

Bleomycin による HeLa 細胞染色体構造異常について

新潟大学医学部産科婦人科学教室(主任:鈴木雅洲教授)

大学院学生 大 野 剛

概要 抗腫瘍剤の一つである Bleomycin については、すでに生化学的な作用機序も明らかにされ、臨床的にもすぐれた治療効果が報告されているが、著者は Bleomycin の腫瘍細胞に対する作用機序並びに抗腫瘍効果について染色体学的立場から検討するため、HeLa 細胞に Bleomycin を作用させて細胞分裂の変化、異常染色体の発現について調べ、以下の結果を得た。

① Bleomycin の HeLa 細胞に対する細胞分裂阻止作用は $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ の低濃度においてすでに軽度に見られ、高濃度になるに従い強い阻止作用を示した。さらに一定時間 Bleomycin を作用させた後の 6～72 時間後においても、経時的に細胞分裂阻止の増加がみられた。

② 種々の Bleomycin 濃度において、濃度の増加とともに異常染色体の増加が観察され、また Bleomycin を一定時間作用させた後の 6～36 時間後の経時変化においても異常の増加を示した。

③ Bleomycin 作用による HeLa 細胞の染色体異常の型は heterochromatic region を有する染色体、break を有する染色体、gap を有する染色体を特徴とし、dicentric chromosome, ring chromosome, exchange の発現は非常に少なかった。また染色体各グループ別では A, B, C, D 群に高頻度に発現した。

④ Bleomycin による染色体構造異常の型と他の抗腫瘍剤による染色体構造異常の型との間には類似性が認められず、Bleomycin の腫瘍細胞に対する作用機序が他の抗腫瘍剤のそれと異なつた独得のものであることが染色体学的にも云い得るであろう結果を得た。

緒 言

近年抗腫瘍剤の開発が進み、臨床的応用例も増加している。Mitomycin-C をはじめとする抗腫瘍剤の多くは生化学的にも作用機序が明らかにされ、DNA, RNA, 蛋白等に対してそれぞれ異なつた作用を有しており、また臨床的な治療効果も同一ではなく、染色体におよぼす影響においても抗腫瘍剤によつて、それぞれ特徴的な染色体変化をおこすことが知られている。

抗腫瘍剤の一つである Bleomycin (以下 BLM と略) は Umezawa, et al. (1966) により発見され、in vitro においてはもちろんのこと、臨床的にもすぐれた効果を示すことが鈴木 (1969) 等により報告されており、他の抗腫瘍剤に較べ副作用の少ないことを特徴とする。しかしその作用機序については必らずしも明らかではなく、とくに腫瘍細胞染色体への影響についての報告はない。著者はすでに HeLa 細胞を用いて BLM の

腫瘍細胞に与える影響について染色体学的立場から検討し、そのうちの異数性の変化についてはすでに報告した (著者, 1970)。今回さらに異常染色体の発現について検討を試みた。

実験材料及び実験方法

実験材料

新潟大学医学部細菌学教室より HeLa 細胞の分与を受け、5% 仔牛血清加 YLE 培養液で 37°C に培養し、実験に供した。

BLM は日本化薬株式会社製のブレオマイシン (銅を含まない CP_3F_1) 15mg/Amp を用いた。

実験方法

HeLa 細胞の培養方法および染色体標本の作成については拙著 (大野, 1970) に述べたので詳細は省略する。染色体の分析は岡田 (1968) の方法にしたがい、Denver 方式により A, B, C, D, E, F, G, の各群に分類し、異常染色体の型については、異染性部分 (heterochromatic region)

を有する染色体 (h.c.r.と略), 裂孔染色体 (gap と略), 切断染色体 (break と略), 環状染色体 (ring と略), 二着糸点染色体 (dicent と略), 断片染色体 (frag と略), 異常付随体を有する染色体 (satel と略), その他の異常染色体 (others と略) に区別した。

1. 細胞分裂指数 (Mitotic Index, MI)

a. BLM作用群

BLMの種々濃度におけるMIの変化を検討するため, HeLa 細胞をTDフラスコに移し5%仔牛血清を加えたYLE培養液で medium change を行ない, 同時に 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, 100.0 $\mu\text{g/ml}$ の BLMを加えてそれぞれ24時間培養し, colcemide 処理の後塗抹標本を作成した. 対照群としてBLM無処理で同様な操作を加えて標本を作成した. 各標本を光学顕微鏡を用いて, 対照群および各濃度別にそれぞれ 4,000細胞中の分裂核を算え, per 1,000cells をもってMIとした。

また 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の BLMを24時間作用させた後のMIの経時的变化をみるため, HeLa 細胞をTDフラスコに移し medium change と同時に 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の BLMを加え24時間培養し, その後BLMを含まない培養液に medium change して培養を続け, 6, 12, 24, 36, 48, 72時間後に colcemide 処理後, 塗抹標本を作成しMIおよび核分裂係数 (Mitotic Rate, MR) を算定した. 対照群にはBLM無処理で同様な操作を加えて作成した標本を用いた。

b. MIの経日的変化

HeLa 細胞をTDフラスコに移して medium change した後, 1, 2, 3, 4, 5, 6日間培養を続け, colcemide 処理を加えずに塗抹標本を作成し, MIを求め HeLa 細胞のMIの経日的変化を検べた。

2. 異常染色体の出現頻度

HeLa 細胞のBLMの作用による異常染色体の出現頻度および種類を検討するため, 以下の実験を行なった。

a. BLMの種々濃度における異常染色体の出現頻度

HeLa 細胞をTDフラスコに移し, medium change と同時に 0.1, 0.5, 1.0, 10.0, $\mu\text{g/ml}$ の BLMを加えて, 24時間培養し, colcemide 処理の後染色体標本を作成し, 染色体分析を行なった。

b. HeLa 細胞の異常染色体の出現頻度

自然状態における HeLa 細胞の異常染色体の出現頻度を知るため, HeLa 細胞をTDフラスコに移し, medium change を行なつて24時間培養し, colcemide 処理の後染色体標本を作成し, 染色体分析を行なった。

c. BLM作用後の異常染色体出現の経時的变化

HeLa 細胞をTDフラスコに移し medium change と同時に 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の BLMを加えて24時間培養し, その後BLMを含まぬ培養液に medium change して培養を続け, 6, 12, 24, 36時間後にそれぞれ colcemide 処理を行ない染色体標本を作成し, 一定時間BLM作用後の異常染色体の経時的变化を検討した。

実験成績

1. Mitotic Index

HeLa 細胞を培養し, MIの経日的変化を検討したところ, 1日目26.6, 2日目33.0, 3日目43.8, 4日目47.8と, ほぼ直線的増加を示したが, その後5日目37.2, 6日目37.0と減少傾向を示した. 一方, 24時間培養後のHeLa 細胞のMIは colcemide 処理群では27.0であり, colcemide 無処理群では26.6であり, 特に差はみられなかった。

培養液中のBLMの種々の濃度におけるMIは, 24時間培養後に 1.0 $\mu\text{g/ml}$ では23.0, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ では22.0と control の27.0に較べわずかながら減少を示し, 0.1~0.5 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度のBLMにも細胞分裂阻止作用がみられた. さらに 1.0 $\mu\text{g/ml}$ では15.0, 10.0 $\mu\text{g/ml}$ では9.0, 100.0 $\mu\text{g/ml}$ では6.0と高濃度になるにしたがい強い分裂作用を示した。

培養24時間目におけるMR (BLM-MI/control-MI) は, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ では85.1%, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ で

表1 HeLa 細胞の異常染色体出現頻度 (24時間培養後)

Group	No. of chromo-somes	Hetero chromatic region	Satellite	Chromatid abnormalities				Frag-ment	Others	Total (%)
				Gap	Break	Dicentric	Monocentric			
A	429	44 (10.3)		2 (0.5)	1 (0.2)					47 (11.0)
B	201	20 (10.0)			5 (2.5)					25 (12.4)
C	1267	52 (4.1)		5 (0.4)	3 (0.2)	1 (0.1)				61 (4.8)
D	410	12 (2.9)	9 (2.2)	2 (0.5)	3 (0.7)					26 (6.3)
E	448	12 (2.7)		1 (0.2)	2 (0.4)					15 (3.3)
F	287	4 (1.4)								4 (1.4)
G	246	1 (0.4)	7 (2.8)							8 (3.3)
Other	10						1	9		10
Total (%)	3294	145 (4.4)	16 (0.5)	10 (0.3)	14 (0.4)	1 (—)	1 (—)	9 (0.3)		196 (5.9)

は81.4%, 1.0 μ g/ml では55.5%, 10.0 μ g/ml では33.3%, 100.0 μ g/ml では22.2%と, 濃度の増加にしたがつて減少を示した。

一方, 一定濃度のBLM, すなわち 1.0 μ g/ml のBLMを24時間作用させ, BLMを含め培養液に medium change を行なった後のMIの経時の変化は, 6時間後21.5, 12時間後15.5, 24時間後15.0, 36時間後17.5, 48時間後19.5, 72時間後20.5であり, 差はみられなかった。しかし, MRは, 6時間後95.6%, 12時間後88.6%, 24時間後76.9%, 36時間後76.1%, 48時間後53.9%, 72時間後43.9%で明らかに時間の経過とともに減少した。

2. 異常染色体の出現頻度

自然状態における HeLa₃細胞の24時間培養後の異常染色体は, 表1のごとく, 染色体分析を行なった50細胞 3,294個の染色体のうち, 196個 (5.9%) であり, 一細胞あたり 3.9個の出現頻度であった。染色体異常の内容は, h.c.r. が145個で 4.4% (2.9 per cell) と最も高頻度であり, *次いで satel が16個 (0.5%), frag が9個 (0.3%) であった。一方, break および gap, はそれぞれ, 14個 (0.4%) および10個 (0.3%) であり, HeLa 細胞の自然状態における break お

よび gap の出現頻度は低い。dicent および mono に至っては非常に少ない。また核型別の異常染色体の頻度は, B群の 201個中25個 (12.4%) が最も多く, 次いでA群の11.0%, D群の 6.3%, C群の 4.8%, E群の 3.3%, G群の 3.3%, F群の 1.4%の順に多くみられた。

種々濃度のBLMを作用させ異常染色体の出現の影響をみると, 表2に示すごとく, 0.1 μ g/ml 濃度では 1,214個中164個 (13.5%), 8.2 per cell の出現頻度であり, control の 2.3倍の頻度であった。他濃度においても 0.5 μ g/ml で21.5% (12.7 per cell), 1.0 μ g/ml で16.9% (10.8 per cell) 10.0 μ g/ml で29.4% (13.2 per cell) であり, それぞれ control の 3.6倍, 2.9倍, 5.0倍の増加を示した。異常染色体のうち, h.c.r., gap, break の異常が多く satel, frag 等の異常の変化はあまりみられなかった。

BLMの各濃度における核型別の変化は, 表2に濃度別に示したが, A群, B群, D群の異常が著明であり, たとえば 0.5 μ g/ml 濃度においては, A群では 145個中56個 (38.6%) で control の 3.5倍の増加を示し, 以下B群で34.2% (2.8倍), C群19.5% (4.1倍), D群24.4% (3.9倍),

表2 BLMの種々濃度における異常染色体の出現頻度(24時間作用後)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Group	No. of chromo- somes	Hetero chromatic region	Satellite	Chromatid abnormalities				Frag- ment	Others	Total (%)
					Gap	Break	Dicentric	Mono- centric			
0.1	A	162	19(11.7)		1(0.6)	6(3.7)	1(0.6)				27(16.7)
	B	82	20(24.4)		3(3.7)	3(3.7)	2(2.4)				28(34.1)
	C	495	48(9.7)		5(1.0)	5(1.0)					58(11.7)
	D	141	5(3.5)	4(2.8)	1(0.7)	6(4.3)					16(11.3)
	E	144	10(6.9)			2(1.4)					12(8.3)
	F	92	1(1.1)								1(1.1)
	G	80	2(2.5)	1(1.3)		1(1.3)					4(5.0)
	Other	18							18		18
	Total (%)	1214	105(8.6)	5(0.4)	10(0.8)	23(1.9)	3(0.2)		18(1.5)		164(13.5)
0.5	A	145	36(24.8)		6(4.1)	12(8.3)	2(1.4)				56(38.6)
	B	79	20(25.3)		2(2.5)	4(5.1)	1(1.3)				27(34.2)
	C	473	54(11.4)		14(3.0)	24(5.1)					92(19.5)
	D	119	5(4.2)	16(13.4)	2(1.7)	6(5.0)					29(24.4)
	E	155	15(9.7)		4(2.9)	2(1.3)					21(13.5)
	F	99	1(1.0)		4(4.0)	4(4.0)					9(9.1)
	G	95	5(5.3)	2(2.1)	1(1.1)						8(8.4)
	Other	11							11		11
	Total (%)	1176	136(11.6)	18(1.5)	33(2.8)	52(4.4)	3(0.3)		11(0.9)		253(21.5)
1.0	A	172	40(23.3)		5(2.9)	9(5.2)					54(31.4)
	B	75	12(16.0)		3(4.0)	4(5.3)					19(25.3)
	C	526	63(12.0)		8(1.5)	12(2.3)					83(15.8)
	D	145	10(6.9)	10(6.9)	3(2.1)	5(3.4)					28(19.3)
	E	167	11(6.6)		1(0.6)	1(0.6)					13(7.8)
	F	94	2(2.1)		2(2.1)						4(4.3)
	G	85	1(1.2)	2(2.4)							3(3.5)
	Other	11							10	1	11
	Total (%)	1275	139(10.9)	12(0.9)	22(1.7)	31(2.4)			10(0.8)	1(0.1)	215(16.9)
10.0	A	114	32(28.1)		9(7.9)	11(9.6)					52(45.6)
	B	59	13(22.0)		4(6.8)	5(8.5)					22(37.2)
	C	376	59(15.7)		12(3.2)	23(6.1)					94(25.0)
	D	105	16(15.2)	10(9.5)	3(2.9)	4(3.8)					33(31.4)
	E	106	22(20.8)		4(3.8)	7(6.6)					33(31.1)
	F	73	8(11.0)		2(2.7)	2(2.7)					12(16.4)
	G	59	3(5.1)	7(11.9)		1(1.7)					11(18.6)
	Other	7							7		7
	Total (%)	899	153(17.0)	17(1.9)	34(3.8)	53(5.9)			7(0.8)		264(29.4)

E群13.5% (4.1倍), F群 9.1% (6.5倍), G群 8.4% (2.6倍)であつた。

また 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の BLMを24時間作用させ、その後BLMを含まぬ培養液に medium change

した後の異常染色体の経時的出現頻度は、表3に示すごとく、6時間後では1,923個中260個(13.5%)の染色体に異常がみられ、8.7per cellの出現頻度であつた。同じく、12時間後では13.4

表3 BLM (1.0 $\mu\text{g/ml}$) を24時間作用させ, medium change した後の異常染色体の出現頻度

Hours	Group	No. of chromo-somes	Hetero-chromatic region	Satellite	Chromatid abnormalities				Frag-ment	Others	Total (%)
					Gap	Break	Dicen-tric	Mono-centric			
6	A	261	45(17.2)		16(6.1)	1(0.4)	1(0.4)				63(24.1)
	B	116	27(23.3)		4(3.4)	1(0.9)				1(0.9)	33(28.4)
	C	713	63(8.8)		11(1.5)	8(1.1)					82(11.5)
	D	226	13(5.8)	8(3.5)	3(1.3)	4(1.8)					28(12.4)
	E	265	21(8.0)		2(0.8)	2(0.8)					25(9.4)
	F	170	8(4.7)								8(4.7)
	G	154	1(0.6)	2(1.3)							3(1.9)
	Other	18						1	17		18
	Total (%)	1923	178(9.3)	10(0.5)	36(1.9)	16(0.8)	1(0.1)	1(0.1)	17(0.9)	1(0.1)	260(13.5)
12	A	259	50(19.3)		6(2.3)	4(1.5)	1(0.4)				61(23.6)
	B	114	34(29.8)			1(0.9)					35(30.7)
	C	719	73(10.2)		7(1.0)	7(1.0)					87(12.1)
	D	219	21(9.6)	4(1.8)	3(1.4)	3(1.4)					31(14.2)
	E	277	22(7.9)			4(1.4)					26(9.4)
	F	145	3(2.1)			1(0.7)					4(2.8)
	G	136	3(2.2)			1(0.7)					4(2.9)
	Other	8							8		8
	Total (%)	1877	206(11.0)	4(0.2)	16(0.9)	21(1.1)	1(0.1)		8(0.4)		256(13.4)
24	A	275	58(21.1)		8(2.9)	6(2.2)	1(0.4)				73(26.5)
	B	119	28(23.5)		4(3.4)	2(1.7)				1(0.8)	35(29.4)
	C	681	96(14.1)		6(0.9)	7(1.0)	1(0.1)				110(16.2)
	D	234	25(10.7)	8(3.4)	1(0.4)	5(2.1)	1(0.4)				40(17.1)
	E	260	26(10.0)		2(0.8)	3(1.2)					31(11.9)
	F	162	17(10.5)								17(10.5)
	G	146	5(3.4)	2(1.4)							7(4.8)
	Other	10							9	1	10
	Total (%)	1887	255(13.5)	10(0.5)	21(1.1)	23(1.2)	3(0.2)		9(0.5)	2(0.2)	323(17.1)
36	A	278	66(23.7)		11(4.0)	3(1.1)					80(28.8)
	B	122	25(20.5)		6(5.0)	2(1.6)	1(0.8)				34(27.9)
	C	731	98(13.4)		23(3.1)	18(2.5)					139(19.0)
	D	242	19(7.9)	7(2.9)	6(2.5)	12(5.0)					44(18.2)
	E	277	16(5.8)		2(0.7)	3(1.1)					21(7.6)
	F	162	4(2.5)								4(2.5)
	G	152	3(2.0)	14(9.2)							17(11.2)
	Other	32						2	29	1	32
	Total (%)	1996	231(11.6)	21(1.1)	48(2.4)	38(2.0)	1(0.1)	2(0.1)	29(1.5)	1(0.1)	371(18.6)

% (8.5per cell), 24時間後で17.1% (10.8per cell), 36時間後で18.6% (12.4per cell) であり, 時間の経過にしたがって異常染色体の増加がみられ, そのうちでもとくに h.c.r., gap, break, の増

加がみられた. 核型別の異常染色体の出現頻度も, 表3に示すとおりで, B, A, D, C群に高濃度であり, E, F, G群では少ない. しかしいずれの核型においても時間の経過にしたがって,

写真1 Medium change 後6時間目の分裂期像
(B L M 1.0 μ g/ml 24時間作用後)



写真2 Medium change 後6時間目の分裂期像
(B L M 1.0 μ g/ml 24時間作用後)

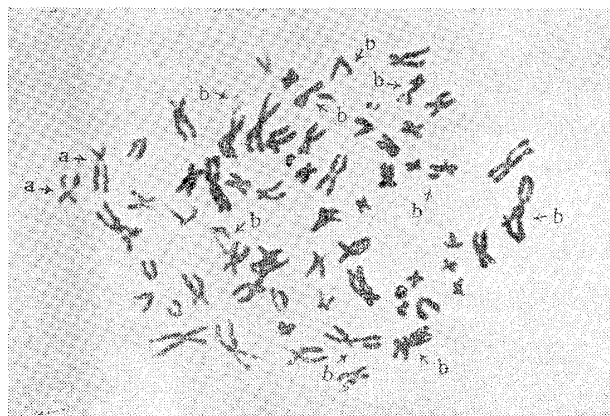
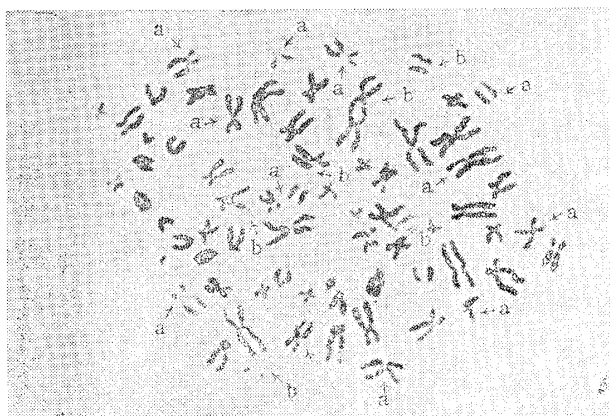
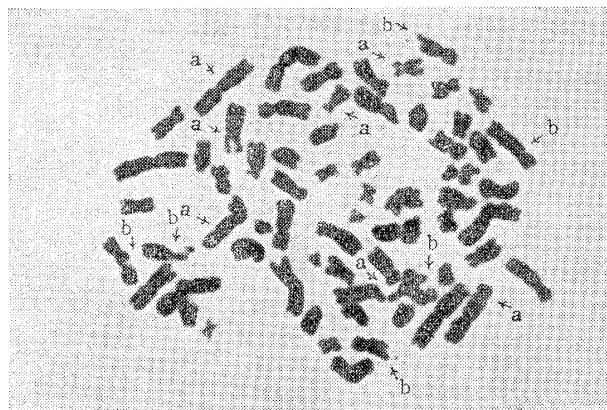


写真3 medium change 後24時間目の分裂期像
(B L M 1.0 μ g/ml 24時間作用後)



異常染色体が増加し、とくに B, A, D 群の異常が著明である。写真1, 2, 3, 4に 1.0 μ g/ml 濃度の B L M を 24 時間作用させた後の medium change 後の 6~36 時間目の中期分裂像を示す (a: 異染色性部分, b: その他の染色体異常)。

写真4 Medium change 後36時間目の分裂期像
(B L M 1.0 μ g/ml 24時間作用後)



考 案

正常健康人における染色体分析で、構造異常を有する染色体の出現頻度は佐々木 (1968) の 0.98 \pm 0.19%, 本多 (1969) の 3.3%, Jacobs (1969) の 3%, Ohhama (1970) の 3.3%, その他の報告より約 3% 前後と考えられている。一方 HeLa 細胞においては、その特殊性から、他の哺乳動物細胞に比べ高率の異常染色体出現頻度を示すとされ、Vrba (1967) は 6.8% といい、Bushong (1968) によると 2 倍体の fibroblast の約 10 倍の頻度であるという。著者は 24 時間培養後の HeLa 細胞にて、5.9% の異常染色体出現率を得、これは一細胞当たり 3.9 個の頻度であつた。

Kunimoto, et al. (1967), Suzuki, et al. (1968) らによると B L M は、RNA ならびに蛋白合成に殆んど影響を与えることなく DNA 合成を阻害するといわれ、さらに Suzuki, et al (1969) は B L M が DNA 分子を低分子に切断し、その結果 DNA 複製が不可能となり DNA 合成が阻害されることを報告している。

こういった作用機序を有する B L M を、悪性腫瘍細胞である HeLa 細胞に種々の濃度で 24 時間作用させてみたわけであるが、生じて来た構造異常別出現頻度は、break 型が 0.1 μ g/ml の B L M 濃度で control の 4.8 倍、0.5 μ g/ml で同じく 11 倍、1.0 μ g/ml で 6.0 倍、10.0 μ g/ml では 14.8 倍を示し、gap 型では 0.1 μ g/ml で 2.7 倍、0.5 μ g/ml で 9.3 倍、1.0 μ g/ml で 5.6 倍、10.0 μ g/ml

ml で12.7倍であり, h.c.r. 型では $0.1\mu\text{g/ml}$ で 2.0倍, $0.5\mu\text{g/ml}$ で 2.6倍, $1.0\mu\text{g/ml}$ で 2.5倍, $10.0\mu\text{g/ml}$ で 3.9倍とそれぞれ増加を示したが, satel 型, frag 型ではほとんど変化がみられなかった.

實際上 h.c.r., gap, break, をはつきりと識別することは容易なことではなく, Merz (1961) は heterochromatic region に break を生ずるといい, Cohen, et al. (1967) は明らかな chromatid の不連続性をもつて break とする一方, 染色性の少ない部分を有するものを gap としている. さらに Jacobs (1969) は chromatid の一部が無染色で転位のないものについて gap とし, 転位を生じたものを break と呼んでいる. Skakkebaek, et al. (1968) は転位のない不連続性のものを gap, 転位を生じたものを break, 染色性の悪い部分を有するものを二次狭窄に分けている. 著者はこれらを一連の経過と考え, 異染色性の程度の強いものから無染色に至つたものを gap と, さらに chromatid の転位を生じたものについて break とした.

以上から BLM の HeLa 細胞に与える染色体異常の特徴は break, ならびに gap といえ得ると考えられる. さらに染色体各グループ別出現頻度については, 実験成績の表2のごとく, 各グループ共濃度とともに増加しているが, そのうちでも, A, B, C, D群の増加に較べ E, F, G群の増加が著しい. E, F, G群における異常染色体出現の著しい増加については, これらの群にとくに異染色性部位が多いわけではないので, control にて構造異常の自然発生が非常に起こりにくいこの群が BLM 作用で他の group なみに異常を生じたものとして説明され得るであろう. ところで染色体の DNA-replication に要する時間について, Kikuchi, et al. (1964), German (1964) は replication はすべての染色体が同時に開始するのではなく, 各 group により異なり B_4 , A_1 , B_5 , C の順に始まり F, G は遅れて開始するといひ, また replication の終了は逆に F, G が最も早く B, D は遅いという. すなわち, A, B, C, Dのごと

く大型の染色体は一般に DNA-replication に長時間を要し, F, Gのごとく小型の染色体は短時間に終了するといえる. DNA-replication に長時間要するものほどその間に replication 阻止因子の影響を受けやすく, 染色体の異常をおこしやすいと考えた場合, 自然状態における A, B群の異常の多いことが説明される. 一方, BLM が replication 以前の DNA 切断の段階で阻止作用を示すことは, control に比しての F, G群での BLM による異常の増加があることから説明され得る.

Ohhama (1970) によれば BLM のヒト白血球におよぼす影響は break, gap, および frag に多く, dicent, ring, 等に少ない. この点は著者の成績に一致する. また BLM 類似の抗腫瘍剤 Phleomycin (PLM) については Tanaka, et al. (1963) により DNA 合成阻止作用 Falashi, et al. (1964) により DNA-polymerase 阻止作用が明らかにされている. Jacobs (1969) によると, PLM によりヒト白血球で $0.1\mu\text{g/ml}$ で 5%, $10.0\mu\text{g/ml}$ で 30% の異常細胞をみており, gap, break, frag の異常が多く dicent, exchange は高濃度においてのみ少数みられたという. 抗腫瘍剤 Mitomycin-C (MMC) の作用機序は Ben-Porat, et al. (1961), Sekiguchi, et al. (1960), Shiba, et al. (1959) 等により, DNA 合成阻止にあるといわれ, さらに Iyer, et al. (1963) により DNA-strand の cross-linking によるものであることが明らかにされた. その染色体におよぼす影響は Nowell (1963) 等によると, break と exchange の出現であり, Cohen, et al. (1964) は $0.1\mu\text{g/ml}$ および $1.0\mu\text{g/ml}$ の MMC を 24 時間作用させて 0.75 per cell および 2.30 per cell の break を, 本多 (1969) は同じく $0.1\mu\text{g/ml}$ および $1.0\mu\text{g/ml}$ 濃度で 8.0%, および 42.5% の exchange を報告している. 核型別においては, No 1, 9, 16 に好発し, 21~22, y 群では最も少ないという. また DNA-dependent-RNA 阻止作用を有するとされる Actinomycin-D (AMD) は Arrighi, et al. (1965), Ostertag (1965) らによると decondensed chro-

mosome および break の染色体異常が特徴とされる。しかし, Nowell (1963) のごとく AMD による break の増加をみないものもある。また, 作用機序は明らかでないが, Lysergic acid diethylamide (LSD-25) が break を主とする染色体異常を来すことが, Egoscue (1968), Zellweger (1967), Irwin, et al. (1967) らにより報告されており, break の他, gap, exchange もみられるという。Cohen, et al. (1967) によると核型別では A_1 , B_1 , A_2 , C の順に高頻度で, F, G では少ない, 一方放射線照射では佐々木 (1969), Bender (1962) らによると break, gap の他, dicent, frag が高頻度にみられ, 佐々木 (1969) は A, B, C 群での構造異常が多いという。その他, Vrba (1967) は Endoxan では gap, break が多く, Vig (1968) は Daunomycin では gap の他 exchange, frag が多くみられるという。すなわち Daunomycin は DNA 合成阻害のほか RNA および蛋白合成阻止作用をもち DNA と結合しやすく, DNA-strand の cross-linking により fragment の再結合をおこしやすく, 染色体異常として exchange の増加を来すといわれる。

このように生化学的にも DNA に対する抗腫瘍剤の作用機序は異なっており, その特徴により, MMC のごとく cross-linking をおこすものでは exchange が多く, RNA 合成阻害によるものでは染色体異常は軽度であるなどと染色体の異常との間に密接な関連があるものと思われる。BLM は生化学的にも DNA の切断作用をもち, 他の抗腫瘍剤の作用機序を異にしており, また染色体異常の型の面でも exchange の少ない点で MMC, Daunomycin, LSD-25 とは, また dicent, frag の少ない点で放射線とは異なっており, BLM 特有の染色体異常を呈するといえると思われる。

結 語

抗腫瘍剤 BLM を HeLa 細胞に種々濃度で作用させたところ,

1) MI は $0.1 \sim 0.5 \mu\text{g/ml}$ BLM 濃度では対照の約 85%, $1.0 \mu\text{g/ml}$ にて 56%, $10.0 \mu\text{g/ml}$ にて 33%, $100.0 \mu\text{g/ml}$ では約 20% に細胞分裂を阻

止した。

2) $1.0 \mu\text{g/ml}$ 濃度の BLM を 24 時間作用させた後 6 ~ 72 時間の MI は 6 時間後 96%, 12 時間後 89%, 24 時間後 77%, 36 時間後 76%, 48 時間後 54%, 72 時間後 44% と時間とともに減少した。

3) 24 時間培養後の HeLa 細胞の異常染色体は 5.9% (3.9 per cell) の出現頻度であつた。

4) 種々の BLM 濃度による 24 時間培養後の異常染色体は $0.1 \mu\text{g/ml}$ で対照群の 2.3 倍, $0.5 \mu\text{g/ml}$ で 3.6 倍, $1.0 \mu\text{g/ml}$ で 2.9 倍, $10.0 \mu\text{g/ml}$ で 5.0 倍に増加した。異常の種類としては h.c.r. を有する染色体, gap, break が増加した。また核型別では A, B, C, D 群に高頻度であり, 濃度とともに E, F, G 群の増加が著しかつた。

5) $1.0 \mu\text{g/ml}$ BLM 濃度 24 時間培養後の HeLa 細胞の異常染色体の 6 ~ 36 時間後の経時変化において, 時間とともに異常の増加がみられ, h.c.r. を有する染色体, gap, break の増加が著しく核型では B, A, D 群の異常が多かつた。

稿を終るにあたり, 御指導, 御校閲を賜つた恩師鈴木雅洲教授に深甚の謝意を表するとともに, 直接御指導戴いた岡田正俊先生, 本多達雄先生に深謝いたします。また多大の御援助, 御指導戴いた白倉美佐子先生, 並びに新潟大学医学部細菌学教室今井康允先生に感謝いたします。

本論文の要旨は第 8 回日本癌治療学会で発表した。

文 献

- 本多達雄 (1969): 日産婦誌, 21, 1319
- 大野 剛 (1970): 日産婦誌, 掲載予定
- 岡田正俊 (1968): 性染色質および染色体異常に関する研究, 第 16 回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会, 特別講演要旨
- 鈴木雅洲 (1969): 日癌治, 4, 1, 631
- 佐々木太郎 (1968): 日産婦誌, 20, 631
- Arrighi, F. and Hsu, T.C. (1965): Exp. Cell. Res., 39, 305.
- Bender, M.A. and Gooch, P.C. (1962): Radiation Research, 16, 44.
- Ben-Porat, T., Reissig, M. and Kaplan, A. (1961): Nature, 190, 33.
- Bushong, S.C., Watson, J.A. and Wald, N. (1968): Radiology, 90, 2, 958.
- Cohen, M.M. and Shau, M.W. (1964): J. Cell Biol., 23, 386.

- Cohen, M.M., Marinello, M.J. and Back, N.* (1967): Science, 155, 1417.
- Egozcue, J., Irwin, S. and Maruffo, C.A.* (1968): JAMA, 204, 3, 122.
- German, J.L.* (1964): J. Cell. Biol. 20, 37.
- Irwin, S. and Egozcue, J.* (1967): Science, 157, 313.
- Iyer, V.N. and Szybalski, W.* (1963): Proc. Nat. Acad. Sc., 50, 355.
- Jacobs, N.F., Neu, R.L. and Gardner, L.I.* (1969): Mutation Res., 7, 251.
- Jacobs, P.A., Couru Brown, W.M. and Doll, R.* (1961): Nature, 191, 1178.
- Kikuchi, Y. and Sandberg, A.A.* (1964): J. Nat. Can. Inst., 32, 5, 1109.
- Kunimoto, T., Hori, M. and Umezawa, H.* (1967): J. Antibiot., A 20 277.
- Merz, T.* (1961): Science, 133, 329.
- Nowell, P.C.* (1963): Exp. Cell Res., 33, 445.
- Ohhama, K. and Kadotani, T.* (1970): Jap. Jour. Human Genet., 14, 293.
- Ostertag, W. and Kersten, W.* (1965): Exp. Cell. Res., 39, 296.
- Sekiguchi, M. and Takagi, Y.* (1960): Biochim. et Biophysica Acta, 41, 434.
- Shiba, S. Tirawaki, A., Taguchi, T. and Kawamata, J.* (1959): Nature, 183, 1056.
- Suzuki, H., Nagai, K., Yamaki, H., Tanaka, N. and Umezawa, H.* (1964): J. Antibiot., 22, 446.
- Tanaka, N., Yamaguchi, H. and Umezawa, H.* (1963): Biochem. Biophys. Res. Commun., 10, 171.
- Vig, B.K., Kontras, S.B., Poddock, E.F. and Samuels, L.D.* (1968): Mutation Res., 5, 279.
- Vrba, M.* (1967): Human Genetik, 4, 362.
- Zellweger, H., Mc Donald, J.S. and Abbo, G.* (1967): Lancet, ii, 1066.

(No. 2398 昭45 10・5 受付)