

Effects of Partial S-phase Synchronization on Chemosensitivity for Cultured Cell Line of Human Small Cell Lung Cancer

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/2297/8059

ヒト肺小細胞癌培養細胞株におけるS期部分 同調と制癌剤感受性の検討

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

中 積 泰 人

(昭和63年8月23日受付)

肺癌において細胞周期同調を用いた化学療法を導入することの是非を基礎的に検討する目的で、ヒト肺小細胞癌培養細胞株 SBC-3 細胞を 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C) で S 期 (DNA 合成期) 部分同調を行い、種々の制癌剤の感受性を調べた。S 期部分同調の条件は抗 bromodeoxyuridine (BrdU) 抗体と propidium iodide (PI) との二重染色を用いてフローサイトメリー (flow cytometry, FCM) により解析し、制癌剤感受性は human tumor clonogenic assay (HTCA) を用いて検討した。まず、対数増殖期の SBC-3 細胞に Ara-C を 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} M の 3 濃度で接触させ、72 時間まで 12 時間毎に、抗 BrdU 抗体と PI との二重染色を行い、FCM で DNA 量と BrdU 量との同時測定を行った。Ara-C の濃度依存性に DNA 合成の低下、細胞回転の遅延がみられたが、各濃度で S 期部分同調が得られた。 10^{-7} , 10^{-6} M Ara-C では、G₁ 期 (DNA 合成前期) から S 期への移行阻害はなく、S 期の DNA 合成の低下による S 期延長作用により S 期部分同調が得られ、 10^{-5} M Ara-C では、当初 G₁ 期での軽度の蓄積作用を認めたが、その後は 10^{-7} , 10^{-6} M Ara-C と同様の機序で S 期部分同調が得られた。次に、 10^{-7} M Ara-C で S 期部分同調後、HTCA にて制癌剤感受性を検討した。S 期部分同調の条件は、 10^{-7} M Ara-C 持続接触時間が平均 28 時間で、その時の S 期の割合は対照群で平均 36%、Ara-C 処理群で平均 59% であった。この条件で 10^{-6} M Ara-C ($p < 0.01$) と 5×10^{-6} M mitomycin C (MMC) ($p < 0.05$) でのみ制癌剤感受性の増強がみられたが軽度であり、他の制癌剤では増強がみられなかった。 10^{-7} M Ara-C での S 期部分同調で、ほとんどの制癌剤で感受性の増強が見られなかった理由として、Ara-C により S 期細胞数の増加が得られたものの、個々の細胞での DNA 合成の低下がおこること、recruitment (非増殖期細胞を増殖期に動員すること) の関与が少ないことなどが考えられた。本実験で、肺癌における細胞周期同調を用いた癌化学療法の有用性が示されたが効果は弱く、今後さらに条件の検討の必要があると思われる。

Key words human lung cancer cell line, synchronization, bivariate DNA/BrdU distribution, chemosensitivity, human tumor clonogenic assay

近年肺小細胞癌に対し強力な多剤併用化学療法が導入され、70~90%の奏効率が得られるようになったが、寛解例の大部分は2年以内に再発し長期生存は困難である^{1,2)}。非交叉耐性交替療法³⁾、維持療法⁴⁾、自家骨髄移植を併用した大量化学療法⁵⁾などが試みられているが、現在のところ明らかな効果は得られて

いない。長期生存への第一歩は、まず、寛解導入療法により完全寛解を得ることであり、強力な多剤併用化学療法の確立が必要であると考えられる。

一方、全肺癌の85%以上を占める非小細胞癌の治療手術可能例はわずか20%であり、しかもその半数に再発が必至という事実⁶⁾からも肺癌治療の中で全身

Abbreviations: ACNU, nimustine; ADM, adriamycin; Ara-C, 1- β -D-arabinofuranosylcytosine; BLM, bleomycin; BrdU, bromodeoxyuridine; BSA, bovine serum albumin; CDDP, cisplatin; CTX, cyclophosphamide; CV, coefficient of variation; EDTA, ethylene

療法として化学療法の担う役割がきわめて大きいことがわかる。Cisplatin (CDDP) が登場して以来、非小細胞癌の治療成績は向上し、CDDP と vindesine の併用により30%~40%の奏効率が得られているが⁷⁸⁾、延命効果に対する寄与は必ずしも明らかでなく、標準化された併用化学療法を確立するためにはさらに系統的な研究が必要である。

癌の化学療法で制癌剤を適切に投与するためには、それぞれの制癌剤の癌細胞に対する細胞生物学的効果、特に増殖阻害動態についての基礎的な研究が重要である。制癌剤の細胞に対する致死効果は細胞回転に依存して大きく変動し、増殖期と安定期の細胞では薬剤感受性が大きく異なること (cycle dependency)⁸⁰⁻¹¹³⁾や、それぞれの薬剤において細胞周期上のある特定の相にのみ、致死効果のあること (age response)^{120,121)}が知られており、また、制癌剤が細胞回転の進行に影響をおよぼすこと (cycle progression)^{140,141)}も知られている。ほとんどの制癌剤は増殖期にある細胞により効果的であるが、一般に腫瘍細胞は骨髄や腸管などの正常細胞より世代時間が長く、増殖期にある細胞も少なく¹⁶⁾治療しきわめて不利である。そこで、なんらかの手段でこの状態を変化させて、治療にとって有利に導こうという試みがある。つまり、非増殖期にある細胞を増殖期に動員し (recruitment)、さらに増殖期にはいった細胞を細胞周期のある相に集め (同調, synchronization)、その相に強い感受性を示す制癌剤を投与することにより治療効果をあげようとするものである。この方法は細胞回転の理論からみた有効な投与方法といえ、急性白血病を中心に研究されている¹⁷⁻²³⁾。

従来、細胞回転の研究には tritium thymidine (³H-TdR) によるオートラジオグラフ法が用いられてきたが、多大な労力と時間がかかるうえ、放射性物質の投与という倫理的問題などの多くの障害があった。近年、多くの細胞の相対的 DNA 量の短時間測定にフローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) が用いられるようになった。しかし、細胞周期各期の解析においては複雑な数学的解析を行う必要があり²⁴⁾、また、制癌剤によって DNA ヒストグラムに相当な変化が生じた場合解析が困難であった。

Gratzner²⁵⁾により thymidine のアナログである bromodeoxyuridine (BrdU) に対するモノクローナ

ル抗体が作製され、さらに Dolbeare ら²⁶⁾によって propidium iodide (PI) 染色との組み合わせで DNA 量と DNA 合成能とを同時に測定する方法が報告されて以来、本抗体を用いた細胞周期の解析が注目されている。

本研究では、治療成績が不良な肺癌において、細胞周期同調を用いた化学療法を導入することの是非を基礎的に検討するために、まずヒト肺癌培養細胞株において 1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C) の細胞動態におよぼす影響について、抗 BrdU 抗体と PI との二重染色を用いて S 期 (DNA 合成期) 部分同調が得られるか否かを検討し、さらに S 期部分同調時に制癌剤感受性が増強されるか否かを human tumor clonogenic assay (HTCA) により検討したので報告する。

材料および方法

I. 培養細胞

ヒト肺小細胞癌培養細胞株 SBC-3²⁷⁾を用いた。SBC-3 細胞は、10%牛胎児血清 (fetal calf serum, FCS, Sigma, St. Louis) 加 RPMI 1640 (Gibco, Grand Island) 培養液にペニシリン (明治, 東京) 100U/ml, ストレプトマイシン (明治) 0.1mg/ml を添加したものを培地として、組織培養フラスコ (Costar 3055, Cambridge) 内で37°C, 5%炭酸ガス培養器内で静置培養した。細胞の単離は、0.25%トリプシン+0.05% ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) で37°C 5分間処理により行った。各実験に応じた細胞数に調整し、72時間培養後の対数増殖期にある SBC-3 細胞を実験に用いた。

II. Ara-Cの細胞動態におよぼす影響の検討 (S 期部分同調の条件の設定)

1. Ara-C の添加

2×10⁴ 個/ml の細胞浮遊液 10ml を組織培養フラスコ (Costar 3055) 内で72時間培養後新しい培養液に全量交換し、Ara-C (日本新薬, 京都) を 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵M の各濃度で接触させ、12, 24, 36, 48, 60, 72時間後の細胞について以下の検討を行った。

2. 細胞増殖曲線の作成

細胞増殖曲線はトリパンブルー染色法 (0.5%トリパンブルー) にて生細胞数を算定して作成した。

3. BrdU 添加

diamine tetraacetic acid; FCM, flow cytometry; FCS, fetal calf serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; 5-FU, 5-fluorouracil; HTCA, human tumor clonogenic assay; ³H-TdR, tritium thymidine; INT, p-iodonitrotetrazolium violet; LI, labeling

抗 BrdU 抗体と PI とを用いた二重染色の方法は、Dolbear ら²⁹⁾による方法に準じて以下のように行った。

単離した細胞を 1×10^6 個/ml の濃度で浮遊させ $10 \mu\text{M}$ ($3 \mu\text{g/ml}$) の BrdU (Sigma) を加え 37°C 、5%炭酸ガス培養器内で30分間接触させ、 Ca^{++} および Mg^{++} を含まない冷リン酸緩衝塩類溶液 (phosphate buffer saline, PBS, 日水, 東京) で2回洗浄後、 -20°C の70%エタノールで固定し 4°C に保存した。

4. 抗 BrdU 抗体と PI との二重染色

細胞を PBS で2回洗浄後2 N塩酸を加え室温で30分間加水分解し、 $0.1\text{M Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ で2回洗浄、PBS で1回洗浄して中和した。 1×10^6 個の細胞あたり $230 \mu\text{l}$ の 0.5% Tween 20 (Sigma)、0.5%牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA, Sigma) 加 PBS で浮遊させ、 $20 \mu\text{l}$ の fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 BrdU 抗体を加え室温で30分間、その後 4°C で一晚接触させた。0.5% Tween 20 加 PBS で3回洗浄後、RNase (Sigma) 4000U/ml にて 37°C 、30分間処理後 PI 液 (Sigma) $5 \mu\text{g/ml}$ で30分間反応させた。

一方、BrdU を加えずに同様の処理を行ったものを対照とした。

5. フローサイトメトリー (FCM)

フローサイトメーターは昭和電工社製 CS-20 を用い、488nm のアルゴンレーザーで励起し 630nm の赤色蛍光で DNA 量 (PI) を、530nm の緑色蛍光で BrdU 量 (FITC) を同時測定し、DNA 量を横軸に、BrdU 量を縦軸にとる two parameter dot plot を作成した。CS-20 は、ビーズを用いて coefficient of variation (CV) が2.0%以下となるように調整し、測定直前には細胞を $40 \mu\text{m}$ ナイロンメッシュに通し平均約32,000個の細胞を測定した。

III. S期部分同調と制癌剤感受性の検索

1. S期部分同調の条件

4×10^4 個/ml の細胞浮遊液 50ml を組織培養フラスコ (Costar 3275) 内で72時間培養後、新しい培養液に全量交換した後、Ara-C を 10^{-7}M の濃度で添加し、IIの実験でS期へ部分同調されると想定される時間に細胞を取り出し単離した。対照としては、Ara-C の代わりに生理食塩水を加えた。一部の細胞

で抗 BrdU 抗体と PI との二重染色を行った。

2. Human tumor clonogenic assay (HTCA)

HTCA は Salmon ら²⁹⁾および木村ら²⁹⁾の方法に準じて以下のように行った。

1) 制癌剤1時間接触の場合

0.5%トリパンブルー液にて生細胞数を算定し生細胞数を 7.5×10^4 個/ml の細胞濃度になるように10% FCS 加 RPMI 1640 に浮遊させ、 37°C 恒温槽内にて1時間各制癌剤と後述の濃度で接触させたのち、同培養液で2回洗浄した。対照には制癌剤の代わりに生理食塩水を加えた。径 35mm のプラスチック製ペトリディッシュ (Falcon 3001, Lincoln Park) にあらかじめ 0.5% agar (high grade agarose) と 15% FCS 加 RPMI 1640 (総量 1ml) で feeder layer (下層) を作成しておき、これに前述の細胞を 5×10^4 個/ml の割合で 0.3% agar と 15% FCS 加 RPMI 1640 (総量 1ml) に浮遊させたものを plating layer (上層) として重層させた。 37°C 、5%炭酸ガス培養器内で2週間静置培養してコロニー形成に対する制癌剤1時間接触の効果をみた。一薬剤につき二濃度とし、それぞれの実験は triplicate で行った。

2) 制癌剤持続接触の場合

1時間接触とほぼ同様であるが、前述と同様の feeder layer に生細胞数 5×10^4 個を 0.3% agar と 15% FCS 加 RPMI 1640 に加え各制癌剤を後述の濃度で添加し (総量 1ml) plating layer として重層させた。 37°C 、5%炭酸ガス培養器内で各制癌剤と接触させたまま2週間静置培養した。1) と同様に一薬剤につき二濃度とし、それぞれの実験は triplicate で行った。

3) コロニー数のカウント

2週間静置培養後、p-iodonitrotetrazolium violet (INT, Sigma) 1mg/ml でコロニーを染色した。コロニー数は、automatic particle counter (Handex CP-2000, 白井松器械, 大阪) を用いてカウントした。感度を上げるために CP-2000 に位相差顕微鏡 (SZH-141, オリンパス, 東京) を接続して、 $\phi 50 \mu\text{m}$ 以上の細胞集塊をコロニーと判断した。ディッシュの中央に $24\text{mm} \times 17\text{mm}$ の長方形の測定領域 (ディッシュ全面積の44%に相当) をもうけて、その領域内のコロニー数をカウントした。各制癌剤濃

index; MMC, mitomycin C; MTX, methotrexate; NK171, etoposide; PBS, phosphate buffer saline; PI, propidium iodide; VCR, vincristine; 40487S, 4-hydroperoxycyclophosphamide.

度でのコロニー数は3回分の平均とし、制癌剤の効果は対照に対するコロニー形成率で求めた。

4) 制癌剤

濃度依存性の制癌剤としては、adriamycin (ADM, 協和発酵工業, 東京) 10^{-7} , 10^{-6} M, bleomycin (BLM, 日本化薬, 東京) 5×10^{-8} , 5×10^{-7} M, cisplatin (CDDP, 日本化薬) 10^{-6} , 10^{-5} M, mitomycin C (MMC, 協和発酵工業) 5×10^{-7} , 5

$\times 10^{-6}$ M, nimustine (ACNU, 三共, 東京) 5×10^{-7} , 5×10^{-6} M, cyclophosphamide (CTX) の活性体である 4-hydroperoxycyclophosphamide (40487 S, 塩野義製薬, 大阪) 10^{-7} , 10^{-6} M を用い1時間接触させた。

時間依存性の制癌剤としては、Ara-C 10^{-8} , 10^{-7} M, etoposide (NK171, 日本化薬) 3×10^{-8} ,

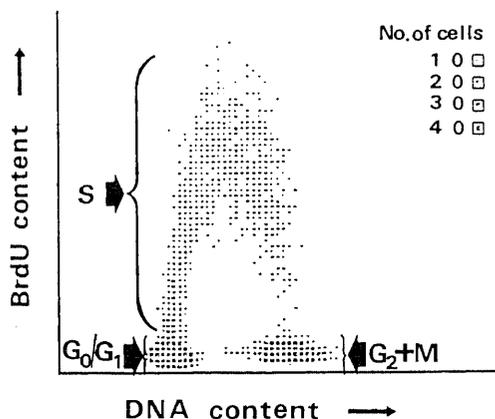


Fig. 1. Dot plots of bivariate DNA/BrdU (PI/FITC) distributions of exponentially growing SBC-3 cells.

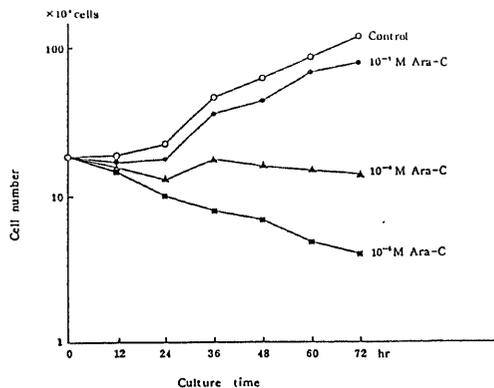


Fig. 2. Growth curve of SBC-3 cells after continuous exposure to Ara-C in various concentrations. Circles, triangles and squares represent the mean values of 3 experiments.

○—○, control; ●—●, 10^{-7} M Ara-C; ▲—▲, 10^{-6} M Ara-C; ■—■, 10^{-5} M Ara-C.

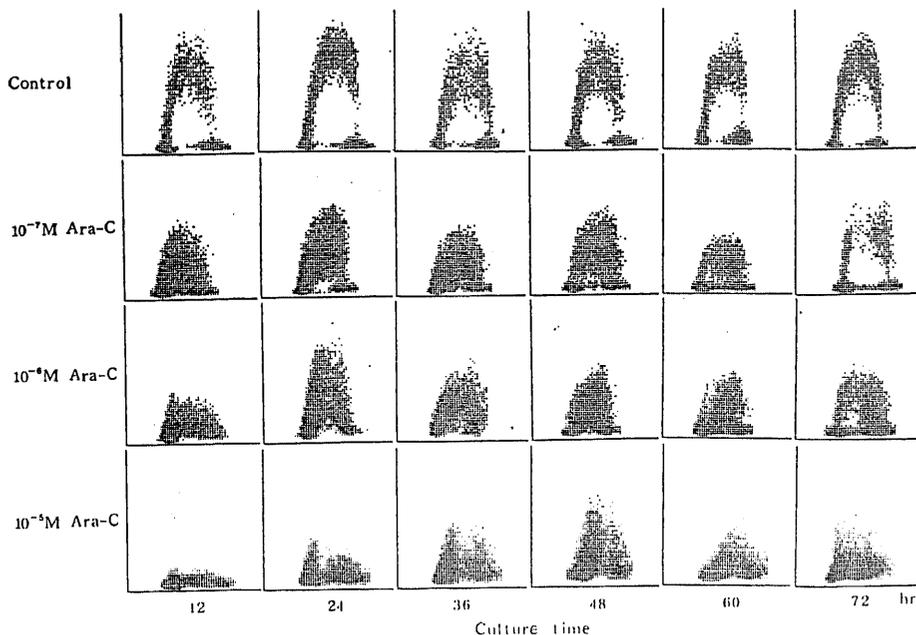


Fig. 3. Dot plots of bivariate DNA/BrdU distributions after continuous exposure to Ara-C in the three concentrations.

$3 \times 10^{-7} M$, methotrexate (MTX, 日本レダリー, 東京) 10^{-8} , $10^{-7} M$, 5-fluorouracil (5-FU, 協和発酵工業) 10^{-6} , $10^{-5} M$, vincristine (VCR, 塩野義製薬) 5×10^{-11} , $5 \times 10^{-10} M$ を用い持続接触させた。

5) 統計学的検定法

コロニー形成率は、平均値±標準誤差 (mean±SEM) にて算定した。2群の平均値の差はウィルコクソンのT検定 (順位符号検定) を用い、2変量間の相関は Pearson の積率相関係数を求めた。危険率 5%以下を有意とした。

成績

I. Ara-C の細胞動態におよぼす影響

1. 対照 SBC-3 細胞の DNA 量と BrdU のとりこみ

図1にAra-Cを加えない時の対照 SBC-3 細胞の対数増殖期における BrdU と PI との two parameter dot plot を示す。横軸には DNA 量 (PI), 縦軸には BrdU 量 (FITC) を示してあるが, DNA 合成を行っている細胞が DNA 合成速度に比例した量の BrdU を取り込み緑色蛍光を発生するため逆U字型となる。即ち, DNA 合成速度は BrdU 量に比例することになる。一般に腫瘍細胞は非増殖期の細胞 (G_0 期の細胞) と増殖期の細胞とにわけられる。後者の細胞は DNA 合成前期 (G_1 期), DNA 合成期 (S期), DNA 合成後期 (G_2 期), 分裂期 (M期) に区別されている。BrdU を取り込んだ細胞が S 期細胞であるが, これは BrdU を標識してない細胞を対照として決定した。BrdU を取り込んでいない細胞のうち DNA 量の小さい細胞集団が G_0/G_1 期細胞であり, DNA 量の大きい細胞集団が G_2+M 期細胞である。また S 期細胞のうち, DNA 量が G_0/G_1 期細胞と同等のものを早期 S 期細胞, G_2+M 期細胞と同等のものを後期 S 期細胞とし, 両者の中間のものを中期 S 期細胞とした。

2. Ara-C 接触による SBC-3 細胞の細胞動態の変化

図2に示すように Ara-C を SBC-3 細胞に接触させた場合, 細胞増殖は薬剤濃度に依って抑制された。 $10^{-7} M$ Ara-C では, 対照に比べて軽度の増殖抑制がみられ, $10^{-5} M$ Ara-C では高度の増殖抑制がみられた。 $10^{-4} M$ Ara-C では両者の中間であった。次に Ara-C 3 濃度, 個々の場合について分析した。

1) $10^{-4} M$ Ara-C の場合 (図3, 図4B)

$10^{-4} M$ Ara-C 12時間後の SBC-3 細胞の抗 BrdU 抗体と PI との二重染色では, DNA 合成の低下と早

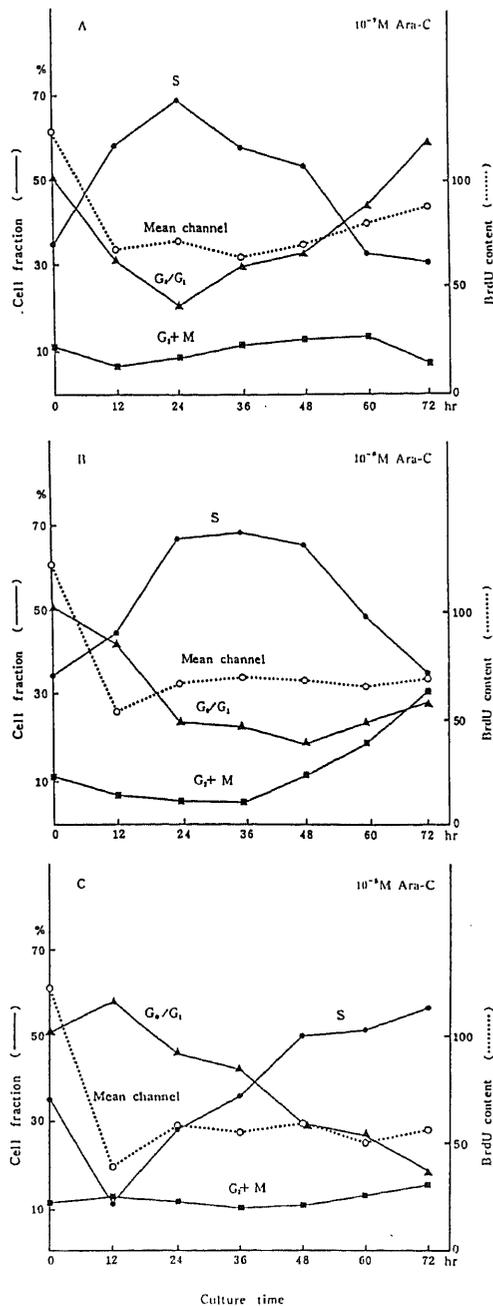


Fig. 4. Sequential changes in cell phase and BrdU mean channel of SBC-3 cells continuously exposure to $10^{-7} M$ Ara-C(A), $10^{-5} M$ Ara-C (B) and $10^{-4} M$ Ara-C(C). Circles, triangles and squares represent the mean values of 4 experiments.

- ▲—▲, G_0/G_1 cell fraction ;
- , S cell fraction ;
- , G_2+M cell fraction
- , mean channel numbers of BrdU.

期 S 期細胞の増加がみられた。24 時間後には早期 S 期細胞の増加が明らかで、また、 G_2+M 期細胞の減少がみられた。36 時間後には早期 S 期と中期 S 期の中間の細胞が増殖したが、DNA 合成の低下は持続した。また G_2+M 期細胞の減少がみられた。48 時間後には中期 S 期細胞の増加がみられ、やはり DNA 合成は低下した。60 時間後には中期 S 期と後期 S 期の中間の細胞の増加がみられ、また、 G_2+M 期細胞の増加がみられた。72 時間後には後期 S 期、 G_2+M 期細胞の増加がみられ、DNA 合成の低下は持続した。

図 4 B に $10^{-6}M$ Ara-C 投与における SBC-3 細胞の S 期、 G_0/G_1 期、 G_2+M 期の比率および S 期細胞の BrdU の平均チャンネル数の時間的推移を示す。S 期細胞の BrdU の平均チャンネル数は、S 期細胞の取り込んだ BrdU 量の平均を表し、平均の DNA 合成速度を意味する。24~48 時間にかけて S 期の増加がみられ、70% 弱の S 期の部分同調が得られるが、S 期細胞の BrdU 平均チャンネル数は低下しており、個々の細胞での DNA 合成の低下がみられた。 G_0/G_1 期、 G_2+M 期は S 期の増加と共に減少し、 G_2+M 期は 48 時間後より増加し、 G_0/G_1 期は 72 時間後より増加傾向にあった。これらの結果より $10^{-6}M$ Ara-C 投与では、S 期の DNA 合成の低下により S 期が延長し S 期に細胞が蓄積し、S 期の部分同調が認められた。しかし、個々の細胞の DNA 合成は低下していた。

2) $10^{-7}M$ Ara-C 投与の場合 (図 3, 図 4 A)

$10^{-7}M$ Ara-C 投与した SBC-3 細胞の抗 BrdU 抗体と PI との二重染色では、12 時間後には早期 S 期細胞の増加がみられ、24~36 時間後に中期 S 期細胞の増加がみられ、60 時間後に後期 S 期細胞の増加がみられた。

図 4 A に $10^{-7}M$ Ara-C 投与における経時的推移を示すが、 $10^{-6}M$ Ara-C と比べると細胞回転が速く 24 時間後に同程度の S 期部分同調が得られるが、やはり S 期細胞の BrdU の平均チャンネル数は低下し DNA 合成の低下がみられた。しかし、DNA 合成の低下は $10^{-6}M$ Ara-C と比べるとやや軽度であった。 G_0/G_1 期は S 期の増加と共に減少し、S 期の減少と共に増加した。 G_2+M 期は S 期の増加と共に減少傾向を示し、S 期の減少と共に増加し G_0/G_1 期の増加に伴い減少傾向にあった。 $10^{-6}M$ Ara-C と同様に DNA 合成の低下により S 期の部分同調が得られると考えられるが、細胞増殖の抑制が軽度で DNA 合成の低下も軽度である点が $10^{-6}M$ Ara-C と異なった。

3) $10^{-6}M$ Ara-C 投与の場合 (図 3, 図 4 C)

$10^{-6}M$ Ara-C 投与した SBC-3 細胞を抗 BrdU 抗体と PI との二重染色でみると、DNA 合成の低下が強く、著しい細胞回転の遅延がみられた。即ち 36~48 時間後に早期 S 期細胞の増加がみられ、60~72 時間後に中期 S 期細胞の増加がみられた。 $10^{-6}M$ Ara-C では DNA 量が S 期にありながら、DNA 合成を行っていない細胞が明らかに認められた。これは、 10^{-7} 、 $10^{-6}M$ Ara-C の場合でも軽度観察された。

図 4 C に $10^{-6}M$ Ara-C 投与における経時的推移を示す。12 時間で S 期の高度の減少がみられるが、時間をおって徐々に S 期の増加がみられた。 G_0/G_1 期は当初一過性の軽度の増加を認めたが、24 時間以後は、S 期の増加につれて減少した。BrdU の平均チャンネル数は、 $10^{-7}M$ Ara-C では平均 73、 $10^{-6}M$ Ara-C では 65、 $10^{-6}M$ Ara-C では 53 であり、 $10^{-6}M$ Ara-C では、DNA 合成の低下が著しかった。

3. Ara-C の投与による S 期部分同調

今回の実験の範囲内では、S 期細胞の割合は Ara-C の濃度が低い程多い傾向にあったが、同調されている時間は Ara-C の濃度が高い程長かった。また、同調時の BrdU の平均チャンネル数は、 $10^{-7}M$ Ara-C では平均 69、 $10^{-6}M$ Ara-C では 67、 $10^{-6}M$ Ara-C では 55 で、Ara-C の濃度が高い程低い傾向にあり DNA 合成が低下した。これらは細胞増殖抑制の程度と DNA 合成の低下による S 期延長作用が Ara-C に濃度依存性であると説明できる。低濃度と高濃度 Ara-C での S 期部分同調は、S 期細胞が多いことは同じでも、DNA 合成能や殺細胞効果が異なっていた。

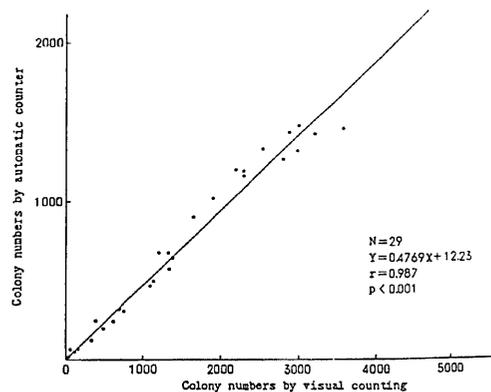


Fig. 5. Relationship between colony numbers measured using inverted microscope (visual count) and those obtained by automatic particle counter, CP-2000 (automatic counter).

II. S期部分同調と制癌剤感受性

制癌剤の感受性については、細胞のコロニー形成率で検討した。

1. コロニー数のカウント

コロニー数は automatic particle counter (Handex CP-2000) で自動計測した。このコロニー数のカウントの信頼度を検討するために、倒立顕微鏡 (X40) により肉眼的にコロニー数を算定し自動計測の

Table 1. Cytotoxicity of anticancer drugs on S-phase partial synchronization of SBC-3 cells

Drugs	Concentration (M)	n	Colony forming rate (% of control)		Difference
			Synchronization (-)	Synchronization (+)	
ADM	10 ⁻⁷	7	15.6±11.5	13.9±8.9	N. S.
	10 ⁻⁶	7	0.2±0.4	0.9±1.1	N. S.
BLM	5×10 ⁻⁸	7	58.9±19.6	49.4±25.0	N. S.
	5×10 ⁻⁷	7	14.9±9.2	15.6±11.9	N. S.
CDDP	10 ⁻⁶	7	50.1±20.3	59.0±27.5	N. S.
	10 ⁻⁵	6	8.9±6.3	7.5±2.0	N. S.
MMC	5×10 ⁻⁷	7	29.2±12.9	22.6±16.7	N. S.
	5×10 ⁻⁶	7	1.6±2.2	0.5±0.8	p<0.05
ACNU	5×10 ⁻⁷	6	54.0±19.9	60.4±35.2	N. S.
	5×10 ⁻⁶	7	13.2±3.8	31.6±21.4	N. S.
40487S	10 ⁻⁷	6	60.1±28.6	37.1±9.6	N. S.
	10 ⁻⁶	6	12.0±3.2	25.4±19.2	N. S.

Values represent the mean ± SED.
N. S., not significant by Wilcoxon signed rank test.

Table 2. Cytotoxicity of anticancer drugs on S-phase partial synchronization of SBC-3 cells

Drugs	Concentration (M)	n	Colony forming rate(% of control)		Difference
			Synchronization(-)	Synchronization(+)	
Ara-C	10 ⁻⁸	11	108.7±20.7	75.7±24.3	p<0.01
	10 ⁻⁷	12	35.1±15.3	35.3±17.8	N. S.
NK171	3×10 ⁻⁸	5	87.7±19.9	78.3±29.3	N. S.
	3×10 ⁻⁷	11	1.0±1.1	1.2±2.6	N. S.
MTX	10 ⁻⁸	9	97.5±19.2	82.8±26.1	N. S.
	10 ⁻⁷	11	18.3±13.4	17.0±17.2	N. S.
5-FU	10 ⁻⁶	11	68.3±27.9	60.5±28.8	N. S.
	10 ⁻⁵	10	2.3±3.6	1.3±2.0	N. S.
VCR	5×10 ⁻¹¹	11	56.8±29.9	49.0±38.6	N. S.
	5×10 ⁻¹⁰	10	5.5±9.7	13.5±20.9	N. S.

Values represent the mean ± SED.
N. S., not significant by Wilcoxon signed rank test.

値と比較した。なお、倒立顕微鏡ではディッシュのすべてのコロニー数を算定し、自動計測ではディッシュの中央部44%にあるコロニー数をカウントしたものである。図5に示すように相関係数 $r = 0.987$ と非常に高い相関を認めた ($p < 0.001$) ので制癌剤の感受性は自動計測によるコロニー形成率で調べた。

2. 制癌剤感受性

制癌剤の効果はS期部分同調の細胞について検討した。

S期部分同調の条件はAra-Cの濃度は細胞毒性の最も低い 10^{-7} Mを用い、接触時間は24~30時間とした。Ara-Cの接触時間は平均27.7時間、S期の割合は対照群で35.8%、Ara-C投与群で58.8%であり、これらを用いて制癌剤の効果を調べた。

制癌剤の殺細胞効果はAra-C投与群と非投与群で、それぞれの対照に対するコロニー形成率で示した。制癌剤については濃度依存性としてADM, BLM, CDDP, MMC, ACNU, 40487S, 時間依存性としてAra-C, NK171, MTX, 5-FU, VCRを用いた。

濃度依存性の制癌剤では(表1), 5×10^{-6} M MMCでのみ制癌剤感受性の増強が有意にみられ ($p < 0.05$), 時間依存性の制癌剤では(表2), 10^{-6} M Ara-Cでのみ制癌剤感受性の増強が有意にみられた ($p < 0.01$)。

考 察

現在用いられている制癌剤の大部分は、cycle dependency や age reponse を有することが知られている。しかし、一般に腫瘍細胞は正常細胞より世代時間が長く、増殖期にある細胞も少ない¹⁶。したがって、非増殖期細胞を増殖期に入れること (recruitment) や、さらには、この増殖期にはいった細胞を細胞周期の一定の相に集め (synchronization) その相に強く作用する制癌剤を投与して、より有効な抗腫瘍効果を得ようとするのが、細胞回転の理論からみた有効な治療法である。

Recruitment, synchronization を応用した治療は白血病での報告が多い¹⁷⁻²³が、本実験では肺癌においても synchronization を用いた化学療法が有用であるかどうか検討した。Synchronizing agents としてはこれまで、早期S期ブロックをきたす Ara-C¹⁷⁻²⁰, MTX²¹, metaphase arrest をきたす VCR²⁰, G₂期の進行の遅延をきたす BLM²¹, 総腫瘍細胞数を減少させることにより recruitment をきたす CTX²²などが用いられているが、本実験では

S-phase specific な薬剤で代表的な synchronizing agent である Ara-C を選んだ。

Ara-C は、Bergmann ら²⁴により海綿類から抽出し精製された化合物で、抗代謝系の白血病治療剤として臨床面で広く利用され固形癌にも有効であるとされている²⁴。100倍以上の異なった濃度範囲にわたる投与量で使用可能という他剤にはあまりみられない特徴を有し、それぞれの投与量によって異なった作用機序が想定される興味深い薬剤である^{25,26}。Ara-C の作用機序は^{27,28}、体内にとりこまれた Ara-C がリン酸化を受けて活性化され (Ara-CTP), DNA ポリメラーゼに作用し、核酸前駆物質であるデオキシシチジン三リン酸の DNA への取り込みを競合的に阻害するといわれ、また、Ara-C が DNA に結合するともいわれている。Ara-C の細胞回転におよぼす影響については多くの報告がなされているが^{13-15,39-43}、Skipper ら¹³は、Ara-C を典型的な S-phase specific の薬剤と報告している。Cycle progression に対する Ara-C の効果については、Karon ら³⁹はハムスター線維芽細胞 (Don-C 細胞) に 1 あるいは $10 \mu\text{g/ml}$ の Ara-C を投与し、³H-thymidine (³H-TdR) を標識して検討し、Ara-C が S 期から G₂ 期への移行を阻害すると報告しているが、Bhuyan ら¹⁴は、白血病細胞 (L1210 細胞) に $5 \mu\text{g/ml}$ の Ara-C を投与し、³H-TdR とりこみで検討し、Ara-C は G₁ 期から S 期への一過性の移行を阻害したと報告している。また、Wheeler ら¹⁵は、喉頭扁平上皮癌細胞 (H. Ep. No.2 細胞) に Ara-C を $50 \mu\text{g/ml}$ 投与して ³H-TdR 取り込みで検討し、G₁-S 期移行期に部分同調がみられたとし、Tobey ら^{40,41}は、中国ハムスター細胞 (CHO 細胞) に $5 \mu\text{g/ml}$ の Ara-C を投与し、³H-TdR 取り込みと DNA ヒストグラムで検討し、Ara-C は完全には DNA 合成の開始を阻止できるものではなく、G₁ 期から S 期への移行率を減少させる結果 G₁-S 期移行期に細胞の蓄積をきたすと報告している。一方、Yataganas ら⁴²は、白血病細胞 (SK-L7 細胞) に Ara-C を 10^{-6} ~ 10^{-3} M 投与し ³H-TdR 取り込みと DNA ヒストグラムで検討し、G₁ 期から S 期への移行はほぼ正常だが S 期初期でブロックされ、低濃度で短期接触の場合ブロックは一過性で可逆性だが、高濃度の場合には完全に不可逆性で、また、約 10% の細胞は G₁ 期でブロックされると報告している。高本ら⁴³は、ヒト羊膜由来の単層培養細胞 (FL 株) に Ara-C を投与し ³H-TdR 取り込みと DNA ヒストグラムで検討し、低濃度での S 期延長作用と高濃度での G₁ 期お

びG₁-S期移行部の蓄積作用を報告している。これらのAra-Cによる効果の相違は、使用した細胞の種類、処理濃度およびその他の実験条件の違いによるものと考えられる。

著者の実験結果では、10⁻⁷、10⁻⁸M Ara-CではG₁期からS期への移行阻害はなくS期でのDNA合成の低下によるS期延長作用と考えられた。10⁻⁸M Ara-Cの場合は、12時間後に一過性に軽度のG₁期の増加を認めたが、24時間以後は10⁻⁷、10⁻⁸M Ara-Cと同様の機序と思われる。一過性のG₀/G₁期増加については、高本ら⁴⁰⁾は高濃度Ara-CではG₁およびG₁-S期移行部蓄積作用を報告しており、G₁期からS期への移行阻止作用によるものが考えられるが、一部にはS期にあった細胞への殺細胞効果によるS期の減少も一因として考えられるとしている。また、高濃度Ara-Cでは、RNA合成も阻害されG₁期にも作用するとの報告^{37,40)}もあり、本実験での10⁻⁸M Ara-Cでの一過性のG₀/G₁期の増加は、これらを反映しているものと思われる。また、10⁻⁸M Ara-Cの場合、DNA合成の低下が著しくかなりの細胞が死滅しているのにもかかわらず24時間以後のS期が増加しているのは、培養液中のAra-C濃度の低下が考えられる。すなわち、FCSおよび培養細胞にAra-Cの分解活性が存在しないとされており⁴⁰⁾、Ara-Cとの持続接触中に培養液中のAra-C濃度が一定に保たれていない可能性があり、今後の検討が必要と思われる。

Synchronizationの機序として、Van Puttenら⁴⁰⁾は3つの可能性を示している。第一はcycle phase specificな薬剤によりその相の細胞が死滅し、感受性の低い細胞群が優勢になってくるためによるもの。第二には薬剤によりある相にブロックされるため、あるいはある相の進行が遅延されるため、第三には細胞死による細胞数の減少のためrecruitmentが起こり、その間接的な結果によるものである。彼らはこのなかでも第二の機序が臨床的に効果的であるとしている。本実験でAra-CによるS期部分同調は第二の可能性、つまり、S期における細胞回転の進行遅延(S期の延長作用)によることが明らかになった。

制癌剤の細胞周期におよぼす影響の検討は、制癌剤の作用機序の解明や感受性の検討、適切な併用薬剤の選択による効果増強などを目的として行われるが、近年、大量の細胞のDNA量を短時間に測定できるFCMが用いられるようになった。しかし、FCMによるDNAヒストグラムの解析では、

DNA量が2C(二倍体)または4C(四倍体)付近の細胞の解析が困難で⁴¹⁾、早期S期とG₀/G₁期、後期S期とG₂+M期の区別が不正確となり各細胞周期の分画を正しく評価できない。また、DNA量が3Cにありながら実際にはDNA合成をほとんど行っていない細胞を区別できず²⁰⁾、DNA合成速度も評価できない。一方、BrdUに対するモノクローナル抗体を用いたDNA量とDNA合成能を同時に測定する方法は、G₀/G₁期と早期S期、G₂/M期と後期S期を視覚的に区別できるとともにS期内でのDNA合成能の変化をとらえることができ、新しい細胞周期の解析法として注目されている²⁰⁾。また、DNA合成期(S期)細胞の比率は細胞の増殖能を表す代表的な指標と知られているが、この方法を用いればアイソトープを使用することなく容易にS期細胞を同定できるようになった。

Synchronizationについての検討は、従来、³H-TdR取り込みとDNAヒストグラムにより行われていたが、抗BrdU抗体を用いた方法は、まだ文献的には報告がみられず、著者の報告が初めてと思われる。抗BrdU抗体を用いた解析は従来の方法と異なり、S期細胞の比率だけでなくDNA合成の程度も簡単に評価でき非常に有用と思われる。

Human tumor clonogenic assay (HTCA)は、tumor stem cell assayとも呼ばれている。他の制癌剤感受性試験が癌細胞全てを対象にしているのに対して、本法では増殖能を有する細胞、即ち、“self renewal”をおこない得る細胞がtumor stem cell = clonogenic cellであるという考えを基本として、これらの細胞を選択的にテストの対象としている。Hamburgerら⁴²⁾により開発された本法は、in vitroでの感受性と臨床結果とが高い相関を示す精度の高い制癌剤感受性試験として世界的に注目されている。その後、木村ら²⁰⁾、Alonso⁴³⁾、von Hoffら^{50,51)}などにより精力的にこの方法の制癌剤感受性試験としての有用性が追試・検討され、この方法は従来報告されている種々の感受性試験に比し臨床効果との相関性が高く優れた感受性試験であると報告している。著者の行ったHTCAは木村らによる方法²⁰⁾に準じているが、Salmonら²⁰⁾の原法に比べてはるかに簡便化されており実用的である。

感受性試験に用いる制癌剤の濃度は、臨床で使われる時の血中濃度を参考にして決定される。即ち、各薬剤の通常投与量をワンショット静注した場合の血中濃度曲線β-phase起始部の濃度(多くの場合、これは最高血中濃度のほぼ10分の1に相当する)を

基準に設定される⁵⁰。しかし、本実験では、S期部分同調時に制癌剤の感受性が増強されるかどうかを検討するため、制癌剤の濃度はコロニー形成率が求められる2濃度で検討している。臨床上の濃度の1/1000~10倍におよんでいる。

また、著者はコロニー数の算定については、INTでコロニーを染色後位相差顕微鏡により拡大してautomatic particle counterでコロニー数を計測した。倒立顕微鏡で算定した結果と比較すると、図5のように、相関係数0.987と非常に優れた相関性 ($p < 0.001$) が認められ、多数の検体を短時間に処理できること、コロニー算定にあたって測定者の主観が入らず同一条件で計測でき客観性があることより、培養細胞株を用いたHTCAにおいては非常に有用と思われた。

臨床上 synchronization を応用した化学療法は、白血病についての報告が多い¹⁷⁻²⁰。Lampkin ら¹⁷は小児白血病を中心に検討している。Ara-C による synchronization 後S期に特異的といわれる Ara-C、MTX、VCR を投与し、いずれも単独効果よりも効果的であったと報告している。Volger ら¹⁸、Kremer ら¹⁹は、急性白血病において Ara-C 投与48時間後で³H-TdR 標識率 (labeling index, LI) の高値および DNA 合成率が上昇することより、synchronization だけでは説明ができず一部 recruitment の関与を推定している。そして、Ara-C 投与後に、大量の MTX および VCR を投与し60%の寛解率をあげ、しかも寛解群、非寛解群の間に Ara-C による LI の上昇に有意差を認め増殖期を高めることの重要性を強調している。Büchner ら²⁰は、白血病症例に Ara-C を48時間点滴静注し、flow microfluorometry にてS期細胞の上昇を認め、これを Ara-C による DNA 合成の遅延または recruitment によるものと判断し ifosfamide を投与して効果をあげている。日本でも、Yoshida ら²¹が synchronization を用いた化学療法で良好な成績をあげている。

白血病以外の固形腫瘍に対しても、同様な試みがなされている。Klein ら²²は、実験腫瘍を用いた広範な基礎的効果を臨床面に応用し、白血病のみならず悪性リンパ腫、肺癌などの固形癌の治療に用いている。すなわち、VCR 投与により metaphase arrest の状態とし、これらがS期に細胞同調した時に大量の CTX を投与するもので、同時投与に比べ効果の増強がみられることを報告している。肺癌に対しては、Straus²³は、CTX の大量投与によって recruit-

ment が起こるが、³H-TdR の LI の上昇はやや遅れて8日間を要することから第9日目に S-phase sensitive な MTX を連続投与した。その結果、肺癌28例中20例に効果がみられたと報告している。Lanzotti ら²⁴は、BLM 4日間持続注入後にメラノーマ細胞の³H-TdR の LI が上昇し同調された成績をもとに、BLM を4日間投与後5日間の強力な併用療法 (CTX, VCR, MTX, 5-FU) を行い、肺癌に効果を認めている。しかしながら、³H-TdR による LI や DNA ヒストグラムの S 期比率を指標とした synchronization を用いた化学療法では効果が認められていても、理論上期待される程の効果が得られていないのが現状である。

著者の実験では、 10^{-7} M Ara-C の持続接触約28時間後にS期部分同調が得られその時の制癌剤感受性をHTCAにより検討した結果、 10^{-7} M Ara-C ($p < 0.01$) と 5×10^{-6} M MMC ($p < 0.05$) とで軽度の制癌剤感受性の増強がみられたが他の制癌剤では増強がみられなかった。SBC-3 細胞における制癌剤感受性については、CDDP、ACNU は、通常濃度では対照の50%前後のコロニー形成率なので、境界領域の感受性ではつきりしなかったが、高濃度 (10倍) では感受性が認められた。他の薬剤ではすべて通常濃度で感受性が認められた。このことから元来薬剤に耐性であったためにS期部分同調で制癌剤感受性の増強がみられなかった可能性については否定される。しかし、感受性の増強がほとんどの薬剤でみられなかった理由のひとつとして、Ara-C によるS期部分同調ではS期の細胞数は増加するものの、個々の細胞でDNA合成が低下しているために制癌剤感受性が低下している可能性が考えられる。今後、synchronization を検討する際、³H-TdR による LI や DNA ヒストグラムによるS期の比率だけでなく個々の細胞のDNA合成能についても考慮する必要があると思われる。

S期部分同調時の制癌剤感受性について検討した報告は、ほとんど臨床症例や動物実験によるものであり、cell line を使用した in vitro の報告は少ない。Ritch ら²⁵は、Sarcoma 180細胞を 5×10^{-6} M Ara-C に1時間接触後、経時的にDNAヒストグラムの測定およびADM (1×10^{-6} M, 4×10^{-6} M) を1時間接触させた時の clonogenic assay を行った。そして Ara-C と ADM を同時に併用した時に比べると、Ara-C 投与2時間後では殺細胞効果が500倍強化されたと報告している。彼らはDNAヒストグラムではAra-C投与後8時間まで変化がみられなかった

ので、この clonogenic assay の成績の理由はS期への細胞同調による細胞回転のブロック以外にあるとしているが、著者の実験成績から判断すると、Ara-C 投与後2時間の時点では、早期S期細胞の増加がみられている可能性があると思われる。中期S期に同調される11時間後でも殺細胞効果の増強がみられているが、2時間後のそれに比べ減弱している。すなわち、S期部分同調のうち早期S期細胞に同調した時期に、強い制癌剤感受性の増強がよりみられると考えられる。著者の実験では中期S期での同調時にHTCAを施行したが、早期S期の同調にはもっと効果があつたかもしれない。また、本実験ではAra-Cは持続接触としたが、このために制癌剤感受性試験時にDNA合成が低下したままとなり効果が得られなかった可能性が考えられる。すなわち、Ara-Cは短時間接触として、S期部分同調を得た方がDNA合成能が高くなる可能性が考えられる。今後、これらの点の検討も必要と思われる。

一方、多くの報告では^{17-20,52}細胞周期同調時にAra-Cは中等量(10^{-6} M)以上使用されているが、著者は、増殖期の多い培養細胞株を用いたこと、軽度の細胞増殖の抑制しか認めない低濃度Ara-Cを使用したことから、recruitmentの関与が少なかったことが考えられ、細胞回転を考慮した化学療法ではrecruitmentの関与が無視できない。

正常細胞の世代時間は、悪性腫瘍細胞のそれよりも短く増殖分画は大きいため、synchronizationも強くおこることが予想され、この点について臨床的な成績から、吉川ら²⁰、Clavelら⁵³は腫瘍細胞以上に正常細胞の障害が強かったと悲観的な報告をしている。現状では、悪性腫瘍細胞のみを選択的にsynchronizationすることは不可能であり、synchronizationによって必ずしも化学療法係数が上昇するとはいえない。しかしながら、recruitmentおよびsynchronizationは細胞回転の理論からみた有効な投与方法であり、現在の制癌剤の治療成績をみる限り、また、今後CDDPのような新しい画期的な制癌剤の開発がない限り、検討を続けるべき治療法と思われる。抗BrdU抗体などを用いたFCMによる細胞動態の解析法、HTCAなどの制癌剤感受性試験は非常に有用であり、今後もこれらを利用して、化学療法の至適投与方法を確立する必要がある。

結 論

肺癌において細胞周期同調を用いた化学療法を導入することの是非を基礎的に検討する目的で、ヒト

肺小細胞癌培養株SBC-3細胞を1- β -D-arabino-furanosylcytosine (Ara-C)でS期部分同調を行い、種々の制癌剤の感受性を調べた。S期部分同調の条件は抗bromodeoxyuridine (BrdU)抗体とpropidium iodide (PI)との二重染色法を用いてフローサイトメトリーにより解析し、制癌剤感受性はhuman tumor clonogenic assay (HTCA)を用いて検討し以下の成績を得た。

1. 10^{-7} M Ara-Cでは対照に比べて軽度の細胞増殖抑制がみられ 10^{-6} M Ara-Cでは高度の細胞増殖抑制がみられた。 10^{-6} M Ara-Cでは両者の中間であった。

2. Ara-Cの濃度に依存してDNA合成の低下、細胞回転の遅延がみられた。

3. 10^{-7} M, 10^{-6} M Ara-Cでは、G₁期からS期への移行阻害はなく、S期のDNA合成の低下によりS期が延長し、S期に細胞が蓄積することによって、 10^{-7} M Ara-Cでは24時間前後に、 10^{-6} M Ara-Cでは24~48時間後にS期の部分同調が得られた。 10^{-6} M Ara-Cでは、当初一過性のG₁期細胞の増加を認めたが、24時間以後はS期延長作用により72時間前後にS期の部分同調が得られた。

4. S期の部分同調時、個々の細胞のDNA合成は、Ara-Cの濃度依存性に低下していた。

5. 10^{-7} M Ara-Cで平均28時間連続接触させたところ、S期の割合は、対照群で平均36%、Ara-C処理群で平均59%とS期部分同調が得られた。この時点で、adriamycin, bleomycin, cisplatin, mitomycin C (MMC), nimustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, Ara-C, etoposide, methotrexate, 5-fluorouracil, vincristineを用いてHTCAを行ったところ、 10^{-6} M Ara-C ($p < 0.01$), 5×10^{-6} M MMC ($p < 0.05$)でのみ制癌剤感受性の増強がみられた。

以上の結果から、ヒト肺小細胞癌培養細胞株SBC-3においてAra-CによりS期部分同調が得られたが、制癌剤感受性については一部の制癌剤で増強がみられたものの軽度で、他の多くの制癌剤では増強がみられなかった。効果増強がみられない理由として、Ara-CによるDNA合成の低下による制癌剤感受性の低下や、recruitmentの関与が少ないことなどが考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った松田保教授に深甚の謝意を表します。また、直接、御指導、御助言を頂きました金森一紀講師、中村忍助教授、吉田喬講師、ならびに呼吸器研究室の諸先生方に心から感謝いたします。

Human tumor clonogenic assay についての御指導および肺癌培養細胞株を提供して頂きました。岡山大学第二内科木村郁郎教授、大塚泰亮助教授、ならびに教室員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第28回日本肺癌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Greco, F. A., Johnson, D. H., Hainsworth, J. D. & Wolff, S. N.: Chemotherapy of small-cell lung cancer. *Semin. Oncol.*, **12**, 31-37 (1985).
- 2) Ihde, D. C.: Current status of therapy for small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, **54**, 2722-2728 (1984).
- 3) Aroney, R. S., Bell, D. R., Chan, W. K., Dalley, D. N. & Levi, J. A.: Alternating non-cross-resistant combination chemotherapy for small cell anaplastic carcinoma of the lung. *Cancer*, **49**, 2449-2454 (1982).
- 4) Maurer, L. H., Tulloh, M., Weiss, R. B., Blom, J., Leone, L., Glidewell, O. & Pajak, T. F.: A randomized combined modality in small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, **45**, 30-39 (1980).
- 5) 中積泰人, 原田実根: 肺小細胞癌と骨髄移植. *内科*, **59**, 490-494 (1987).
- 6) 藤田次郎, 西條長宏: わが国における肺非小細胞癌の治療の現状と問題点. *医学のあゆみ*, **130**, 579-585 (1984).
- 7) Gralla, R. J., Casper, E. S., Kelsen, D. P., Braun, D. W., Jr., Dukeman, M. E., Martini, N., Young, C. W. & Golbey, R. B.: Cisplatin and vindesine combination chemotherapy for advanced carcinoma of the lung: A randomized trial investigating two dosage schedules. *Ann. Intern. Med.*, **95**, 414-420 (1981).
- 8) Kris, M. G., Gralla, R. J., Kalman, L. A., Kelson, D. P., Casper, E. S., Burke, M. T., Groshen, S., Cibas, I. R., Bagin, R. & Heelan, R. T.: Randomized trial comparing vindesine plus cisplatin with vinblastin plus cisplatin in patients with non-small cell lung cancer, with an analysis of methods of response assessment. *Cancer Treat. Rep.*, **69**, 387-395 (1985).
- 9) 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).
- 10) Barranco, S. C., Novak, J. K. & Humphrey, R. M.: Response of mammalian cells following treatment with bleomycin and 1,3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea during plateau phase. *Cancer Res.*, **33**, 691-694 (1973).
- 11) Twentyman, P. R. & Bleehen, N. M.: Changes in sensitivity to radiation and to bleomycin occurring during the life history of monolayer cultures of a mouse tumour cell line. *Br. J. Cancer*, **31**, 68-74 (1975).
- 12) Bhuyan, B. K., Scheidt, L. G. & Fraser, T. J.: Cell cycle phase specificity of antitumor agents. *Cancer Res.*, **32**, 398-407 (1972).
- 13) Skipper, H. E., Schabel, F. M., Jr., Mellett, 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. Rep.*, **54**, 431-450 (1970).
- 14) Bhuyan, B. K., Fraser, T. J., Gray, L. G., Kuentzel, S. L. & Neil, G. L.: Cell-kill kinetics of several S-phase-specific drugs. *Cancer Res.*, **33**, 888-894 (1973).
- 15) 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).
- 16) Clarkson, B. D.: Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukemia. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, **30**, 81-119 (1969).
- 17) Lampkin, B. C., Nagao, T. & Mauer, A. M.: Synchronization and recruitment in acute leukemia. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2204-2214 (1971).
- 18) Vogler, W. R., Cooper, L. E. & Groth, D. P.: Correlation of cytosine arabinoside-induced increment in growth fraction of leukemic blast cells with clinical response. *Cancer*, **33**, 603-610 (1974).
- 19) Kremer, W. B., Vogler, W. R. & Chan, Y. K.: An attempt at synchronization of marrow

- cells in acute leukemia. Relationship to therapeutic response. *Cancer*, **37**, 390-403 (1976).
- 20) **Büchner, T., Barlogie, B., Asseburg, U., Hiddemann, W., Kamanabroo, D. & Göhde, W.**: Accumulation of S-phase cells in the bone marrow of patients with acute leukemia by cytosine arabinoside. *Blut*, **28**, 299-300 (1974).
- 21) **Yoshida, T., Hattori, K., Nakamura, S., Mitamura, E., Kobayashi, S. Ohtake, S. & Tanimoto, K.**: A simple rapid autoradiography for ³H-thymidine labeling index and its application to therapy of adult acute leukemia. *Cancer*, **46**, 2298-2307 (1980).
- 22) 吉川治哉, 今井邦之, 大野竜三, 神谷 忠, 西脇 洋, 石黒順造, 上田龍三, 竹山英夫, 若山喜久子, 横幕省三, 緒方完治, 小林政英, 山田一正, 植谷忠昭: 急性白血病における Neo-DCMP 療法. *臨床血液*, **16**, 305-312 (1975).
- 23) **Ernst, P. & Killmann, S. A.**: Perturbation of generation cycle of human leukemic myeloblasts in vivo by methotrexate. *Blood*, **38**, 689-705 (1971).
- 24) **Fried, J. & Mandel, M.**: Multi-user system for analysis of data from flow cytometry. *Comput. Programs Biomed.*, **10**, 218-230 (1979).
- 25) **Gratzner, H.**: Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iodo deoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, **218**, 474-475 (1982).
- 26) **Dolbeare, F., Gratzner, H., pallavicini, M. G. & Gray, J. W.**: Flow cytometric measurement of total DNA content and incorporated bromodeoxyuridine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **80**, 5573-5577 (1983).
- 27) 岸本信康, 大槌泰亮, 平木俊吉, 三宅賢一, 小沢志朗, 田村哲生, 沼田健之, 河原 伸, 田村 亮, 宮本宏明, 西井研治, 木村郁郎: ヒト肺小細胞癌 5 株の培養樹立とそれらの性状について. *肺癌*, **24**, 第25回日本肺癌学会総会抄録, 664 (1984).
- 28) **Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehnen, B., Durie, B. G. M., Alberts, D. S. & Moon, T. E.**: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1321-1327 (1978).
- 29) 木村郁郎, 平木俊吉: 肺癌における colony assay の有用性. *呼吸*, **4**, 1466-1472 (1985).
- 30) **Klein, H. O. & Lennartz, K. J.**: Chemotherapy after synchronization of tumor cells. *Semin. Hematol.*, **11**, 203-227 (1974).
- 31) **Lanzotti, V. J., Thomas, D. R., Holoye, P. Y., Boyle, L. E., Smith, T. L. & Samuels, M. L.**: Bleomycin (NSC-125066) followed by cyclophosphamide (NSC-26271), vincristine (NSC-6757-4), methotrexate (NSC-740), and 5-fluorouracil (NSC-19893) for non-oat cell bronchogenic carcinoma. *Cancer Treat. Rep.*, **60**, 61-68 (1976).
- 32) **Straus, M. J.**: Combination chemotherapy in advanced lung cancer with increased survival. *Cancer*, **38**, 2232-2241 (1976).
- 33) **Bergmann, W. & Feeney, R. J.**: The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2809-2810 (1950).
- 34) 太田和雄, 栗田宗次, 西村 稜, 小川一誠, 亀井良孝, 今井邦之, 有吉 寛, 片岡邦之, 村上 稔, 尾山 淳, 星野 章, 天羽弘行, 加藤武俊: 悪性腫瘍の化学療法における多剤併用 MFC 療法. *日本癌治療学会誌*, **6**, 267-276 (1971).
- 35) **Castaigne, S., Daniel, M. T., Tilly, H., Herait, P. & Degos, L.**: Does treatment with Ara-C in low dosage cause differentiation of leukemic cells?. *Blood*, **62**, 85-86 (1983).
- 36) **Early, A. P., Preisler, H. D., Slocum, H. & Rustum, Y. M.**: A pilot study of high-dose 1-β-D-arabinofuranosylcytosine for acute leukemia and refractory lymphoma: Clinical response and pharmacology. *Cancer Res.*, **42**, 1587-1594 (1982).
- 37) **Graham, F. L. & Whitmore, G. F.**: Studies in mouse L-cells on the incorporation of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine into DNA and on inhibition of DNA polymerase by 1-β-D-arabinofuranosylcytosine 5'-triphosphate. *Cancer Res.*, **30**, 2636-2644 (1970).
- 38) **Chabner, B. A.**: Cytosine arabinoside. In Chabner B. A. (eds.), *Pharmacologic Principles of Cancer Treatment*. p387-401, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1982.
- 39) **Karon, & Shirakawa.**: Effect of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine on cell cycle passage time. *J. Nat. Cancer Inst.*, **45**, 861-867 (1970).
- 40) **Tobey, R. A.**: Effects of cytosine arabinoside, daunomycin, mithramycin, azacytidine, adriamycin and camptothecin on mammalian cell

cycle traverse. *Cancer Res.*, **32**, 2720-2725 (1972).

41) **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).

42) **Yataganas, X., Strife, A., Perez, A. & Clarkson, B. D.**: Microfluorimetric evaluation of cell kill kinetics with 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, **34**, 2795-2806 (1974).

43) **高本 滋, 太田和雄**: F. M. F. による細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法*, **5**, 727-736 (1978).

44) **Silagi, S.**: Metabolism of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in L cells. *Cancer Res.*, **25**, 1446-1453 (1965).

45) **Raijmakers, R., De Witte, T., Linssen, P., Wessels, J. & Haanen, C.**: The relation of exposure time and drug concentration in their effect on cloning efficiency after incubation of human bone marrow with cytosine arabinoside. *Br. J. Haematol.*, **62**, 447-453 (1986).

46) **Van Putten, L. M., Keizer, H. J. & Mulder, J. H.**: Perspectives in cancer research. Synchronization in tumour chemotherapy. *Europ. J. Cancer*, **12**, 79-85 (1976).

47) **Dean, P. N., Dolbeare, F., Gratzner, H., Rice, G. C. & Gray, J. W.**: Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd. *Cell Tissue Kinet.* **17**, 427-436 (1984).

48) **Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.**:

Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).

49) **Alonso, K.**: Human tumor stem cell assay A prospective clinical trial. *Cancer*, **54**, 2475-2479 (1984).

50) **Von Hoff, D. D., Clark, G. M., Stogdill B. J., Sarosdy, M. F., O'Brien, M. T., Casper, J. T., Mattox, D. E., Page, C. P., Cruz, A. B. Sandback, J. F.**: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.*, **42**, 1926-1931 (1983).

51) **Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradly, E., Sandback, J., Jones, D. & Makuch, R.**: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, **70**, 1027-1032 (1981).

52) **Ritch, P. S., Occhipinti, S. J., Cunningham, R. E. & Shackney, S. E.**: Schedule-dependent synergism of combinations of hydroxyurea with adriamycin and 1- β -D-arabinofuranosylcytosine with adriamycin. *Cancer Res.*, **41**, 3881-3884 (1981).

53) **Clavel, J., Gary-Bobo, J., Guerrin, J., Klein, T., Pommatau, E., Brule, G. & Chauvergne, J.**: Essais de chimiothérapie des cancers épidermoïdes en phase évaluative avancée par un protocole basé sur la notion de synchronisation cellulaire. *Sem. Hôp. paris*, **50**, 3107 (1974).

