Cis-diamminedichloroplatinum 耐性ヒト膀胱癌 培養細胞株の樹立とその特性

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

越 智 淳 三

ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A CIS-DIAMMINEDICHLORO PLATINUM-RESISTANT HUMAN BLADDER CANCER CELL LINE

Junzo Ochi

Department of Urology, Okayama University Medical School

(Director: Prof. H. Ohmori)

A cis-diamminedichloroplatinum (CDDP)-resistant cell line, CL-7/CDDP, has been established by chronic exposure of a parent human bladder cancer cell line, T24 (CL-7), to CDDP at progressively increased concentrations for 20 months. CL-7/CDDP was 2.7-fold more resistant to CDDP than CL-7 as determined by colony formation assay. Biological and biochemical characteristics were examined in CL-7/CDDP to compare with CL-7. There were no differences in doubling time and plating efficiency between the two cell lines, but a small one in the mode of chromosome numbers. Intra-cellular CDDP amounts after CDDP exposure showed no difference between the two cell lines, but CL-7/CDDP showed a higher glutathione (GSH) and metallothionein (MT) level. It is suggested that the mechanism of acquired resistance to CDDP is attributed to intra-cellular detoxication, but not to the efflux. CL-7/CDDP may be useful for elucidation of the mechanism of CDDP resistance in human bladder cancer.

Key words: cis-diamminedichloroplatinum resistance, human bladder cancer cell line, intra-cellular detoxication

要旨: CDDP 耐性機序解明を目的として, まず親株 T24 (CL-7) に CDDP を持続接触させ, 濃度を漸増させることにより CDDP 耐性膀胱癌培養細胞株 CL-7/CDDP を樹立した. ついでこの CL-7/CDDP と親株 CL-7 それぞれの生物学的特性・生化学特性を検討した.

CDDP 耐性膀胱癌培養細胞株 CL-7/CDDP は, 親株 CL-7 に対し 2.7 倍の CDDP 耐性を示した. 両株の doubling time および plating efficiency に差はなかったが, 染色体数のモードにおいて若干の差を認め, 耐性発現は mutation → selection あるいは selection のいずれかによるものと思われた. 細胞内 CDDP 量に差はなかったが, 細胞内 GSH, MT は CL-7/CDDP が高値を示した. CDDP 耐性発現は, 細胞外への efflux の亢進ではなく, 細胞内不活化に依存すると考えられた.

CDDP 耐性膀胱癌培養細胞株と親株の生物学的・生化学的相違点が示された. この細胞株を用いた実験をさらに進めることにより CDDP 耐性克服も可能と思われる.

キーワード: シスプラチン耐性, ヒト膀胱癌培養細胞株, 細胞内不活化

緒 言

Cis-diamminedichloroplatinum (以下 CDDP) は進行尿路上皮癌に対して最も高い奏効率を示す薬剤のひとつである¹⁾²⁾. しかし当初奏効した症例でも再発病巣あるいは転移巣は耐性を獲得し, 治療が困難であるこ

とが多い. この CDDP 耐性発現は, 泌尿器癌化学療法
の大きな問題であり, 耐性発現の機序解明および耐性
克服は, 化学療法の成績を向上させるうえで最重要課
題のひとつである.

CDDP 耐性機序解明を目的として, まず CDDP 耐性

ヒト膀胱癌培養細胞株 CL-7/CDDP を樹立した。ついでこの CL-7/CDDP と親株 CL-7 それぞれの生物学的特性、生化学的特性を検討した。

材料と方法

1. 細胞

使用した細胞は、1970年 Bubenik ら³⁾により樹立されたヒト膀胱癌培養細胞株 T24 (日本医科大学附属第一病院泌尿器科 中神義三教授より提供) を Tsushima ら⁴⁾が cloning して得た CL-7 である。

2. 培養方法

培養液は10% bovine serum 添加 Eagle's MEM (日本製薬, 東京)を用いた。pH は NaHCO_3 を加え約7.2 になるよう調節した。培養プラスチックシャーレ (3002 tissue culture dish, Falcon Co. USA) を用い開放系とし、37℃, 5% CO_2 下で静置培養を行った。継代は 0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液にて行った。

3. 制癌剤感受性試験

制癌剤感受性試験はコロニー形成法を用いた。Dish 内に semiconfluent monolayer に発育している細胞に対し 0.2% trypsin および 0.04% EDTA の等量混合液を加え、pipetting を行い single cell suspension とした。これを前述の培養液にて希釈し、生細胞数 400 個/ml の細胞浮遊液を作製した。これを予め培養液 2.5 ml を入れた 3002 tissue culture dish に、0.5 ml ずつ分注し、200 個/dish とした。37℃, 5% CO_2 下で 24 時間培養のち、培養液を捨て、各濃度の薬剤を加えた培養液で 2 時間同様に培養し薬剤に接触させた。その後培養液を捨て、Hanks 液にて 2 回洗浄し、あらたに培養液を 3 ml 加え、incubate した。10~12 日めに培養液を捨て、メタノールにて固定しギムザ染色して乾燥させたのち、細胞数 30 個以上より成るコロニー数を count した。薬剤無添加培養液のコロニー数を control として relative plating efficiency を各濃度別に計算し、片対数グラフから LD_{50} をもとめた。実験は各濃度 3 枚の dish を用い、3 回行った。

4. 細胞膜電気泳動法

細胞をラバーポリスマンで機械的に dish よりはがし、PBS (ー) で 3 回洗浄した。Homogenize したのち、 $1,000 \times g$ (4℃, 10 分間) 遠心し上清を得た。35% ショ糖溶液 5 ml 上に重層し $18,000 \times g$ (15℃, 60 分間) 遠心し、membrane fraction をショ糖加緩衝液に取り出した。再度 $10,000 \times g$ (4℃, 60 分間) 遠心した。これをトリクロル酢酸で 2 回、エタノールで 1 回、

$12,000 \times g$ (4℃, 3 分) 遠心分離によって洗浄した。8M 尿素、さらに 0.005% BPB, 20% グリセロール, 25% β -メルカプトエタノール, 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む Tris-HCl 緩衝液を加えて、5 分間熱処理し試料液とした。予め作製した 8% SDS-ポリアクリルアミドゲルの表面に試料を加え、10mA (1 時間), 16mA (3 時間) 通電した。染色・脱色処理のち水洗し、原点からの移動距離を測定した。

5. Doubling Time 測定

感受性試験に用いた control のプラスチックシャーレ上のコロニーを無作為に 50 個取り出し、それぞれの細胞数を count した。細胞数と incubate time から doubling time を算出した。

6. 染色体分析

対数増殖期の細胞をコルヒチン (1 μ g, 3 時間) 処理し、metaphase で停止していることを確認した。EDTA trypsin 処理し遠心した細胞に 0.075M KCl 2 cc を加え、低張処理をした。細胞を酢酸メタノールで固定する操作を 3 回繰り返す。スライドグラスに滴下・乾燥させたのちギムザ染色した。50 個の細胞の染色体数を count した。

7. 細胞内 CDDP 濃度

細胞を 0.05% trypsin および 0.53mM EDTA 液にて処理し、 $1.2 \times 10^7/4.75$ ml の細胞浮遊液を作製した。これに CDDP 0.6mg/ml 溶液 0.25 ml を加え、5% CO_2 , 37℃ で 4 時間 incubate した。4 時間後、PBS (ー) で 2 回洗浄したのち濃硝酸 3.0 ml を加え、80℃ で 5 時間 incubate した。氷冷しながら 40% NaOH 3.5 ml, 25% Na_2CO_3 2 ml を加え攪拌、さらに sodium diethyldithiocarbamate 300mg を加えて、80℃ で 1 時間 incubate した。1 時間後クロロホルム 3 ml を加え 5 分間振盪する方法でクロロホルム抽出を 2 回行った。集めたクロロホルム液を濃縮乾固、残渣をメタノール 0.5 ml で溶解し、原子吸光装置 (日立製作所 Z-8000) を用いて Pt 濃度を測定した。

8. 細胞内グルタチオン量

細胞内還元型グルタチオン (GSH) および酸化型グルタチオン (GSSG) は、Burchill ら⁵⁾⁶⁾の方法によって測定した。すなわち、細胞を 10% トリクロル酢酸/0.02% HCl + 0.25% Triton X-100, bovine serum albumin 中で攪拌・氷中放置したのち、遠心し上清を得た。これを 2 回繰り返す。等量のエーテルで 5 回抽出してトリクロル酢酸を除去した。これを 5mM EDTA, 0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.5 で 20 倍に希釈 (試料 100 μ l) し

試料を2つに分けた。一方の試料に、1.18mg/ml 5-5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) solution (SIGMA D8130) 0.1ml, 10U/ml の glutathione reductase solution (SIGMA G4751) 0.1ml, 1mg/ml の NADPH solution (SIGMA N6505) 0.1ml, リン酸緩衝液0.15mlを加えた。室温にて412nmにおける吸光度を5分間測定し、既知量のGSHより得られる標準曲線からGSH量を求めた。また、もう一方の試料に0.04M N-methylmaleimideを加え、室温で60分間incubateした。次いで10回エーテル抽出したのち、上記測定法にて、GSSGを測定した。

9. 細胞内グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) 量

細胞にリン酸緩衝液を加えて凍結・融解を繰り返したのち、遠心し上清を得た。これを試料として、30mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) solution 0.1ml, 30mM GSH solution 0.1ml, 0.11M KPO₄ buffer 3.0 mlを加え、室温にて340nmにおける吸光度を5分間測定し、GST量を算出した⁷⁾。

10. 細胞内メタロチオネイン (MT) 量

MT定量はCdヘモリゼート法⁸⁾⁹⁾により行った。細胞に4倍量の0.25M ショ糖溶液を加えてhomogenizeし、これを18,000×g, 20分間, 4℃で遠心分離した。試料を2つに分け、一方は蛋白定量の試料とした。もう一方にCdCl₂ (Cd: 10ppm) 溶液1.0mlを加えて5分間放置した。これに、予め作製したrat RBC hemolysate 0.2mlを加え100℃ 1分間加熱し、1,000×gで5分間遠心分離して上清を得た。このhemolysate処理を3回行った。上清のCd量を原子吸光計(日立製作所 Z-8000)を用いて測定し、MT量を算出した。

結 果

1. CDDP 耐性株の樹立

CL-7にCDDPを初期濃度0.01μg/mlから漸増して20カ月持続接触させることにより、0.25μg/mlの濃度で順調に増殖するCL-7/CDDPを得た。その後これをCDDP無添加培養液にて6カ月継代培養したのち、再びCDDP 0.25μg/ml培養液にて継代し、順調に増殖することを確認した。

コロニー形成法によるCDDPに対するLD₅₀は、CL-7 2.3μg/ml, CL-7/CDDP 6.2μg/mlであった。CL-7/CDDPは親株に比し、2.7倍の耐性を獲得していた (Fig. 1)。

2. 生物学的特性

Doubling timeは、CL-7 33.4時間, CL-7/CDDP 33.3

Fig. 1 Dose-response curves for CDDP in CL-7 and CL-7/CDDP. Cells were exposed to various concentrations of CDDP for 2 hours and plating efficiency was measured by colony formation assay. Bars: Mean±standard deviation (SD)

Table 1 Biological Characteristics

Parameter	CL-7	CL-7/CDDP
Doubling Time (hrs.)	33.4	33.3
Mode of chromosome numbers	64(20%)	63(24%)
Plating efficiency (%)	64.1±6.4	69.9±7.6

Table 2 Biochemical Characteristics

Parameter	CL-7	CL-7/CDDP
GSH (nmol/4×10 ⁶ cells)	24.8	40.8
GSSG (nmol/4×10 ⁶ cells)	2.08	2.32
GST (μmol/min/mg)	0.129	0.092
CDDP (nmol/10 ⁷ cells)	1.13	1.15
MT (nmol/mg protein)	1.07	2.29

時間で差は認めなかった。染色体数のモードは、CL-7 64 (20%), CL-7/CDDP 63 (24%)であった。Plating efficiencyは、CL-7 64.1±6.4%, CL-7/CDDP 69.9±7.6%であった (Table 1)。光顕的には、CL-7/CDDPはCL-7に比し、核/細胞質の比率が増加し、核小体が明瞭となり、また細胞質内に顆粒状物質が豊富であった (Fig. 2)。SDS-PAGEによる細胞膜蛋白分析では、CL-7/CDDPにおいて、MW 52,000近辺のbandが強くなる傾向が認められた (Fig. 3)。

3. 生化学的的特性 (Table 2)

細胞内GSHは、CL-7 24.8nmol/4×10⁶cells, CL-7/CDDP 40.8nmol/4×10⁶cellsであり、CL-7/CDDPが高値を示した。細胞内GSSGは、CL-7 2.08nmol/4×10⁶cells, CL-7/CDDP 2.32nmol/4×10⁶cellsで両株に

Fig. 2 Phase contrast photographs of CL-7 and CL-7/CDDP. $\times 100$

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of cell membrane fractions of CL-7 and CL-7/CDDP. Membrane fractions were subjected to 8% polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue and the sizes of molecular weights were determined by the use of standard size markers.

差がなかった, 細胞内 GST は, CL-7 $0.129 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$, CL-7/CDDP $0.092 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった. 細胞内 CDDP 量は, CL-7 $1.13 \text{nmol}/10^7 \text{cells}$, CL-7/CDDP $1.15 \text{nmol}/10^7 \text{cells}$ であり, 両株に差は認めなかった. 一方, 細胞内 MT 量は, CL-7 $1.07 \text{nmol}/\text{mg protein}$, CL-7/CDDP $2.29 \text{nmol}/\text{mg protein}$ であり, 細胞内

GSH と同様, 細胞内 MT も CL-7/CDDP が高値を示した.

考 察

1965年 Rosenberg ら¹⁰⁾が白金化合物に大腸菌の分裂阻害作用があることを発見して以来, その1つである CDDP の抗腫瘍効果が注目され¹¹⁾, 現在では泌尿性

器癌，婦人科癌，頭頸部癌，消化器癌を対象に抗癌剤として臨床応用されている。

CDDP は泌尿器科領域では，膀胱癌，精巣癌に対し最も奏効率の高い抗癌剤のひとつである。しかし当初奏効した症例においても再発病巣あるいは転移巣は耐性を獲得し，治療が困難となることが多い。これは生体内に CDDP 耐性腫瘍細胞が出現するためと考えられる。この耐性発現機序の解明と耐性克服は，癌化学療法うえで最も重要な課題の一つである。そのためには，耐性腫瘍細胞と感受性細胞の相違点を検討することが不可欠である。抗癌剤耐性株樹立の報告は多いが，CDDP 耐性株についての報告は少なく，膀胱癌培養細胞株よりの樹立の報告はわずかに 1 編のみ¹²⁾である。

本研究では，まず膀胱癌培養細胞株 CL-7 に CDDP を持続接触させて CDDP 耐性膀胱癌培養細胞株 CL-7/CDDP を樹立した。樹立には 20 カ月を要したが，その後 6 カ月間 CDDP 無添加培養液で継代培養してもその耐性化に変化がなかったことから，耐性化は不可逆的变化であると考えられる。

コロニー形成法による感受性試験では，CL-7/CDDP は CL-7 に比し 2.7 倍の耐性を示した。他領域癌の CDDP 耐性株^{13)~26)}に比べて耐性度はやや低いようであるが，各パラメーターの差，形態学的相違を勘案すると耐性獲得は確実である。また実際の臨床で，抗癌剤が最大耐用量に近い量で投与されている現状では，むしろ十分な耐性度とも考えられる。

光顕所見では，CL-7/CDDP に著明な核小体を認めた他，種々の変化を認めた。CDDP 耐性卵巣癌細胞株において，菊池ら¹⁷⁾は腫大した核と著明な核小体を報告，吉谷ら¹⁶⁾は細胞境界の不明瞭さと細胞の大小不同など一部 CL-7/CDDP と共通な変化を報告している。これらの形態的变化が他の生物学的，あるいは生化学的变化とどの様に関連するかは今後の研究課題である。

Doubling time は，CDDP 耐性株において延長しているとの報告¹⁴⁾¹⁶⁾¹⁹⁾，短縮しているとする報告²¹⁾様々であるが，CL-7/CDDP は不変であった。延長していたとする報告は，CDDP 添加培養液における doubling time も含まれているため比較は困難であるが，CL-7/CDDP も CDDP 添加培養液中では，増殖速度は遅延 (data 不載) していた。

染色体数については，吉谷ら¹⁶⁾は減少したと報告しているが，Hospers ら¹⁴⁾，Behrens ら²¹⁾は不変としてい

る。CL-7/CDDP は CL-7 に比し，染色体数のモードが 64 から 63 に移動していた。このことから，耐性獲得において，① 63 の染色体数を有する細胞が選択された (selection)，あるいは② 64 の染色体数を有する細胞に変異が生じ (mutation)，63 に移行し，選択された (selection) のいずれかの機構が考えられる。

各種耐性細胞で P-glycoprotein をはじめ細胞膜輸送系の変化が注目されている²⁷⁾²⁸⁾。CL-7/CDDP 両株の細胞膜 SDS-PAGE パターンに差がないこと，両株の CDDP 接触後の細胞内 CDDP 濃度に差がないことから，細胞膜輸送系の変化は否定的である。つまり，細胞外への CDDP 排出 (efflux) の亢進は耐性獲得に関与していないと考えられる。

GSH は，グルタミン酸，システイン，グリシンの 3 つのアミノ酸からなるペプチドで，種々の生理作用を有している。薬物の代謝に関しては，活性代謝物の解毒抱合過程において重要な働きをするといわれている。GSH は CL-7/CDDP が CL-7 に比し高値を示したが，多くの報告¹²⁾¹⁴⁾¹⁸⁾²⁶⁾²⁹⁾において，CDDP 耐性細胞で GSH は増加しており，GSH が CDDP 耐性化に関与している可能性は高い。Lewis ら³⁰⁾は，臨床的に CDDP を含む多剤併用化学療法に耐性を示した症例において，化学療法前後で腫瘍細胞内 GSH を測定し，耐性獲得後の細胞内 GSH が高値であったと報告している。In vitro だけでなく，実際の臨床材料においても CDDP 耐性化に伴う GSH 量の変化が確認されたことから，GSH は耐性克服の重要因子であることが示唆される。

GSH と薬剤の抱合を促進すると考えられている GST については，CDDP 耐性細胞で上昇しているとの報告や^{24)~26)30)}，不変との報告¹²⁾¹⁴⁾，あるいは低下しているとの報告など²²⁾²⁹⁾様々である。CL-7/CDDP はやや低い傾向であった。この点については今後検討を要する。しかし，GSH 合成阻害剤である buthionine sulfoximine を用いて細胞内 GSH を減少させることにより，CDDP 耐性細胞の CDDP 感受性を上昇させ得るとの報告²²⁾³¹⁾からも，GSH による薬剤不活化は CDDP 耐性機序の 1 つとして注目すべきであろう。

細胞内 CDDP 量については，CDDP uptake 減少を示したとする報告¹³⁾¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾²⁰⁾²⁵⁾²⁹⁾と，CDDP 濃度は不変との報告¹²⁾¹⁶⁾がある。今回の実験では，細胞内 CDDP 量は不変であった。しかし，細胞外への efflux 亢進を示した報告は見られないことから，CDDP 耐性は P-glycoprotein²⁷⁾²⁸⁾に代表される多剤耐性機構とは，異

なる機序によるものと考えられる。

MTは多量のSH基を有する蛋白質で、重金属の解毒、亜鉛の代謝等の生理学的役割を担っているといわれる。CDDP耐性細胞において、細胞内MT量が増加したとする報告はないが、今回の実験において、CL-7/CDDPはCL-7に比し細胞内MT量が高値を示した。Cd耐性株においてMT含量が増加しているとの報告^{32)~34)}によれば、Cd耐性株は同時にCDDP耐性も獲得しており、重金属化合物であるCDDP耐性にMTが関与している可能性は高い。

以上の結果より、CDDP耐性発現は、ADM耐性におけるP-glycoproteinを介した細胞外への抗癌剤排出(efflux)亢進とは異なった、細胞内不活化(detoxication)に依存していることが示唆された。今後このCDDP耐性株を用い、さらに実験を重ねることによりCDDP耐性克服が可能と考えられる。

結 語

CDDP耐性発現機序の解明および耐性克服を目的として、CDDP耐性膀胱癌培養細胞株を作製し、その生物学的ならびに生化学特性を検討した。

- 1) CDDP耐性膀胱癌培養細胞株CL-7/CDDPは、親株CL-7に対し2.7倍のCDDP耐性を示した。
 - 2) 両株のdoubling timeおよびplating efficiencyに差はなかったが、染色体数モードにおいて若干の差を認めた。
 - 3) 細胞内CDDP量に差はなかった。
 - 4) 細胞内GSH, MTはCL-7/CDDPが高値を示した。
 - 5) CDDP耐性発現は、細胞外への排出(efflux)の亢進ではなく、細胞内不活化に依存すると考えられた。
- CDDP耐性膀胱癌培養細胞株と親株の生物学的・生化学的相違点が見られた。この細胞株を用いた実験をさらに進めることによりCDDP耐性克服も可能と思われる。

本研究の一部は文部省科学研究費No. 01570894による援助を受けた。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師大森弘之教授に深謝いたします。さらに貴重な御助言を賜った松村陽右助教授、直接本実験を御指導くださいました故古本純講師、津島知靖講師、本学佐藤二郎名誉教授、米国国立癌研究所研究員常盤孝義博士に深謝いたします。最後に、T24細胞を御提供くださいました日本医科大学中神義三教授、測定に御協力いただいた守谷由美子嬢、原洲尚子嬢、守屋幸江嬢、日本化薬総合研究所制癌研究室諸氏に謝意を表しま

す。本論文の要旨は、第49回日本癌学会総会(札幌)にて報告した。

文 献

- 1) 吉本 純, 松村陽右, 朝日俊彦, 尾崎雄治郎, 棚橋 豊子, 陶山文三, 金重哲三, 津島知靖, 水野全裕, 大森弘之: 泌尿性器悪性腫瘍に対するCis-diamminedichloroplatinumを含む多剤併用療法の試み。西日泌尿, 43, 953—958, 1981。
- 2) 新島端夫, 小磯謙吉, 上野 精, 石井泰憲, 赤座英之, 大谷幹伸: cis-Diamminedichloroplatinum (II)による泌尿性器悪性腫瘍の治療。泌尿紀要, 28, 85—89, 1982。
- 3) Bubeník, J., Barešová, M., Viklický, V., Jakoubková, J., Sainerová, H. and Donner, J.: Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumor-specific antigen. Int. J. Cancer, 11, 765—773, 1973。
- 4) Tsushima, T., Tokiwa, T., Matsumura, Y., Yoshimoto, J., Obama, T., Ohmori, H. and Sato, J.: Isolation of clones from T24 cells and test of their sensitivity to adriamycin. Res. Exp. Med., 188, 239—246, 1988。
- 5) Tietze, F.: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem., 27, 502—522, 1969。
- 6) Burchill, B.R., Oliver, J.M., Pearson, C.B., Leinbach, E.D. and Berlin, R.D.: Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. J. Cell Biol., 76, 439—447, 1978。
- 7) Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B.: Glutathione-S-transferases. J. Biol. Chem., 249, 7130—7139, 1974。
- 8) Onosaka, S. and Cherian, M.G.: Comparison of Metallothionein determination by polarographic and Cadmium-saturation methods. Toxicol. Appl. Pharmacol., 63, 270—274, 1982。
- 9) 佐藤政男, 長井 靖: メタロチオネインの測定法とその利用。トキシコロジーフォーラム, 10, 348—357, 1987。
- 10) Rosenberg, B., Van Camp, L. and Krigas, T.: Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature, 205, 698—699, 1965。
- 11) Rosenberg, B., Van Camp, L., Trosko, J.E., and Mansour, V.H.: Platinum compounds: A new class of potent anti tumour agents. Nature, 222, 385—386, 1969。
- 12) Bedford, P., Shellard, S.A., Walker, M.C., Whelan, R.D.H., Masters, J.R.W. and Hill, B.

- T.: Differential expression of collateral sensitivity or resistance to cisplatin in human bladder carcinoma cell lines pre-exposed in vitro to either x-irradiation or cisplatin. *Int. J. Cancer*, 40, 681—686, 1987.
- 13) Kikuchi, Y., Iwano, I., Miyauchi, M., Kita, T., Oomori, K., Kizawa, I., Sugita, M. and Tenjin, Y.: The mechanism of acquired resistance to cisplatin by a human ovarian cancer cell line. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 632—635, 1988.
 - 14) Hoppers, G.A.P., Mulder, N.H., de Jong, B., de Lay, L., Uges, D.R.A., Fichtinger-Schepman, A. M.J., Scheper, R.J. and de Vries, E.G.E.: Characterization of a human small cell lung carcinoma cell line with acquired resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in vitro. *Cancer Research*, 48, 6803—6807, 1988.
 - 15) Kuppen, P.J.K., Schuitemaker, H., van't Veer, L.J., de Bruijn, E.A., van Oosterom, A.T. and Schrier, P.I.: Cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant sublines derived from two human ovarian tumor cell lines. *Cancer Research*, 48, 3355—3359, 1988.
 - 16) 吉谷徳夫, 安達茂実, 三沢芳夫, 湯沢秀夫, 本多達雄, 金沢浩二, 竹内正七, 田中耕平: Cisplatin 耐性ヒト卵巣癌細胞株の誘導とその細胞生物学的性状の解析. *日産婦誌*, 41, 7—14, 1989.
 - 17) 菊池義公, 岩野一郎, 宮内宗徳, 喜多恒和, 木澤功, 大森景文, 加藤宏一: シスプラチン耐性ヒト卵巣癌細胞株の樹立とその耐性機構. *日産婦誌*, 40, 379—383, 1988.
 - 18) Richon, V.M., Schulte, N. and Eastman, A.: Multiple mechanisms of resistance to cis-diamminedichloroplatinum (II) in murine leukemia L1210 cells. *Cancer Research*, 47, 2056—2061, 1987.
 - 19) Hong, W., Saijo, N., Sasaki, Y., Minato, K., Nakano, H., Nakagawa, K., Fujiwara, Y., Nomura, K. and Twentyman, P.R.: Establishment and characterization of cisplatin-resistant sublines of human lung cancer cell lines. *Int. J. Cancer*, 41, 462—467, 1988.
 - 20) Waud, W.R.: Differential uptake of cis-diamminedichloroplatinum (II) by sensitive and resistant murine L1210 leukemia cells. *Cancer Research*, 47, 6549—6555, 1987.
 - 21) Behrens, B.C., Hamilton, T.C., Masuda, H., Grotzinger, K.R., Whang-Peng, J., Louie, K.G., Knutsen, T., McKoy, W.M., Young, R.C. and Ozols, R.F.: Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Research*, 47, 414—418, 1987.
 - 22) Hamilton, T.C., Winker, M.A., Louie, K.G., Batist, G., Behrens, B.C., Tsuruo, T., Grotzinger, K.R., McKoy, W.M., Young, R.C. and Ozols, R.F.: Augmentation of adriamycin, melphalan, and cisplatin cytotoxicity in drug-resistant and -sensitive human ovarian carcinoma cell lines by buthionine sulfoximine mediated glutathione depletion. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 2583—2586, 1985.
 - 23) Kikuchi, Y., Miyauchi, M., Kizawa, I., Oomori, K. and Kato, K.: Establishment of a cisplatin-resistant human ovarian cancer cell line. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77, 1181—1185, 1986.
 - 24) Saburi, Y., Nakagawa, M., Ono, M., Sakai, M., Muramatsu, M., Kohno, K. and Kuwano, M.: Increased expression of glutathione S-transferase gene in cis-diamminedichloroplatinum (II)-resistant variants of a Chinese hamster ovary cell line. *Cancer Research*, 49, 7020—7025, 1989.
 - 25) Teicher, B.A., Holden, S.A., Kelley, M.J., Shea, T.C., Cucchi, C.A., Rosowsky, A., Henner, W.D. and Frei, E., III: Characterization of a human squamous carcinoma cell line resistant to cis-diamminedichloroplatinum (II). *Cancer Research*, 47, 388—393, 1987.
 - 26) Louie, K.G., Behrens, B.C., Kinsella, T.J., Hamilton, T.C., Grotzinger, K.R., McKoy, W. M., Winker, M.A. and Ozols, R.F.: Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. *Cancer Research*, 45, 2110—2115, 1985.
 - 27) Juliano, R.L. and Ling, V.: A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, 455, 152—162, 1976.
 - 28) Riordan, J.R. and Ling, V.: Purification of P-glycoprotein from plasma membrane vesicles of Chinese hamster ovary cell mutants with reduced colchicine permeability. *J. Biol. Chem.*, 254, 12701—12705, 1979.
 - 29) Mansouri, A., Henle, K.J., Benson, A.M., Moss, A.J. and Nagel, W.A.: Characterization of a cisplatin-resistant subline of murine RIF-1 cells and reversal of drug resistance by hyperthermia. *Cancer Research*, 49, 2674—2678, 1989.
 - 30) Lewis, A.D., Hayes, J.D. and Wolf, C.R.: Glutathione and glutathione-dependent

- enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: Intrinsic differences and cell cycle effects. *Carcinogenesis*, 9, 1283—1287, 1988.
- 31) Lai, G., Ozols, R.F., Young, R.C. and Hamilton, T.C.: Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.*, 81, 535—539, 1989.
- 32) Andrews, P.A., Murphy, M.P. and Howell, S.B.: Metallothionein-mediated cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 19, 149—154, 1987.
- 33) Bakka, A., Endresen, L., Johnsen, A.B.S., Edminson, P.D. and Rugstad, H.E.: Resistance against cis-diamminedichloroplatinum in cultured cells with a high content of metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 61, 215—226, 1981.
- 34) Endresen, L., Schjerven, L. and Rugstad, H.E.: Tumours from a cell strain with a high content of metallothionein show enhanced resistance against cis-dichlorodiammineplatinum. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 55, 183—187, 1984.
- (1991年4月8日受理, 特别掲載)
-