

Effects of Anticancer Agents on Cell Cycle Traverse of Human Osteosarcoma Cell Line in Culture -Analysis by Flow Cytometry

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/2297/7843

ヒト骨肉腫由来培養細胞 (OST 株) の増殖ならびに 細胞回転に及ぼす諸種抗癌剤の影響 —Flow cytometry による解析—

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任：野村 進教授)

平 井 純

(昭和60年12月28日受付)

本実験において、各種抗癌剤のヒト骨肉腫由来培養細胞株の細胞回転に及ぼす影響について flow cytometry を使用して研究した。抗癌剤は骨肉腫に臨床によく使用されている adriamycin (ADR), vincristine (VCR), 及び methotrexate (MTX) をもちいた。また、オートグラフィー、細胞像、細胞数変化により DNA ヒストグラムと細胞動態の相関についても調査した。ADR は濃度依存的に作用をしたが、しかし、低濃度では時間依存的に作用した。VCR は低濃度では M 期延長、つまり可逆的有糸核分裂阻止作用を認め、高濃度では G₁ 期の延長と S 期での殺細胞効果を認めており、濃度依存的に作用している事が証明された。MTX は G₁ 期の延長、及び S 期からの移行阻止が観察され、その結果、S 期での synchronization をきたした。二剤併用投与においては一剤のみの作用機序が優位に出現した。以上の結果により、化学療法に際しては、各薬剤の細胞回転に及ぼす影響を考慮して、投与スケジュールを決定するべきと考える。

Key words osteosarcoma, human tumor cell line, anticancer agent, cell cycle, flow cytometry

悪性腫瘍に対する化学療法は抗癌剤多剤併用投与の有効性が、Li ら¹⁾により指摘されて以来、にわかに注目されるようになった。しかしながらその多くは、臨床上有効性が認められた複数の抗癌剤を経験的に、あるいは個々の生化学的作用機序を背景として組合せて用いられている現状にある。

一方、近年 Bruce ら²⁾, Sinclair³⁾, 及び Wheeler ら⁴⁾, によって抗癌剤の細胞回転に及ぼす影響が論じられるようになり、この方面から、より効率的な併用投与方法が再検討されるようになってきた。しかし、従来の細胞回転の解析は、アイソトープ標識細胞の経時的変化を利用した、いわゆるオートラジオグラフィ法、あるいは細胞回転における各期の細胞重量の差を利用した細胞沈降分離装置によるものであり、手技的にきわ

めて煩雑で、しかも長時間を要し、また精度の上でも難点があるとみられていた。近年、細胞回転期の各期における細胞内 DNA 量の差異を利用し、feulgen 核染色したのちの DNA 蛍光量測定によって、各期における細胞数を算定する顕微分光測定法が考案された。その後、Van-Dilla ら⁵⁾によって、コンピューター解析を可能にした flow cytometer (DNA 瞬間自動測定装置) が開発されるに至り、細胞回転における各期の細胞量の把握が正確かつ短時間に可能となった。これは、Krishan ら⁶⁾, つづいて高本ら⁷⁾によって、抗癌剤の細胞回転に及ぼす影響の解析に利用され、その有効性が立証された。

今回、著者は骨肉腫 OST 株を用いて、临床上、骨肉腫治療によく反応するとして使用されている、adria-

Abbreviations: ADR, adriamycin; FCM, flow cytometry; G₀, Gap₀; G₁, Gap₁; G₂, Gap₂; ³H-TdR, ³H-thymidine deoxyribose; LI, labeling index; M, mitotic phase; MI, mitotic index; MTX, methotrexate; OST strain, Osteogenic Sarcoma Takase strain; PBS, phosphate

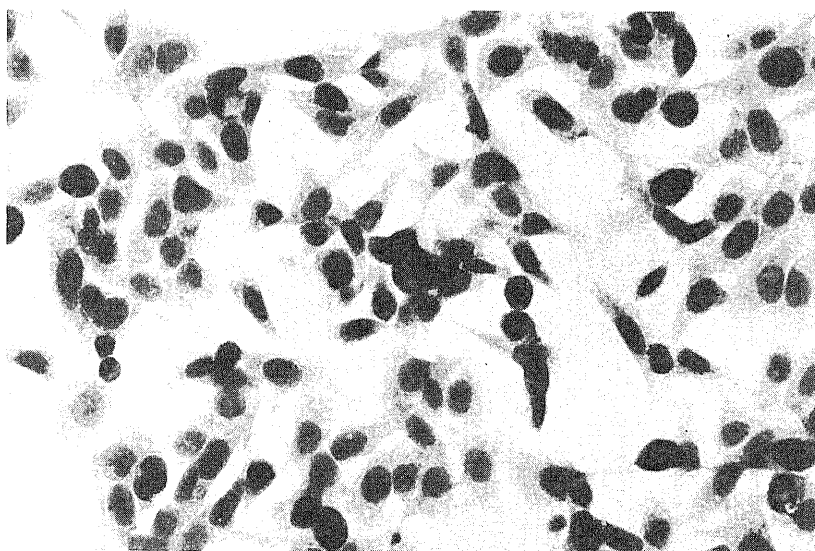
mycin, vincristine, methotrexate の3剤をそれぞれ単独投与もしくは2剤併用した場合の細胞回転の様相につき flow cytometry を中心に観察するとともに、オートラジオグラフィー、細胞所見、及び生細胞数の測定などの解析を行って、骨肉腫への投与法の基礎的検討を行った。

対象および方法

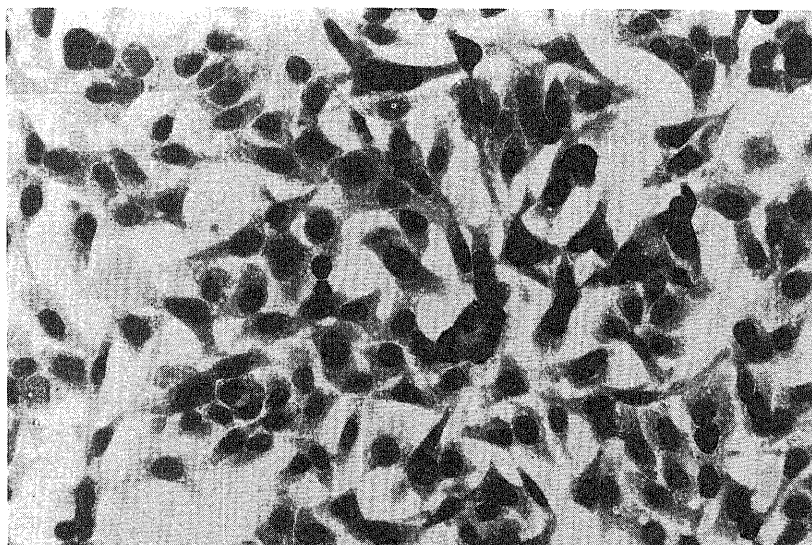
I. 腫瘍細胞

昭和39年以来、当教室で継代維持されているヒト骨肉腫由来培養細胞株 (OST 株) を使用した (写真1)。

II. 抗癌剤の種類と用量



48 hr after subculture



96 hr after subculture

Photo. 1 Microscopical findings of cultured OST cell line (Hematoxylin-Eosin stain ; x150)

buffer saline ; RPMI 1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640 ; S, DNA synthetic phase ; VCR, vincristine.

1. 種類

adriamycin (Adriacin, 協和酸酵, ADR), vincristine (Oncovi, 塩野義, VCR), methotrexate (Methotrexate, 日本レダリー, MTX) をそれぞれ使用した。

2. 用量

各薬剤は、生理食塩水に溶解し、それぞれ 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度液を調製し、これらの一定量を培養液 20 ml に添加し、薬剤の作用濃度が 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.005 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 及び 0.0005 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように薬剤含有培養液を調製した。本実験では細胞増殖の抑制を認めた最小有効濃度を低濃度、その 10 割量の中濃度、100 割量を高濃度として表現した(表)。また、2 剤併用は各低濃度を組み合わせて同時に作用させ観察した。

III. RI 標識物質

thymidine ($6\text{-}^3\text{H}$) (^3H -TdR, 5.0 $\mu\text{Ci}/\text{mole}$) を使用した。

IV. 細胞培養

1. 培地

市販の合成培地 RPMI 1640 (ニッスイ製粉) にコウシ血清 (56°C, 30 分間非動化) を 20% 濃度に加えた培養液 (pH 7.0~7.4) を使用した。

2. 細胞浮遊液

37°C 下で 96 時間培養した細胞集団を Ca^{++} ・ Mg^{++} を除いた Dulbecco リン酸緩衝塩類溶液 (PBS) にて洗浄後、トリプシン処理を行い、800 rpm 5 分間遠心した。沈渣を直ちに $15\sim 20\times 10^4$ 個/ml の細胞濃度となるように、前記の培養液中に再浮遊した。

3. 培養

flow cytometry (FCM) には 75 cm^2 ディスポーザブル培養瓶 (Corning) に細胞浮遊液 20 ml を、オートラジオグラフィならびに細胞形態観察には 7 cm^2 スライドガラス付きディスポーザブル培養瓶 (Falcon)

に 3 ml をそれぞれ分注し、密栓後 37°C 下にて培養した。

V. 観察方法

1. FCM による DNA ヒストグラムの作成

薬剤の添加または無添加培地中で所定時間培養した細胞は前記のように処理して細胞浮遊液とし、遠心後、細胞を 25% メタノール 1 ml にて固定した。次いで 0.005% propidium iodide-0.1% sodium citrate 溶液 4 ml を注入し、冷暗所で 20 分間放置し細胞核を染色した後、flow cytometer (Instruments cytograf system 50-H) を使用し、細胞数約 15×10^4 個について DNA ヒストグラムを求めた。

2. オートラジオグラフィ

^3H -TdR を 0.5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の濃度になる様に添加し、cumulative labeling 法により generation time を算出した。また 30 分感作の puls labeling 法により labeling index (LI) を求めた。

3. 細胞の形態観察

所定の条件下で培養した細胞は PBS 溶液にて洗浄後 96% エタノール固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施行した。染色標本については細胞 3,000 個を検鏡し、mitotic index (MI) を求めると共に形態学的変化について観察した。

4. 生細胞数の算定

生細胞は trypan blue exclusion test により算定した。すなわち、培養細胞は遠心、洗浄後、0.1% trypan blue 液に浮遊せしめ、生細胞数と死細胞の比率を測定した。一方、自動血球アナライザー (コールター・エレクトロニクス) によって総細胞数を求め、これに対する比率によって生細胞数を算出した。

5. 観察時期

OST 株の generation time が 41 時間であることを考慮し、薬剤と接触せしめてから 24 時間後、及び 48 時間後に、また、薬剤除去してから 48 時間後に、各測定を行った。

Table

Group	Anticancer agent	Low Dose $\mu\text{g}/\text{ml}$	Middle Dose $\mu\text{g}/\text{ml}$	High Dose $\mu\text{g}/\text{ml}$
Antibiotic	ADR	0.05	0.50	5.00
Vinca alkaloid	VCR	0.005	0.05	0.50
Antimetabolite	MTX	0.05	0.50	5.00

成 績

I. 培養ヒト骨肉腫細胞の増殖と細胞回転

1. DNA ヒストグラム

継代直後の骨肉腫細胞群の DNA ヒストグラムは G_1 期細胞群 (G_1 期) に大きなピークをもつ単峰性のパターンを示したが, 24 時間後では S 期細胞群 (S 期), G_2+M 期細胞群 (G_2+M 期) の増加が認められ, G_2+M 期にかけてのスロープが出現し, 48 時間後, 及び 72 時間後ではさらに S 期, 及び G_2+M 期が増加すると共に G_1 期に大きなピークを有する 2 峰性のパターンになった. 72 時間後は再度, S 期, 及び G_2+M 期の減少傾向がみられ, 120 時間後では完全に継代直後のパターンに一致する像を呈した. 細胞回転と DNA ヒストグラムの関係を図 1, 2 に示した.

2. オートラジオグラフィ

OST 細胞の継代培養 48 時間後から 96 時間迄における generation time を解析したところ 41 時間であった. また, 24 時間毎の pulse labeling にて LI を算出すると培養 24 時間後に最高値を示したが, 以後軽度低下し, 48 時間後から 96 時間後にかけて一定値を示し, さらに長時間経過すると漸次減少傾向を示した (図 2).

3. MI と細胞所見

MI は培養 48 時間後から 96 時間後までほぼ一定した高値を示し, 以後漸次減少した (図 2). また, 培養 24 時間後の組織像では紡錘形細胞が大部分を占め, 巨細胞が散見された. 96 時間後頃から集落形成を認めるようになり, 巨細胞の増加とともに pyknosis が出現

し増加の傾向を呈した (写真 1).

4. 生細胞数

培養 24 時間後の生細胞は培養直後のそれと大差がないが, 48 時間後から指数函数的に生細胞の増加が認められ, 96 時間後には細胞増殖は平衡状態となった (図 3).

II. 培養ヒト骨肉腫細胞の細胞回転に及ぼす抗癌剤の影響

1. 単剤の影響

1) ADR

i) DNA ヒストグラム

低濃度では経時的な G_1 期の減少と G_2+M 期の蓄積を認め, 薬剤投与 48 時間後における対照との比較では, G_1 期と G_2+M 期のピークが逆転したパターンを示した. 培地から薬剤を除去して 48 時間後においても G_2+M 期の増加が観察された. 中濃度では経時的に G_1 期の減少と S 期の増加が認められ, 薬剤投与 48 時間後では S 期にピークを有する単峰性のパターンを示した. しかし, 薬剤を除去して 48 時間後には G_2+M 期のみのピークを有する単峰性のパターンを呈した. 高濃度では 24 時間後, 及び 48 時間後共に対照とほぼ同様のパターンを示した. しかし, 薬剤除去して 48 時間後では生細胞は存在せず, ヒストグラム作製は不能であった (図 4).

ii) LI

低濃度では 24 時間後には 18.5% と対照に比較して減少し, 48 時間後にはさらに減少して 12.3% であった. 中濃度では 24 時間後に 68.5% と高値を示し, 48 時間後に 32.3% と約半数に減少したが, 対照に比較して

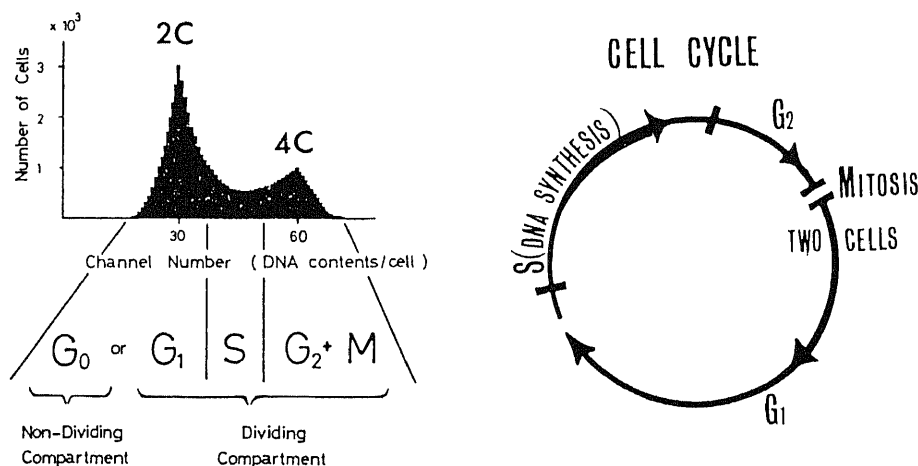


Fig. 1. Correlation between DNA histogram and cell cycle phases. 2C, diploid; 4C, tetraploid.

なお高値であった。高濃度では24時間後, 48時間後共に0%であった(図4)。

iii) MIと細胞所見

ADRの低濃度作用下での24時間後のMIは0.3%と低値を示し, 48時間後では0%となった。中濃度, 及び高濃度での24時間後, 48時間後のMIは共に0%であった。また, 経時的, 濃度依存的に細胞の萎縮傾向とpyknosisの増加が認められた(図4, 写真2A)。

iv) 生細胞数

ADRの低濃度の24時間後の算定では, 対照に比較して生細胞数は減少していたが, 以後減少傾向はなく,

薬剤を除去して48時間後ではむしろ増加の傾向が認められた。中濃度の24時間後の生細胞は低濃度とほぼ同様の経過であったが, 48時間後においてもなお減少しており, 薬剤除去して48時間後でも増加傾向はなかった。高濃度では前2者に比し, さらに生細胞数の減少が著しく, 薬剤除去して48時間後でも生細胞はまったく認められなかった(図5)。

2) VCR

i) DNAヒストグラム

低濃度作用下では G_2+M 期の経時的な蓄積傾向を呈し, G_1 期と G_2+M 期にピークを有する2峰性のパ

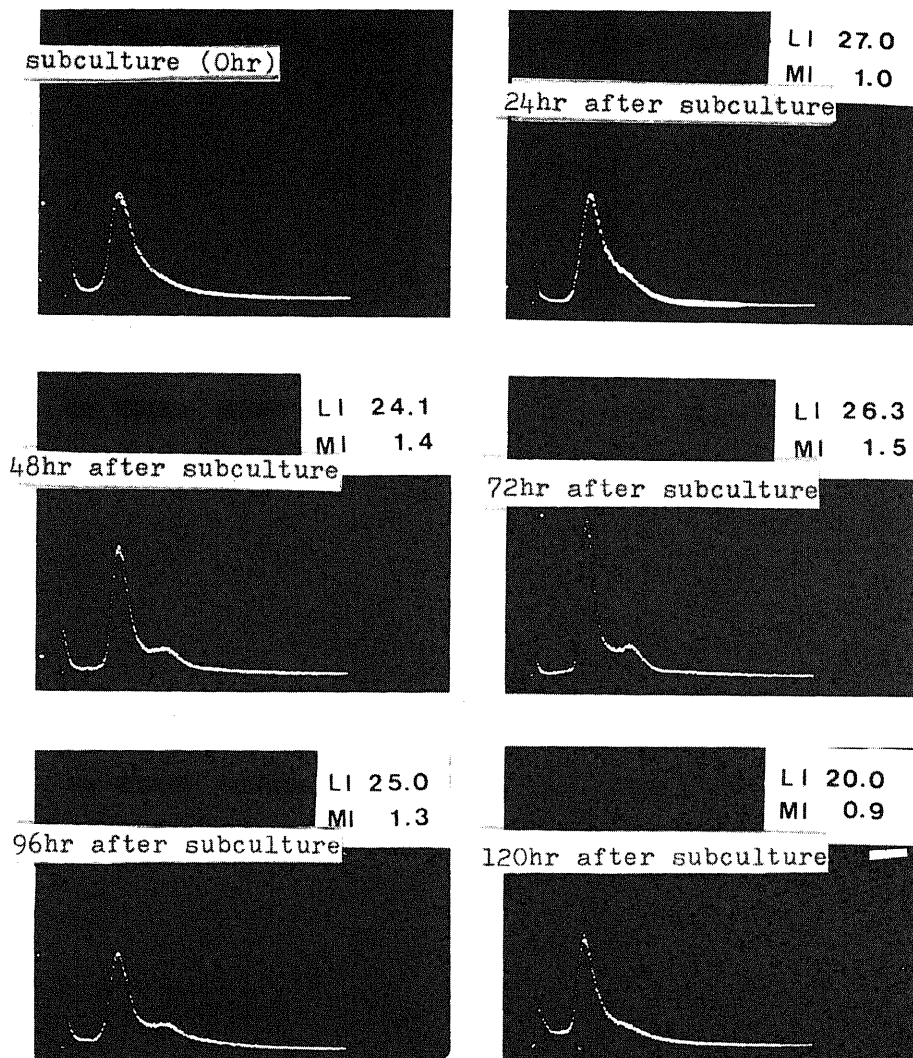


Fig. 2. Profiles of DNA histogram patterns and changes in labeling index (LI) and mitotic index (MI) of human osteosarcoma cell line OST in culture.

ターンを示した。薬剤除去 48 時間後では対照と同様のパターンに復した。中濃度、及び高濃度の 24 時間後では G_1 期、及び S 期にピークを有する 2 峰性のパターンを示し、 S 期のピークが G_1 期のピークより高く出現した。48 時間後も 2 峰性のパターンを示したが、 S 期と G_1 期のピークの高さは同等であった。薬剤除去 48 時間後では S 期の上昇を認めるが対照と類似したパターンとなった (図 6)。

ii) LI

VCR を各濃度で作用せしめた場合、24 時間後の LI は対照とほぼ同様であり、48 時間後で軽度に低値を示したに過ぎなかった (図 6)。

iii) MI と細胞所見

低濃度作用下、24 時間後の MI は対照の約 2 倍、48 時間後で約 3 倍と高値を示した。中濃度、及び高濃度作用下では 24 時間後で約 50% が分裂期を思わせる細胞群であり、48 時間後では多数の pyknosis が出現した (図 6、写真 2 B)。

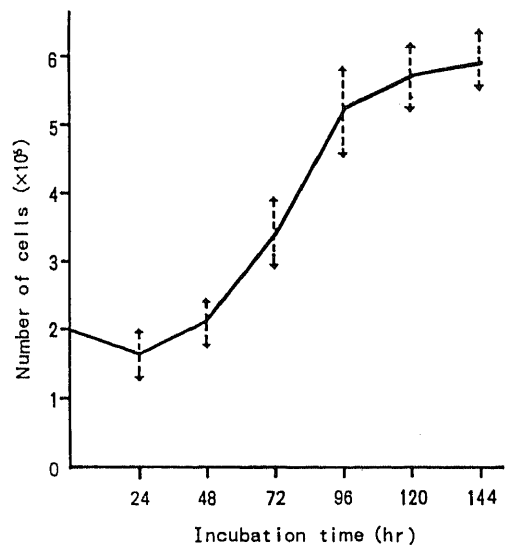


Fig. 3. Growth curve of OST cell line in culture. Each value represents the mean $\pm$ SD of 5 studys.

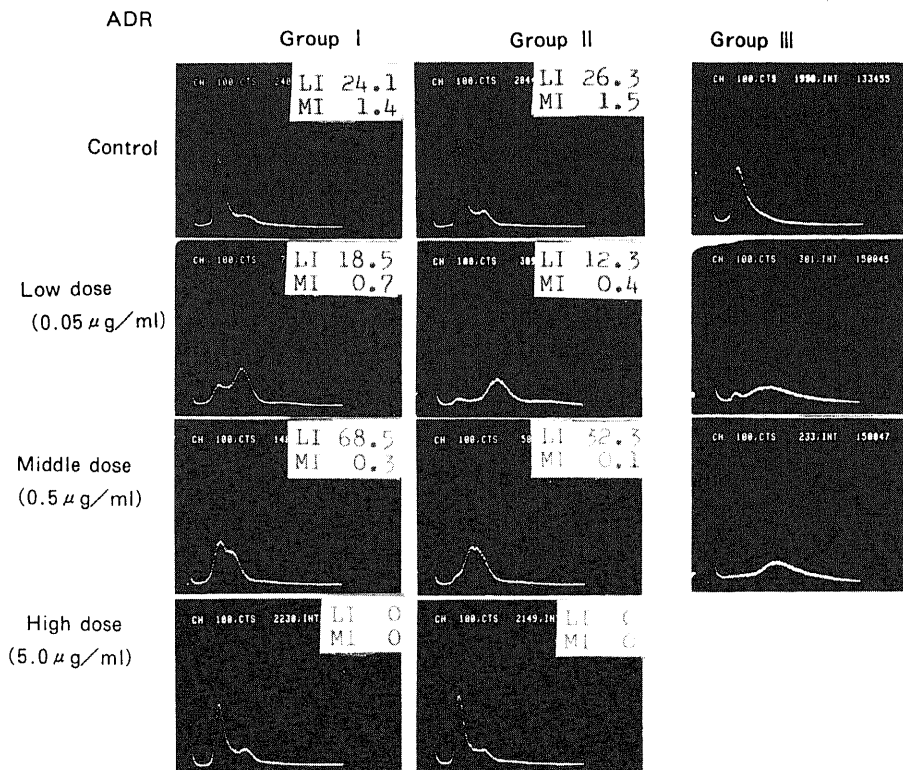


Fig. 4. DNA histograms of OST cells treated with ADR in culture. The OST cells were exposed to ADR at 37°C for 24hr (Group I) and for 48hr (Group II). The cells of Group II were consecutively cultured, after eliminating ADR, in fresh medium for 48hr (Group III).

iv) 生細胞数

低濃度下では軽度増殖抑制が認められたが、薬剤除去後には生細胞数の急増を呈した。中濃度、及び高濃度下では24時間後、48時間後と経時的に細胞数の減少を示したが、薬剤の除去後はむしろ増加の傾向があった(図7)。

3) MTX

i) DNA ヒストグラム

MTXの低濃度、中濃度、及び高濃度下いずれのヒストグラムにおいても、24時間後にG₂+M期の著明な減少とS期の低下がみられ、G₁期、及びG₁→S移行期からなる単峰性に近いパターンを示した。48時間後になると僅かにS期の増加が認められ、薬剤除去48時間後では対照と同程度に回復する傾向がみられた(図8)。

ii) LI

所定のMTX濃度のいかにかわらず、LIは24時間後で対照の約1.5倍、48時間後で約3倍の高値を

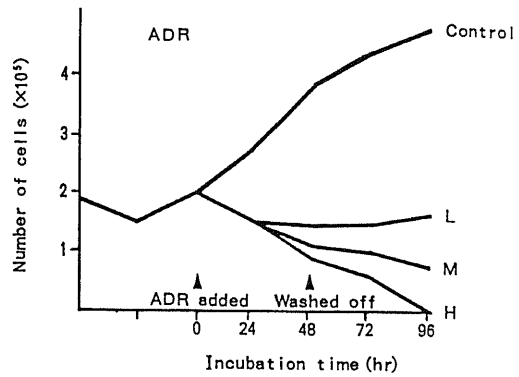


Fig. 5. Growth profiles of OST cells treated with ADR in various concentrations.

L, low dose; M, middle dose; H, high dose.

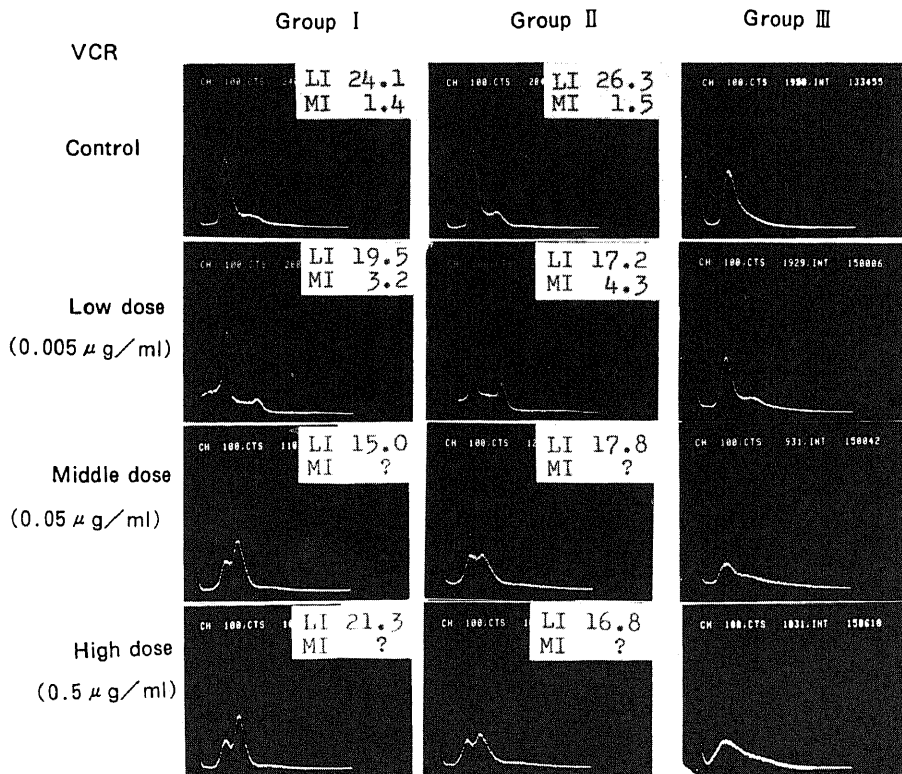


Fig. 6. DNA histograms of OST cells treated with VCR in culture. The OST cells were exposed to VCR at 37°C for 24hr (Group I) and for 48hr (Group II). The cells of Group II were consecutively cultured, after eliminating VCR, in fresh medium for 48hr (Group III).

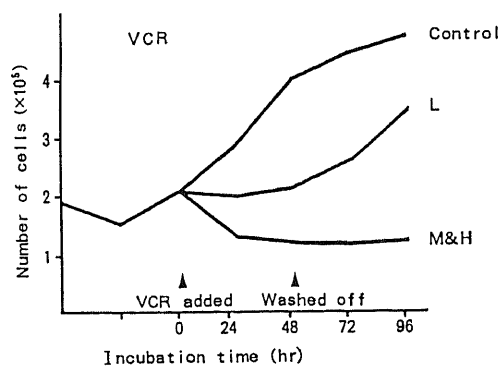
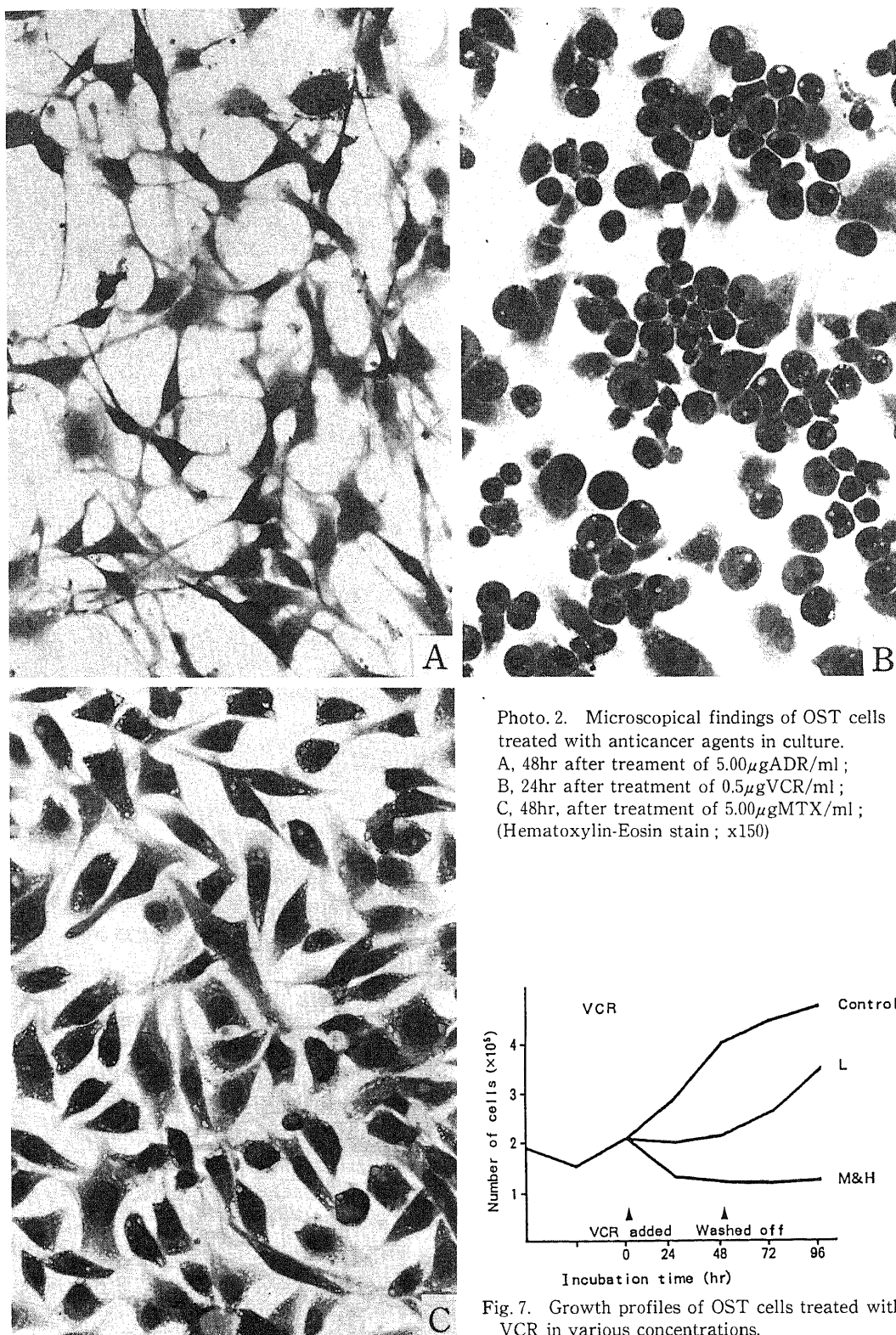


Fig. 7. Growth profiles of OST cells treated with VCR in various concentrations.

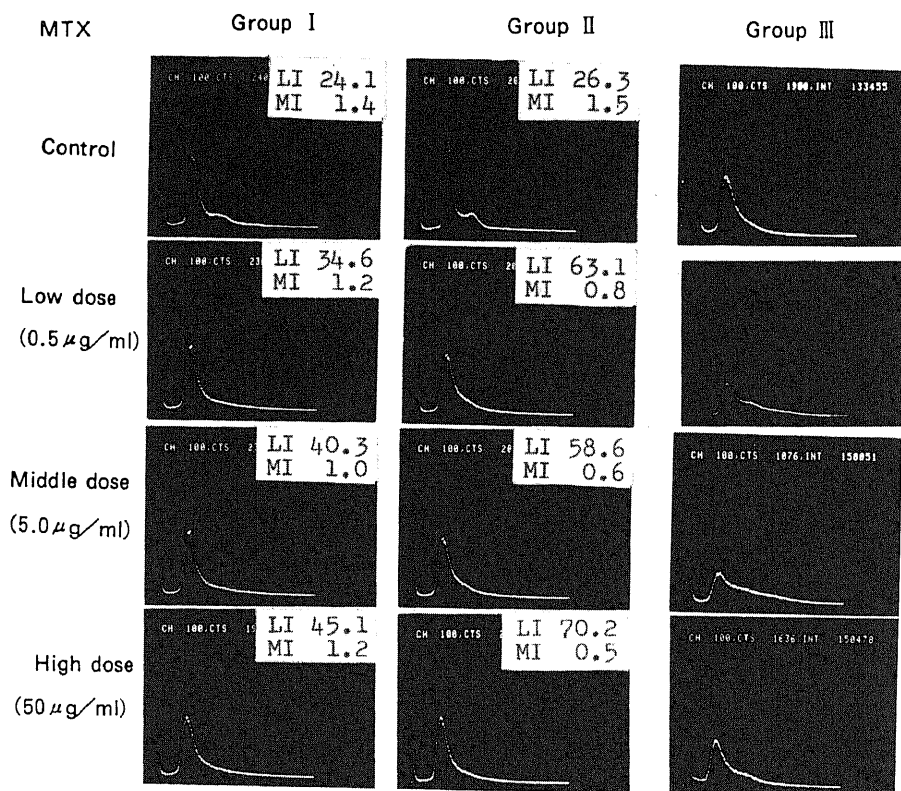


Fig. 8. DNA histograms of OST cells treated with MTX in culture. The OST cells were exposed to MTX at 37°C for 24hr (Group I) and for 48hr (Group II). The cells of Group II were consecutively cultured, after eliminating MTX, in fresh medium for 48hr (Group III).

示した (図 8)。

iii) MI と細胞所見

作用濃度のいかにかわらず MI は経時的に減少し、均一化した細胞集団となり、細胞像でもとくに変化はなかった (図 8, 写真 2 C)。

iv) 生細胞数

各濃度、共に同様の経過をとり、24 時間後では軽度減少したが 48 時間後では減少を認めず、薬剤除去後は急増した (図 9)。

2. 2 剤併用の影響

1) ADR と VCR の併用

i) DNA ヒストグラム

ADR と VCR の共存下 24 時間後のヒストグラムでは G₁ 期の減少, G₂+M 期の増加によって同位のピークを有する 2 峰性となり、48 時間後では G₂+M 期の著しい蓄積を示す単峰性のパターンとなった。薬剤除去後 48 時間後になると G₁ 期, G₂+M 期の蓄積がみられ、2 峰性のパターンとなった (図 10)。

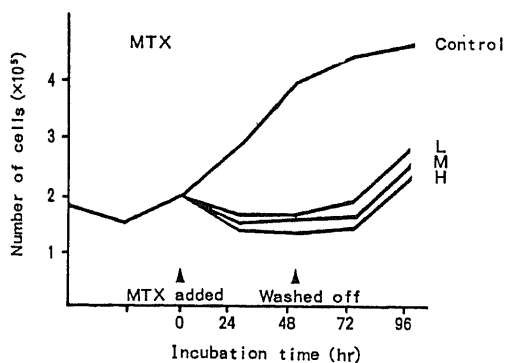


Fig. 9. Growth profiles of OST cells treated with MTX in various concentrations.

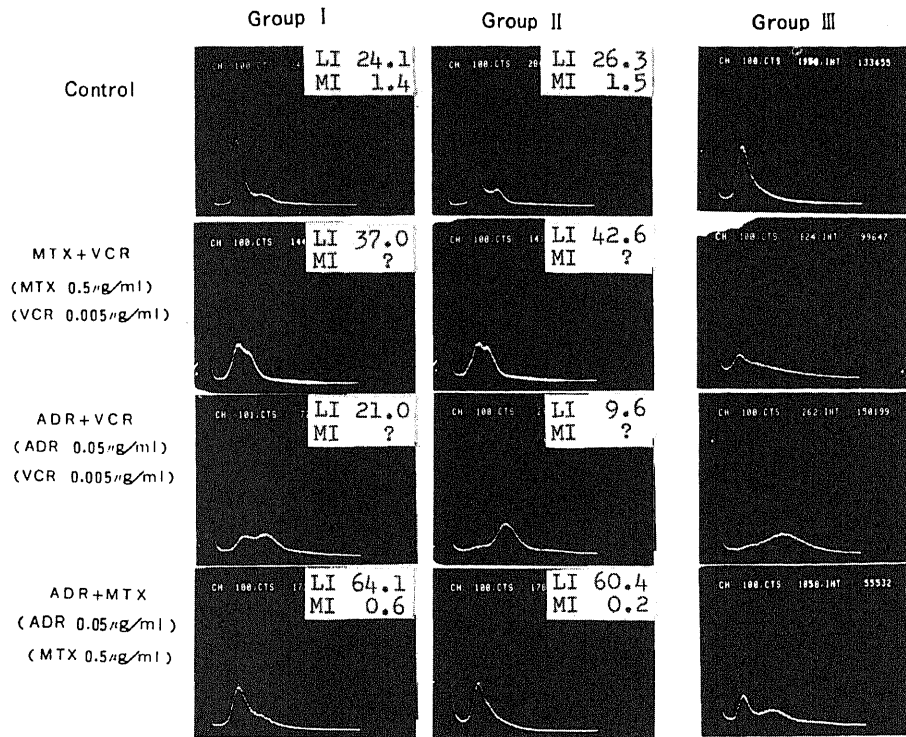


Fig. 10. DNA histograms of OST cells treated with combination of ADR, VCR and MTX in culture. The OST cells were exposed to combination agents at 37°C for 24hr (Group I) and for 48hr (Group II). The cells of Group II were consecutively cultured, after eliminating combination agents, in fresh medium for 48hr (Group III).

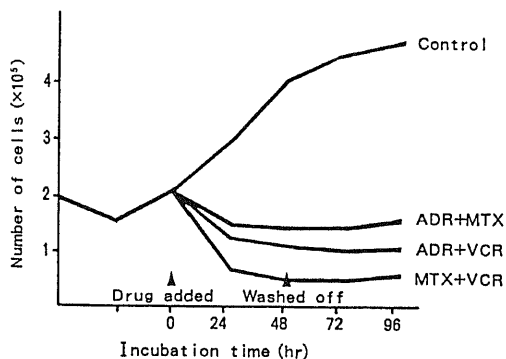


Fig. 11. Growth profiles of OST cells treated with various combination of ADR, VCR and MTX in culture.

ii) LI

作用下 24 時間後の LI は対照とほぼ同率であり、48 時間後では対照と比較してやや減少の傾向を示した (図 10)。

iii) MI と細胞所見

VCR の中濃度、及び高濃度作用下で認められた分裂期を思わせる細胞が少数出現したため、MI は測定不能であった。また、萎縮した細胞が多数出現し、pyknotosis は増加傾向が認められた。

iv) 生細胞数

経時的に減少傾向にあることを観察したが薬剤を除去して 48 時間後では変化はなかった (図 11)。

2) ADR と MTX の併用

i) DNA ヒストグラム

ADR と MTX を同時に作用せしめた場合、作用下 24 時間後、48 時間後、共に G₂+M 期の著しい低下を

伴った単峰性のパターンが示された。しかし、薬剤除去して48時間後になるとS期と共に G_2 +M期の増加がみられ、2峰性のパターンとなった(図10)。

ii) LI

経時的にLIは高値を示し、MTXを単独に作用せしめた場合と同一の経過を呈した(図10)。

iii) MIと細胞所見

MIは漸次減少し、48時間後には0%となりMTX単独作用と同様の細胞像がみられた。

iv) 生細胞数

経時的に減少傾向にあることが観察されたが薬剤除去して48時間後ではむしろ増加傾向が認められた(図11)。

3) MTXとVCRの併用

i) DNAヒストグラム

MTXとVCRを同時に作用せしめた場合、24時間後のDNAヒストグラムではS期の増加に伴う特徴的な2峰性のパターンがみられ、48時間後においてもほぼ同様のパターンが示された。薬剤を除去して48時間後になると G_1 期の蓄積と G_2 +M期の出現を認め、対照に類似したパターンとなった(図10)。

ii) LI

作用24時間後、及び48時間後のLIは対照に比較して軽度至高値を示した(図10)。

iii) MIと細胞所見

作用24時間後にVCRを中濃度あるいは高濃度にせしめた場合に観察された分裂期様の細胞が多数出現し、48時間後にはこれらの細胞とともにpyknosisが多数出現した。しかし、MIは測定不能であった。

iv) 生細胞数

経時的に減少傾向が認められ、2剤併用中、最大の増殖抑制効果を示した。しかし、薬剤除去して48時間後には増加、または減少傾向はみられなかった(図11)。

考 察

I. OST株の増殖と細胞回転

DNAヒストグラムに見られるS期、 G_2 +M期の細胞数の推移はLI、MIの推移と同一傾向にあった。また、経時変化では培養48時間後から96時間までの間では指数函数的増殖を示し、DNAヒストグラムでもS期、及び G_2 +M期の細胞数はほぼ一定していた。このことはOST株の G_0 期細胞集団は最少であり、S期、 G_2 期、及びM期の細胞集団が最大となり、細胞回転が順調に進行している時期と思われる。従って抗癌剤の細胞回転に及ぼす影響を検討する上で好適の条件とみなされた。

II. 諸種抗癌剤のOST株の細胞回転に及ぼす影響

1. ADR

一般に抗癌性抗生物質はDNA合成のみならずRNA合成をも阻害するため、細胞回転の立場からみてcycle phase non-specificな薬剤として考えられてきた。しかし、Kimら⁹⁾、及びKrishanら⁹⁾はS期細胞がADRに強い感受性を有することを報告し、Drewinkoら⁹⁾は $S \rightarrow G_2$ 移行期に強い感受性を示すことを、またBarrancoら¹⁰⁾はM期、及びearly S期がもっとも強い感受性を示すことを報告している。これら各研究者の報告には多少の相異はあるが、最近ではADRはcycle phase specificな薬剤としての特徴をも有するものと考えられてきている。

今回えられた著者の実験成績では、ADRの低作用濃度のDNAヒストグラムは経時的に G_2 +M期の集積を示しているが、LI、及びMIでは経時的に減少傾向がみられている。これは G_2 +M期の集積による相対的な減少とみなされ、 G_1 期、S期での細胞回転上の通過障害はなく、 G_2 期に至って細胞回転が停止して殺細胞効果があらわれたものと考えられた。ADRの中濃度のDNAヒストグラムでも、経時的にS期の集積、LIの高値がみられたが、MI、生細胞数が減少したことからS期で細胞回転の進行が停止し、殺細胞効果を示したものとみなされた。ADRの高濃度のDNAヒストグラムは対照のそれとほぼ同様であるが、LI、及びMIが共に0%であったところから、Krishan⁹⁾、高本ら⁷⁾の報告のごとく完全な細胞回転の停止が観察された。さらに、薬剤除去後にも生細胞の存在が認められなかったことから、高濃度では細胞回転上の各期に関係なく殺細胞効果を示したものと考えられた。以上を総括すると、生細胞の測定値からみてもADRは濃度依存性を有する事は明らかであるが、低濃度、及び中濃度では G_1 期の延長などは認められず、細胞回転からみた場合は時間依存性を有する一面もあるとみなされた。

2. VCR

本剤の作用機序について、Creaseyら¹¹⁾は2つの異なる作用点を指摘している。その1は、可逆的な分裂阻止作用を示すことであり、その2は、DNA依存性RNAポリメラーゼ系に関与し、RNA合成を抑制する作用である。また、細胞回転において、どの期がVCRに感受性を有するかについて、Madoc-Jonesら¹²⁾はS期がもっとも強い感受性を有することを報告している。著者の実験では、VCRは低濃度のDNAヒストグラムは、24時間後でも48時間後でも、 G_2 +M期の蓄積が認められ、後者では、前者より大であったが、必ずしも G_2 +M期の経時的な増加とはいえないようである。細胞所見ではmitosisは増加が著明で、DNAヒ

ストグラムでの $G_2 + M$ 期の蓄積の主成分は、M 期細胞集団であることが示唆された。生細胞数からみても増加傾向があり、とくに薬剤除去後に著しい増加が認められたことから、M 期による延長から M 期の細胞集積と考えられ、Johnson ら¹³⁾によって報告されたように、可逆的な分裂阻止をきたす可能性が示唆された。VCR の中濃度、及び高濃度の DNA ヒストグラムをみずと G_1 期、S 期にピークを有する 2 峰性のパターンが示され、24 時間後の S 期に比較して、48 時間後の S 期が減少していることは、細胞所見、すなわち 24 時間後に出現した分裂期様の細胞が、48 時間後に pyknosis となり、死滅した結果であると考えられた。そして、LI が対照と比較して軽度到低値を示していることから、late S 期細胞回転が停止したものと推測された。また、24 時間後、48 時間後に G_1 期蓄積をきたし、薬剤除去 48 時間後では、対照と類似したパターンとなり、生細胞が増加したことから、 G_1 期の細胞群は生存し続けるものとみられた。これは、Skipper ら¹⁴⁾が MTX について観察したように RNA、及び DNA 合成阻害を示す薬剤では、RNA 合成が行なわれる G_1 期、 G_2 期で細胞回転の遅延、停止、及び G_0 期への移行によって、殺細胞作用からののがれる場合があるとした“phase specific with self limitation”の概念に一致すると思われた。総括すると、VCR の低濃度では可逆的な分裂阻止が観察され、中濃度、及び高濃度では G_1 期延長と S 期における殺細胞作用が観察され、ADR 低濃度において認められたような細胞回転上の時間依存性は認められなかった。

3. MTX

Skipper ら¹⁴⁾によれば、一般に代謝抗抗剤は“cycle phase specific”な薬剤であるが、DNA 合成阻害の他に、RNA、蛋白合成阻害への関与があることから、“S-phase specific with self limitation”の薬剤であると思われており、Wheeler ら⁴⁾は $G_1 \rightarrow S$ 移行期の partial synchronization を観察している。

著者の実験では、MTX の作用濃度と関係なく、濃度依存性は認めなかった。DNA ヒストグラムでみると、24 時間後、及び 48 時間後に G_1 期にピークを有する単峰性のパターンが示され、S 期の増加傾向が認められた。LI についても同様の結果がえられており、細胞所見でも、均一化した細胞集団を形成していた。生細胞数は 24 時間後には減少したが、48 時間後には減少なく、薬剤除去後、著しい増加がみられたことから、MTX 存在下での培養初期には殺細胞効果をもたらす可能性はあるが、以後 G_1 期の延長、及び S 期の synchronization をきたすものと考えられた。これは前述の Skipper ら¹⁴⁾の成績、また、Tobey ら¹⁵⁾が代

抗抗剤 cytosine arabinoside, hydroxyurea について観察したように G_1 期 $\rightarrow$ S 期の移行率が減少した結果、 $G_1 \rightarrow S$ 移行期に蓄積をきたしたとの報告に一致していた。以上、えられた成績を総括すると、MTX の用量は“high dose MTX”に匹敵する高濃度であったが作用 24 時間後において殺細胞効果は認められず、また細胞回転からみて、曲型的な時間依存性や、濃度依存性を示すパターンはえられなかった。本剤は G_1 期の延長と S 期の synchronization をきたすか、または、 $G_1 \rightarrow S$ 期への移行率を減少させ、 G_1 期 $\rightarrow$ S 期移行期の synchronization をきたす可能性のあることが示唆された。

4. ADR と VCR の併用

VCR の低濃度では可逆的な有糸核分裂阻止作用を観察し、ADR の低濃度では不可逆的な G_2 期の集積が観察されたことについては前述した。ADR と VCR の 2 剤を同時に作用せしめると ADR を低濃度で作用させた場合と同一経過がみられ、生細胞数でも ADR 単独作用でのそれと差異はなかった。ADR による G_2 期における細胞回転停止のため、VCR によっておこる有糸核分裂阻止作用の定型的なパターンはみられなかった。

5. ADR と MTX の併用

MTX の作用初期では S 期での殺細胞効果がみられ、長時間作用下でみられる G_1 期延長、及び S 期、また、 $G_1 \rightarrow S$ 期移行期 synchronization については前述のとおりである。ADR と MTX を同時に作用せしめた場合の DNA ヒストグラムは、MTX 単独作用でみられたパターンとほぼ同様であり、薬剤を除去して 48 時間後では ADR の低濃度作用下で示されたパターンと同様であった。また、薬剤除去して 48 時間後に G_2 期の蓄積が認められたことから、ADR が S 期細胞群に作用した結果とみなされた。このことは MTX を 48 時間作用させた後、薬剤を除去した場合と異なり、生細胞数の増加傾向が認められなかったことから裏付けられた。しかし、細胞増殖抑制効果については、ADR を低濃度作用させた場合と有意の差はなく、逆に MTX により G_1 期に停滞した細胞群が ACR の殺細胞作用からののがれる可能性のあることが示唆された。

6. MTX と VCR の併用

MTX と VCR の 2 剤を同時に作用せしめた場合の DNA ヒストグラムでは、VCR の中濃度、または、高濃度で 24 時間作用せしめた場合とほぼ同様のパターンを呈し、VCR の作用が優位に現われたことを示し、細胞像でも VCR 優位の所見が得られた。VCR が低作用濃度であるにもかかわらず、VCR の中濃度、及び高濃度作用時の DNA ヒストグラムを呈したことは

MTX の作用による synchronization の結果、集積した細胞群が VCR に効率的に感受性を示したためと考えられた。また、生細胞数の点からみても、2 剤併用例の中で最大の抑制効果をもたらした。

以上 OST 株で ADR, VCR, 及び MTX の 3 種の抗癌剤をそれぞれ単独に、また 2 剤併用して作用せしめた場合の影響について検討した。従来、抗癌剤の細胞回転からみた作用機序の研究は、Sinclair³⁾に代表されるように、まず細胞集団を synchronization に導き、各期における薬剤感受性を、そしてそれが時間依存性か、あるいは濃度依存性であるかを検討することになった。しかし、細胞回転に及ぼす影響を検討する場合、各期の相互関係にもとづいて解析するのが理想的であり、これは FCM によって初めて可能となった。抗癌剤に対する癌細胞の感受性は癌の種類によって異なることは当然であるが、著者の実験結果からは、濃度依存性として考えられてきた ADR は時間依存的に効果を発揮する可能性のあることが示唆され、時間依存性と考えられている VCR は G₁ 期の延長をきたすことから時間依存性とは決めつけがたい結果がえられている。以上の事実にみられるように今後、薬剤独自の作用機序にとらわれることなく、抗癌剤の細胞回転に及ぼす影響を考慮した上での投与スケジュールが決定されるべきであろう。

一方、多剤併用投与の利点として、太田¹⁰⁾は抗癌スペクトルの拡大、薬剤耐性細胞の出現の防止、相乗効果の発現などをあげている。著者の研究結果では、多剤併用においても 1 剤の作用機序が優位に出現する傾向がみられた。たとえば VCR と MTX を併用した場合のように、まず、MTX によって synchronization が成立し、ついでその期の VCR に感受性を示す細胞が障害されるというわけである。また逆に、ADR と MTX を併用した場合のように MTX によって G₁ 期が延長したために ADR の細胞回転上の時間依存性が発揮されず、G₁ 期にある細胞集団がそのまま生存し続ける可能性のあることが示唆された。また、ADR 投与後、MTX を投与した場合、ADR を臨床用量に匹敵する濃度で作用させると G₁ 期の細胞集団は減少し、S 期、または G₂ 期の細胞集団が増加した。その後、MTX を投与すると S 期の細胞集団、すなわち標的となる細胞集団は少ないため MTX の効果が十分期待できないものと推測された。投与順序を逆にした場合、まず MTX によって作用初期に S 期の細胞集団が減少し、その後、G₁ 期及び S 期の synchronization が起こり細胞回転が遅延することになる。そこで MTX を除去すると、再び、これらの細胞集団は細胞回転に動員され、ADR の作用を受けることになることから、後者の投

与スケジュールが併用療法としては有効と考えられた。最近、Jaffe¹⁷⁾も臨床経験から“high dose MTX”療法を行った後、ADR を投与したほうが有効のようであると報告しており、今後の臨床結果に注目したい。

結 論

adriamycin (ADR), vincristine (VCR), 及び methotrexate (MTX) のヒト骨肉腫由来培養細胞株の細胞回転に及ぼす影響について flow cytometry を中心として解析し検討した。その結果、以下の結論がえられた。

1. ADR の細胞増殖抑制作用は濃度依存的に認められたが、臨床的に適用されている用量では、細胞回転の面から考察すると、時間依存的に作用する薬剤としての特性をも併せもっていることが明らかにされた。

2. VCR は濃度依存的に細胞増殖抑制を示し、低濃度では M 期の延長、すなわち可逆的な有糸核分裂阻止作用が認められ、中濃度、及び高濃度では、G₁ 期の延長と S 期における殺細胞効果が観察された。

3. MTX の作用には濃度依存性は認められず、比較的早期に S 期における殺作用効果のあることが示唆された。その後、G₁ 期の延長と S 期の synchronization が観察された。

4. 2 剤併用においては、1 剤の作用特性が優位に出現し、特に MTX と VCR を併用した場合、著明に殺作用効果の増強が認められた。以上のことから、抗癌剤の多剤併用療法で最大の効果をうるためには、各薬剤の細胞回転に及ぼす個々の影響を十分に把握し、抗癌剤の選択、組合せ、投与スケジュールなどを慎重に考慮すべきであると考えられる。

謝 辞

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師野村進教授、ならびに金沢大学癌研究所越村三郎教授に深甚の謝意を表します。また、終始御指導を賜った富田助教授、ならびに金沢大学整形外科腫瘍グループの諸先生方や安田俊久文部技官の御協力に感謝します。

また、本論文の要旨は第 59 回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

文 献

- 1) Li, M. C., Whitmore Jr, W. F., Golbey, R. & Grabstald, H.: Effects of combined drug therapy on metastatic cancer or the testis, JAMA, 175, 1291-1299 (1960).
- 2) Bruce, W. R., Meeker, B. E. & Valeriote, F. A.: Comparison of the sensitivity of normal

hematopoietic and transplanted lymphoma colony-forming cells to chemotherapeutic agents administered in vivo. *J. Nat. Cancer Inst.*, **37**, 233-245 (1966).

3) **Sinclair, W. K.**: Hydroxyurea. Effects on chinese hamster cells grown in culture. *Cancer Res.*, **27**, 297-308 (1967).

4) **Wheeler, G. P., Bowdon, B. J., Adamson, D. J. & Vail, M. H.**: Comparison of the effects of several inhibitors of the synthesis of nucleic acids upon the viability and progression through the cell cycle of cultured H. Ep. no. 2 cells. *Cancer Res.*, **32**, 2661-2669 (1972).

5) **Van Dilla, M. A., Trujillo, T. T., Mullaney, P. F. & Coulter, J. R.**: Cell microfluorometry. A method for rapid fluorescence measurement. *Science (Wash. D. C.)*, **163**, 1213-1214 (1968).

6) **Krishan, A. & Frei, E.**: Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts. *Cancer Res.*, **36**, 143-150 (1976).

7) 高本 滋・加藤武俊・太田和雄: FMF による制癌剤の作用機序に関する研究. *癌と化学療法*, **5**, 145-153 (1978).

8) **Kim, S. H. & Kim, J. H.**: Lethal effect of adriamycin on the division cycle of Hela cells. *Cancer Res.*, **32**, 323-325 (1972).

9) **Drewinko, B. & Gottlieb, J. A.**: Survival kinetics of cultured human lymphoma cells exposed to adriamycin. *Cancer Res.*, **33**, 1141-1145 (1973).

10) **Barranco, S. C., Gerner, E. W., Burk, H. & Humphrey, R. M.**: Survival and cell kinetics effects of adriamycin on mammalian cells. *Cancer*

Res., **33**, 11-16 (1973).

11) **Creasey, W. A. & Markiw, M. E.**: Biochemical effects of the vinca alkaloids. II. A comparison of the effects of colchicine, vinblastine and vincristine on the synthesis of ribonucleic acids in Ehrlich ascites carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **87**, 601-609 (1964).

12) **Madoc-Jones, H. & Mauro, F.**: Interphase action of vinblastine and vincristine differences in their lethal action through the mitotic cycle of cultured mammalian cells. *J. Cell Physiol.*, **72**, 185-196 (1968).

13) **Johnson, I. S., Wright, H. F., Svoboda, G. H., & Vlantis, J.**: Antitumor principles derived from vinca rosea linn. I. Vincalukoblastine and leurosine. *Cancer Res.*, **20**, 1016-1022 (1960).

14) **Skipper, H. E., Schabel, F. M. Jr., Mellet, L. B., Montgomery, J. A., Wilkoff, L. J., Lloyd, H. H. & Brockman, R. W.**: Implications of biochemical, cytokinetic, pharmacologic and toxicologic relationships in the design of optimal therapeutic schedules. *Cancer Chemother. Rept.*, **54**, 431-450 (1970).

15) **Tobey, R. A. & Crissman, H. A.**: Use of flow microfluorometry in detailed analysis of effects of chemical agents on cell cycle progression. *Cancer Res.*, **32**, 2726-2732 (1972).

16) 太田和雄: 癌化学療法の基礎と臨床, 第3版, 212-215頁, 蟹書房, 東京, 1980.

17) **Jaffe, N., Frei III, E. & Filler, R. M.**: High dose methotrexate with citrovorum factor in osteogenic sarcomaprogress report II. *Cancer Treat. Rep.*, **61**, 675-679 (1977).

Effects of Anticancer Agents on Cell Cycle Traverse of Human Osteosarcoma Cell Line in Culture — Analysis by Flow Cytometry Jun Hirai, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Jusen Med. Soc.*, **94**, 1184-1198 (1985)

Key words: osteosarcoma, human tumor cell line, anticancer agent, cell cycle, flow cytometry

Abstract

In the present work, the effects of several anticancer agents on the cell cycle traverse of cultured human osteosarcoma cell line was investigated using flow cytometry. The agents adopted in this study were adriamycin (ADR), vincristine (VCR) and methotrexate (MTZ) which have been preferably used in the clinical chemotherapy of osteosarcoma. Autoradiography, morphological changes and growth profiles of cells were also examined as reference parameters of cell kinetics in relation to DNA histogram. The effect of ADR appeared to be dependent on dose level, but at a low dose it seemed to be time-dependent. VCR at a low dose caused a prolongation of the duration of M phase, namely reversible metaphase arrest. On the other hand, at a high dose of VCR a prolongation of G₁ phase and cell killing in S phase were observed, indicating that the effect of this agent was dose-dependent. MTX caused the prolongation of G₁ phase duration and prevented the release from S phase, resulting in synchronization. In combination of VCR and MTX, individualized effects were dominantly expressed.

From these results, it was concluded that combination chemotherapy should be scheduled by considering the effect of anticancer agents on cell cycle traverse.