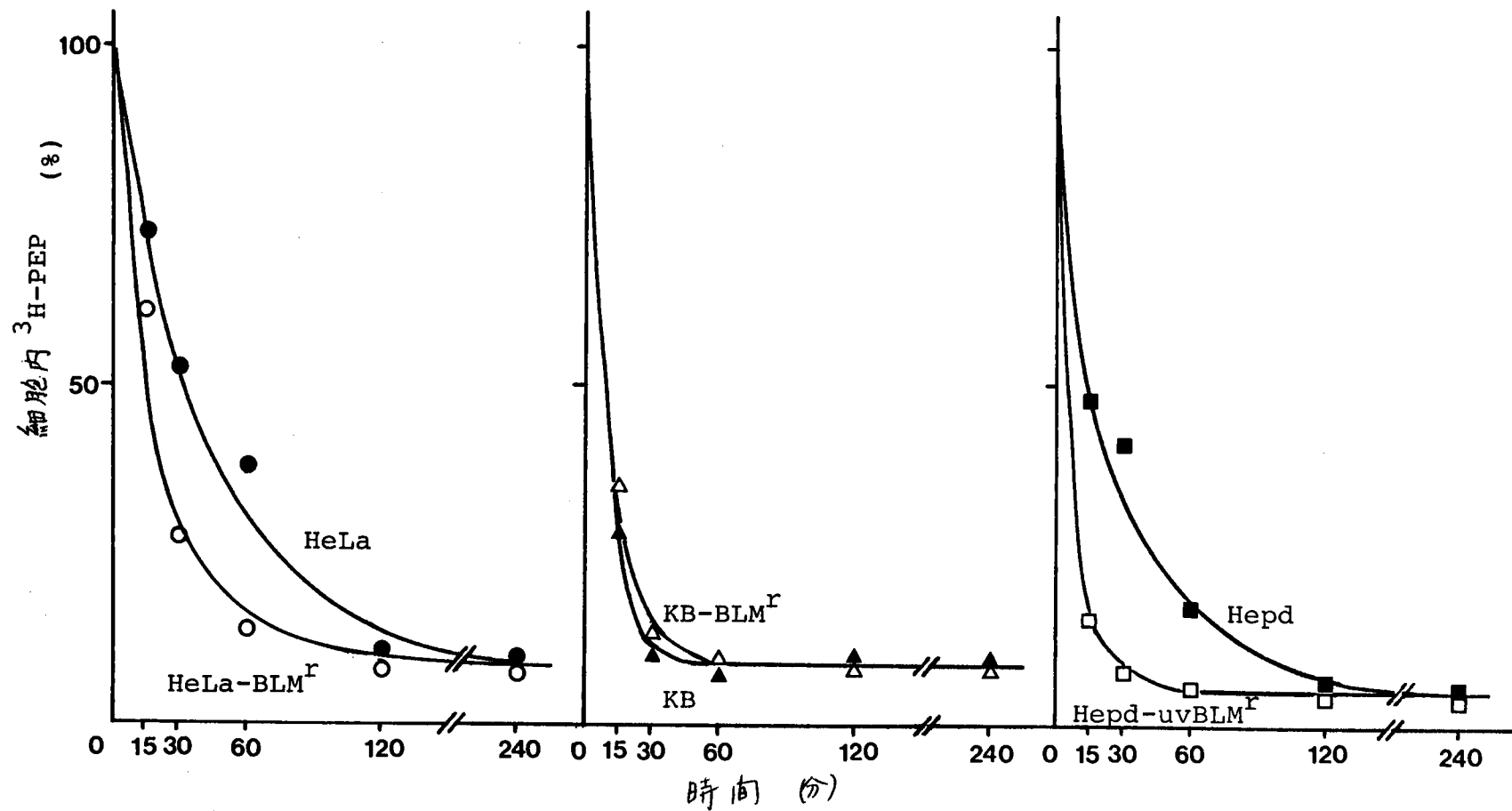
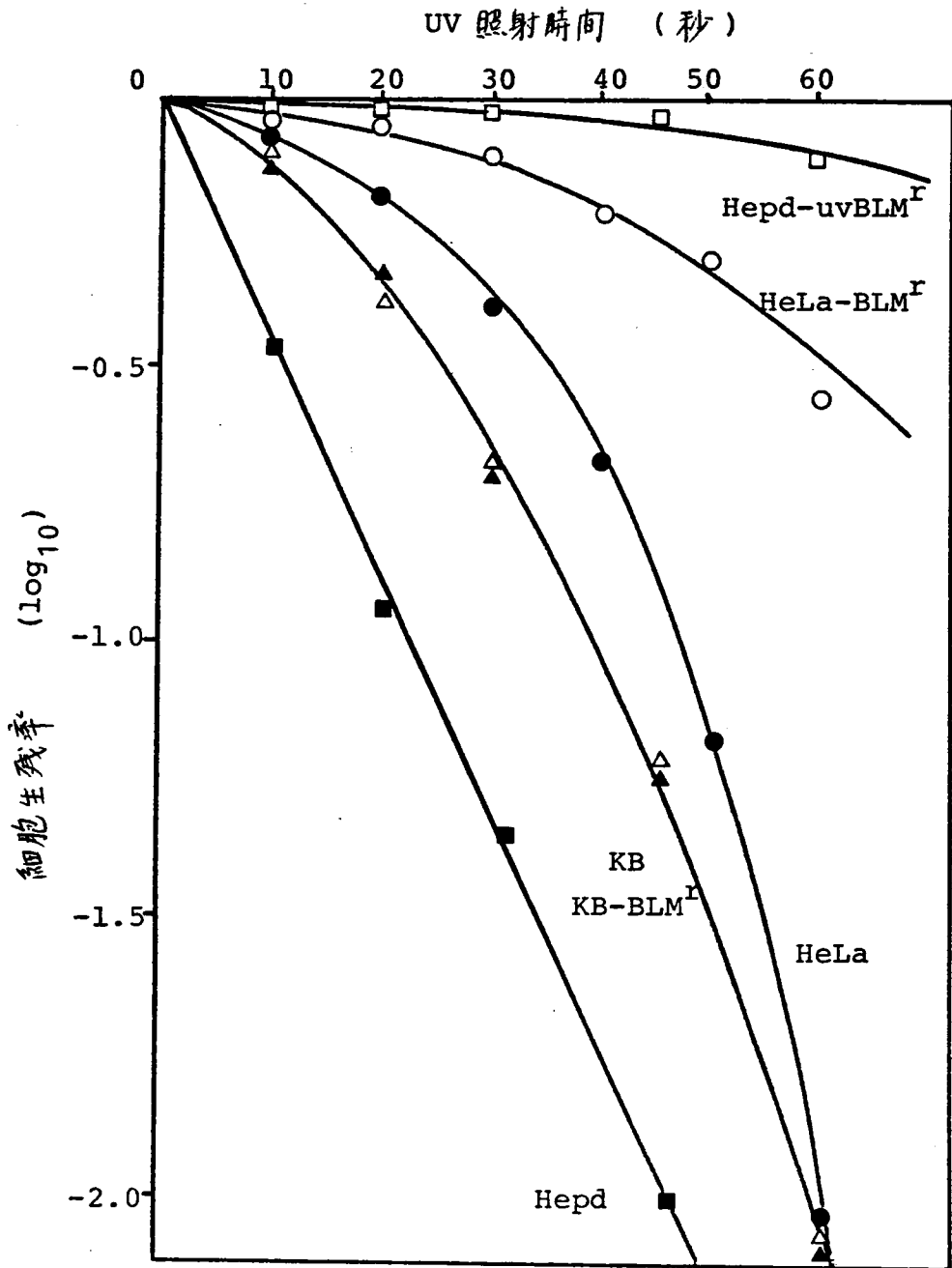


圖 6



四 7

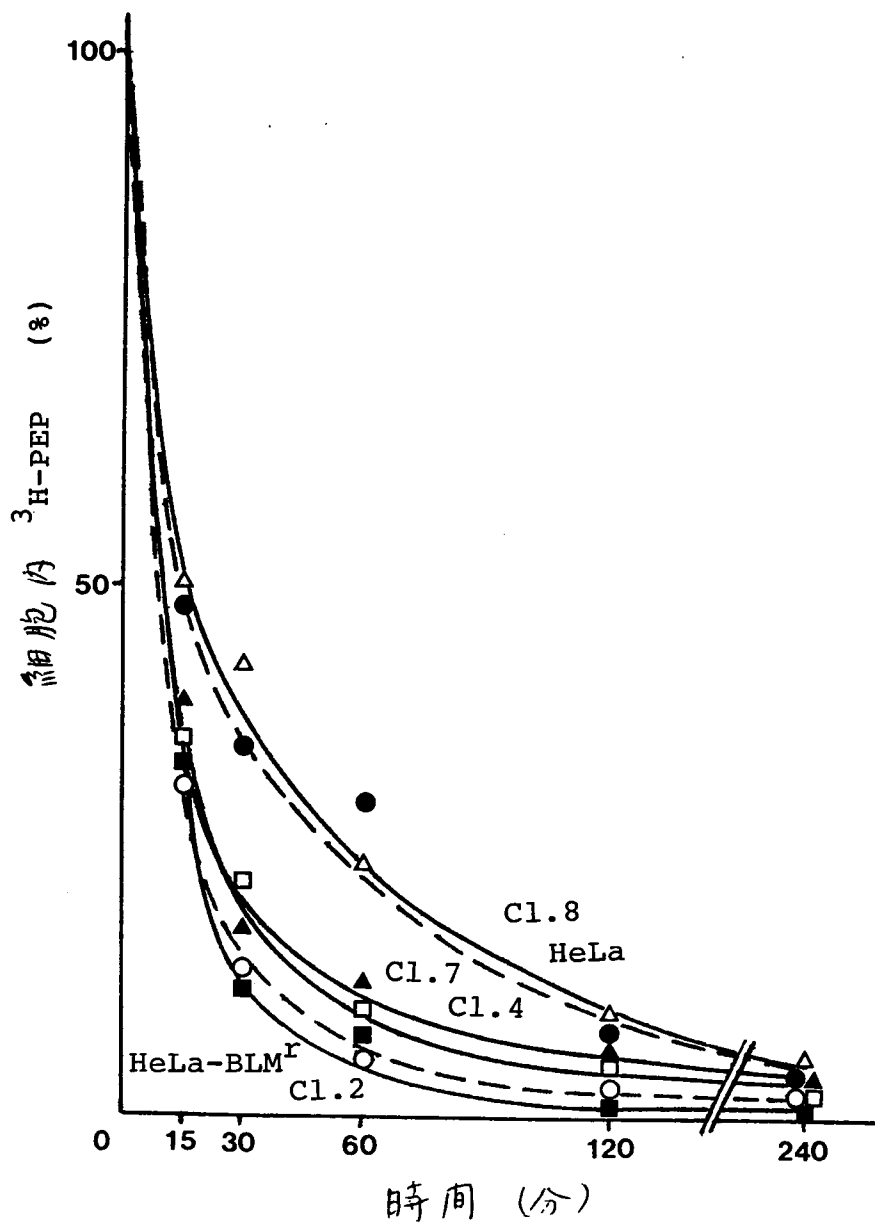


図 8

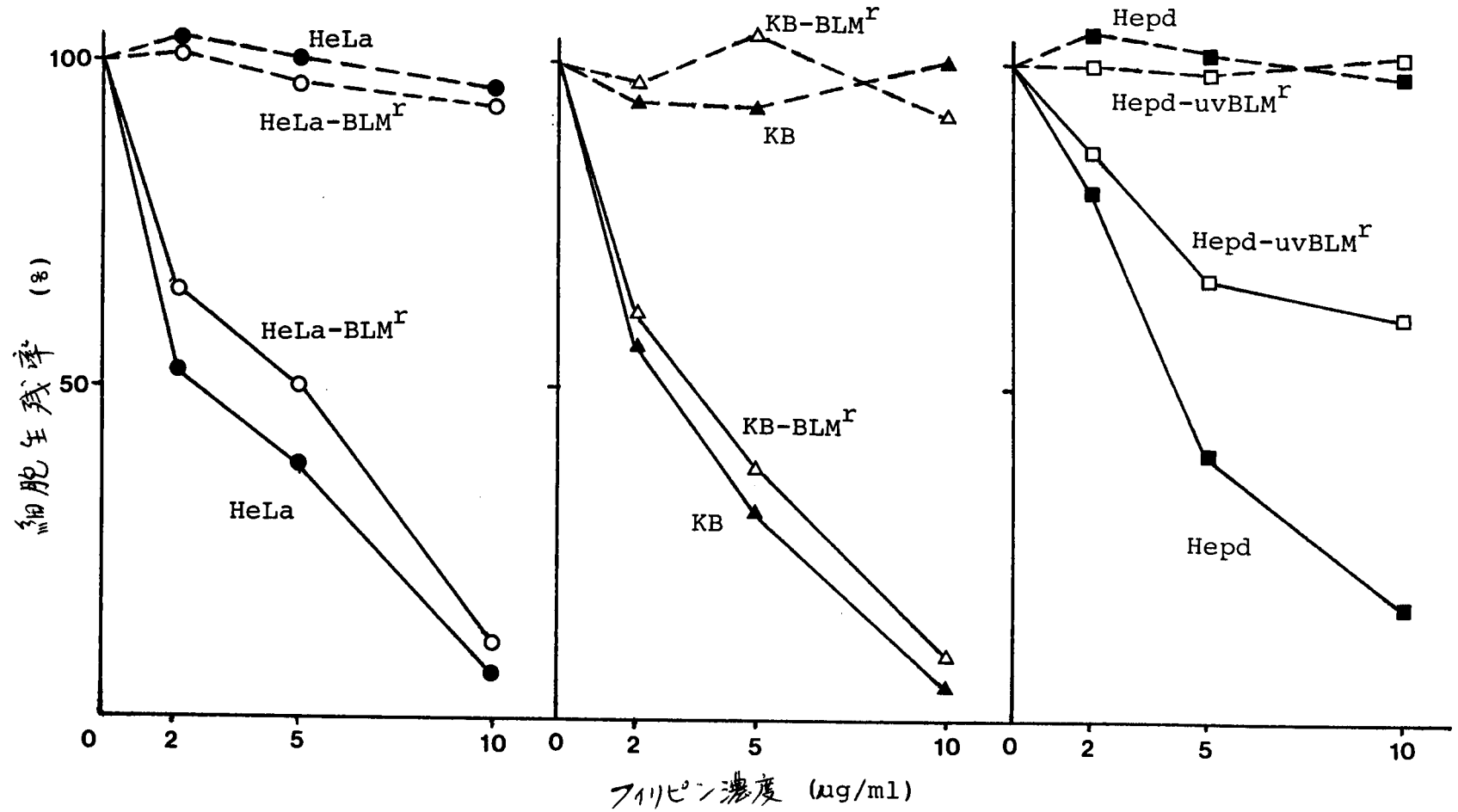


圖 9

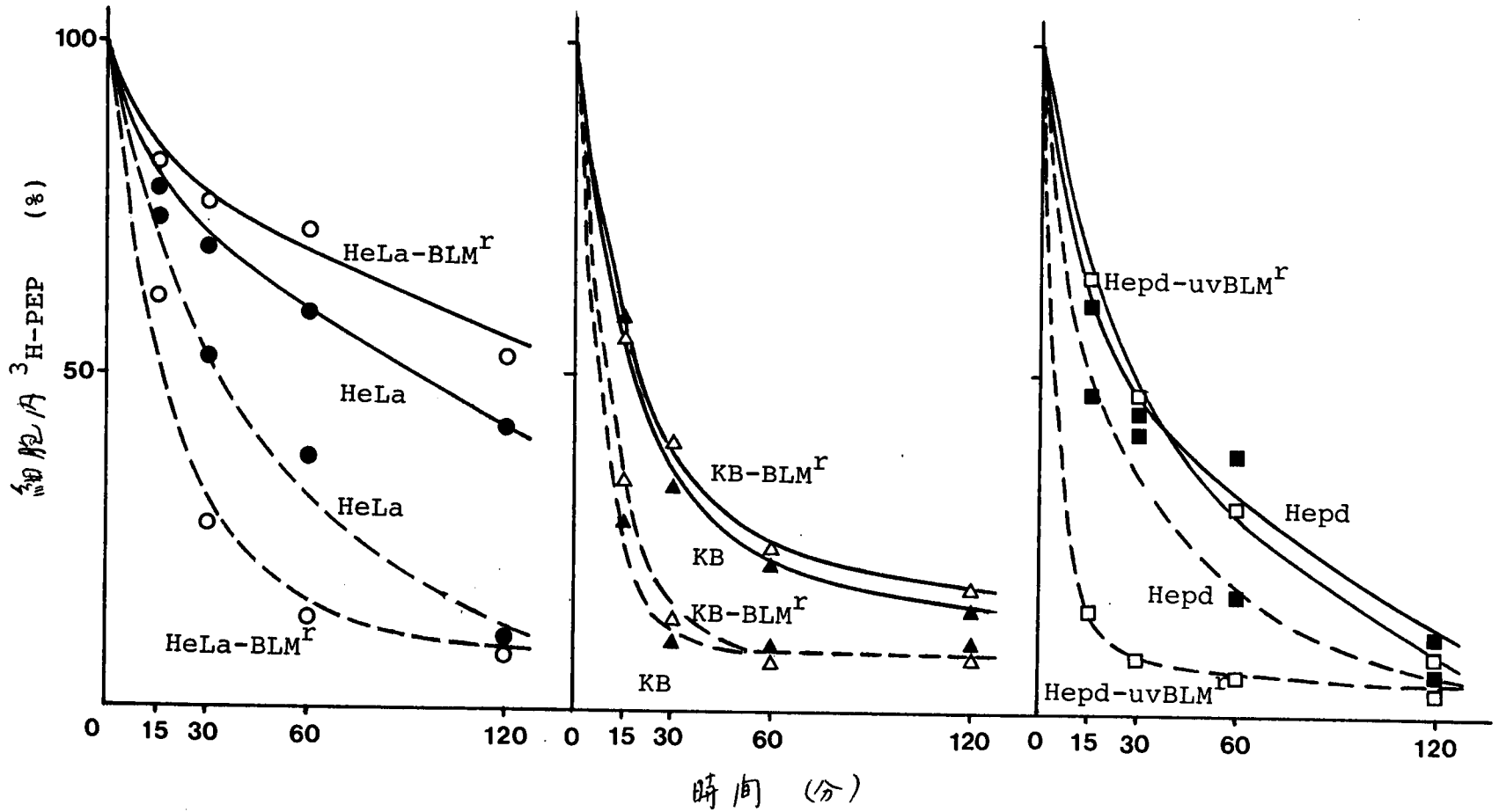
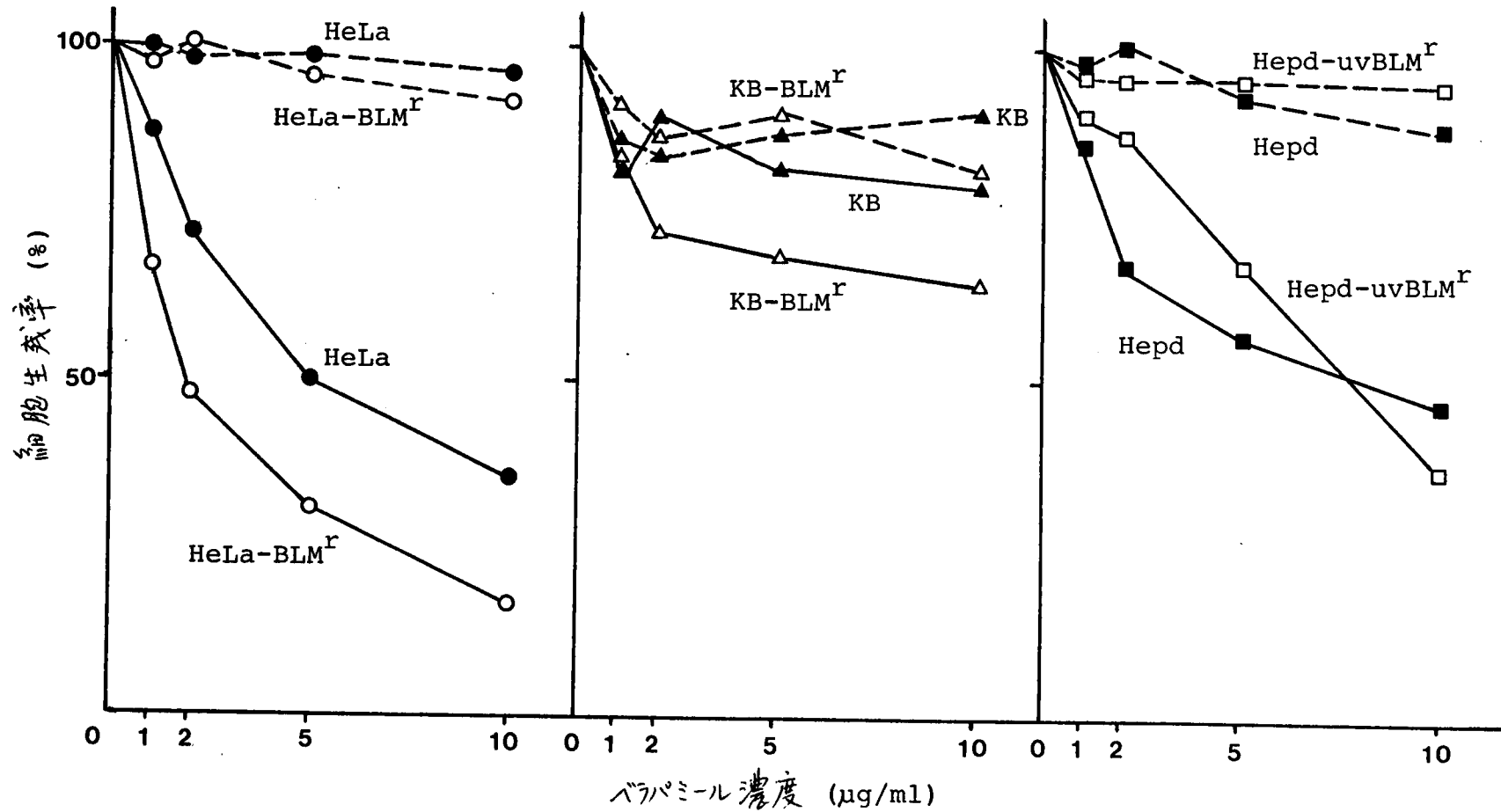




図10



四二

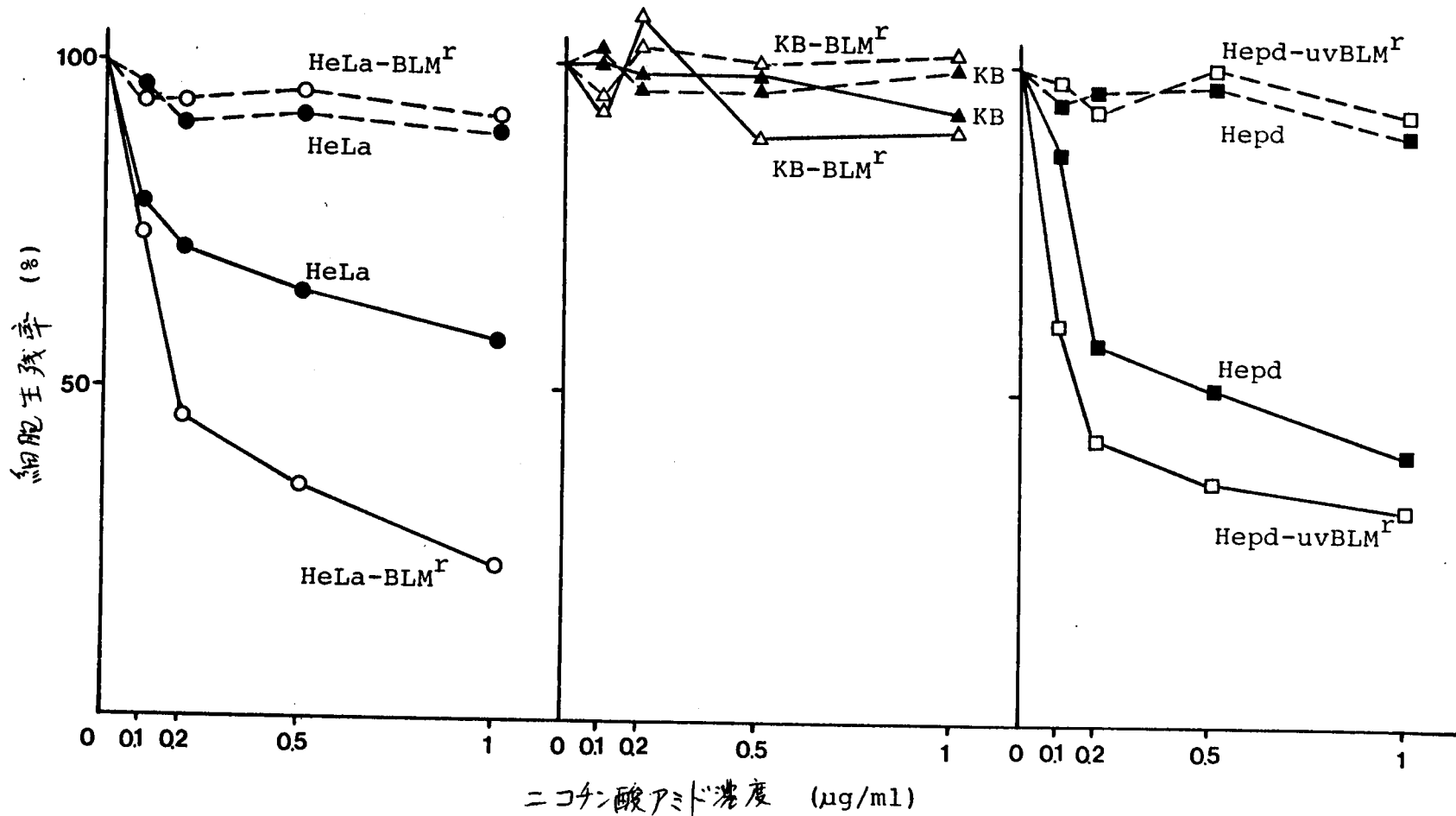


表 1

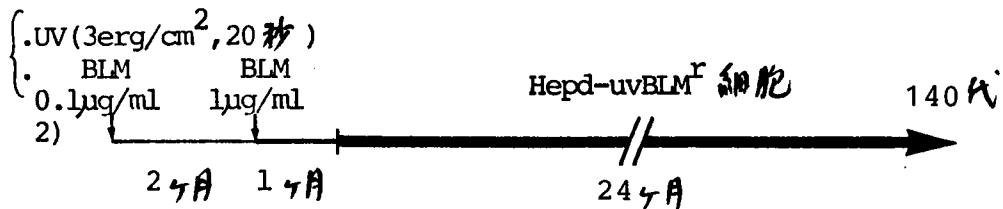
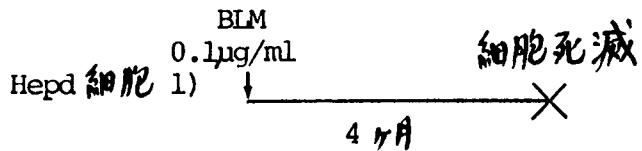
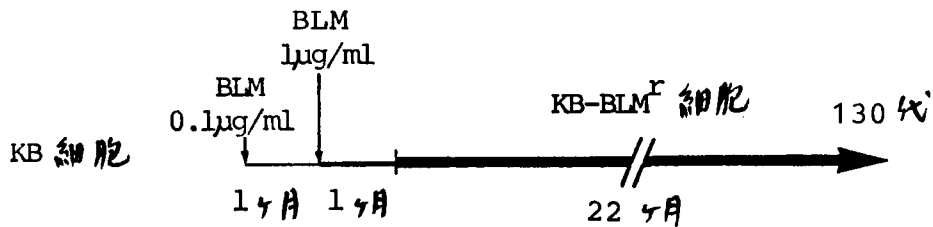
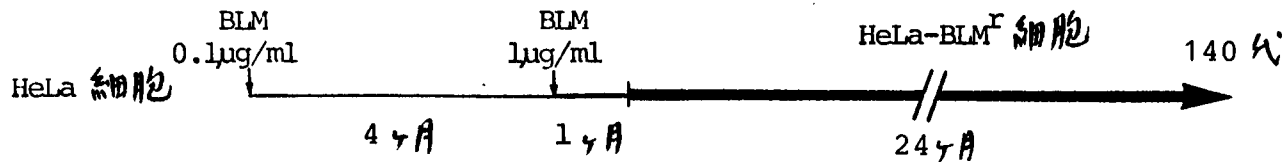


表 2

細胞抽出液	<u>B. subtilis</u> PCI 219 のコロニー数				生存率 (a/b)	相対比
	+ BLM	平均 (a)	- BLM	平均 (b)		
HeLa	88,77	82.5	830,900	865.0	0.10	(2.50)
HeLa-BLM <sup>r</sup>	126,188	157.0	1060,900	980.0	0.16	(4.00)
KB	117,121	119.0	820,800	810.0	0.15	(3.75)
KB-BLM <sup>r</sup>	202,172	187.0	720,600	660.0	0.28	(7.00)
Hepd	72,77	74.5	640,600	620.0	0.12	(3.00)
Hepd-uvBLM <sup>r</sup>	83,70	76.5	730,700	715.0	0.11	(2.75)
緩衝液対照	41,46	43.5	1412,1008	1210.5	0.04	(1.00)

表3

細胞	細胞膜透過性		BLM不活化活性 <sup>c)</sup>	DNA修復能 <sup>d)</sup>
	細胞内への取り込み <sup>a)</sup>	細胞放出 <sup>b)</sup>		
HeLa-BLM <sup>r</sup>	0.56 (↓)	(↑)	1.6 (↑?)	24.5 (↑↑)
KB-BLM <sup>r</sup>	0.60 (↓)	(→)	1.9 (↑?)	1.0 (→)
Hepd-uvBLM <sup>r</sup>	1.00 (→)	(↑)	1.0 (→)	93.5 (↑↑↑)

表 4

## 实验 I

变 异 原		-BLM 平均	生存率 (%)	+BLM 平均	BLM 细胞出现率
UV (sec)	0	1216	100.0	-	-
	10	1014	83.4	295	$1.48 \times 10^{-1}$
	20	876	72.0	232	$1.16 \times 10^{-1}$
	30	766	63.0	215.5	$1.08 \times 10^{-1}$
X-ray (rad)	0	1216	100.0	-	-
	50	724	59.5	262	$1.31 \times 10^{-1}$
	100	624	51.3	175.5	$8.78 \times 10^{-2}$
	200	580	47.7	108	$5.40 \times 10^{-2}$

## 实验 II

MMC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0	671	100.0	-	-
	0.1	589	87.8	508	$2.54 \times 10^{-1}$
	0.5	546	81.4	369.5	$1.85 \times 10^{-1}$
	1.0	436	65.0	312.5	$1.56 \times 10^{-1}$

表 5

HeLa-radBLM <sup>r</sup> 細胞		HeLa-mmcBLM <sup>r</sup> 細胞	
クローン	BLM耐性度 (倍)	クローン	BLM耐性度 (倍)
1	16.6	1	17.4
2	15.0	2	25.2
3	10.6	3	20.0
4	11.4	4	20.6
5	11.8	5	19.2
6	13.2	6	14.8
7	21.0	7	18.4
8	6.4	8	16.6
9	12.2	9	14.0
10	10.3	10	17.2
11	13.7	11	15.6
		12	13.8

表 6

細胞	細胞膜透過性		BLM不活化活性	DNA修復能
	細胞内への 取り込み	細胞外 放出		
HeLa-radBLM <sup>r</sup>				
Cl. 7	0.60 (↓)	(↑)	1.5 (↑?)	87.7 (↑↑↑)
4	0.60 (↓)	(↑)	1.5 (↑?)	68.9 (↑↑↑)
8	1.00 (→)	(→)	1.6 (↑?)	54.1 (↑↑↑)
HeLa-mmcBLM <sup>r</sup>				
Cl. 2	0.55 (↓)	(↑)	1.7 (↑?)	59.1 (↑↑↑)
HeLa-BLM <sup>r</sup>				
	0.56 (↓)	(↑)	1.6 (↑?)	24.5 (↑↑)



表7

细胞	BLM	PEP	ACD	ADM	MMC	CPDD	5-FU	MTX	VCR (倍)	交叉耐性/耐性 在示可/细胞数 剂数/剂数
HeLa-BLM <sup>r</sup>	20.0	10.7	2.7	3.8	1.3	0.3	1.0	1.0	2.0	4/8
KB-BLM <sup>r</sup>	11.6	12.0	1.3	1.8	0.9	1.0	2.0	2.1	1.3	3/8
Hepd-uvBLM <sup>r</sup>	185.0	45.0	10.0	2.4	1.0	1.2	12.8	4.7	0.9	5/8
HeLa-radBLM <sup>r</sup> Cl.7	21.0	10.8	1.1	6.1	1.1	4.3	2.3	1.7	3.8	5/8
HeLa-mmcbLM <sup>r</sup> Cl.2	25.2	11.9	2.2	4.6	4.2	3.3	1.5	2.0	3.2	7/8
交叉耐性在示可/耐性 耐性细胞数/细胞数		5/5	3/5	4/5	1/5	2/5	3/5	3/5	3/5	

表 8

<sup>3</sup> H-PEP 処理時間 (分)	HeLa	HeLa-BLM <sup>r</sup>	KB	KB-BLM <sup>r</sup>	Hepd	Hepd-uvBLM <sup>r</sup>
0	41.4 ± 9.0	46.1 ± 2.8	45.1 ± 3.6	44.3 ± 9.2	56.3 ± 10.3	62.8 ± 10.4
30	219.2 ± 37.2	151.6 ± 5.9	326.2 ± 43.9	241.1 ± 30.1	461.4 ± 100.5	424.6 ± 93.4
60	319.9 ± 14.1	206.7 ± 17.3	439.2 ± 44.7	272.4 ± 5.5	717.2 ± 72.3	670.5 ± 26.8
フィリピン (10μg) + 60	420.9 ± 52.0	397.1 ± 69.8	1270.4 ± 167.7	1207.0 ± 130.3	1614.2 ± 25.0	1772.4 ± 52.7

(dpm ± SD)

表9

## 体細胞における主な抗癌剤耐性株

抗癌剤	細胞	耐性機構	発表年	文献
ACD	ハムスター DC3F CLM-7	膜透過性の低下	1970	51
	マウス P388	細胞外放出の亢進	1977	52
ADM Daunomycin	マウス P388	細胞外放出の亢進	1978	53
			1979	54
			1979	55
BLM	ラット AH66F	BLM 分解酵素の上昇 DNA 修復能の上昇	1973	9
	ハムスター CHO	膜透過性の低下	1979	12
	マウス L5178Y	膜透過性の低下	1981	11
	ハムスター CHO	膜透過性の低下	1981	10
		BLM 分解酵素の上昇	1981	28
MTX	ハムスター CHO	標的酵素活性の上昇	1976	56
	マウス S-180	標的酵素活性の上昇	1978	57
	" L1210			
	" L5178Y			
	" 3T6			
	ハムスター BHK	膜透過性の低下	1982	20
" CHO				
ヒト MOLT-3				
5-FU	マウス S49	活性化酵素の減少	1979	58
	マウス L1210	活性化酵素の減少	1982	59
	" P388		1982	60