

Experimental Study on Chemosensitivity Test for Anticancer Drugs Using Flowcytometry

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8057

フローサイトメトリーの抗癌剤感受性試験への 応用についての実験的研究

金沢大学がん研究所・外科部 (主任：磨伊正義教授)

菅 敏 彦

(昭和63年 8月16日受付)

既存の抗癌剤感受性試験である human tumor clonogenic assay (HTCA), 腎被膜下移植法 (subrenal capsule assay, SRC) やヌードマウス異種移植らによる方法は, 感受性判定に要する時間が最低 7 日以上と長く, 実際臨床の立場からは術後比較的早期に個々の症例に適した抗癌剤の選択は不可能といわざるを得ない. 本研究は, フローサイトメトリー (flowcytometry, FCM) の迅速かつ正確な細胞回転の解析能を利用し, 早期の抗癌剤感受性試験への応用を目的とした. 抗癌剤による細胞周期の変化は Fried の DNA 解析法を用いて数量的に解析し, 従来用いられてきたコロニー形成法の殺細胞効果と比較検討した. 本実験に用いた細胞株は, ヒト腎癌細胞株 (NCC-nu), ヒト子宮頸癌細胞株 (HeLa), ヒト肝細胞癌株 (PLC) の 3 細胞株で, 薬剤は用量依存性とされているアドリアマイシン (adriamycin, ADR), マイトマイシン C (mitomycin C, MMC), シスプラチン (cisplatin, CDDP) の 3 薬剤を用いた. 使用薬剤濃度は, 理論的組織内濃度を中心として設定した. 抗癌剤処理後の細胞周期の変化は, 12 時間後より S+G₂M 期への DNA 集積として認められ, 24 時間後で明らかとなった. 抗癌剤処理前後の FCM における S+G₂M 比 (抗癌剤処理群 % S+G₂M/対照群 % S+G₂M) は, 薬剤濃度と共に増加する傾向にあった. 理論的組織内濃度における S+G₂M 比とコロニー形成法による殺細胞効果は有意の相関性が認められた. 一方, 抗癌剤高感受性細胞では理論的組織内濃度で S+G₂M 比は 1.3 以上であったが低感受性細胞はそれ以下で, S+G₂M 比 1.3 が判定の基準となりえうと考えた. これらの成績より FCM による抗癌剤処理後の S+G₂M 期解析を試みることで, 抗癌剤感受性試験への応用の可能性が示唆された.

Key words Flowcytometry, *in vitro* chemosensitivity test, cell kinetics, DNA analysis

1956年 Puck ら¹⁾が培養細胞を用いてコロニー形成法による放射線の生物物理学的作用の定量化に成功して以来, コロニー形成法は抗癌剤の殺細胞効果の定量化にも応用され, 抗癌剤研究に重要な方法として用いられている. さらに近年, 個々の臨床例に対し抗癌剤の使用を目的に, 原腫瘍の抗癌剤感受性を調べる方法として, 1977年 Hamberger ら²⁾により開発された二重寒天培養法を用いたコロニー形成法いわゆる human tumor clonogenic assay (HTCA)

や, 谷川ら³⁾による scintillation assay³⁾があり, これらは臨床的にも多くのヒト癌に試みられている. しかし, これら既存の *in vitro* 抗癌剤感受性試験においては感受性判定までに要する時間が 7 日から 14 日と長く, 短期間判定可能な抗癌剤感受性試験の開発が望まれている. 1969年, M. Van Dilla ら⁴⁾がアルゴンイオンレーザーを用いたフローサイトメトリー (flowcytometry, FCM) を発表して以来, 短期間に多くの細胞の増殖動態および DNA 測定が可能となり,

Abbreviations: ADR, adriamycin; BLM, bleomycin; CDDP, cisplatin; DF-10, Dulbecco's modified Eagle's medium contains 10% fetal bovine serum; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; FCM, flowcytometry; 5Fu, 5-fluorouracil; HTCA, human tumor

細胞周期の解析などの基礎的研究に応用されて来た。さらに近年、FCMの研究が進むにつれ *in vitro* での各種抗癌剤の細胞周期の進行に及ぼす変化が解明されつつある。以上の事実を踏まえ、著者はFCMを用いて短期間判定の可能な抗癌剤感受性試験の確立を目的として、抗癌剤による細胞周期の変化を数量的に解析し、従来用いられてきたコロニー形成法の殺細胞効果と比較しつつ実験して得た結果について以下に報告する。

材料および方法

I. 使用細胞および培養法

実験に用いた細胞は、教室で樹立したヒト腎癌由来株 (NCC-nu)⁸⁾、ヒト肝細胞癌株 (PLC)、ヒト子宮頸癌株 (HeLa) の3細胞株であり、それぞれの倍加時間は NCC-nu 細胞27.4時間、PLC 細胞30.2時間、HeLa 細胞24.8時間と約25時間から30時間であった。また個々の細胞株の平板効率 (plating efficiency) を表1に示す。これら培養株の維持は、90%ダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) (日本製薬、東京) と10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, Co., U. S. A.) より成る培養液に抗生剤 (カナマイシン 100 μ g/dl, ファンギゾン 0.1Cq/dl) を加えた培養液 (DF-10) を用い、培養条件は開放系 (37℃, 湿潤, 5% CO₂) で行った。また、継代は0.02% エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) と0.25% トリプシン (Difco Laboratories, U. S. A.) を用いて細胞浮遊液を作成

し、1:4 または 1:8 の希釈で4-5日に1回行った。

II. コロニー形成法による抗癌剤殺細胞効果測定

コロニー形成法は Puck⁹⁾ の方法に準じて行い、組織培養ペトリ皿3002 (直径 60mm) (Falcon, U. S. A.) を用い、各細胞のコロニー形成率よりコロニー間の癒合が見られず、約100個のコロニー形成の期待できる、各ペトリ皿あたり200個の対数増殖期細胞を3mlに単離細胞浮遊液として浮遊させペトリ皿に植え込み、37℃, 5% CO₂ 下に24時間開放系にて培養後、高濃度より倍々希釈した抗癌剤含有培養液と交換して2時間培養した。ついで培養液を除去した後、ハンクス液にて3回洗浄し、以後抗癌剤を含まない培養液にて7日間静置培養した。対照としての抗癌剤無処置群も同様の洗浄と培養液交換を行った。7日目に培養液を除去し、1%クリスタルバイオレットにて染色後各ペトリ皿の細胞数30個以上よりなるコロニー数を倒立顕微鏡下に測定した。各実験はペトリ皿3組にて行い、同数の実験を3回くり返し行った (図1)。各濃度における生存率 (survival rate, S. R.) は次の式より算出した。

$$S. R. (\%) = \frac{\text{処置群のコロニー数/無処置群のコロニー数}}{\times 100}$$

この式より得られた値をプロビット値に変換し、それぞれの回帰直線より90%の殺細胞効果を示す薬剤濃度を90%発育阻止濃度値 (90% growth inhibitory concentration, IC₉₀ 値) として求めた。

III. フローサイトメトリー

1. 検体処理法

Table 1. Plating efficiency of NCC-nu, HeLa and PLC cells

Kind of cell line	Plating efficiency (%) ^{a)} in the inoculation size (cells/dish) of		
	100	200	400
NCC-nu	52.3±4.9 ^{b)}	44.5±3.7	41.8±1.2
HeLa	56.4±4.0	65.2±6.2	56.4±3.2
PLC	53.4±3.4	52.6±2.7	50.8±2.9

a) Dishes were inoculated with each number of cells and incubated for 7 days under 5% CO₂ gass. Then number of colonies formed were counted.

$$\text{Plating efficiency}(\%) = \frac{\text{Number of colonies formed}}{\text{Number of cells inoculated}} \times 100$$

b) Mean ± S. D. (n=9).

clonogenic assay; IC₉₀, 90% growth inhibitory concentration; LD₅₀, 50% lethal dose; L. I., labeling index; M. I., mitotic index; MMC, mitomycin C; MTX, methotrexate; S. R., survival rate; SRC, subrenal capsule assay.

NCC-nu, HeLa, PLC の3細胞株を組織培養フラスコ3024 (Falcon) に植え込み、継代培養2日目の対数増殖期に、高濃度より倍々希釈した抗癌剤含有培養液と交換して2時間培養した。ついで培養液を除去後、ハンクス液にて3回洗浄し、以後抗癌剤を含まない培養液にて6, 12, 24時間静置培養した。対照として抗癌剤無処置群も同様の洗浄と培養液交換を行った。静置培養6, 12, 24時間後 EDTA, トリプシンを用いて単離細胞浮遊液とした後、70%エタノールにて固定し、4°Cにて保存した。

2. DNA 染色と細胞内 DNA 分布ヒストグラム測定法

70%エタノールにて固定、保存した細胞は、ハンクス液で2回遠心洗浄後、二重鎖の RNA 分解のため 0.1% RNase (Sigma Chem. Co., U. S. A.) を用い、37°C, 30分間処理した。その後ハンクス液にて1回洗浄の後、50 μ g/ml プロピディウムイオダイド⁶⁾ (propidium iodide, P. I.) (Sigma Chem. Co.) にて4°C, 30分間 DNA 染色を行った。DNA 染色後の細胞は氷冷下に保存し、2時間以内にフローサイトメーター CS-20 (昭和電工, 東京) を用いて DNA 解析を行った。各実験は3組で行い、同様の実験を3回くり返し行った。DNA 解析に先立ち細胞を50 μ ナイロンメッシュにて可能な限り異物を除去した。(図2)

3. 使用薬剤と濃度

実験に使用した薬剤は、一般に濃度依存性と考えられるマイトマイシンC (mitomycin C, MMC), アドリアマイシン (adriamycin, ADR), シスプラチン

(cisplatin, CDDP) である。薬剤濃度は、臨床投与量の最高有効血中濃度の1/10を理論的組織内濃度⁷⁾と仮定した。臨床投与量を ADR 20mg, MMC 10mg, CDDP 100mg とすると薬剤濃度は、ADR 0.4 μ g/ml, MMC 0.2 μ g/ml, CDDP 2.0 μ g/ml となり、この濃度を基準として高濃度より倍々希釈法にて抗癌剤含有培養液を作成した。

4. 細胞内 DNA 分布ヒストグラムの解析

抗癌剤処理後の細胞周期の解析は、細胞内 DNA 分布ヒストグラム上第1のピークを G₁ 期細胞、第2のピークを G₂ + M 期細胞とし (図3)、この2つのピークの間を S 期細胞と仮定し、更に DNA 量のバラツキは正規分布に従い分布するとした Fried の DNA 解析法⁸⁾を用い全細胞に占める G₁ 期細胞、S + G₂M 期細胞の比率を求めた。更に、抗癌剤処理に伴う細胞周期上の S + G₂M 期細胞の変化を数量化するため、抗癌剤処理群の S + G₂M 期細胞の比率と無処理群の S + G₂M 期細胞の比率の比を S + G₂M 比として以下の式にて求めた。

$$\text{S} + \text{G}_2\text{M 比} = \frac{\text{抗癌剤処理群 \% S} + \text{G}_2\text{M}}{\text{無処理群 \% S} + \text{G}_2\text{M}}$$

IV. 統計学的検定法

各測定値は平均 (mean) または平均値 $\pm$ 標準偏差 (mean $\pm$ S. D.) で表示し、個々の比較には Student の t 検定法を用い、2変量間の相関分析では Pearson の相関係数を求めた。いずれも $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

I. 抗癌剤による殺細胞効果

1. コロニーの性状および濃度依存曲線について
コロニー形成法において1コロニーとして算定し

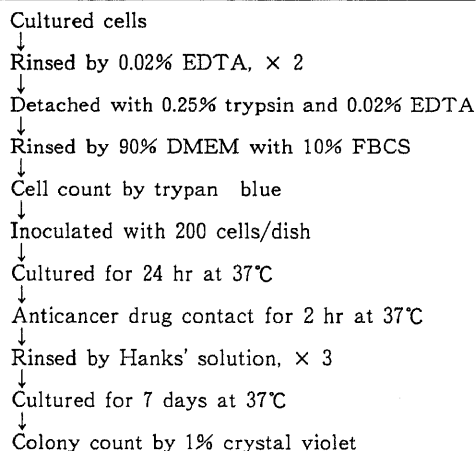


Fig. 1. Procedure of colony forming assay.

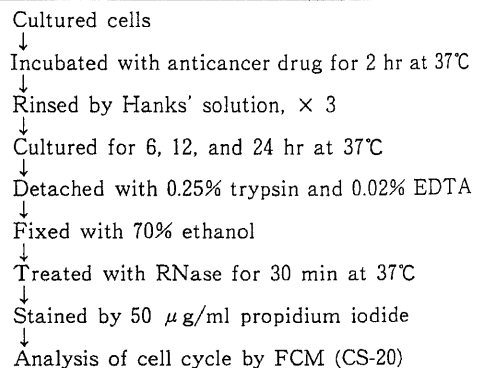


Fig. 2. Procedure of flowcytometry.

たのは、個々の細胞の癒合の見られない30個以上の細胞組織よりなる細胞集団であるが、抗癌剤処理群では1個のコロニーを形成する細胞数が少ない傾向にあり、30個以下の細胞よりなるコロニーがしばしば認められた。また、得られた濃度依存曲線(図4-a, b, c)は3剤全て類似した exponential decreased type であった。

2. IC_{50} 値

それぞれの回帰曲線より求められた IC_{50} 値を表2に示した。 IC_{50} 値は ADR では NCC-nu 細胞が最も低く、MMC では PLC 細胞が低い値を示していた。CDDP では3細胞間に大きな差は認められなかった。

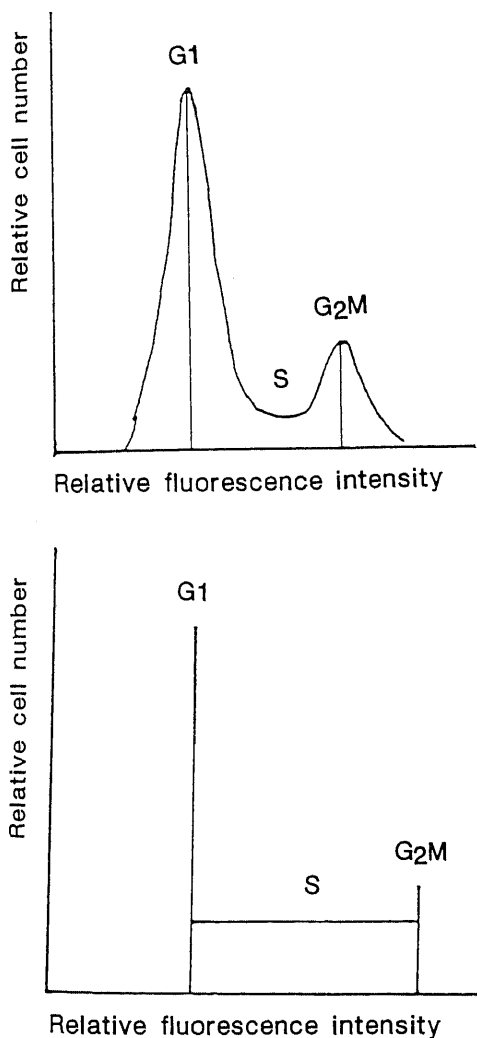


Fig. 3. The schema of DNA histogram.

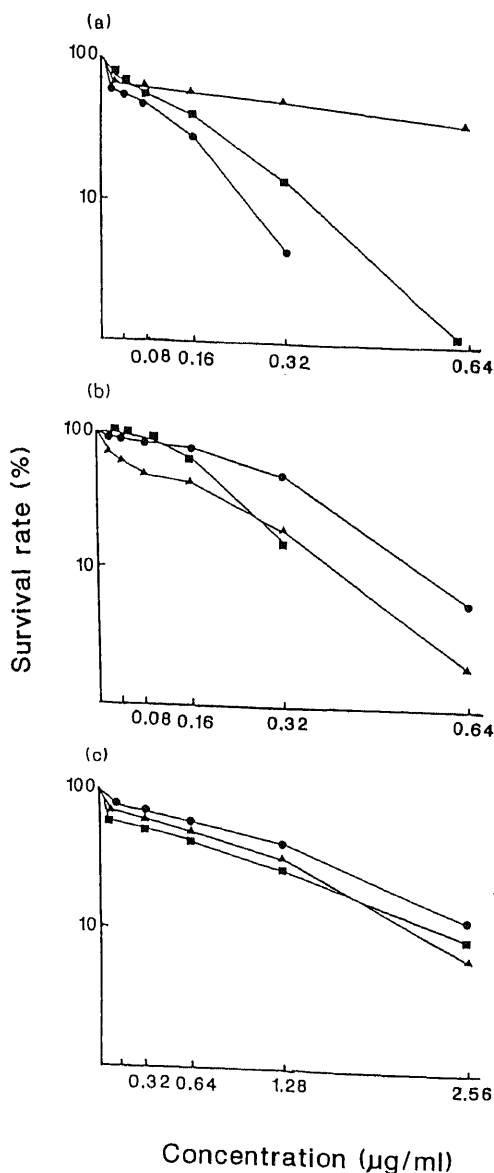


Fig. 4. Dose-survival curve of cells treated with drugs. The cells were exposed to different concentration of the drugs in medium for 2hr. After exposure, the drugs were removed and cells were washed three times with Hanks's solution. Then the cells were cultured for 7 days. Survival rate of the cells was determined by colony forming assay. ●, NCC-nu cells; ■, HeLa cells; ▲, PLC cells. (a) The cells were treated with adriamycin (ADR). (b) The cells were treated with mitomycin (MMC). (c) The cells were treated with cisplatin (CDDP).

3. 臨床投与量との比較

臨床的に使用する各抗癌剤の1回投与量は教室では通常 ADR 20mg, MMC 10mg, CDDP 100mg を使用しており、それぞれの投与量での理論的最高血中濃度は、循環血液量を 5L とした場合 ADR $4\mu\text{g/ml}$, MMC $2\mu\text{g/ml}$, CDDP $20\mu\text{g/ml}$ と考えられる。固形腫瘍では理論的最高血中濃度の1/10が移行するとされており、理論的組織内濃度はそれぞれ ADR $0.4\mu\text{g/ml}$, MMC $0.2\mu\text{g/ml}$, CDDP $2.0\mu\text{g/ml}$ である。そこで臨床投与量との比較のため理論的組織内濃度と IC_{90} 値の比 (理論的組織内濃度/ IC_{90} 値) を治療係数^{a)}として求めた (表3)。治療係数は NCC-nu 細胞では、ADR が1.4と最も高く、ついで CDDP 0.8, MMC 0.4 の順であった。HeLa 細胞では、ADR 1.1, CDDP 0.8, MMC 0.4 の順であり、PLC 細胞では、CDDP 0.8, MMC 0.7, ADR 0.3 であった。つまり、治療係数が1.0以上である NCC-nu 細胞、HeLa 細胞では ADR が臨床上の常用投与量で感受性効果を示すことが示唆された。一方 MMC, CDDP では3細胞すべてが、ADR では PLC 細胞が治療係数が1.0未満であり、臨床効果はあまり期待できないものと考えられた。そこで治療係数が1.0以上の細胞を抗癌剤高感受性、1.0未満を低感受性とした。

II. フローサイトメトリーによる細胞周期の解析および抗癌剤感受性判定

1. 細胞内 DNA 分布ヒストグラムの経時的変化

1) ADR

3細胞において $0.025\mu\text{g/ml}$ では各時間における細胞周期の変化に大差は認められなかった。NCC-nu 細胞では、 $0.1\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で処理6時間後より G_2M 期への細胞集積が認められ時間の経過と共に G_1 期細胞の減少、 G_2M 期への細胞集積が著明となった。HeLa 細胞では、 $0.1\mu\text{g/ml}$ で処理12時間後に G_2M 期への一過性の細胞集積を認めたが処理24時間後には消失し、更に $0.2\mu\text{g/ml}$ 以上では各時間において G_2M 期への細胞集積が認められた。

Table 2. *In vitro* chemosensitivity of NCC-nu, HeLa and PLC cells

Kind of cell line	IC ₉₀ value ($\mu\text{g/ml}$) of		
	ADR	MMC	CDDP
NCC-nu	0.27	0.36	2.61
HeLa	0.37	0.36	2.44
PLC	1.21	0.29	2.45

PLC 細胞では 0.1 および $0.2\mu\text{g/ml}$ では明らかな変化を認めず、 $0.4\mu\text{g/ml}$ の12時間以後より G_2M 期への細胞集積を認めた (図5-a, b, c)。

2) MMC

3細胞株において $0.05\mu\text{g/ml}$, $0.1\mu\text{g/ml}$ では明らかな変化を認めなかった。NCC-nu 細胞においては12時間後の $0.2\mu\text{g/ml}$ で G_2M 期への細胞集積が認められ、さらに $0.4\mu\text{g/ml}$ 以上では12時間以上で S 期への一峰性集積を認めた。HeLa 細胞では $0.1\mu\text{g/ml}$ で処理12時間後に G_2M 期への細胞集積を認めたが、処理24時間後には認めなかった。更に $0.2\mu\text{g/ml}$ 以上では各時間で G_2M 期への細胞集積が認められ、さらに $0.4\mu\text{g/ml}$ 以上では G_2M 期への細胞集積に加え S 期への集積を認めた。PLC 細胞においては24時間後 $0.2\mu\text{g/ml}$ で軽度の G_2M 期への細胞集積が認められ、 $0.4\mu\text{g/ml}$ 以上では G_2M 期への細胞集積に加え S 期への集積を認めた (図5-d, e, f)。

3) CDDP

NCC-nu 細胞においては $2.0\mu\text{g/ml}$ で処理12時間後より S 期及び G_2M 期への細胞集積を認め、処理24時間後には G_2M 期の細胞集積が著明となった。HeLa 細胞では12時間後の $0.5\mu\text{g/ml}$, $1.0\mu\text{g/ml}$ で一過性の G_2M 期の細胞集積が認められたが、処理24時間後には認められず $2.0\mu\text{g/ml}$, $4.0\mu\text{g/ml}$ では処理12時間後より S 期及び G_2M 期への細胞集積を認めた。PLC 細胞においては $1.0\mu\text{g/ml}$ で処理24時間後には G_2M 期の細胞集積がみられ、 $2.0\mu\text{g/ml}$, $4.0\mu\text{g/ml}$ では処理12時間後より S 期及び G_2M 期への細胞集積を認めた (図5-g, h, i)。

2. 細胞内 DNA 分布ヒストグラムの数量的解析

1) S+ G_2M の変化と抗癌剤濃度の関係

3細胞株に対する S+ G_2M 期細胞の割りあい (% S+ G_2M) を Fried の DNA 解析法を用いて解析

Table 3. Therapeutic index by anticancer drugs on NCC-nu, HeLa and PLC cells

Kind of cell line	Therapeutic index ^{a)} of		
	ADR	MMC	CDDP
NCC-nu	1.4	0.4	0.8
HeLa	1.1	0.6	0.8
PLC	0.3	0.7	0.8

a) Clinical dose = regular clinical dose/body blood volume (51). Regular clinical dose: ADR, 20 mg; MMC, 10 mg; CDDP, 100 mg. Therapeutic index = Clinical dose/ IC_{90} .

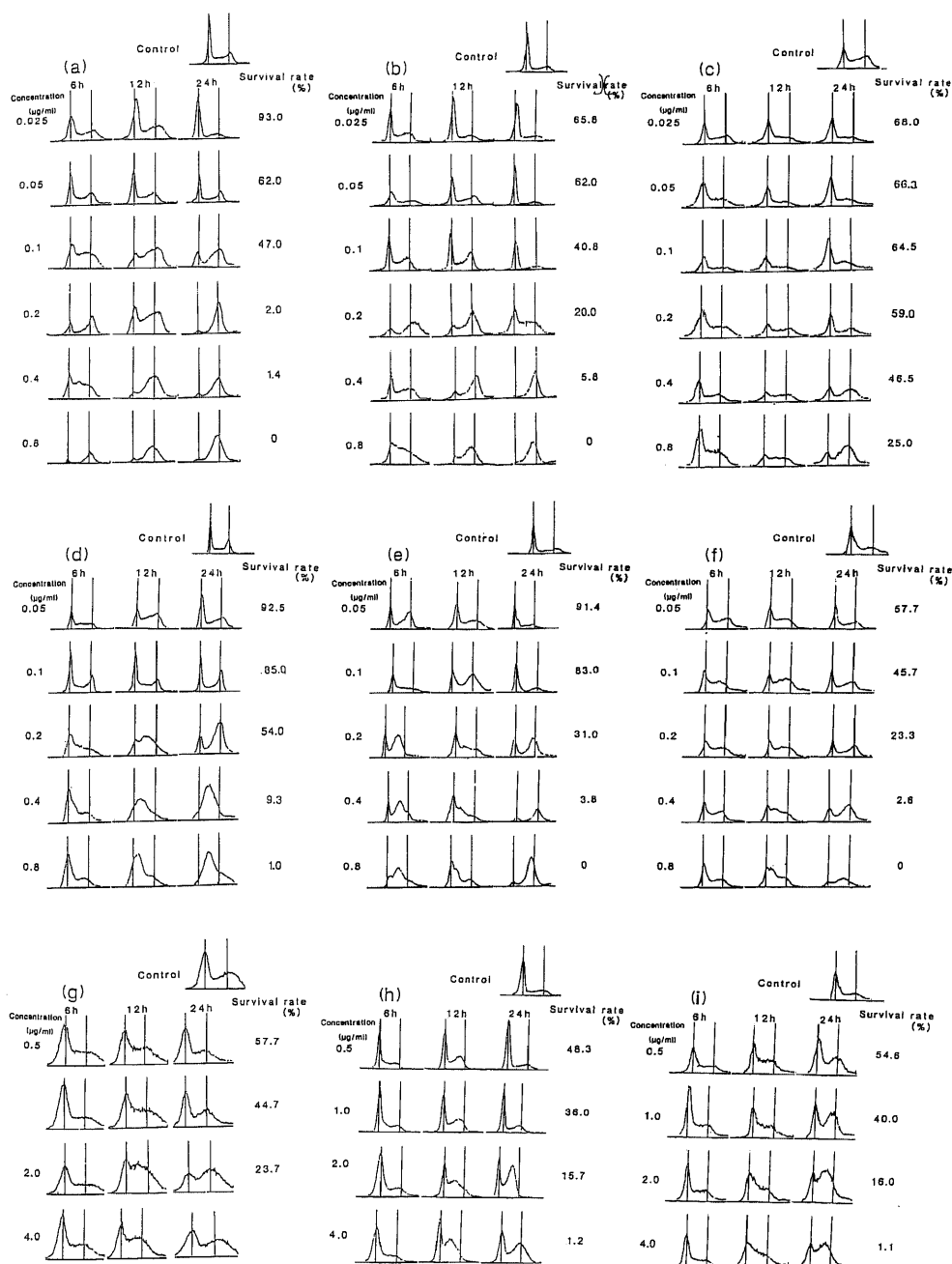


Fig. 5. Survival rate and time course of DNA/cell distribution histogram.

- (a) NCC-nu cells treated with ADR.
- (b) HeLa cells treated with ADR.
- (c) PLC cells treated with ADR.
- (d) NCC-nu cells treated with MMC.
- (e) HeLa cells treated with MMC.
- (f) PLC cells treated with MMC.
- (g) NCC-nu cells treated with CDDP.
- (h) HeLa cells treated with CDDP.
- (i) PLC cells treated with CDDP.

し、抗癌剤無処置細胞の% S+G₂M に対する抗癌剤処理細胞の% S+G₂M の比を S+G₂M 比として求めた。抗癌剤濃度の増加に伴い S+G₂M 比は増加傾向を示した。

i) ADR

NCC-nu 細胞では 0.025 μ g/ml より S+G₂M 比の増加を認め、コロニー形成法において約50%の S. R. が期待できる 0.1 μ g/ml では S+G₂M 比は1.31

で、10%以下の S. R. を示す理論的組織内濃度である 0.4 μ g/ml では1.41であった。PLC 細胞でも濃度の増加に伴い S+G₂M 比の増加を認めたが、0.4 μ g/ml では1.15と NCC-nu 細胞に対し S+G₂M 比の変化は少なかった。一方、HeLa 細胞では 0.025 μ g/ml から 0.1 μ g/ml の低濃度において S+G₂M 比は1.0以下と減少したが、0.2 μ g/ml 以上では濃度増加に伴い S+G₂M 比は増加し、0.4 μ g/ml では1.28であった (図 6-a)。

ii) MMC

3細胞株ともに濃度に伴い S+G₂M 比の増加を認め、理論的組織内濃度である 0.2 μ g/ml における S+G₂M 比は、NCC-nu 細胞1.21, HeLa 細胞1.16, PLC 細胞1.12であった (図 6-b)。

iii) CDDP

全細胞株において濃度に伴い S+G₂M 比の増加を認め、理論的組織内濃度である 2.0 μ g/ml における S+G₂M 比は、NCC-nu 細胞1.18, HeLa 細胞1.22, PLC 細胞1.12であった (図 6-c)。

2) S+G₂M 比と殺細胞効果の関係

それぞれの濃度における S. R. と S+G₂M 比をグラフ上に示した (図 7-a, b, c)。両者の関係は負の相関を示し、それぞれの回帰曲線は ADR で NCC-nu 細胞は $Y = -0.003X + 1.409$ ($r = -0.963$), HeLa 細胞は $Y = -0.008X + 1.674$ ($r = -0.862$), PLC 細胞 $Y = -0.006X + 1.475$ ($r = -0.995$) であった。MMC で NCC-nu 細胞は $Y = -0.002X + 1.318$ ($r = -0.971$), HeLa 細胞は $Y = -0.004X + 1.318$ ($r = -0.984$), PLC 細胞は $Y = -0.003X + 1.248$ ($r = -0.997$) であった。CDDP で NCC-nu 細胞は $Y = -0.003X + 1.244$ ($r = -0.990$), HeLa 細胞は $Y = -0.005X + 1.298$ ($r = -0.980$), PLC 細胞 $Y =$

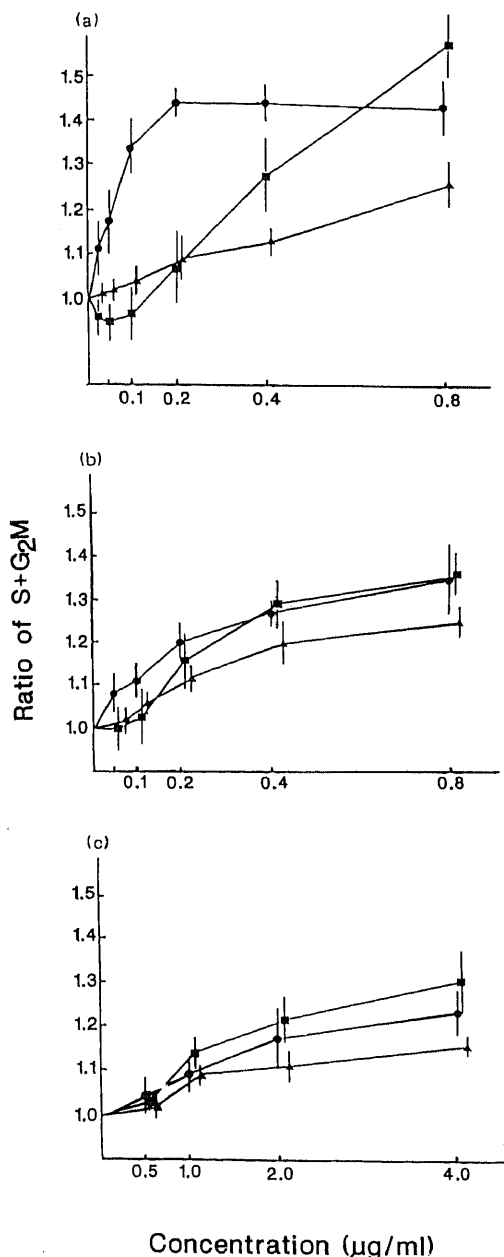


Fig. 6. Dose-response curve of cells on flowcytometry (FCM) treated with drugs. The cells were exposed to different concentration of the drugs in medium for 24 hr. After exposure, the cells were removed and cells were washed three times with Hanks' solution. Then the cells were cultured for 24 hr. The percentage of S + G₂M on cell cycle was analysed by Fried's DNA analysis.

(a) The cells were treated with ADR.

(b) The cells were treated with MMC.

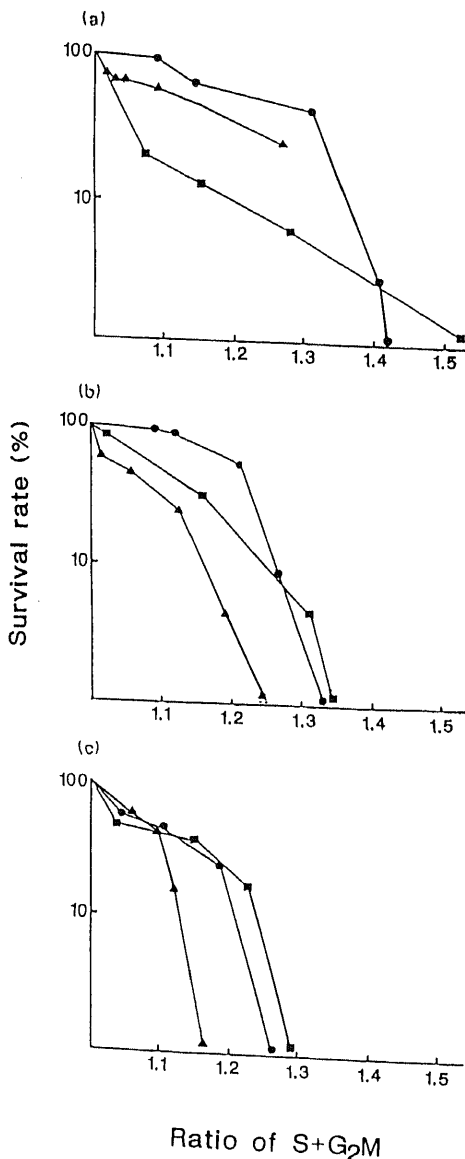
(c) The cells were treated with CDDP.

●, NCC-nu cells; ■, HeLa cells; ▲, PLC cells.

The results are shown as mean $\pm$ S. D. ($n=9$).

$-0.001X + 1.154$ ($r = -0.967$) で、コロニー形成法による S. R. と S+G₂M 比は優位に ($p < 0.001$) に負の相関を示した。

以上の実験結果よりコロニー形成法で高感受性とした細胞は、理論的組織内濃度の抗癌剤処理にて90%以上の殺細胞効果を示し、FCM における S+G₂M 比は1.3以上であった。つまり、FCM を用いた抗癌剤感受性試験では理論的組織内濃度での S+G₂M 比、1.3を基準として感受性の判定が可能と考えられた。



考 察

抗癌剤による細胞周期の変化と DNA 合成能の関係については、1972年、Tobey ら¹⁶が、H³ チミジン取り込み能の低下と細胞周期上 G₂M 期への細胞集積の関係について報告しており、本邦でも高本ら¹⁷が同様の検討を行っている。しかし、FCM を用いた抗癌剤感受性試験への応用に関する試みは野村ら^{12,13}の報告のみであり、明確な検査条件や判定法も確立されていないのが現状である。本研究はこれらの事実を踏まえ、抗癌剤による殺細胞効果と細胞周期の変化の関係より、FCM の抗癌剤感受性試験への応用の可能性を既存の *in vitro* 抗癌剤感受性試験と対比のもとに検討し、更に FCM を用いた抗癌剤感受性試験の判定法の設定を試みた。

in vitro 薬剤感受性試験には増殖抑制法¹⁸、コロニー形成法²が従来より一般に用いられている。これらのうち、問題の多いとされている増殖抑制法に比しコロニー形成法は95%以上の細胞単離率、コロニー高形成能をもつ癌細胞ならば最も信頼の高い方法といえる。この条件を満たすヒト癌細胞は決して多くはないが、著者が実験に用いた NCC-nu 細胞⁹、HeLa 細胞、PLC 細胞はこの条件を十分備えていたので、著者もこのコロニー形成法を用い対照とした。

FCM を用いた抗癌剤による細胞周期の変化の測定条件として、まず薬剤接触時間を2時間とした。多数の *in vitro* 抗癌剤感受性試験の報告の中で、薬剤との接触時間は多少差を認めるものの2時間接触

Fig. 7. Relationship between survival rate and ratio of S+G₂M. Survival rate of the cells was determined by colony forming assay. Ratio of S+G₂M of the cells was determined by Fried's DNA analysis. The results are shown as mean of data.

(a) The cells were treated with ADR.

●, NCC-nu cells, $Y = -0.003X + 1.409$ ($r = -0.963$, $p < 0.001$); ■, HeLa cells, $Y = -0.008 + 1.374$ ($r = -0.862$, $p < 0.05$); ▲, PLC cells, $Y = -0.006X + 1.475$ ($r = -0.995$, $p < 0.001$);

(b) The cells were treated with MMC.

●, NCC-nu cells, $Y = -0.002X + 1.318$ ($r = -0.971$, $p < 0.001$); ■, HeLa cells, $Y = -0.004X + 1.318$ ($r = -0.984$, $p < 0.001$); ▲, PLC cells, $Y = -0.003X + 1.248$ ($r = -0.997$, $p < 0.001$);

(c) The cells were treated with CDDP.

●, NCC-nu cells, $Y = -0.003X + 1.244$ ($r = -0.990$, $p < 0.001$); ■, HeLa cells, $Y = -0.005X + 1.298$ ($r = -0.980$, $p < 0.001$); ▲, PLC cells, $Y = -0.001X + 1.154$ ($r = -0.967$, $p < 0.001$).

としたものが最も多く、また著者が対照としたコロニー形成法でも2時間接触で良好な濃度依存曲線が得られた。

一般に、各種抗癌剤の *in vitro* 殺細胞様式は、下山ら¹⁹⁾¹⁶⁾により濃度依存性速効性作用群 (I a 型)、濃度依存性速効性かつ遅効性作用群 (I b 型)、制限付時間依存性作用群 (II a 型)、時間依存性作用群 (II b 型) の4つに分類されており、そのうち今回著者が用いた ADR, MMC は I a 型に、CDDP は I b 型に分類されている薬剤である。濃度依存性作用群に分類されるこれら3薬剤の作用様式および細胞周期に及ぼす変化として、I a 型に含まれる抗癌抗生物質の ADR¹⁷⁾¹⁸⁾, MMC¹⁹⁾²⁰⁾ は、DNA 結合体と言われ DNA 2重鎖と交差連合²¹⁾あるいは間置して DNA 合成、ひいては RNA 合成障害を起すとされている。その結果不可逆的に G₂ 期細胞の蓄積もしくは細胞周期の進行停止が起こり細胞は死に至るとされている。一方、I a 型に分類されている CDDP は細胞周期非特異性であるが、ADR, MMC と同様に DNA 2重鎖と交差連結し DNA 合成障害を来し、細胞周期上 G₂M 期、S 期細胞集積として認められる。

一方、薬剤処理後より FCM の検体処理までの時間、つまり効果判定時間を6, 12, 24時間として経時的に検討した。本実験でも薬剤負加による細胞周期の変化は諸家¹¹⁾¹⁷⁻²⁰⁾の報告のごとく G₂M 期、S 期細胞集積として認められた。しかし、著者の成績に示すごとくかなりの殺細胞効果の期待できる薬剤濃度においても12時間では S 期、G₂M 期の集積は著明ではなく、24時間で明らかとなるものが存在した。また、使用した3細胞株の倍加時間は約25~30時間であり細胞回転の時間からも24時間での効果判定は妥当と考えられる。

しかし、固形腫瘍では明確な倍加時間は不明で、抗癌剤処理後24時間での判定は疑問の残るところであるが、野村ら¹²⁾¹³⁾、林²²⁾は固形腫瘍よりの単離細胞浮遊液においても抗癌剤処理後24~48時間で細胞周期の変化の判定が可能であるとしている。さらに、著者も現在胃癌の臨床材料を用いて検討中であるが、本法でも24時間で S+G₂M 期への細胞集積を認め、コロニー形成法との比較を24時間後の S+G₂M 期の変化で行った。

使用薬剤濃度の設定に関しては Van Hoff⁹⁾の理論による濃度設定法およびマウスの LD₅₀ からの濃度設定が用いられている。著者も Van Hoff の理論に基づき臨床投与量の最高血中濃度の 1/10 を理論的組織内濃度と設定し、この濃度を中心として前記の濃度段

階を設定した。殺細胞効果のほとんど期待できない低濃度では、明らかな細胞周期の変化は認められず、理論的組織内濃度前後の薬剤濃度で S+G₂M 期への細胞集積を認めた。また、NCC-nu 細胞では理論的組織内濃度より高濃度の MMC 処理で S 期への一峰性集積を認めた。この一峰性集積に関しては Krishan ら¹⁷⁾, Ohara ら²⁰⁾が同様の報告をしており、さらに高濃度では細胞回転の停止を来たすとしている。このことから細胞周期の変化を観察するにあたっては、抗癌剤濃度が高濃度では細胞回転の停止²³⁾をきたし、又低濃度では何ら細胞回転に影響を及ぼさず²⁴⁾両濃度においては細胞回転からの感受性判定は困難と考える。しかし本実験に用いた薬剤濃度では高濃度での細胞回転の停止は認められず、理論的組織内濃度を中心とした薬剤濃度の設定は妥当と考える。

細胞回転における S+G₂M 期への集積に関して Barlogie ら²³⁾²⁴⁾は ADR では不可逆的なもので、その後細胞は死に至るとし、G₂+M 期への細胞集積は抗癌剤の殺細胞効果の指標となりうるとしている。また、Krishan¹⁷⁾, Ohara ら²⁰⁾は S 期への一峰性集積は薬剤の致死的效果を示すとしている。さらに Tobey ら¹⁰⁾はブレオマイシン (bleomycin, BLM) による G₂M 期への細胞集積と ³H チミジンの標識率の関係について検討し、G₂M 期への細胞集積は殺細胞効果を示すとしている。以上より S+G₂M 期の細胞集積は細胞障害を示すと考えられ、著者も S+G₂M 期への細胞集積を殺細胞効果の指標としてとらえ、抗癌剤感受性判定に用いた。しかし、DNA ヒストグラムの形態的变化のみでは客観的判定が困難であり、正確な各細胞周期の細胞の割合を知る必要があるが、G₁ 期細胞、S 期細胞、G₂M 期細胞の明確な区別は不可能である。そこで著者は各周期の細胞が正規分布に存在するとした Fried⁸⁾の DNA 解析法を用いて各期細胞の割合を算定し S+G₂M 期の数量化を行なった。薬剤処理による細胞周期の変化の指標として、野村ら¹³⁾はファクター A (治療前全細胞数に対する治療後の細胞周期上 S+G₂M 期に存在する細胞数の増減の割合)、ファクター B (治療前細胞周期上 S+G₂M 期に存在した細胞数に対する治療後 S+G₂M 期に存在する細胞数の増減の割合) を設定し検討している。固形腫瘍では60~70%の静止期細胞を含んでおり、この静止期細胞の多少によりファクター A は変化率に大きな差を生じる。一方ファクター B は静止期細胞を除外して分裂期細胞のみを対象としており、抗癌剤の効果判定にはファクター B が有用であ

るとしている。著者は培養細胞を用いた実験であるため分裂期細胞のみを対象として検討したが、臨床応用を目的として静止期細胞の除外される抗癌剤処理群と無処理群の S+G₂M 期細胞の比率の比を S+G₂M 比として判定に使用した。

S+G₂M 比は薬剤濃度の上昇に伴い増加するが、それぞれの薬剤における理論的組織内濃度⁷⁾での S+G₂M 比とコロニー形成法による殺細胞効果を検討したところ、両者は高い相関を示し、薬剤感受性試験への応用の可能性が示唆された。さらに ADR に対してコロニー形成法で高感受性である NCC-nu 細胞および HeLa 細胞は理論的組織内濃度である 0.4 μg/ml で90%以上の殺細胞効果を認め S+G₂M 比はそれぞれ1.49および1.31であり、また NCC-nu 細胞では 0.1 μg/ml 細胞でも1.31であった。一方、コロニー形成法で3薬剤に対して低感受性である PLC 細胞、MMC、CDDP に対して低感受性である NCC-nu 細胞、HeLa 細胞では理論的組織内濃度⁷⁾の薬剤処理で S+G₂M 比は1.22以下であった。以上より、理論的組織内濃度の薬剤処理で S+G₂M 比の値が1.3を基準として薬剤に対する感受性の判定がある程度可能と考えられた。

FCM を用いた抗癌剤感受性試験と既存の *in vitro* 感受性試験を比較すると、判定時間が HTC-A²⁾で14日、Scintillation assay³⁾で7日と長いのに比べて、本法では24時間と短時間に判定が可能である。また HTCA や Scintillation assay はコロニー形成能を有する細胞、いわゆる幹細胞のみの感受性判定であり、通常腫瘍組織に占める0.0012-0.3530%²⁸⁾の細胞についてのみの検討と考えられる。一方 FCM を用いた DNA 測定法では、短時間に大量の細胞の DNA 分布状態の把握が可能であり、抗癌剤による細胞周期の変動から全細胞に対する薬剤感受性の判定を示唆すると考える。また *in vivo* 感受性試験である腎被膜下移植法 (subrenal capsule assay, SRC)²⁹⁾は4日から6日間と比較的短時間に感受性の判定が可能であるが、正常の免疫能を有するマウスを使用するためその免疫能の関与や、生着腫瘍は炎症細胞浸潤と結合組織に置き換えられ、肉眼的な修飾が加わり効果判定に問題が残されている²⁹⁾。この意味から免疫能のほとんどと影響しないヌードマウスを用いた実験が理想的で、臨床との相関も高い²⁹⁾と言われているが、判定までには1ヶ月以上の時間を要し、ヌードマウス自体高価で費用面での問題も残る。一方 HTCA³⁾や Scintillation assay⁴⁾と臨床効果の相関は決して高いものとはいえず、幾多の問題を残すとこ

ろである。FCM を用いた抗癌剤感受性試験もコロニー形成法との相関性は高いが、臨床効果の相関はまだまだ検討中で今後の課題とされる。

固形腫瘍に対する化学療法での問題点として、固形腫瘍では一般に静止期細胞が60-70%を占めており、静止期細胞は抗癌剤感受性が低く十分な殺細胞効果を得られないのが現状である。この問題を解決するには静止期細胞を分裂期に移行させる必要があり、この方法が動員である²⁹⁾⁽³⁰⁾。また動員された細胞を感受性の高い細胞周期に移動させるのが同調で、Pouillat³¹⁾は固形腫瘍において methotrexate (MTX)を用いることにより同調を起し S 期、G₂M 期に特異性を有する抗癌剤を投与することにより効果が認められたとしている。著者も臨症例において MTX-5-fluorouracil (5-Fu) sequential therapy³²⁾を応用しその有効性を認めている。FCM を用いることで個々の腫瘍細胞が動員、同調を来す最低濃度が比較的短時間で推測可能と考えられ、今後 FCM を用いた抗癌剤感受性試験は殺細胞効果のみならず、副作用軽減、併用薬剤のスクリーニングへの発展が期待される。

結 論

FCM を用いた抗癌剤感受性試験への応用を目的として抗癌剤処理後の細胞周期の変化を解析し、コロニー形成法による殺細胞効果と比較検討した結果、以下の結論を得た。

1. コロニー形成法による NCC-nu 細胞、HeLa 細胞、PLC 細胞の抗癌剤 (ADR, MMC, CDDP) に対する感受性は明らかな差を認め、臨床投与量との比較でも ADR に対し、NCC-nu 細胞、HeLa 細胞が高い感受性を示した。

2. 抗癌剤処理後の経時的 S+G₂M 期への細胞集積解析により、抗癌剤による細胞周期の変化の判定時間を24時間と定めることが可能であった。

3. 理論的組織内濃度での S+G₂M 比とコロニー形成法による殺細胞効果は、高い相関を示し薬剤感受性試験への応用の可能性が示唆された。

4. 薬剤高感受性細胞は、理論的組織内濃度で S+G₂M 比は1.3以上で、S+G₂M 比の値が1.3を基準として薬剤に対する感受性判定の基準となりえると考えた。

謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に心から感謝致します。さらに心よく研究の御指導、御助言をして戴きました金沢大学がん研究所ウイルス部波

多野基一名誉教授並びに化学療法部佐々木琢磨教授、田中基裕助手に感謝致します。また直接実験の御指導をいただきました沢口潔博士、さらに終始御協力と御援助を戴きましたがん研究所外科部諸先生に感謝致します。

本論文の要旨は第46回日本癌学会総会（1987）、第25回日本癌治療学科総会（1987）において発表した。

文 献

- 1) Puck, T. T. & Marcus, I.: Action of X-rays on mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **103**, 653-666 (1956).
- 2) Hamberger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 3) Tanigawa, N., Kern, D. H., Hikasa, Y. & Morton, D. H.: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res.* **42**, 2159-2164 (1982).
- 4) Van Dilla, M. A., Trujillo, T. T., Mullane, P. F.: Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. *Science*, **163**, 1213-1214 (1969).
- 5) 沢口潔: ヒト腎細胞癌 (NCC-nu) の樹立およびその *in vitro* 抗癌剤感受性と温熱療法効果. 十全医学会誌, **94**, 21-38 (1985).
- 6) 佐々木功典, 荻野哲郎, 長嶺由啓, 高橋学: Propidium iodide を用いた flowcytometry による DNA 解析のための基礎的検討. *J. Jpn. Clin. Cytol.*, **23**, 1-8 (1984).
- 7) Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. & Makuch, R.: Association between human tumor colony forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Amer. J. Med.*, **70**, 1027-1032 (1981).
- 8) Fried, J.: Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry. *Comput. Biomed. Res.*, **9**, 263-276 (1976).
- 9) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来細胞株 KK-47, KW-103 および HeLa 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌, **74**, 1606-1620 (1983).
- 10) Tobey, R. A. & Crissman, H. A.: Use of flow microfluorometry in detailed analysis of effect of chemical agents on cell cycle progression. *Cancer Res.*, **32**, 2726-2732 (1972).
- 11) 高本滋, 太田和雄: 抗癌抗生物質の細胞回転におよぼす影響—Flow microfluorometry 分析による—. 癌と化学療法, **6**, 59-70 (1979).
- 12) 野村和弘, 山本博昭, 渋谷壮一郎, 三木啓全, 関政子: 脳腫瘍の化学療法に対する Flow cytometry 分析の応用—第1報 各種抗癌剤による細胞動態の変化. 脳と神経, **33**, 341-350 (1981).
- 13) 野村和弘, 渋谷壮一郎, 渡辺卓: 悪性脳腫瘍の化学療法への応用. 癌と化学療法, **9**, 1151-1163 (1982).
- 14) Alexander, P.: Mouse lymphoma cells with different radiosensitivities. *Nature*, **192**, 572-573 (1961).
- 15) 下山正徳, 木村喜代二: 抗癌剤の殺細胞作用の定量法. —Mitomycin C の殺細胞作用について— *Chemotherapy*, **20**, 787-794 (1976).
- 16) 下山正徳: 制癌剤の cell-kill-kinetics と至適投与法. 癌と化学療法, **3**, 1103-1110 (1976).
- 17) Krishan, A. & Frei, E. III: Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts. *Cancer Res.*, **36**, 143-150 (1976).
- 18) Barranco, S. C., Gerner, E. W., Burk, K. H. & Humphrey, R. M.: Survival and cell kinetics effects of adriamycin on mammalian cells. *Cancer Res.*, **33**, 11-16 (1973).
- 19) Djordjevic, B. & Kim, J. H.: Different lethal effects of mitomycin C and actinomycin D during the division cycle of HeLa cells. *J. Cell. Biol.*, **38**, 477-482 (1968).
- 20) Ohara, H. & Terashima, T.: Lethal effects of mitomycin C on cultured mammalian cells. *GANN*, **63**, 317-327 (1972).
- 21) Rosenberg, B., Van Canp, L. & Kringas, T.: Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, **205**, 698-699 (1966).
- 22) 林正岳: Sr⁹⁰ 誘発骨肉腫マウスに対する High dose methotrexate chemotherapy の検討—Flow cytometry による解析—. 中部整災誌, **26**, 2017-2031 (1983).
- 23) Barlogie, B. & Drewinko, B.: G₂ block, a kinetic effect common to chemically unrelated cytostatic agents. *J. Cell Biol.*, **67** 20a (1975).
- 24) Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D. A. & Freireich, E. J.: The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid

cell line. *Cancer Res.*, **36**, 1975-1979 (1976).

25) 平林直樹 : Humann Tumor Clonogenic Assay 法を用いた制がん剤感受性試験に関する実験的ならびに臨床的研究. *日外会誌*, **87**, 834-845 (1986).

26) Bogden, A., Kelton, D., Cobb, W. & Henry, J.: A rapid screening method for testing chemotherapeutic agents against human xenograft. Gustave Fischer, New York, Inc. p231-250 (1978).

27) 楠山剛紹, 藤田昌英, 下妻晃二郎, 田口鉄男 : Subrenal capsule assay 法による抗癌剤感受性試験 (IV) - 移植腫瘍生着の場としての腎被膜下移植法の検討 - . *癌と化学療法*, **14**, 3105-3113 (1987).

28) 藤田昌英 : *in vitro* 抗癌剤感受性テストメーロードマウス法と SRC を中心に. *医学のあゆみ*, **141**, 528-532 (1987).

29) Bruke, P. J. & Owens, A., H., Jr.: Attempted recruitment of leukemic myeloblasts to proliferative activity by sequential drug treatment. *Cancer*, **28**, 830-836 (1971).

30) Drewinko, B., Brown, B. W., Humphrey, R. & Alexarian, R.: Effect of chemotherapy on the labeling index of myeloma cells. *Cancer*, **34**, 526-531 (1974).

31) Pouillant, P., Weiner, R., Misset, J. L. & Schwarzenberg, L.: Combination chemotherapy based on a model of recruitment by partial synchronization. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **14**, 115 (1973).

32) Bertino, J. R., Sawick, W. L., Lindquist, C. A. & Gupta, V. S.: Schedule dependent antitumor effect of methotrexate and 5-fluorouracil. *Cancer Res.*, **37**, 327-328 (1977).

Experimental Study on Chemosensitivity Test for Anticancer Drugs Using Flowcytometry Toshihiko Suga, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med. Soc.*, **97**, 812—824 (1988)

Key words: flowcytometry, *in vitro* chemosensitivity test, cell kinetics, DNA analysis

Abstract

The determination of a chemosensitivity for an individual cancer patient is possibly required within a short time, because suitable anticancer drugs should be given to the patient immediately after surgery. However, well-known chemosensitivity tests, such as tumor xenograft to athymic mice, human tumor clonogenic assay (HTCA) and subrenal capsule assay (SRC), usually take more than 7 days. For this reason, the author attempted to establish a rapid chemosensitivity test using flowcytometry (FCM). Since the cell cycle of tumor cells is changed after treatment with anticancer drugs, the sensitivity can be determined by a DNA histogram using Fried's DNA analysis. Three human tumor cell lines, NCC-*nu*, HeLa, and PLC, were used in this assay, and mitomycin C (MMC), adriamycin (ADR), and cisplatin (CDDP) were tested. The drug concentration used in this assay was determined by the theoretical concentration of human tissues. The accumulation of DNA in S- and G₂M-phase was recognized 12 hours after drug exposure and distinctively changed 24 hours after. The ratio of the accumulation of DNA in S- and G₂M-phase treated with drugs to that of control (ratio of S+G₂M) was calculated. The ratio of S+G₂M increased in proportion to the concentration of drugs. To compare the ratio of S+G₂M with cytotoxicity, the cytotoxic effect of the drugs *in vitro* was also tested by colony forming assay according to the method of Puck and Marcus. There is a good correlation between the ratio of S+G₂M and cytotoxicity. When the ratio of S+G₂M exceeded 1.3 at the concentration of clinical dose, the cells showed high sensitivity to the

drugs. However, low sensitivity cells did not exceed 1.3. These results showed that the ratio of S+G₂M exceeding 1.3 at the concentration of clinical dose might be available as a criterion of chemosensitivity. This study indicates that DNA analysis using FCM offers the possibility of a new chemosensitivity test.