

# Cell Proliteration Kinetics and Drug Sensitivity of Osteosarcoma Cells Treated in Culture with Adriamycin

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7861">http://hdl.handle.net/2297/7861</a>

## アドリアマイシン処理骨肉腫培養細胞の増殖動態と薬剤感受性

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

紺 谷 悌 二

(昭和61年2月8日受付)

本研究はヒト骨肉腫由来の培養株 (OST 株) のアドリアマイシン (ADR) 投与後の推移の観察と、この ADR 投与後生き残った細胞群 (ADR-resistant cells) と、もとの細胞群との間の各種制癌剤に対する態度の比較についての検討を行ったものである。OST 株を 48 時間静置培養後、ADR を 40 時間作用させて除去し、以後の推移を DNA ヒストグラム、生細胞数及び細胞像により観察をつづけたところ、ADR 投与、除去後 6 週間目に再び正常の細胞回転に復帰してくる生細胞の存在を観察した。この ADR-resistant cells と、もとの細胞群に対して、骨肉腫治療に頻用されている ADR、メソトレキセート (MTX)、ビンクリスチン (VCR)、アクリルピシチン (ACR)、シスプラチン (CDDP) を各々 40 時間作用させ、以後の増殖動態の推移を同様に観察した。その結果 ADR 投与に対しては ADR-resistant cells ではもとの細胞群に比べて感受性の低下を認め、更に上記操作を繰り返していくに連れて感受性の低下は著明となった。この ADR-resistant cells は MTX, VCR, ACR に対しても同様に感受性の低下を認めた。しかし CDDP に対しては ADR-resistant cells はむしろ高い感受性を示した。以上により OST 株には ADR に対して一部遺伝的耐性細胞が含まれており、更にこの細胞群は MTX, VCR に対して交叉耐性を、CDDP に対しては随伴感受性を有していることが示唆された。次いでこれらの制癌剤に耐性を得た細胞群に対して、細胞内への制癌剤取り込みを補助するとされている  $C_a$ 拮抗剤 (ペラバミール) を ADR と併用投与し、ADR 単独投与後群と比較した。その結果併用投与群で細胞増殖抑制効果がより強く現れた。これらの結果は制癌剤耐性の克服の一方法として、随伴感受性を有する制癌剤への変更や、耐性株の感受性増強法の有効性を示唆するものであると考えられた。

---

**Key words** DNA histogram, osteosarcoma, ADR-resistant cells, cross resistance, collateral sensitivity

---

骨肉腫は悪性骨腫瘍のなかでも、きわめて悪性度の高い骨腫瘍であり、その 5 年生存率は必ずしも満足すべきものではなく、従来 10%程度にとどまっていた。このような背景において、潜在性転移も含めて骨肉腫に対する有効かつ合理的な adjuvant chemotherapy の必要性が指摘されるようになってきた。

金沢大学医学部附属病院整形外科学教室でも 1977 年以来、骨肉腫患者に対し、メソトレキセート (MTX) にアドリアマイシン (ADR) 及びビンクリスチン (VCR) を併用する多剤併用療法を適用し、従来の成績に比較

して良好な成績を収めつつある<sup>1)2)</sup>。しかし長期間の維持療法の適用にもかかわらず、結果的には肺転移などの致死的要因が問題視されている。その要因の一つとして考えられるのは、肉腫細胞が制癌剤に対し、耐性を獲得することであり、薬剤耐性をも考慮した治療手段の開発が望まれていることである。

一方、Van Dilla ら<sup>3)</sup>が開発した Flow cytometer (DNA 瞬間自動測定装置) の登場により細胞周期の解析が迅速かつ容易となり、制癌剤の細胞周期に及ぼす影響について多くの検討がなされるようになって

---

Abbreviations: ACR, aclarubicin; ADR, adriamycin; CDDP, cis-dichlorodiammine platinum; DNA, deoxyribonucleic acid; FBS, fetal bovine serum; MTX, methotrexate; OST strain, osteogenic sarcoma Takase strain; PBS, phosphate buffered saline; RPMI 1640,

た<sup>9)</sup>。当教室においても現在までに骨肉腫に対する効果的な化学療法の有無を細胞回転の面から検討し、臨床的にも応用しうる新しい知見が開発されている。林<sup>10)</sup>はSr-89骨肉腫を対象とするin vivo実験系で、平井ら<sup>11)</sup>はヒト骨肉腫由来の培養細胞株(OST株)を対象とするin vitroでそれぞれの実験モデルにおいて従来骨肉腫に対する化学療法剤として用いられているMTX, ADR及びVCRの細胞周期に及ぼす影響を精細に検討し、また、三平ら<sup>12)</sup>はOST株に対するこれら3剤の交代併用療法に関し、薬剤の投与順序が細胞周期にどのように影響するかを精査し、これが治療効果を左右する要因の一つであることを報告した。

そして、これら3剤の中でも、ADRが最も強い増殖抑制効果を示す成績をえている。しかし、ADRの長期間連用は、薬剤耐性細胞の出現につながる事が懸念される。

今回、著者はOST培養細胞株を対象とし、ADRと接触した細胞集団の増殖動態について、DNAヒストグラム、生細胞数及び細胞を指標として検討した。とくに従来行われている比較的短時間内の解析でなく、ADRと接触後数週間にわたって継代細胞を観察し、さらに、頻回にADRと接触せしめた細胞の増殖動態及び薬剤感受性などを検討したので報告する。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

#### 1. 骨肉腫細胞株

1964年、当教室の高瀬ら<sup>13)</sup>によって樹立され、継代されているヒト骨肉腫由来の培養細胞株(OST株)を使用した。OST株は、大多数が紡錘形の細胞集団から成り、一部に巨細胞が存在する単層増殖の培養細胞株である。またそのgeneration timeは、autoradiographyによる解析で40時間とされている<sup>14)</sup>。

#### 2. 細胞培養

##### 1) 培養液

市販の合成培地RPMI 1640(ニッスイ)にウシ胎児血清(FCS, 56°C, 30分間非動化)を20%濃度に加えた培地(pH 7.0-7.4)を用いた。

##### 2) 培養瓶

25 cm<sup>2</sup> disposable tissue culture flask(コーニング社)を使用した。

##### 3) 細胞浮遊液の調整

培養OST株細胞はいったんCa<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を

含まないリン酸緩衝塩類溶液(PBS)(ニッスイ)で洗浄後、0.25%トリプシン溶液で処理した。器壁から剝離された細胞は、1000 rpm, 5分間の遠心後、ただちに前記培養液中に再浮遊せしめたのち、細胞数が1.5~2.0×10<sup>5</sup>個/mlとなるように調整した。

#### 4) 培養方法

37°C下で閉鎖的に培養し、以後1週間ごとに同培地中で継代培養した。

### 3. 使用制癌剤

#### 1) 種類

代謝拮抗剤はメソトレキセート(MTX:メソトレキセート, 日本レダグリー)を、アルカロイド剤はビンクリスチン(VCR:オンコピン, 塩野義製薬)を、抗癌性抗生物質はアドリアマイシン(ADR:アドリアシン, 協和発酵工業)及びアクリラルビシン(ACR:アクリラシノン, 山之内製薬)を使用した。また白金錯体は、シスプラチン(CDDP:プリプラチン, プリストルマイヤーズ)を供用した。

#### 2) 作用濃度

薬剤の作用濃度投与については、細胞増殖抑制が認められる各薬剤の最少有効濃度を低濃度、その10倍量を高濃度とする2つの作用群を設定した(表1)。

### 4. OST株細胞のADRによる反復処理実験

前記OST株細胞浮遊液(1.5~2.0×10<sup>5</sup>個/ml) 5ml宛培養瓶に分注し、密栓し、37°C下48時間静置前培養した後、これにADR(高濃度)を添加し、generation timeをカバーしうる時間、すなわち40時間の培養を行った。その後薬剤を除去し、細胞をPBSで洗浄した後、同条件下で培養を継続した。細胞増殖の動態については、薬剤除去後1週間ごとに継代培養するとともにその都度DNAヒストグラムの作製、生細胞数の測定を行い、また塗抹標本の細胞像についても検討した。

一方、薬剤除去後6週間目の細胞群、すなわち高濃度にADRを作用させたにもかかわらず生存した細胞集団をADR-resistant cells I (ADR-R I)とし、これをPBSで洗浄後、1.5~2.0×10<sup>5</sup>個/ml濃度の細胞浮遊液とした。この浮遊液5ml宛を培養瓶に分注し、37°C下48時間、静置前培養した後、再度ADR高濃度または低濃度を加えて40時間培養した。その後、薬剤を洗浄、除去し、さらに培養を継続した。そして6週間後の増殖細胞を集め、これをADR-R IIとした。以後この操作を反復し、それぞれADR-R III, ADR-R IV及びADR-R VのADR耐性化OST株細胞を得たが、

Roswell Park Memorial Institute medium 1640; VCR, vincristine; 2C, 2 content (diploid); 3C, 3 content (triploid); 4C, 4 content (tetraploid); G<sub>1</sub>, gap1; G<sub>2</sub>, gap2; M, mitotic stage; S, DNA synthetic stage.

これらの ADR 耐性細胞の増殖動態は、前述の事項について経的に測定した。

#### 5. ADR 耐性骨肉腫細胞の諸制癌剤に対する感受性試験

前項の方法で得た ADR 耐性細胞 (ADR-R V) の 20%FCS 加 RPMI 1640 培地浮遊液 ( $1.5 \sim 2.0 \times 10^5$  個/ml) 5ml を培養瓶に分注し、48 時間の前培養を行った。次いでこれに各制癌剤を所定濃度に加え、以下前述の方法に準じて細胞の増殖動態を調べた。

#### 6. flow cytometry

増殖過程の細胞群は、常法に従ってまず薬剤除去後、PBS で細胞を洗浄し、0.25% トリブシン溶液で処理後、剥離された細胞浮遊液を遠心し、沈査に 50% メタノール 1.0 ml を加えて固定した。これを Krishan ら<sup>19)</sup>の方法に従い、5 倍量の蛍光染色液 (propidium

iodide を 0.1% クエン酸ソーダ液に 0.05 mg/ml 濃度に溶解せしめたもの) を加えて OST 細胞核を染色し、Flow cytometer (Otrho Instruments Cytofluorograf System 50H) によって細胞数  $15 \times 10^4$  個についてのヒストグラムを求めた。

DNA ヒストグラムは横軸に DNA 量、縦軸にその細胞数を示したものであり、2C (diploid) は  $G_1$  期または  $G_0$  期 (休止期) の細胞群を示し、4C (tetraploid) は  $G_2$  期 (タンパク、RNA 合成期) 及び M 期 (分裂期) の細胞群を示しており、その中間は便宜上 3C とされている S 期 (DNA 合成期) 細胞群を表現している。一般に増殖期にある細胞集団では 2C に dominant なピークを、そして 4C に小さなピークをもつ 2 峰性パターンを呈している (図 1)。

#### 7. 生細胞数の測定と細胞像の観察

Table 1. Anticancer agents used in this study

Group	Anticancer agent	Low dose $\mu$ g/ml	High dose $\mu$ g/ml
Antibiotic	ADR	0.05	0.50
Vinca alkaloid	VCR	0.005	0.05
Antimetabolite	MTX	0.50	5.00
Antibiotic	ACR	0.05	0.50
Metal complex	CDDP	0.02	0.20

ADR, Adriamycin; VCR, Vincristine;  
MTX, Methotrexate; ACR, Aclarubicin;  
CDDP, Cisplatin.

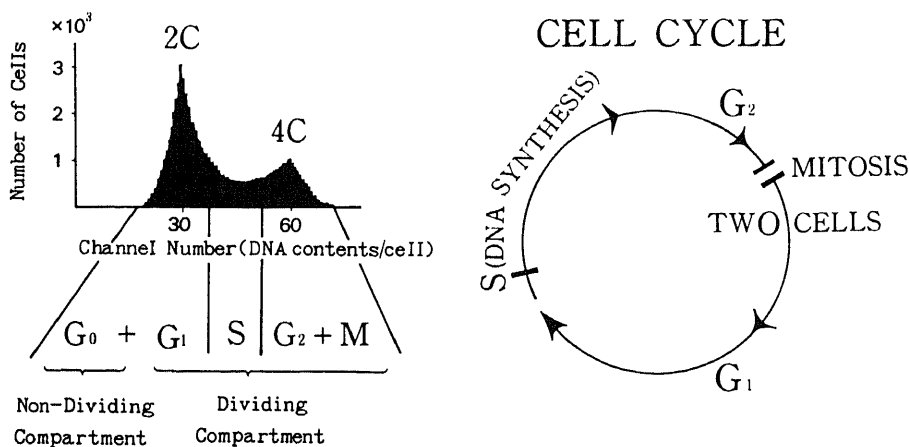


Fig. 1. Correlation between DNA histogram and cell cycle phase.  
2C, diploid; 4C, tetraploid.

自動血球アナライザー (Coulter Electronics) によって総細胞数を求めた後、別に 0.1% トリパンブルー溶液にて生細胞数と死細胞数の割合を算定し、総生細胞数を決定した。

またこれらの細胞像所見については、前記培養瓶を通して、倒立位相差顕微鏡による観察を行い、OST 細胞の経時的形態変化を検索した。

成 績

1. OST 株細胞の増殖動態からみた ADR 感受性

ADR を高濃度で作用させた OST 株細胞群および非処理細胞群の増殖経過を図 2 に示した。

1) 生細胞数

ADR 非処理 OST 細胞、すなわち対照群では、培養 48 時間頃より指数関数的に細胞増殖が観察され、約 2 週間後に plateau に達した。一方、48 時間前培養した OST 細胞を高濃度の ADR で処理すると、薬剤除去後 1 週間までは徐々に生細胞数の減少がみられ、その後急速に減少し、約 3 週間後に最少値を示した。3 週間以後、生細胞数は徐々に増加傾向を示し、5 週目から再び指数関数的に増殖がみられ、6 週後には対照群のそれとほぼ同一値に達した。図 3 は、OST 細胞を、高

濃度及び低濃度で ADR に接触せしめた場合の増殖経過をしめしたものである。OST 細胞を高濃度の ADR で処理した細胞群では、薬剤除去 2 週から 4 週目にかけて生細胞数の著しい減少がみられ、3 週間目に最小値を示したが、その後は、図 2 におけるがごとく増殖は活発となり、6 週間後にはほぼ、対照群の生細胞数に近似していた。ADR を低濃度で作用せしめた場合には、薬剤除去 5 週間後までは対照群における生細胞数より低値をしめしたものの、増殖抑制効果は微弱であった。

2) DNA ヒストグラム

ADR 非処理細胞群では、当初 2C に急峻なピークをもつ単峰性パターンであったが、48 時間頃から増殖期細胞に見る定型的な 2 峰性パターンとなり、その後継代 2 週間目で再び 2C 単峰性のパターンを示すに至った。一方、高濃度に ADR を作用せしめた細胞群の DNA ヒストグラムでは、薬剤除去直後では 3C の急増がみられ、その後時間の経過とともに 4C にピークが移行したが、以後徐々に減少を示し、2 週間後には 2C 単峰性のパターンを示した。そして 6 週間後には定型的な 2 峰性パターンに復元した。

3) 細胞像所見

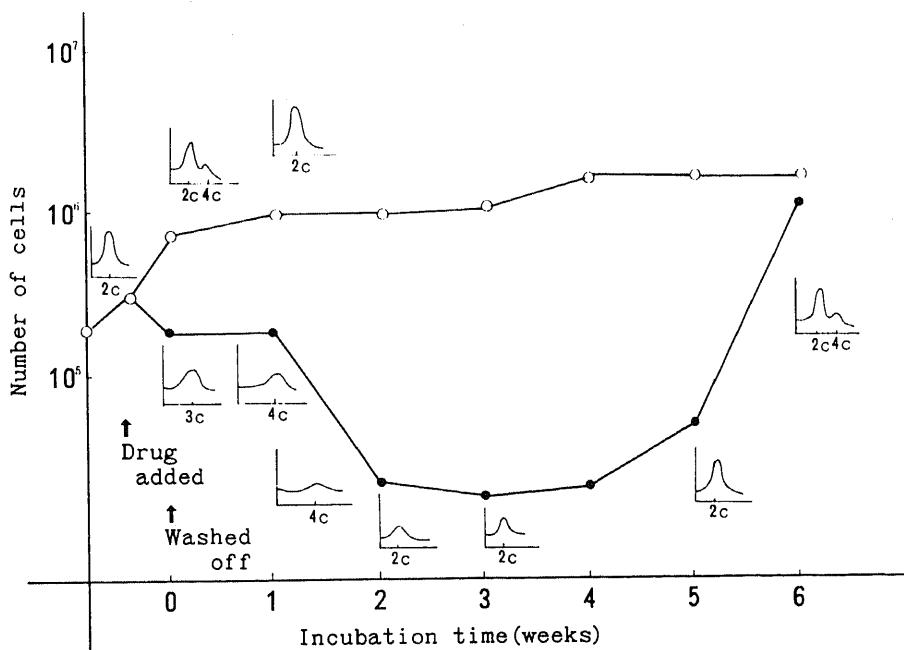


Fig. 2. Growth profiles and DNA histograms of OST cells treated with high dose of ADR in culture.

The OST cells were exposed to ADR at 37°C for 40 hours. ○—○, untreated; ●—●, treated with ADR. The results are shown as mean of three dishes.

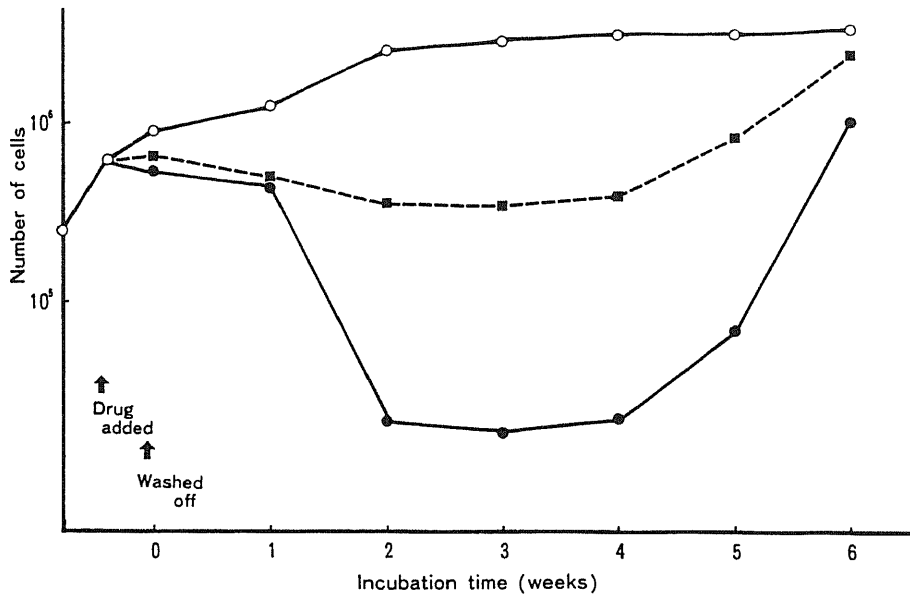


Fig. 3 Growth profiles of OST cells treated with ADR in high or low concentrations.  $\circ$ — $\circ$ , untreated;  $\bullet$ — $\bullet$ , high dose of ADR;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , low dose of ADR. The results are shown as mean of three dishes.

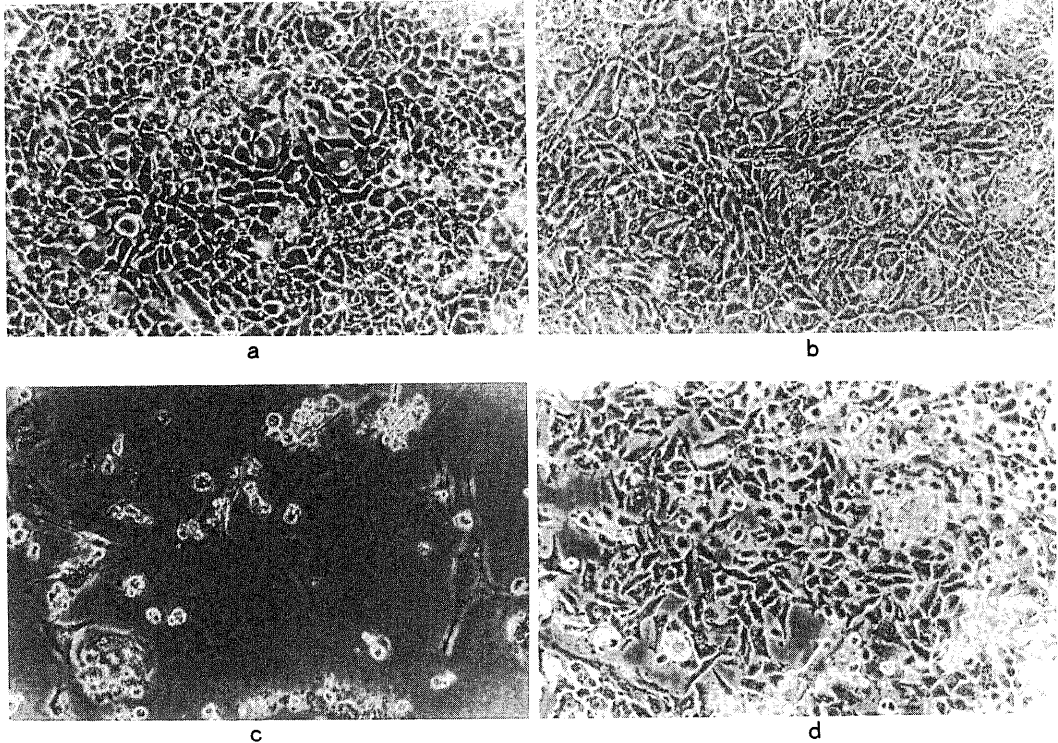


Fig. 4. Histological findings of OST cells treated with high dose of ADR in culture a, untreated (2 weeks later); b, untreated (6 weeks later); c, treated with ADR (2 weeks later); d, treated with ADR (6 weeks later).

図4はADR除去2週間後及び6週間後の細胞像を、非処理の対照群細胞像と対比したものである。ADR処理2週間後では、細胞数の減少、核の巨大化及び胞体の膨化が著明であるが、6週間後では、一部に巨大細胞がみられるものの、多くは紡錘形の正常な形態を保ち、ほぼ対照群に類似した細胞所見であった。

2. ADR処理を2回反復したOST株細胞の増殖動態

前項の実験において、OST細胞を高濃度のADRで処理した場合、薬剤除去6週間後の生細胞数は、ほぼ非処理対照群のそれに近似していることが観察された。そこで6週間目の細胞集団(ADR-R I)を集め、これを再度ADRに接触せしめた場合の増殖動態について検討した。

1) 生細胞数

ADR-R I細胞を再び高濃度のADRに接触せしめた場合、その増殖経過のパターンは、ほぼ原OST細胞におけるそれと同様の抑制効果がみられた。しかし、低濃度ADR処理では、ほとんど増殖抑制効果はみとめられず、対照群における増殖経過とほぼ同様であった(図5)。

2) DNAヒストグラムと細胞像

ADR除去48時間後の細胞群のDNAヒストグラムでは、非処理対照群において若干の3C増加傾向がみられたものの、両者ほぼ同一のパターンであった。

また、細胞像においても、両者間にみるべき差異はなかった(図6)。

3. ADR処理を5回反復したOST株細胞の増殖動態

ADR高濃度で1回処理後、なお増殖した6週間目のOST細胞群(ADR-R I)を、さらに高濃度ADRに40時間接触せしめ、薬剤除去後6週間目の細胞集団(ADR-R II)と、ひきつづきADR-R IIをさらに同様の処理を3回反復した後の細胞集団(ADR-R V)について、これらの細胞群の増殖動態を比較したのが図7である。

低濃度のADRで処理した両者細胞群では、ADR処理を施さない両者細胞群の増殖とそれぞれ同様の経過を辿り、ADRによる抑制はまったく認められなかった。ところがADR-R II及びADR-R V細胞をそれぞれ高濃度ADRで処理した場合、前者では薬剤除去後まもなく著明ではないが増殖抑制効果が認められたのに対し、後者では、ほとんど増殖抑制効果は認められず、非処理対照群及び低濃度処理群の増殖とほぼ同一の経過を示した。このようにADRによる処理回数を重ねるともなると、抑制効果が減弱する傾向がみられたことからOST細胞がADRに対し耐性を獲得したことが推測された。

一方、DNAヒストグラムについては、ADR低濃度作用群において、ADRによる処理回数と無関係に非

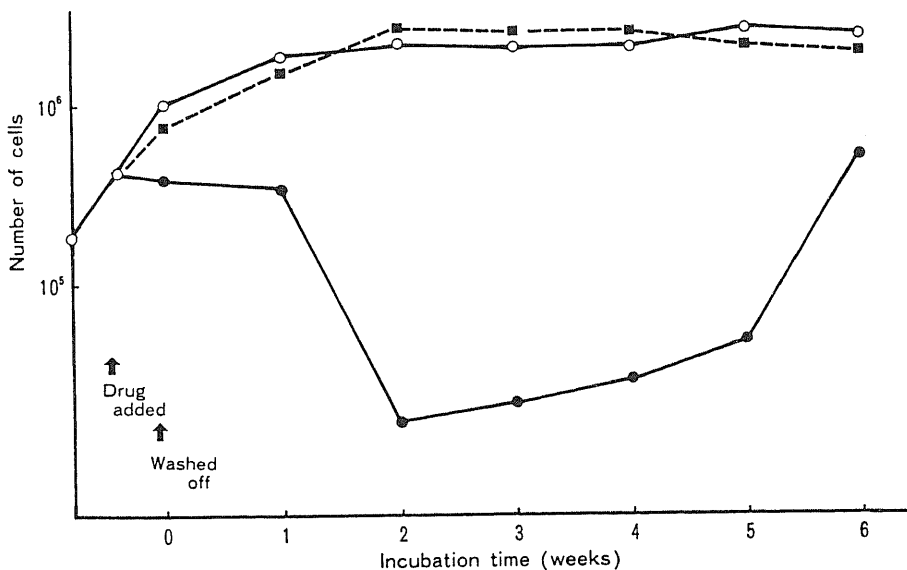


Fig. 5. Growth profiles of ADR-resistant cells (ADR-R I) treated with ADR in high or low concentrations.

○—○, untreated; ●—●, high dose of ADR; ■·····■, low dose of ADR.

The results are shown as mean of three dishes.

処理対照群とほぼ同様のパターンを示したが、高濃度作用群で2Cの増加が早期に認められる傾向にあった。

#### 4. ADR-R I細胞のMTX及びVCRに対する感受性

次にADR-R I細胞群に対するMTX及びVCRの抑制効果を検討して得られた成績は、図8及び図9に示した。原OST株細胞に対しては、MTXの作用濃度に応じて若干の抑制効果がみられたが、ADR-R I細胞に対しては、MTXの高濃度及び低濃度、いずれの作用群においても、増殖抑制効果はまったく認められず(図8)、またDNAヒストグラム及び細胞所見においても、G<sub>1</sub>期及びS期への影響などはまったく認められなかった。一方、VCR作用群でも、作用濃度のいかんにかかわらず、MTXにおけるまったく同様の成績がえられ(図9)、DNAヒストグラムにおけるG<sub>2</sub>+M期の蓄積、また細胞像でもmetaphase arrestを示すような所見はえられなかった。以上の成績から、ADR-R I細胞では、MTX及びVCRに対する交叉耐性がう

かがわれた。

#### 5. ADR耐性OST株細胞(ADR-R V)のADR及びACRに対する感受性とC<sub>a</sub>拮抗剤による抑制効果の増強

ADRに耐性化したOST細胞に対し、ADRと同系化合物であるACRを単独作用せしめた場合、並びにこのADR耐性細胞に対しADRとC<sub>a</sub>拮抗剤ベラパミールを併用した場合の成績は、図10に示した。本図にみられるように、ACRの低濃度作用群ではADR同様、まったく抑制効果はみられず、非処理対照群とほぼ同一の増殖経過を示した。ACRの高濃度作用群では、抑制効果は認められたものの、著明ではなく、この場合もまたADRの高濃度作用群とほぼ同一の経過を示した。

DNAヒストグラム及び細胞像所見でも特に差異は認められなかった。一方、ADRにベラパミールを併用した群では、ADRが低濃度であるのに僅かとはいえ、明らかに抑制効果が認められた。DNAヒストグラムでは、2Cの立ち上り及びそのピークの増高の遅延がみ

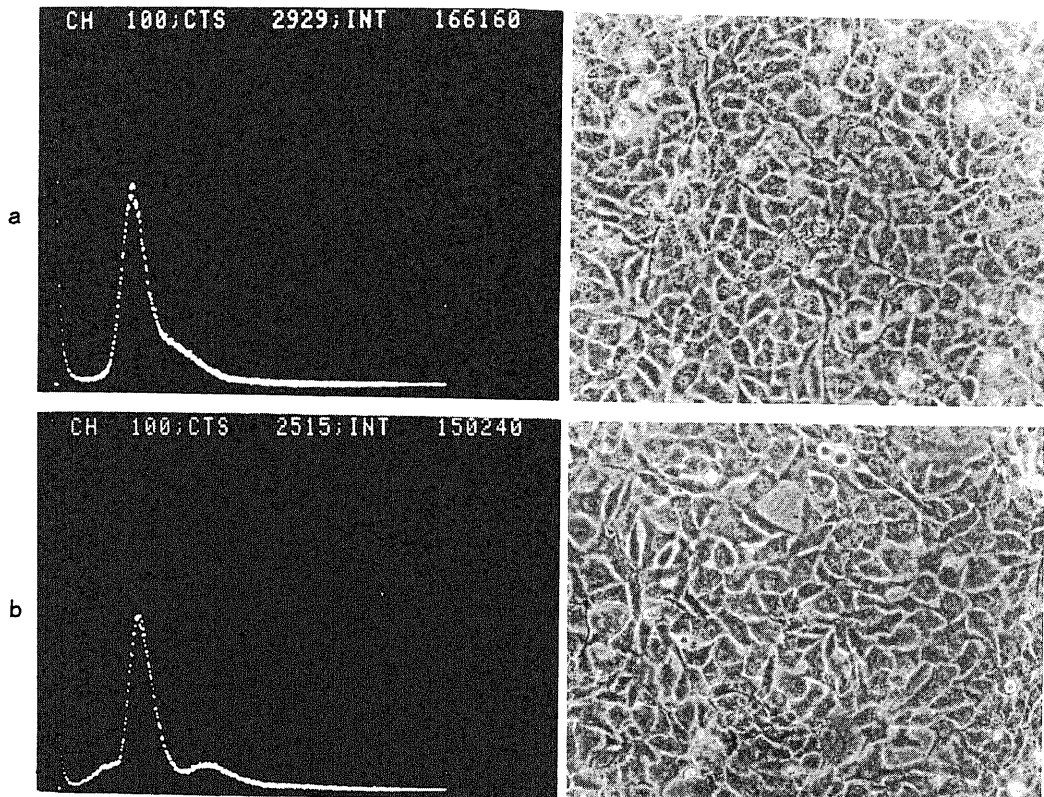


Fig. 6. DNA histograms and histological findings of ADR-resistant cells (ADR-R I) treated with ADR in low concentration.

a, untreated; b, low dose of ADR (48 hours later).



られ、高濃度 ADR 作用群のそれと類似のパターンを示した。このことは、ADR に耐性となった骨肉腫細胞に対しても  $C_{50}$ 拮抗剤の有用性が示唆された。

6. ADR 耐性 OST 株細胞 (ADR-R V) の CDDP に対する感受性

ADR 及び ACR は、ともに DNA と結合 (inter-

calation) することによって細胞毒性を示すことが知られているが、これらアントラヒノン系化合物と異なる DNA binder としての CDDP に対する ADR 耐性細胞の感受性を検討した。図 11 にみられるように、原 OST 細胞は、CDDP の高、低いずれの作用濃度でもまったく感受性を示さなかったが、ADR 耐性細胞に

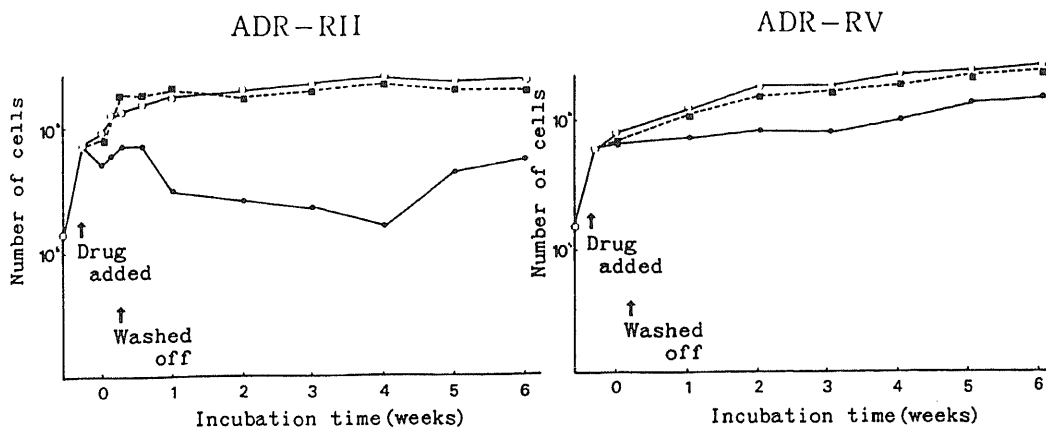


Fig. 7. Growth profiles of ADR-resistant cells (ADR-R II and ADR-R V) treated with ADR.  $\circ$ — $\circ$ , untreated;  $\bullet$ — $\bullet$ , high dose of ADR;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , low dose of ADR. The results are shown as mean of three dishes.

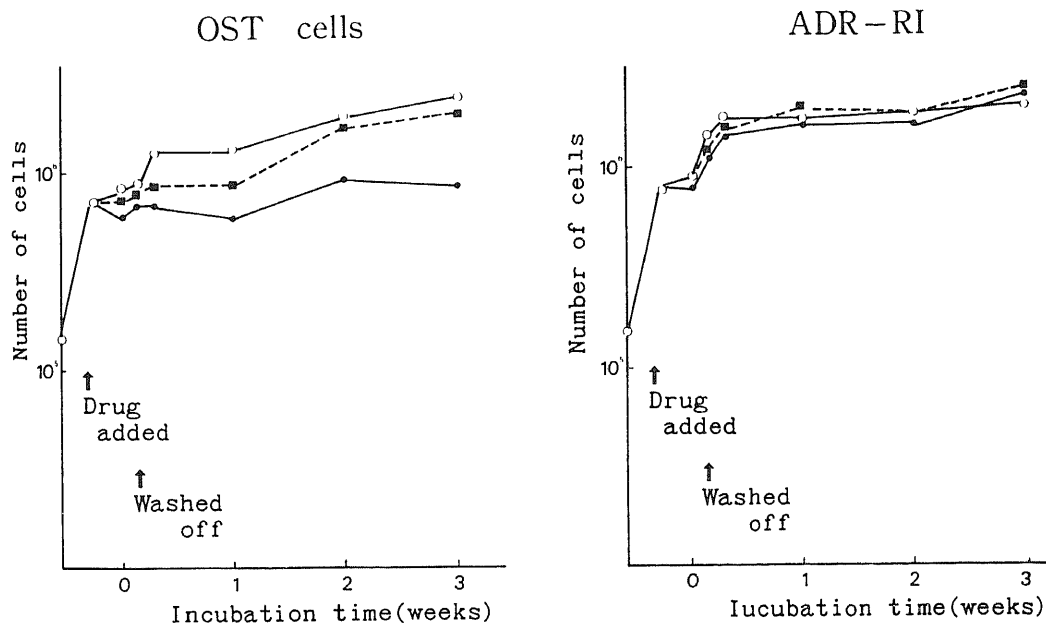


Fig. 8. Growth profiles of parent OST cells and ADR-resistant cells (ADR-R I) treated with MTX in high or low concentrations.  $\circ$ — $\circ$ , untreated;  $\bullet$ — $\bullet$ , high dose of MTX;  $\blacksquare$ — $\blacksquare$ , low dose of MTX. The results are shown as mean of three dishes.

対しては微弱ではあるが感受性が示された。

### 考 察

本研究は骨肉腫の化学療法においてその有用性が評価されている ADR を中心として、耐性出現の機構とその対策の問題を骨肉腫培養細胞株の実験モデルにおいて検討したものである。

まず教室保存の OST 株細胞の培養直後の 2C 単峰性パターンは、プラトー相にある細胞を継代したためと考えられ、その後の細胞増殖に一致して 3C 及び 4C のピークが出現し、細胞数がほぼ一定に達した 2 週間目における細胞群の DNA ヒストグラムは再び単峰性パターンとなっていることからみて、3C 及び 4C の部分は増殖相を忠実に反映しているものと考えられる。すなわち、DNA ヒストグラムと細胞増殖曲線の間には有意の相関関係が存在するものといえる。

ADR はアントラサイクリン系抗生物質であり、DNA 鎖と架橋形成 (cross linking)、あるいは“はまりこみ” (intercalation) することによって DNA の複製、あるいは RNA 合成の阻害をきたし、その結果として細胞毒性、すなわち制癌効果を発揮するものであるが、特に S 期細胞が強い感受性を示すとされとい

る<sup>16)17)</sup>。ADR 高濃度作用群における、DNA ヒストグラムで、3C 単峰性のパターンから 4C 単峰性パターンに移行したことは、まず S 期における細胞集団が ADR の影響を受けて、細胞回転の停止がおり、次いで薬剤除去によって再び G<sub>2</sub>+M 期への細胞回転が始まったためのもと考えられる。その後、4C 単峰が比較的平坦なパターンに変化したことは Barlogie ら<sup>18)</sup>、太田ら<sup>19)</sup>及び高本ら<sup>20)</sup>が報告しているように、不可逆的な G<sub>2</sub>蓄積、すなわち細胞が ADR の作用を受けて G<sub>1</sub>期への進行が不可能となり、いわゆる interphase death を生じたものと考えられる。さらに培養を継続すると、まもなく 2C の立ち上りがみられ、薬剤除去後 6 週間後に至って正常の DNA ヒストグラムのパターンへ復帰したことについては、1) ADR の殺細胞作用により急激に細胞減少がおり、その結果非増殖相にあった細胞、すなわち G<sub>0</sub>期細胞が細胞回転に呼び込まれた (recruitment 現象) こと、2) ADR により大多数の感受性細胞が消失し、少数の遺伝的に ADR 耐性であった細胞が選択的に生き残り、再び増殖を開始したこと、あるいは、3) 何らかの機序によって一過性に環境適合が起り、ADR に耐性を獲得した細胞が再び増殖を始めたこと、などが推測される。

しかしながら、ADR で 1 回処理後に生存し、増殖し

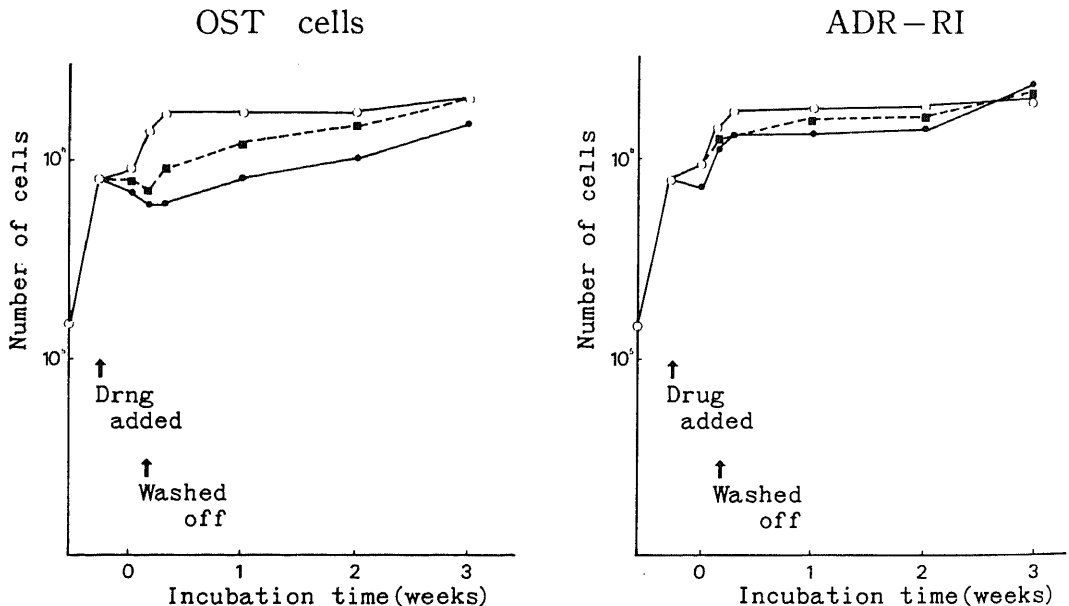


Fig. 9. Growth profiles of parent OST cells and ADR-resistant cells (ADR-R I) treated with VCR in high or low concentrations.

○—○, untreated; ●—●, high dose of VCR; ■……■, low dose of VCR.  
The results are shown as mean of three dishes.

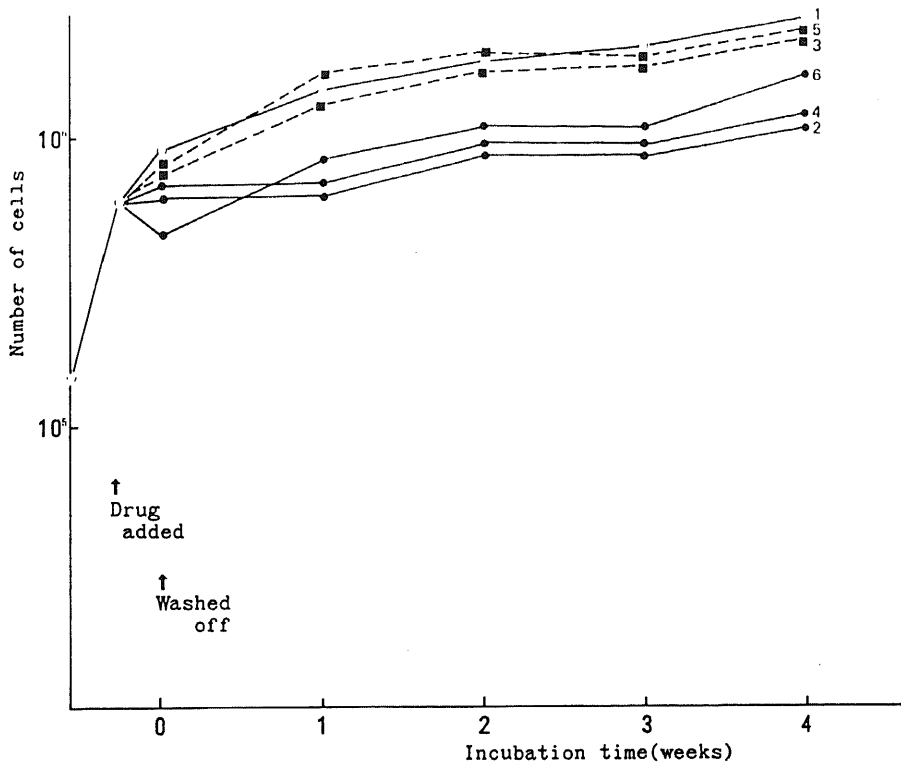


Fig. 10. Responsiveness of ADR-resistant cells (ADR-R V) to various anticancer agents. ○—○(1), none (control); ●—●(2), high dose of ADR; ■····■(3), low dose of ADR; ●—●(4), high dose of ACR; ■····■(5), low dose of ACR; ●—●(6), low dose of ADR plus verapamil. The results are shown as mean of three dishes.

OST cells

ADR-RV

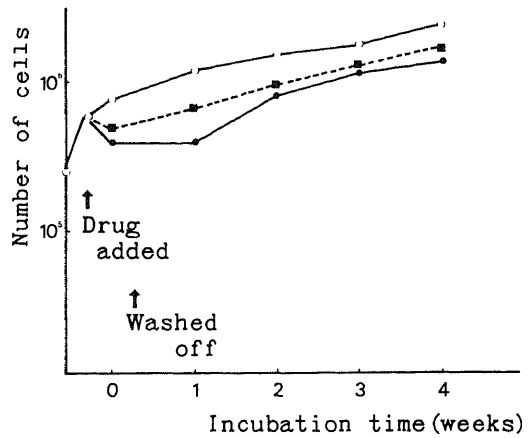
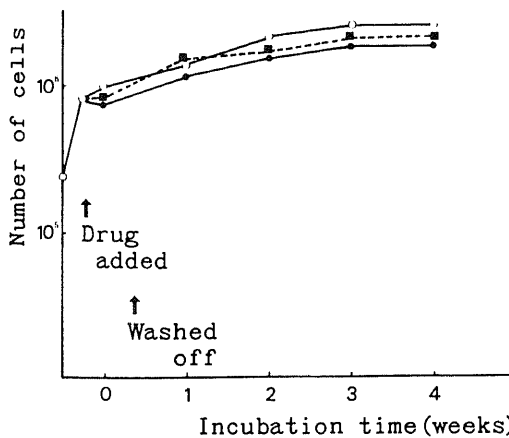


Fig. 11. Sensitivity of ADR-resistant cells (ADR-R V) to CDDP. ○—○, none (control); ●—●, high dose of CDDP; ■····■, low dose of CDDP. The results are shown as mean of three dishes.

た細胞群 (ADR-R I) については、高濃度の ADR 処理後において、原 OST 細胞の薬剤感受性パターンとほとんど同様であることから、これは稲葉<sup>21)</sup>による仮性耐性の状態にあったものと想像される。従ってこの細胞群は遺伝子的に ADR 耐性を示す細胞群ではなく、何等かの機序によって一過性に環境に適合し、ADR 耐性を獲得したものと考えられるのが妥当かと思われる。しかし、一方において低濃度作用群では、ADR に対する感受性がまったく認められなかったことからみると、もともと OST 株の細胞集団中に ADR 耐性細胞が含まれている可能性も否定できないようである。次に ADR で 1 回処理後増殖した細胞群 ADR-R I をさらに ADR の高濃度下で 2 回、3 回、4 回及び 5 回の処理を施してえられた細胞群、ADR-R II, ADR-R III, ADR-R IV, 及び ADR-R V について、それらの増殖動態を比較すると、ADR 処理回数が多い細胞群ほど、非処理対照群に近似した増殖経過を示した。これは ADR 処理という selection pressure により ADR 感受性細胞が漸次減少し、相対的に耐性細胞が優位になったものと考えられる。今後さらに同様の処理操作を繰り返し行うことによって感受性細胞が完全に消失し、耐性細胞のみのクローンがえられることが充分予想される。同様に Johnson ら<sup>22)</sup>は P388 白血病細胞の培養系において ADR 処理を計 12 回することによって完全耐性を獲得した細胞のクローン化が可能であると報告している。

ADR-R V 細胞群のように、ADR 処理を数回反復した細胞群の DNA ヒストグラムにおいて、2C の立ち上がりが薬剤除去後早期に現れるのは、感受性細胞の減少と相対的に耐性細胞が増加することによって、薬剤処理を施したにもかかわらず本来の細胞回転が進行したためと考えられる。

次に ADR-R I 細胞群の MTX または VCR に対する感受性をしらべたところ原 OST 株細胞群の場合とは明らかに異なり、薬剤処理後の細胞増殖曲線では、非処理対照群との間に有意な差異を認めず、また DNA ヒストグラムにおいてもまったく対照群細胞のパターンとほぼ同様であった。このことは ADR-R I 細胞が、MTX 及び VCR と交叉耐性にあることが示唆され、さらに ADR 耐性細胞は ADR 誘導体はもとより、DNA 結合性抗生物質、さらには分裂毒など作用機序の異なる薬剤にも交叉耐性を示すことが多いという報告<sup>23)-26)</sup>に一致した知見であるといえる。

ところで、従来から薬剤耐性細胞の生物学的特色の一つとしてあげられていることは、膜機能の異常である。遺伝的にしろ、獲得されたものにしろ、このような薬剤耐性化した悪性腫瘍細胞では、制癌剤の細胞内

への取り込みが抑制されているため<sup>27)-31)</sup>、薬剤の細胞内濃度は低いとされている<sup>30)31)</sup>。そしてベラパミール、レセルピンなどの  $C_a$ 拮抗剤は耐性細胞における制癌剤の取り込みを増加させ、感受性を回復させようとされている<sup>32)33)</sup>。

これらの報告にもとづいて、ADR 耐性 OST 株細胞 (ADR-R V) に対する低濃度 ADR 処理に際し  $C_a$ 拮抗剤 (ベラパミール) を併用したところ、明らかに増殖抑制効果を得ることが可能であるという結果が得られた。さらに併用時の DNA ヒストグラムをみたところ ADR の低濃度処理にもかかわらず高濃度処理の場合に類似したパターンがえられたことは興味深い。

これらのことは、薬剤耐性機構にはカルシウム機能が深く関与していることを支持するものであり、さらには耐性細胞においては  $C_a$ 拮抗剤が細胞内への薬剤の取りこみ量を増加させ、結局これがより強い殺細胞効果につながったものと推測された。

鶴尾ら<sup>32)34)</sup>は制癌剤の細胞外流出機構に細胞内のカルシウムの機能が関与している事を見出し、 $C_a$ 拮抗剤を併用することにより、細胞内の制癌剤濃度が高まることを認めている。特に ADR, VCR に抵抗性を示す細胞、あるいはこれらの制癌剤に対して耐性を獲得した細胞群に対しては、顕著に制癌効果の増強をもたらすことを報告している。

薬剤耐性のメカニズム及びその克服についてはなお多くの研究が必要であるが、もし前記の知見が実地に臨床応用できるようになれば、広範囲の制癌剤との併用も可能となり悪性腫瘍の治療面に大きな期待が寄せられることになろう。

CDDP は、従来の化学療法に抵抗性となった骨肉腫に対し、近年使用されつつある薬剤の一つである。CDDP に対する OST 株細胞群及び ADR 耐性細胞群 (ADR-R V) の感受性は、DNA ヒストグラムでみる限り両者間に著明な差異は認められなかったが、細胞増殖曲線では、明らかに差異が認められ、MTX, VCR とは異なった様相を呈した。すなわち、ADR 耐性細胞群の方がむしろ薬剤効果が強く認められた。このことは、Inaba ら<sup>35)</sup>の collateral sensitivity (随伴感受性) といわれる現象とみなしうるかも知れない。しかし本現象は、現在のところ法則性も再現性もなく、またその機序についても不明な点が多いところから、今後さらに多くの検討が必要であろう。

以上腫瘍細胞の薬剤耐性化現象については、多くの興味ある問題が含まれており、骨肉腫をはじめ諸種の悪性腫瘍の化学療法においてしばしば遭遇する薬剤耐性の問題を克服するには、さらに詳細な研究が必要であると思われる。

結 論

ヒト骨肉腫由来の培養株 (OST 株) を対象とし、ADR と接触した細胞集団の増殖動態及び諸他の制癌剤に対する感受性を、DNA ヒストグラム、生細胞数及び細胞像の観点から検討し、以下の成績を得た。

1. OST 細胞を高濃度及び低濃度の ADR に接触せしめると、薬剤除去後から用量依存的に増殖抑制がみられた。しかし 5 週間後から再び生細胞数の増加がみられ、6 週間後にはほとんど無処理対照群のそれとほぼ同一であった。DNA ヒストグラムでは、定型的な 2 峰性パターンから、3C → 4C の単峰へと移行したが、6 週間後には、正常の細胞回転相がみられた。

2. ADR で処理し、薬剤除去 6 週間後の OST 細胞は、ADR のみならず、MTX 及び VCR に対しても感受性の低下がみられた。また ADR の高濃度下での接触を反復すると、これら制癌剤に対する感受性はさらに低下した。

3. 一方、ADR、MTX、VCR に抵抗性を示した細胞は、CDDP に対してはむしろ高い感受性を示した。

4. またこの ADR に抵抗性を示す細胞群には、ADR と C<sub>6</sub>拮抗剤を併用することにより、その増殖は明らかに抑制された。

以上の結果から、ヒト骨肉腫培養細胞株 (OST 株) には ADR に対する遺伝的耐性細胞が存在し、頻回の ADR 処理により高度の ADR 耐性を獲得するものと考えられた。またこの細胞群は MTX、VCR に対しても交叉耐性を示すこと、しかし CDDP に対しては随伴感受性を示すことが明らかにされた。

骨肉腫の治療には、このような薬剤耐性の克服手段として随伴感受性を示す薬剤の選択、あるいは C<sub>6</sub>拮抗剤の併用投与の有用性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、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勝郎助教授、ならびに金沢大学整形外科骨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。

本論文の要旨は第 12 回整形外科基礎研究会及び第 64 回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

本研究の一部は昭和 59 年度文部省科学研究費補助金 (C) 59570633 号の援助を受けたことを感謝いたします。

文 献

1) 富田勝郎: 骨肉腫に対する Methotrexate-Citrorum Factor 大量療法の経験。小児がん, 13, 117-123 (1979).

2) 富田勝郎・野村 進・島 巖・宗広忠平・中村孝・野村忠雄・山田義夫・清水俊治・千葉英史・林 正岳・横川明男・松原藤継・樋口雅章・杉木繁隆: 原発性骨肉腫およびその肺転移巣に対する methotrexate-citrovorum factor 大量療法の概要とその評価。整形外科, 32, 1019-1028 (1981).

3) Van Dilla, M. A., Trujillo, T. T., Mullancy, P. F. & Coulter, J. R.: Cell microfluorometry a method for rapid fluorescence measurement. Science, 163, 1213-1214 (1968).

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

5) Yatanagas, X. & Clarkson, B. D.: Flow microfluorometric analysis of cell killing with cytotoxic drugs. J. Histochem. Cytochem., 22, 651-659 (1974).

6) 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).

7) 太田和雄・高本 滋・御供泰治: DNA 瞬間自動測定装置。癌と化学療法, 4, 179-184 (1977).

8) 高本 滋・加藤武俊・太田和雄: F, M, F, による制癌剤の作用機序に関する研究 (第 1 報) - MFC 療法を中心に -。癌と化学療法, 5, 145-153 (1978).

9) 太田和雄・高本 滋: 細胞回転と制癌 - 化学療法の立場から -。癌の臨床, 27, 1499-1506 (1981).

10) 林 正岳: <sup>86</sup>Sr 誘発骨肉腫マウスに対する High dose methotrexate chemotherapy の検討。中部整災誌, 26, 2017-2031 (1983).

11) 平井 純・富田勝郎・林 正岳・三平伸一・横川明男・野村 進: ヒト骨肉腫由来培養細胞株 (OST strain) における抗癌剤の Cell cycle に及ぼす影響 (Flowcytometry を用いて)。中部整災誌, 26, 716-721 (1983).

12) 三平伸一・富田勝郎・林 正岳・平井 純・紺谷悌二・横川明男・下崎英二・野村 進: Flowcytometry を用いた抗癌剤併用投与による、細胞周期の変動と作用効果に関する研究 - OST strain をもちいて -。中部整災誌, 27, 315-318 (1984).

13) 高瀬武平・山崎安朗・井村慎一・安元三郎・布谷猛・森田聖一・宮沢洋一・荒川弥二郎・高田克弘・山田清夫: 組織培養法によるヒト骨肉腫の研究。中部整災誌, 7, 577-589 (1964).

14) 羽柴秀雄: <sup>3</sup>H-Thymidine microauto

radiography によるヒト骨腫瘍由来細胞の研究. 中部  
 整災誌, 11, 347-368 (1968).

15) Krishan, A., Pitman, S. W., Tattersall, M.  
 H. N., Paika, K. D., Smith, D. C. & Frei, E.:  
 Flow microfluorometric patterns of human bone  
 marrow and tumor cells in response to cancer  
 chemotherapy. *Cancer Res.*, 36, 3813-3820 (1976).

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

17) 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).

18) Barlogie, B., Drewinco, B., Johnston, D.  
 A. & Freireich, E. J.: The effect of adriamycin on  
 the cell cycle traverse of a human lymphoid cell  
 line. *Cancer Res.*, 1975-1979 (1976).

19) 太田和雄・御供奏治・高本 滋: 癌細胞の動態と  
 治療法との関係. 癌の制圧—最近の治療学—, 癌の科学,  
 5, 19-46頁, 南江堂, 東京, 京都, 1979.

20) 高本 滋・太田和雄: 抗癌性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).

21) 稲葉 実: 癌細胞の薬剤耐性に関する一般の考  
 察. 癌と化学療法, 9, 165-176 (1982).

22) Johnson, R. K., Ovejera, A. A. & Goldin, A.:  
 Activity of anthracyclines against an adriamycin  
 (NSC-123127)-resistant subline of P388 leukemia  
 with special emphasis on cinerubinA (NSC-18334).  
*Cancer Treat. Rep.*, 60, 99-102 (1976).

23) 稲場 実: 癌細胞の薬剤耐性機序. *Oncologia*, 7,  
 79-91 (1983).

24) 稲場 実: Anthracycline 系抗生物質耐性発現  
 の機序とその克服についての試み. 癌と化学療法, 6,  
 41-48 (1980).

25) Wilkoff, L. J. & Dulmage, E. A.: Resist-  
 ance and cross resistance of cultured leukemia P388  
 cells to vincristine, adriamycin, adriamycin analog  
 and actinomycin D. *J. Natl. Cancer Inst.*, 61, 1521-  
 1524 (1978).

26) Johnson, R. K., Chitnis, M. P., Embrey, W.  
 M. & Gregory, E. B.: In vivo characteristics of  
 resistance and cross-resistance of an adriamycin-  
 resistant subline of P388 leukemia. *Cancer Treat.  
 Rep.* 62, 1535-1547 (1978).

27) Skipper, H. E., Hutchison, D. J., Schabel, F.  
 M. Jr., Schmidt, L. H., Goldin, A., Brockman, R.  
 W., Venditti, J. M. & Wodinski, I.: A quick  
 reference chart cross resistance between anticancer  
 agents. *Cancer Chemother.* 56, 493-498 (1972).

28) Giavazzi, R., Scholar, E. & Hart, I. R.:  
 Isolation and preliminary characterization of an  
 adriamycin-resistant murine fibrosarcoma cell line.  
*Cancer Res.* 43, 2216-2222 (1983).

29) Inaba, M. & Johnson, R. K.: Uptake and  
 retention of adriamycin and daunorubicin by  
 sensitive and anthracycline resistant subline of  
 P388 leukemia. *Biochem. Pharmacol.*, 27, 2123-2130  
 (1977).

30) Chitnis, M. P. & Johnson, R. K.: Bio-  
 chemical parameters of resistance of an  
 adriamycin-resistant subline of P388 leukemia to  
 emetine, an inhibitor of protein synthesis. *J. Natl.  
 Cancer Inst.*, 60, 1049-1054 (1978).

31) Ganapathi, R., Reiter, W. & Krishan, A.:  
 Intracellular adriamycin levels and cytotoxicity in  
 adriamycin-sensitive and adriamycin-resistant P388  
 mouse leukemia cells. *Jnci.*, 68, 1027-1032 (1982).

32) 鶴尾 隆: 制がん剤の膜輸送カルシウム機能修  
 飾物質による効果増強と耐性の克服. 蛋白質核酸酵素,  
 28, 865-871 (1983).

33) Inaba, M., Fukui, M., Yosida, N., Tsukagosi,  
 S. & Sakurai, Y.: Collateral sensitivity of 6-  
 mercaptopurine-resistant subline of P388 and L1210  
 leukemia to the new purine antagonists, 5-  
 carbamoyl-1H-imidazol-4-yl piperonylate and 4-  
 carbamoylimidazolium 5-olate. *Cancer Res.*, 42,  
 1103-1106 (1982).

34) 鶴尾 隆: 細胞カルシウムと癌化学療法. 癌と癌  
 化学療法, 8, 1833-1843 (1981).

**Cell Proliferation Kinetics and Drug Sensitivity of Osteosarcoma Cells Treated in Culture with Adriamycin** Teiji Kontani, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. J. J. Soc., **95**, 222–235 (1986)

**Key words:** DNA histogram, osteosarcoma, ADR-resistant cells, cross resistance, collateral sensitivity

#### Abstract

The purpose of this study was to develop the useful informations about the adjuvant chemotherapy of osteosarcoma, involving the experiments in which the sensitivity of osteosarcoma cells treated with adriamycin (ADR) repeatedly to methotrexate (MTX) or vincristine (VCR) or aclacinomycin A (ACR) or cisplatin (CDDP) and the growth profiles of them were examined by estimating DNA histogram, viable cell number and cytological changes.

OST cell line which was derived from human origin and maintained in our laboratories was used as an experimental target. When OST cells were exposed in nutrient medium to high doses of ADR at 37°C for 40 hours, followed by washing out of the drug, the growth of sarcoma was strongly inhibited for 3 weeks. After 6 weeks from the removal of ADR, the sarcoma cells reversed to normal cell cycle and the viable cells exponentially increased to be comparable to that of the untreated control group. However, the sensitivity of the reversed sarcoma cells to ADR remarkably decreased by repeating the treatment with ADR as mentioned above. The ADR-treated cells which survived were also found to be resistant to MTX or VCR or ACR, which has been commonly used in the treatment of osteosarcoma. On the contrary, the sarcoma cells resistant to ADR as well as ACR were proved to increase in sensitivity to CDDP. These results revealed that parent OST cells might include partially genetic resistant cells to ADR and these ADR-resistant cells have cross resistance to MTX or VCR or ACR and collateral sensitivity to CDDP.

Meanwhile, combined treatment with ADR and Ca-antagonist, verapamil, which is considered to promote in uptake or to inhibit in efflux of anticancer agents into tumor cells, resulted in increasing the inhibition of the sarcoma cell growth.

From the results obtained, it is suggested that the choice of anticancer agents which bring about collateral sensitivity is essential, and the efficacy of the combined use of Ca-antagonist with anticancer agent to overcome the drug resistance is emphasized for chemotherapy of osteosarcoma.