

抗腫瘍剤による細胞同調の研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大竹, 茂樹 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9073

抗腫瘍剤による細胞同調の研究

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

大 竹 茂 樹

(昭和58年3月26日受付)

抗腫瘍剤による細胞同調 (synchronization) を行い、その成立機序を明らかにするために Ehrlich 腹水癌細胞移植マウスを用いて、1-β-D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C), N⁴-behenoyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosine (BH-AC), methotrexate (MTX), vincristine (VCR), および daunorubicin (DNR) について検討した。synchronization 時の細胞回転の動態 (cell cycle progression) を ³H-thymidine 標識率 (LI), ³H-裂指数 (MI) および autoradiography と cytophotometry を併用して得た DNA ヒストグラムを用いて解析した。DNA 合成期 (S 期) 流入量 (S-inf) および S 期流出量 (S-eff) は半定量的に求めた。Ara-C (0.5 mg/kg), BH-AC (0.1 mg/kg) および MTX (0.25 mg/kg) は一過性の LI の上昇により S 期に、VCR (0.0025~0.25 mg/kg) は MI の上昇により細胞分裂期 (M 期) に、DNR (1.0 mg/kg) は分裂前体止期 (G₂ 期) に synchronize することが示された。この時の投与量では殺細胞効果は見られなかった。Ara-C, BH-AC および MTX は投与後 0~8 時間の間 S-eff を強く抑制したが、S-inf は 0~4 時間の間抑制され、4~8 時間後には対照値を越えて回復した。VCR は metaphase arrest を示し、S-eff には影響を与えなかった。分裂終期像がなく S-inf は求められなかったが、DNA ヒストグラムの変化から、S 期の流入量には変化がないようであった。DNR は S-inf, S-eff をともに変化させず、MI の減少があり、DNA ヒストグラムでは G₂ 期の増加がみられた。以上により synchronization はある細胞周期への流入量と流出量の不均衡により引き起こされることが示された。したがって、synchronization の成立する要因は、薬剤による cell cycle progression の変化のみならず、腫瘍細胞自身の細胞動態にも左右されることが示唆された。

Key words Cell synchronization, Cell cycle progression, Cytokinetic analysis, Antineoplastic agents.

急性白血病をはじめ悪性腫瘍の化学療法に関する研究は、Skipper ら¹⁾のマウス白血病 L 1210 細胞を用いた実験的研究結果より導入された“total cell kill”の治療理念を基礎として進められており、着実な成果をあげつつある。一方、ヒト悪性腫瘍細胞では、L 1210 細胞と異なり、成長分画 (growth fraction) の小さいことや、世代時間は正常骨髄細胞のそれより長く、特に体止期にある G₀ 細胞が多いことが明らかになっている²⁾。また、現在広く使用されている抗腫瘍剤の作用様式は悪性腫瘍細胞に特異的に作用するのではなく、正常細胞をも同等に障害する。しかも、その致死効果が細胞回転 (cell cycle kinetics) 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)³⁾⁻⁵⁾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的效果のあること (aga response)⁶⁾⁻⁹⁾が知られている。これらの事実はマウスでの実験結果を臨床に応用するにあたって多くの障害をもたらしている。また、抗腫瘍剤投与によって細胞回転の進行 (cell cycle progression) が影響を受けることも知られている¹⁰⁾¹¹⁾。

悪性腫瘍の治療において治療前の増殖分画の多寡と治療効果の相関は、一部の報告¹²⁾⁻¹⁴⁾を除いておおむね増殖分画の多いもの¹⁵⁾⁻¹⁸⁾や治療経過中に増殖分画の増加するものが¹⁹⁾⁻²¹⁾、治療に良く反応することが報告されている。このことから薬剤を用いて腫瘍細胞を細胞周期のある相に同調させ (細胞同調, 以下 synchronization), その相に強い致死効果を示す抗腫瘍剤を投与することにより治療効果をよりいっそう高めようと

Cytokinetic Analysis of Cell Synchronization by Antineoplastic Agents *in Vivo*. Shigeaki Ohtake, Department of Internal Medicine (III), (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

する試みが急性白血病を中心に他の悪性腫瘍でも報告されている^{15)19)20)22)~27)}。

著者らもサイトシンアラビノシド (1- β -D-arabino-furanosylcytosine, 以下 Ara-C と略) やその誘導体であるビヘノールサイトシンアラビノシド (N⁴-behenoyl-1- β -D-arabinofuranosylcytosine, 以下 BH-AC と略) を用いて、急性非リンパ性白血病において、DNA 合成(S)期部分同調(S phase partial synchronization)を行い、寛解導入効果を検討してきた²⁸⁾²⁹⁾。この中で、synchronization は個々の症例により異なり、必ずしも時期的にも量的にも画一的には起らないことや synchronization 後の化学療法の効果が一一定でないなどの点が明らかになってきた。これは in vivo において抗腫瘍剤によって引き起こされる cell cycle progression の変化が明らかでなく、したがって synchronization の成立する時点の細胞回転の詳細な動態が不明確であり、また、synchronization が悪性腫瘍細胞と正常骨髄細胞で同等に起こるために、化学療法係数を改善し得ないためと考えられた。

本実験では、Ehrlich 腹水癌細胞を用いて、各種抗腫瘍剤による synchronization の過程を経時的に観察し、cell cycle progression の変化について³H-thymidine 標識法と DNA ヒストグラムを組み合わせることにより解析を試みたので報告する。

材料および方法

1. 動物

全実験を通じて体重約 30 g (6~7 週齢) の ddY 系雄白色マウス (三協ラボ) を使用した。5 匹を 1 群として実験した。

2. 腫瘍

金沢大学医学部薬理学教室より分与をうけ当教室にて毎週継代移植されている Ehrlich 腹水癌細胞を用いた。本腫瘍は 4 倍体細胞でリンパ球、中皮細胞などの正常細胞とは、その大きさおよび形態から容易に分別可能であった。腹腔内移植後第 7 日目に癌性腹水を採取し、0.3% チトラート加生理食塩水にて生細胞数を 2.5×10^7 /ml に調整し、 5×10^6 個 (0.2 ml) づつを腹腔内移植した。本腫瘍は Klein らの報告³⁰⁾のごとく、総細胞数の立方根に比例して増加し、第 10 日目にプラトーとなった。各実験は腹腔内移植後第 4 日目に行った。この時の平均世代時間は約 28 時間と推定された。

3. 抗腫瘍剤

Synchronization 作用があると報告されている Ara-C、BH-AC、メソトレキセート (methotrexate, 以下 MTX と略)、ビンクリスチン (vincristine, 以下 VCR と略) および、ダウノルピシン (daunorubicin,

以下 DNR と略) を用いて実験した。各薬剤は所定の様式に従って溶解後、生理食塩水にて希釈し、各濃度とも 0.1 ml/10 g body wt. の投与量となるように腹腔内投与した。対照群には生理食塩水を 0.1 ml/10 g body wt. 腹腔内投与した。

4. in vitro ³H-thymidine 標識法

各薬剤投与直前および投与後一定時間ごとに腹腔穿刺を行い、腹水を 0.02 ml づつ採取し、³H-thymidine (³H-TdR) 標識率 (labeling index, 以下 LI と略)、および分裂指数 (mitotic index, 以下 MI と略) の測定を行った。LI は RPMI 1640 培養液 1 ml に採取細胞を浮遊させ³H-TdR (specific activity 5 Ci/mmol, 日本アイソトープ協会) を 10μ Ci 注入し、30 分間 37°C で孵置した後、3 回洗浄し塗抹標本を作製し autoradiography を行った。MI は腹水採取後すぐに塗抹標本を作製し、ギムザ染色を行った。LI, MI ともに 1,000 個以上の細胞を観察しその百分率であらわした。

5. in vivo 標識法

マウス腹腔内に³H-TdR を 1μ Ci/g body wt. 注入し in vivo 標識を行い、30 分後に各薬剤を投与した。薬剤投与直前、投与後 4 時間および 8 時間後に腹腔穿刺により腹水を採取し、生理食塩水にて 3 回洗浄し塗抹標本を作製した。一部の細胞は trypan blue 色素排泄能より生細胞率を算定した。

6. autoradiography

塗抹標本をメタノールで 30 分間固定後、back ground 減少のため冷過塩素酸液に浸透後、流水でよく洗浄した。これを良く乾燥させ、dipping 法にて 4 倍稀釈した NTB 2 乳剤 (Eastman Kodak) を塗布し、in vitro labeling 法では 1 週間、in vivo labeling 法では 1 ヶ月間暗箱の中で露出した。D 19 現像液 (1:1) にて 15°C 3 分間現像し、冷蒸留水にて停止、フジフィックス (富士フィルム) で 6 分間定着を行い、乾燥後ギムザ染色を施し観察した。銀粒子 5 個以上を標識細胞とした。

7. DNA ヒストグラム

in vivo labeling を行った標本は、写真撮影を行い、標識および非標識細胞を区別して、その位置を記録した (photograph mapping, Fig. 1)。この標本を 5% 三塩化酢酸 (CCl₃COOH) に浸したのち、メタノールに 10 分間浸透し、ギムザ染色を脱色した³¹⁾。10 分間蒸留水中に浸した後 7.5% フェリシアン化カリウム (K₃Fe(CN)₆) に 3 分間浸し、次に 20% チオ硫酸ナトリウム (Na₂S₂O₃) に 3~5 分間浸したのち、3 回水洗し autoradiography の銀粒子を除去した³²⁾。この標本に Feulgen 染色を施した。Feulgen 染色は、標本を 60°C

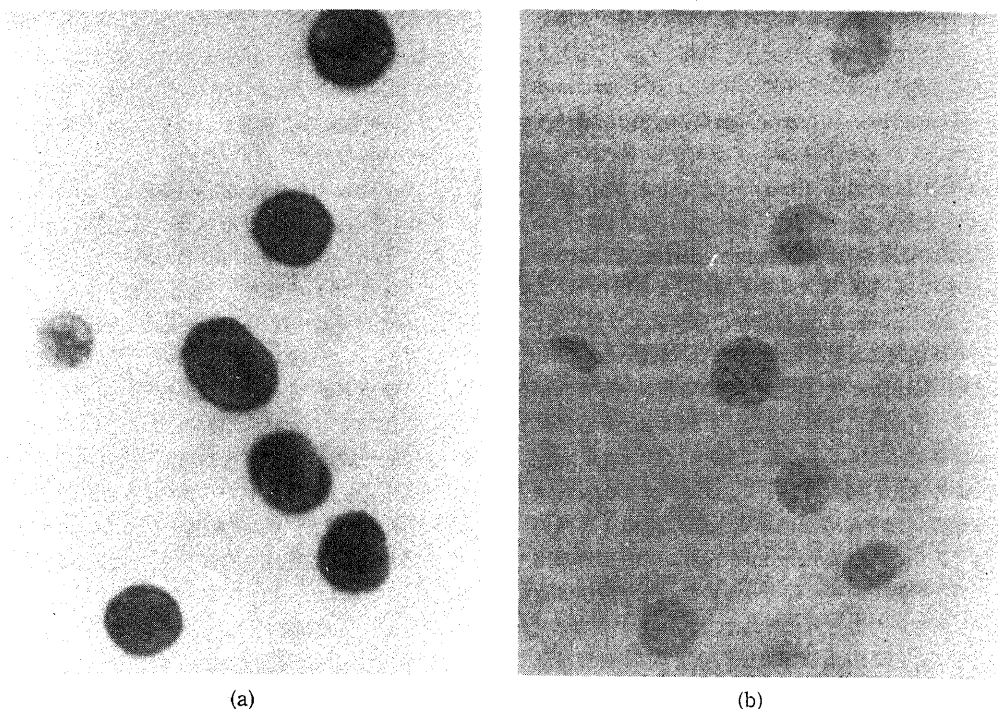


Fig. 1. (a) A part of photographic map for cytophotometry showing 3 labeled and 4 unlabeled cells. (b) The same visual field after removal of Giemsa stain and autoradiographic silver grains and stained by Feulgen reaction.

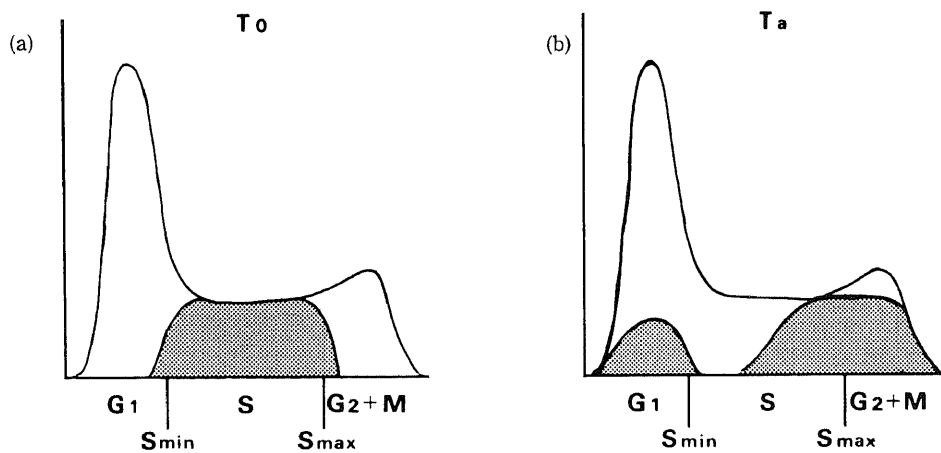


Fig. 2. Schematic representation of pulse labeling and subsequent movement of labeled and unlabeled cells during a waiting time (T_a). (a) Distributions of DNA contents of labeled (shaded) and unlabeled (unshaded) cells at T_0 . (b) Corresponding distributions of DNA contents after a waiting time (T_a). Borderline of DNA content between G_1 and S phase (S_{min}) and that between S and G_2 phase (S_{max}) were conveniently defined. S_{min} is the value of mean plus standard deviation of the DNA content of each daughter nuclei of ana- or telophasic cells. S_{max} is the value of mean minus standard deviation of the DNA content of mitotic cells. S phase influx (S_{inf}) was computed as the average increment per hour in unlabeled S phasic cells during a waiting time, and S phase efflux (S_{eff}) was computed as the average increment per hour in labeled G_2 , M and G_1 phasic cells.

に加温した1N塩酸に5分間浸してDNAを加水分解し、0.5% para-rosaniline-shiff液(Chroma)にて室温で60分間染色し、0.5%亜硫酸水素ナトリウム(NaHSO₃)液にて洗浄した後、型のごとく封入した。Nikon-Vickers M 85 scanning microdensitometerにて波長550 mμ, spot 1 mm 対物レンズ100倍の条件³²⁾³³⁾でそれぞれの標本について、先に作製したphotograph mapと対照しながら、無作為に腫瘍細胞200個のDNA量を測定し、標識または非標識細胞を区別してDNAヒストグラムを作製した。Fig. 2に示したように分裂後休止(G₁)期とS期のDNA量の境界は、anaphaseまたはtelophase細胞の娘核をそれぞれ測定し、そのDNA量の平均値に標準偏差を加えた値とした。S期と分裂前休止(G₂)期のDNA量の境界は分裂(M)期細胞のDNA量を測定し、その平均値から標準偏差を引いたものとした。Olssonら³⁹⁾の方法に従ってS期流入量(S-inf)は単位時間あたりの非標識S期細胞の増加率より算定し、S期流出量(S-eff)は単位時間あたりの標識G₂, MおよびG₁細胞の増加率より算定した。

$$S\text{-inf} = \frac{\% \text{ of nonlabeled S cell at } T_a - \% \text{ of nonlabeled S cell at } T_o}{T_a - T_o}$$

$$S\text{-eff} = \frac{\% \text{ of labeled } G_2, M \text{ and } G_1 \text{ cell at } T_a - \% \text{ of labeled } G_2, M \text{ and } G_1 \text{ cell at } T_o}{T_a - T_o}$$

統計学的検討はStudent's t testを用いp<0.05を有意とした。

成 績

I. ³H-TdR in vitro labeling index (LI)の経時的变化

1. Ara-C: Ara-C 0.05, 0.5および5 mg/kg body wt. (以下mg/kgと略)を1回腹腔内投与した時のLIの経時的变化をFig. 3に示す。対照群ではLIは37~42%の一定値を示した。Ara-C 5 mg/kgでは、投与2~8時間ではLIは著しく抑制され、ほとんど0となった。12時間後より回復が見られ、24時間後には対照群の値を越えた。0.5 mg/kg投与では、2~4時間後まではLIは4.5%まで低下するが、急速に回復し、6~8時間後では対照群の値を有意に上回ってS期細胞の増加がみられた。0.05 mg/kg投与では、LIは2~4時間後には20%まで低下したが、6時間後には対照群の値まで回復した。

2. BH-AC: BH-AC 0.01, 0.1および1.0 mg/kg 1回腹腔内投与時のLIの変化をFig. 4に示す。1.0 mg/kg投与では、LIは12時間後まで半減し以後ゆるやかに回復し、24時間後には対照群の値に回復した。0.1 mg/kg投与では、2時間後LIは31.5%に軽度減少し、6時間後には49.5%と対照群の値を上回り、20時間後まで持続的にLIの上昇が見られた。0.01 mg/kg投与では、2時間後に軽度のLIの減少が見られるのみで、著しい変化は見られなかった。

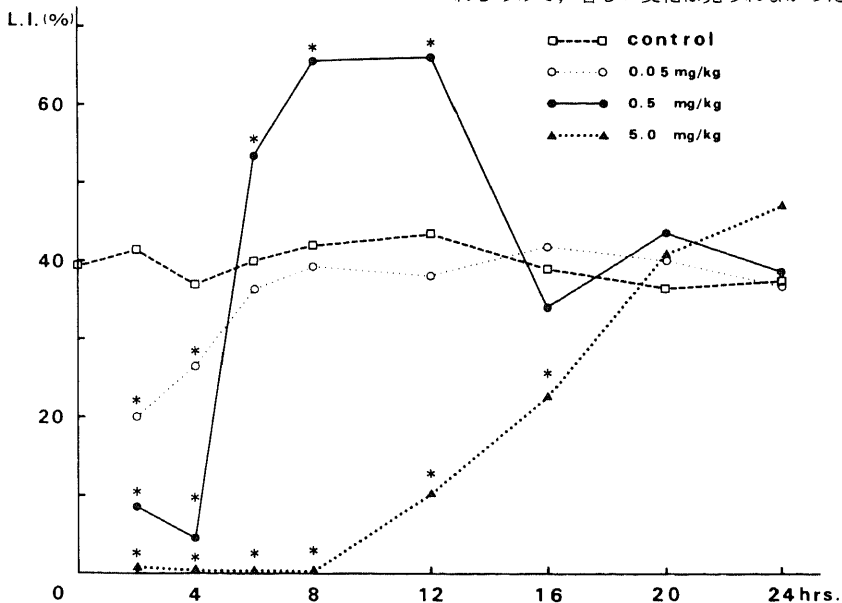


Fig. 3. Effect of a single i. p. injection of Ara-C on ³H-TdR LI of Ehrlich ascites tumors. Each point represents mean value in 5 animals at intervals after Ara-C injection. * : p<0.05 vs control group.

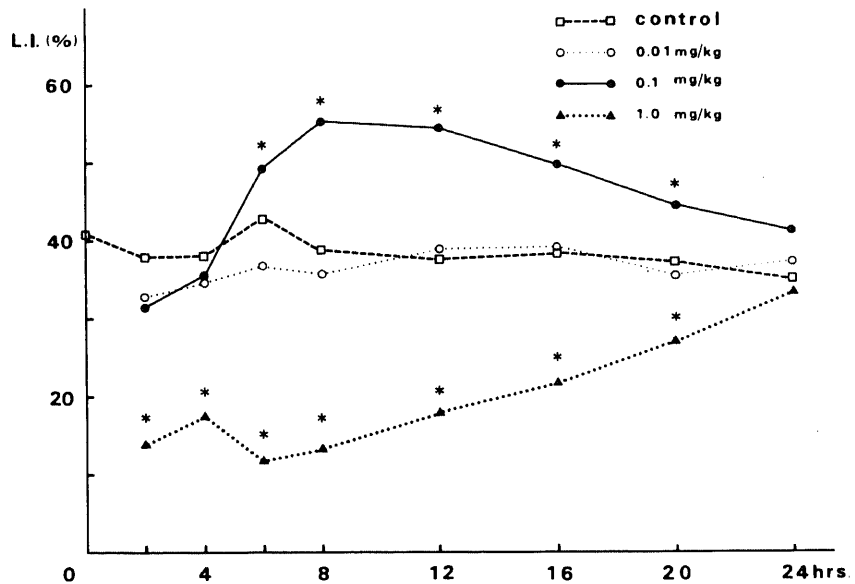


Fig. 4. Effect of a single i. p. injection of BH-AC on ^3H -TdR LI of Ehrlich ascites tumors. Each point represents mean value in 5 animals at intervals after BH-AC injection. * : $p < 0.05$ vs control group.

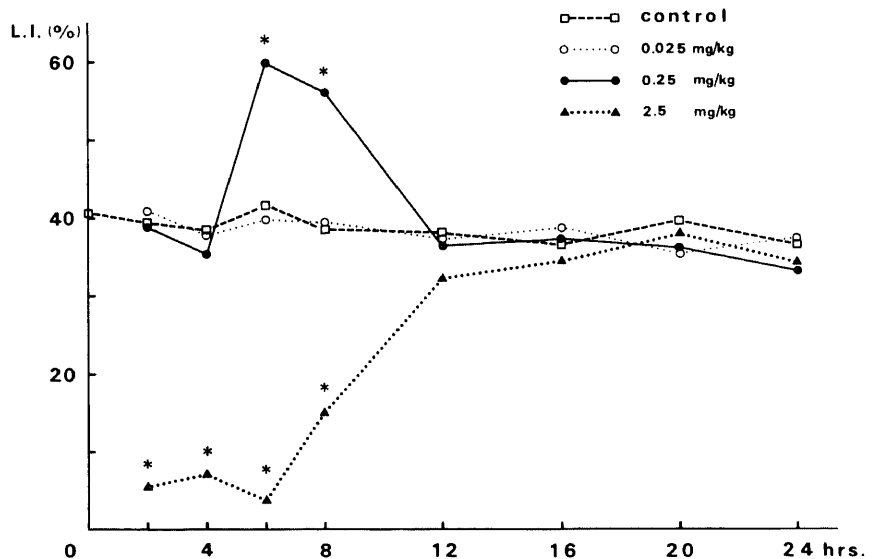


Fig. 5. Effect of a single i. p. injection of MTX on ^3H -TdR LI of Ehrlich ascites tumors. Each point represents mean value in 5 animals at intervals after MTX injection. * : $p < 0.05$ vs control group.

3. MTX: MTX 0.025, 0.25 および 2.5 mg/kg 1 回腹腔内投与した時の LI の経時的変化を Fig. 5 に示す。2.5 mg/kg 投与では LI は 2~6 時間後まで 10% 以下に減少し、以後徐々に回復し 16 時間後には対照群の値に回復した。0.25 mg/kg 投与では 4 時間後まで LI に有意の変化はなく、6 時間後 60% に上昇し、12 時間後には対照群の値まで低下した。0.025 mg/kg 投与

では LI は有意の変化を示さなかった。

4. VCR: VCR は 0.0025, 0.025 および 0.25 mg/kg 投与ともに LI は有意の変化は見られなかった。(図省略)

5. DNR: DNR 0.1, 1.0, 10.0 mg/kg 1 回腹腔内投与時の LI の変化を Fig. 6 に示す。10 mg/kg 投与では LI は 4 時間後より 20% に低下し以後 24 時間後ま

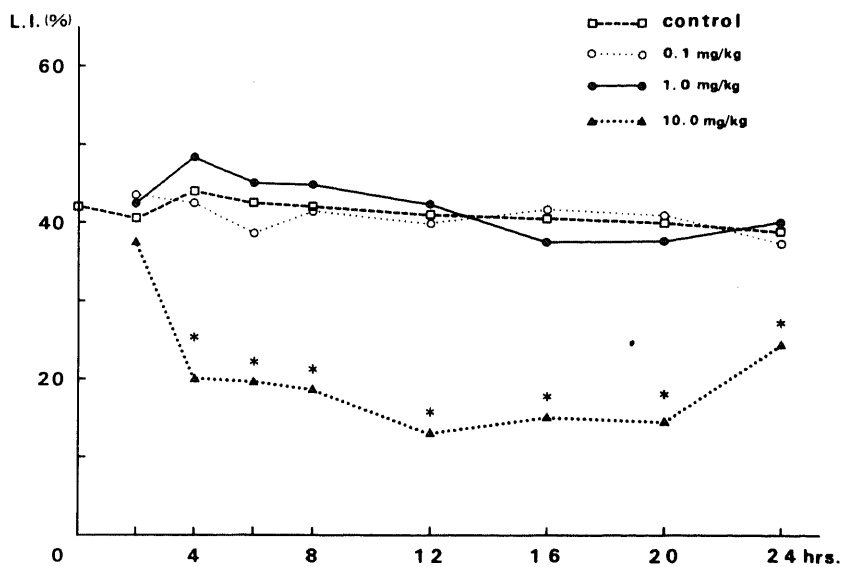


Fig. 6. Effect of a single i. p. injection of DNR on ³H-TdR on ³H-TdR LI of Ehrlich ascites tumors. Each point represents mean value in 5 animals at interval after DNR injection. * : p<0.05 vs control group.

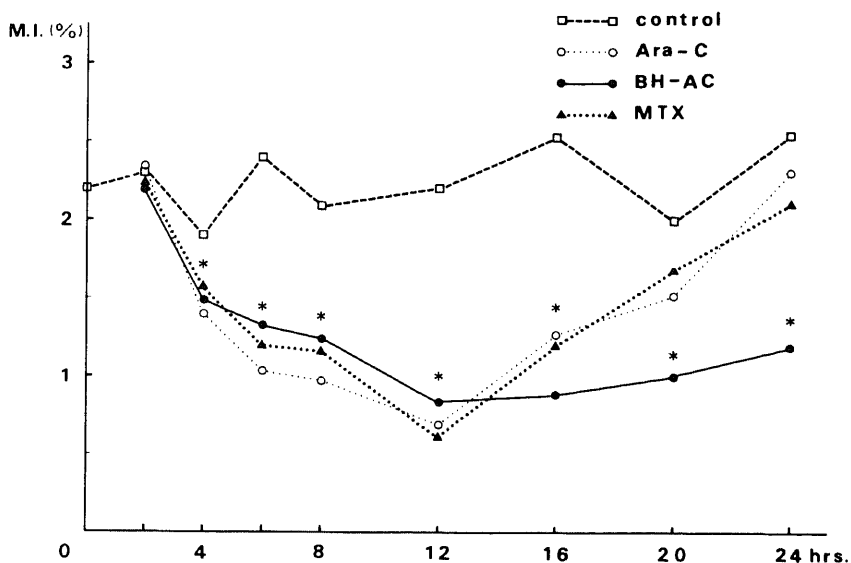


Fig. 7. Effect of a single i. p. injection of Ara-C, BH-AC and MTX on MI at doses of 0.5, 0.1 and 0.25 mg/kg respectively. Each point represents mean value in 5 animals at intervals after injection. * : p<0.05 vs control group.

で持続した。しかし 1.0 および 0.1 mg/kg では LI に有意の変化はみられなかった。

II. 分裂指数 (MI) の経時的変化

1. Ara-C, BH-AC, MTX: LI に著しい変動の見られた Ara-C 0.5 mg/kg, BH-AC 0.1 mg/kg, MTX 0.25 mg/kg 投与時の MI の変化を Fig. 7 に示す。3 剤ともほぼ同じ様な変動を示し、2 時間後では有意の変化はなく 4 時間後より減少し 12 時間まで減少

を続けた。Ara-C, MTX は 24 時間後には対照群の値に回復したが、BH-AC では回復は見られなかった。

2. VCR: VCR 投与時の MI の経時的変化を Fig. 8 に示す。0.25 mg/kg では 2 時間後より MI の上昇があり時間と共に MI の上昇が続き 24 時間後には 13.2% に達した。0.025 mg/kg では、2 時間後より増加し、12 時間後には 11.0% と最高となり、以後減少するが 24 時間後でも 7.8% と上昇していた。0.0025 mg/

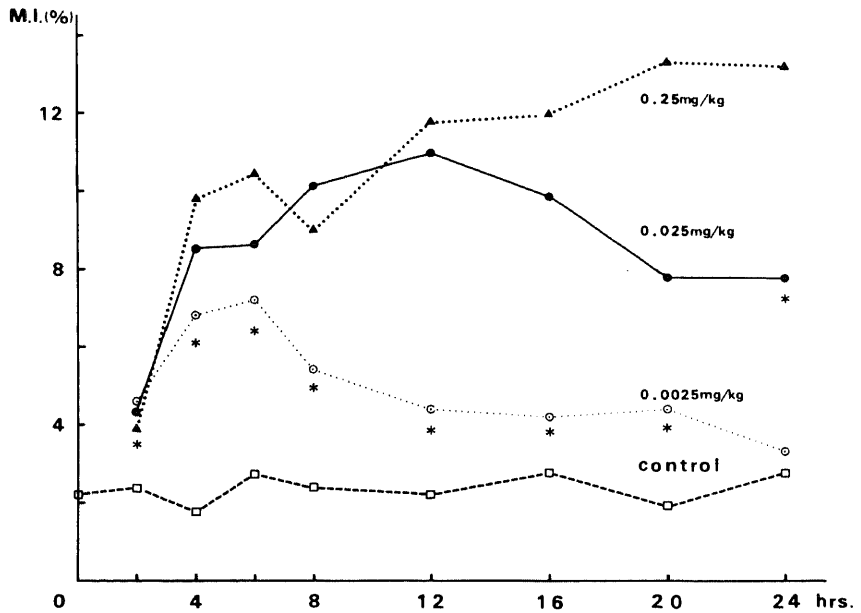


Fig. 8. Effect of a single i. p. injection of VCR on MI of Ehrlich ascites tumors. Each point represents mean value in 5 animals at intervals after VCR injection. * : $p < 0.05$ vs control group.

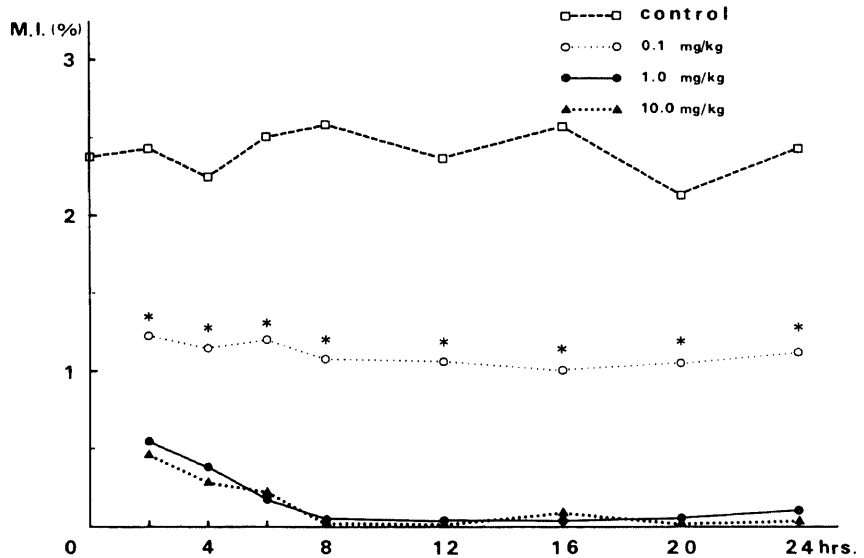


Fig. 9. Effect of a single i. p. injection of DNR on MI of Ehrlich ascites tumors. Each point represents mean value in 5 animals at intervals after DNR injection. * : $p < 0.05$ vs control group.

kg 投与では、2 時間後より上昇がみられ 6 時間後の 7.2% をピークとして 24 時間後には対照群の値に回復した。ギムザ染色上観察される分裂像は大部分 metaphase であり、anaphase や telophase は見られなかった。

3. DNR: DNR 投与後の MI の変化を Fig. 9 に示

す。10.0 および 1.0 mg/kg では 2 時間後より MI は著しく低下し、24 時間後まで継続した。0.1 mg/kg 投与では 2 時間後に対照群の値の約半分に低下し、24 時間後まで持続した。

III. DNA ヒストグラムおよび S-inf, S-eff の変化
LI および MI に著しい変化の見られた、Ara-C 0.5

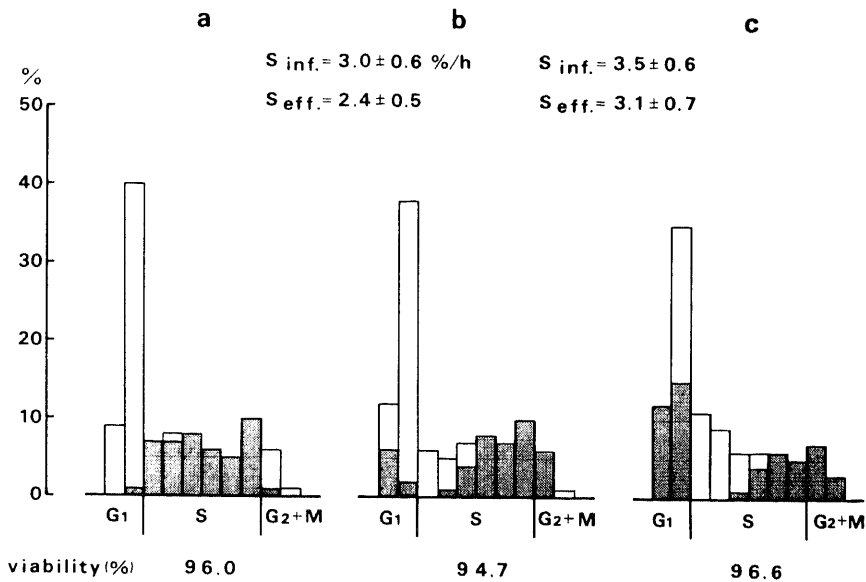


Fig. 10. DNA histograms of tumor cell (a) just before saline injection (b) 4 hours after injection (c) 8 hours after injection. Each value is mean \pm S. E. of 3 to 5 animals. See footnote of Fig. 2. Viability was evaluated with trypan blue dye exclusion test. (mean value)

mg/kg, BH-AC 0.1 mg/kg, MTX 0.25 mg/kg, VCR 0.025 mg/kg, DNR 1.0 mg/kg について、DNA ヒストグラムおよび in vivo pulse labeling を用いて S 期流入量 (S-inf) および S 期流出量 (S-eff) を測定した。

1. 対照群: Fig. 10 に生理食塩水を投与した時の DNA ヒストグラムを示す。0 時間では S 期細胞の大部分と、G₁ および G₂+M 期の細胞のごとく少数が ³H-TdR 標識細胞である。4 時間後には S 期初期の G₁ 期より流入した非標識細胞が増加しており G₂+M 期には 0 時間で S 期にあった標識細胞が移行している。G₁ 期にすでに標識細胞があり、G₂+M 期は最短で 4 時間以内である。8 時間後には、4 時間後にみられた変化がさらに明らかになり、S 期の前半は 0 時間で G₁ にあった非標識細胞で占められており、0 時間で S 期にあった標識細胞は G₂+M から G₁ 期へ移行しているが次の S 期には至っていない。0 ~ 4 時間後の S-inf, S-eff はそれぞれ $3.0 \pm 0.6\%/h$ (mean \pm S.E.), $2.4 \pm 0.5\%/h$ であり、4 ~ 8 時間後の S-inf, S-eff はそれぞれ $3.5 \pm 0.6\%/h$, $3.1 \pm 0.7\%/h$ であり、S 期の流入量、流出量のバランスがとれていることを示している。

2. Ara-C: Fig. 11 に Ara-C 0.5 mg/kg を投与した変化を示す。4 時間後では S 期における非標識細胞の増加はなく、S-inf は $0.2 \pm 0.3\%/h$ と著減していた。G₂+M 期および G₁ 期へ標識細胞の一部が移行し

ているが、S-eff は $1.4 \pm 0.6\%/h$ と減少していた。8 時間後では G₁ から S への移行が見られているが、S から G₂ への移行はさらに減少していた。S-inf $7.5 \pm 1.1\%/h$ と対照群の値を上回っていた。また、G₂+M 期の細胞の減少がみられた。

3. BH-AC: Fig 12 に BH-AC 0.1 mg/kg 投与時の DNA ヒストグラムを示す。Ara-C とほぼ同様の变化を示しており、4 時間後までは S-inf は $0.3 \pm 0.4\%/h$ と著減し、4 ~ 8 時間後には $6.0 \pm 1.2\%/h$ と対照群の値を越えて回復し、G₁ 期から S 期への移行が見られた。一方、S-eff は著減したままであり、これに従って G₂+M 期の減少が見られた。

4. MTX: MTX 0.25 mg/kg 投与 (Fig. 13) も同様の变化を示し、S-inf, S-eff とともに 4 時間までは著減するが、4 ~ 8 時間には S-inf は回復し S-eff は減少したままであり、G₂+M 期の減少も見られた。

5. VCR: VCR 0.025 mg/kg 投与時の変化 (Fig. 14) は metaphase arrest のために anaphase および telophase の細胞がみられず G₁ 期と S 期の境界は設定できなかった。しかし S 期初期と思われる部分に非標識細胞が移行しており、対照群とは変化がない。S-eff は $2.7 \pm 1.2\%/h$ および $2.9 \pm 1.1\%/h$ であり変化がない。しかし G₂+M 期へ移行した標識細胞は、G₁ 期へは移行できず M 期に蓄積していた。

6. DNR: DNR 1.0 mg/kg 投与時の変化を Fig. 15 に示す。S-inf, S-eff とともに著しい変化はなく G₁ 期

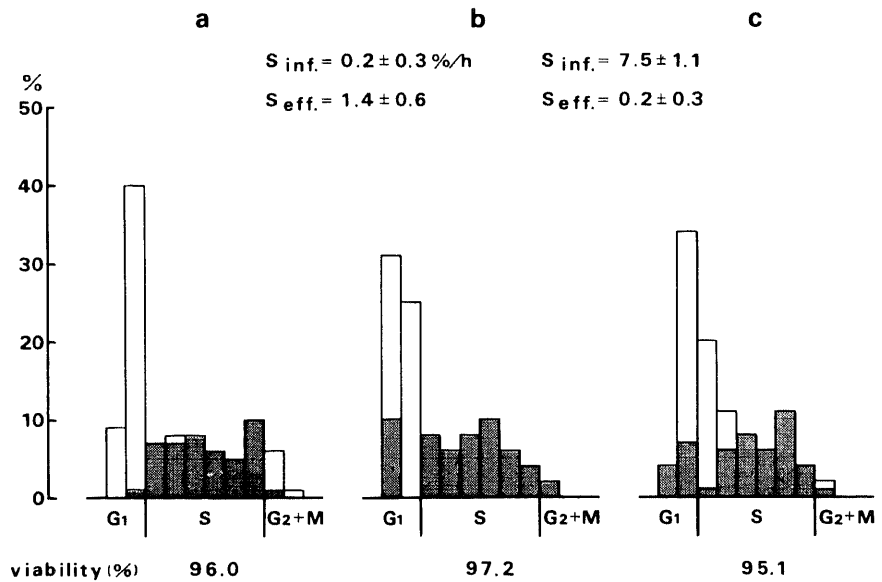


Fig. 11. DNA histograms of tumor cell treated by single i. p. injection of Ara-C (0.5 mg/kg). (a) just before Ara-C injection (b) 4 hours after injection (c) 8 hours after injection. Each value is mean \pm S. E. of 3 to 5 animals. See footnote of Fig. 2. Viability was evaluated with trypan blue dye exclusion test. (mean value).

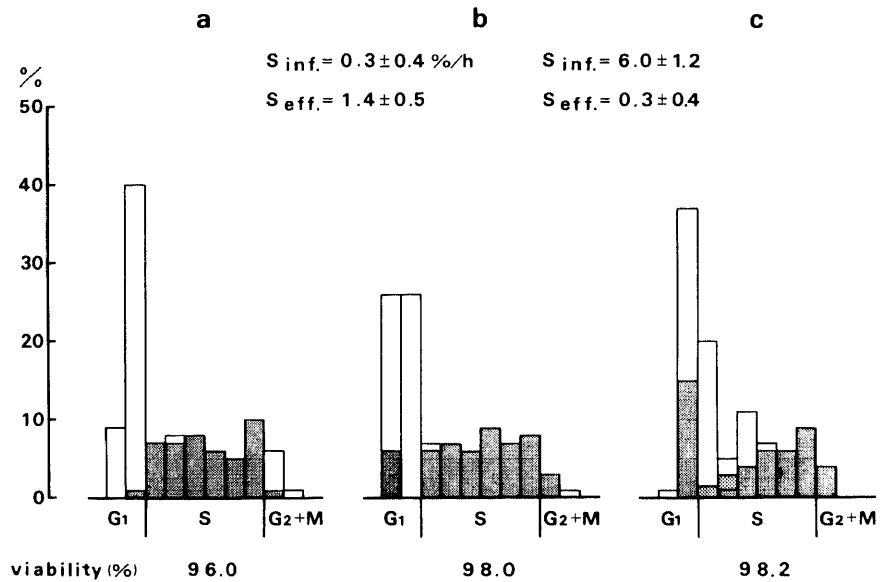


Fig. 12. DNA histograms of tumor cell treated by single i. p. injection of BH-AC (0.1 mg/kg). (a) just before BH-AC injection (b) 4 hours after injection (c) 8 hours after injection. Each value is mean \pm S. E. of 3 to 5 animals. See footnotes of Fig. 2. Viability was evaluated with trypan blue dye exclusion test. (mean value).

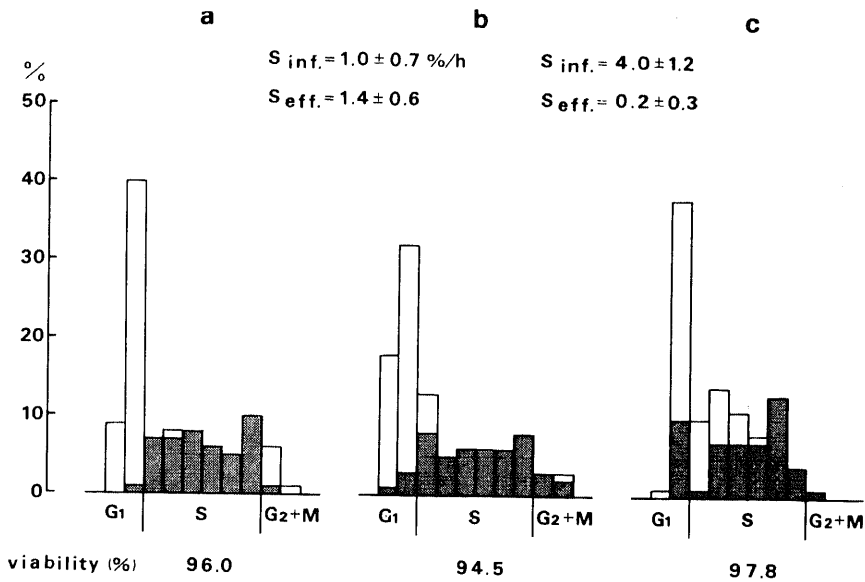


Fig. 13. DNA histograms of tumor cell treated by single i. p. injection of MTX (0.25 mg/kg). (a) just before MTX injection (b) 4 hours after injection (c) 8 hours after injection. Each value is mean \pm S. E. of 3 to 5 animals. See footnote of Fig. 2. Viability was evaluated with trypan blue dye exclusion test. (mean value)

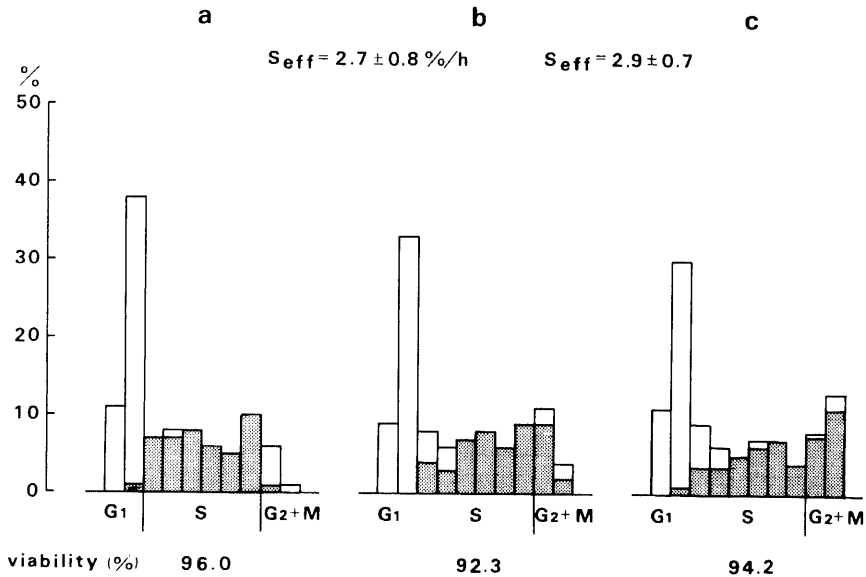


Fig. 14. DNA histograms of tumor cell treated by single i. p. injection of VCR (0.025 mg/kg). (a) just before VCR injection (b) 4 hours after injection (c) 8 hours after injection. Each value is mean \pm S. E. of 3 to 5 animals. See footnote of Fig. 2. Viability was evaluated with trypan blue dye exclusion test. (mean value)

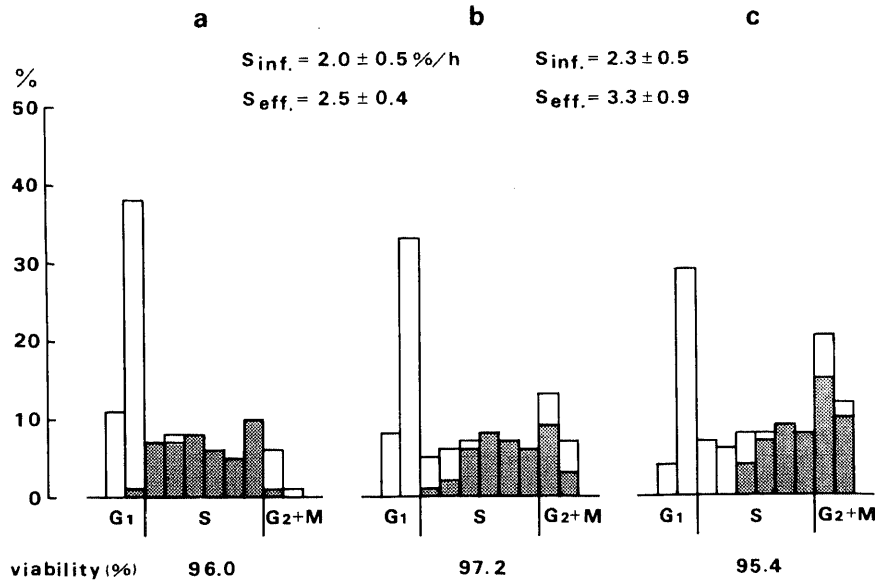


Fig. 15. DNA histograms of tumor cell treated by single i. p. injection of DNR (0.1 mg/kg). (a) just before DNR injection (b) 4 hours after injection (c) 8 hours after injection. Each value is mean \pm S. E. of 3 to 5 animals. See footnote of Fig. 2. Viability was evaluated with trypan blue dye exclusion test. (mean value)

からS期, S期からG₂期への移行に変化はないようである。しかしG₂+M期細胞の増加が見られており, M期やS期への標識細胞の移行がなく, G₂期に蓄積されていた。

IV. 色素排泄能による生細胞数の算定

DNAヒストグラム作製に際し一部の細胞をtrypan blue色素排泄能により, 投与した抗腫瘍剤の致死効果を検討した。Fig.10から15に示すごとく, 生細胞数の割合には何ら変化を認めなかった。

考 察

現在用いられている抗腫瘍剤は, 大部分はcycle dependencyやage responseの有することが知られている。しかし, 一般にヒト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。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抗腫瘍剤を投与して, 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至適投与方法である。本実験では増殖分画の多い, Ehrlich腹水癌細胞を用いて, Ara-C, BH-AC, MTX, VCRおよびDNRによるsynchronizationを試み, その成立にいたる機序を検討した。

Synchronizationは, 細胞周期のある一つの相を, 通

常以上の割合で細胞集団が同時に通過することであり, LIやMIの一過性のピークとして識別できる³⁰。本実験では, Ara-C 0.5 mg/kg投与6~8時間後, BH-AC 0.1 mg/kg投与6~8時間後, MTX 0.25 mg/kg投与6~8時間後に, それぞれ対照群の値を上回るLIの上昇があり, S期においてsynchronizationが成立している。VCR 0.0025 mg/kgでは2~12時間後に, 0.025 mg/kgおよび0.25 mg/kgでは2~24時間後にMIの上昇がありM期においてsynchronizeされている。DNRはLI, MIともに上昇はないが, DNAヒストグラムより, 1.0 mg/kg投与後4~8時間でのG₂期でのsynchronizationが示唆される。抗腫瘍剤によるin vivoでのsynchronizationの機序としてVan Putten³⁰は次の3つの可能性を示している。すなわち, 第1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るため, 第2は薬剤によりある相の細胞回転の進行がblockまたは遅延されるため, 第3は細胞死による細胞数の減少のためrecruitmentが起こり, その間接的な影響によるためとしている。したがって各薬剤によりsynchronizationが成立する過程は, 細胞回転の進行(cell cycle progression)の変化と密接に関連していると考えられる。

Cell cycle progressionの解析は, in vitroでは同調培養法を用いて容易に行われるが, in vivoでは, LI

やMIの経時的変化やMIの蓄積率を調べる方法³⁴⁾や、percentage labeled mitoses curve (PLM)法³⁸⁾⁵⁶⁾や二重標識法³⁹⁾から間接的に調べられていた。PLM法は頻回かつ長時間の試料採取が必要であり、in vivoにおける抗腫瘍剤の影響をみるには不適當である。2重標識法は、1回の試料採取で良いが、DNA合成阻害作用を持つ薬剤を投与した場合、第2回目の標識が阻害されることや、¹⁴Cと³Hの標識を確実に分別するには、技術的に困難な場合がある。Feulgen反応を利用したcytophotometryによるDNAヒストグラムを用いる方法⁴⁰⁾⁴¹⁾や、これを改良したflow microfluorometry (FMF)^{42)~47)}はG₁期やG₂期の細胞群も含めて、細胞周期全体の分析が可能である。cytophotometryでは測定細胞数に限度があるが、FMFでは瞬時に多数の細胞を測定し、精度および再現性の高いDNAヒストグラムが得られ利用範囲が広がっている。しかしDNAヒストグラムのパターンの変化のみでは、各細胞周期間の移行や流量についての解析は不可能である。著者の用いたautoradiographyとDNAヒストグラムを併用する方法は、Fujita⁴⁸⁾やOlssonら³⁹⁾によっても報告されており、DNAヒストグラム上を³H-thymidineにより最初に標識された細胞群が、S期からG₂期、M期そしてG₁期へと移行していく過程を観察できるばかりでなく、G₁期からS期への(S-inf)およびS期からG₂期へ(S-eff)の流量を測定できる利点がある。さらに試料採取の間隔を適当にとることにより各細胞周期の通過時間も測定できる。しかしながら、本法は試料採取後autoradiographyを行いphotographic mappingをし、Feulgen染色後cytophotometryを行うため長時間を必要とし分析できる細胞数にも限度があるという欠点もある。

Feulgen染色によるDNAの定量法は、その染色機序も明らかであり、固定・染色などの条件に問題がなければ特異的との評価も定まり⁴⁹⁾⁵⁰⁾広く用いられている。測定法としてはCaspersson⁵¹⁾の紫外顕微分光法の原理を応用した顕微測光法が開発され、核内DNA量を正確に測定できるようになった⁵²⁾。しかし、S-inf, S-effを求めるために本研究ではG₁期とS期、S期とG₂期の境界点となるDNA量を設定している。しかし、FMFに数学的モデルを導入して解析されたDNAヒストグラムでは、G₁期とS期初期および、S期終期とG₂期のDNA量を厳然と分別できないこと⁵³⁾や、このモデルに従ってfluorescent activated cell sorterを用いて集めたS期細胞は必ずしも³H-TdR標識細胞とは一致しない⁵⁴⁾などの点が指適されており、本法で求めた、S-inf, S-effは半定量的なものと考えねばならない。

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ある。Skipperら⁹⁾は、Ara-CをS phase specificな薬剤に分類しS期への流入は阻害されないとした。しかしin vitroの検討ではGrahamら⁵⁵⁾、Bhuyanら¹⁰⁾は、Ara-CによりG₁期からS期への一過性の移行阻止の見られることを報告し、Wheelerら¹¹⁾はG₁-S移行部にsynchronizeされるとしている。

Tobeyら³⁷⁾⁴³⁾はAra-CはDNA合成開始を完全に阻止できるのではなく、G₁期からS期への移行率を減少させるとしている。一方、Yataganasら⁴⁴⁾はG₁期からS期へは通常の割合で流入するが、その直後でblockされS期初期に蓄積するとしている。Karonら⁵⁶⁾、Brehautら⁴⁰⁾もG₁期からS期への移行は正常におこり、S期からG₂期への移行がblockされるとしている。これらの相違は使用した細胞や薬剤濃度および測定方法の違いによるものと思われる。高本ら⁴²⁾は低濃度でのS期延長作用と、高濃度でのG₁期およびG₁-S境界部への蓄積作用を報告している。

Ara-Cによるin vivoでのsynchronizationはBertalanffyら⁵⁷⁾、Verbinら⁵⁸⁾、Neilら⁵⁹⁾、Edelsteinら⁶⁰⁾、Alabasterら⁴⁵⁾、Agliettaら⁶¹⁾により報告されている。AlabasterらはAra-C感受性L1210細胞で、Ara-C投与後16時間後にearly S期にsynchronizationがおこり、以後S期細胞が減少することを示し、Ara-C抵抗性L1210細胞では、Ara-C投与後8~32時間にかけてS期初期から中期にsynchronizationが起こると報告している。一方Agliettaらは非増殖分画の多いbrown Norway myeloid leukemia細胞で、Ara-C投与後非増殖分画からのrecruitmentがおこり、引きつづいてS期にsynchronizeされると報告している。一方ヒト白血病細胞に対する検討では、Lampkinら²²⁾、Ernstら⁶²⁾はG₁期からS期への流入は正常でS期に蓄積されるとしている。

本実験では、最初の4時間はG₁期からS期への移行はほぼ阻止されているが、4時間~8時間ではLIの上昇に一致してG₁期からS期への流入量は増加する。一方この間はS期からG₂期への流出は阻止されており、S-infはS-effを大きく上回り、この結果S期への蓄積がおこるものと考えられた。このS-infの2相性の変化は、Ara-CによるDNA合成阻害作用が可逆的であり、DNA合成が再開される時には、DNA合成率の低い細胞から始まることや⁶³⁾、G₁期からS期への移行は低濃度では阻止されず、高濃度では阻止される点、さらにAra-Cの血中半減期が非常に短いことから理解される。

BH-ACはAra-Cの誘導体で、4位のアミノ基に長鎖飽和脂肪酸を導入して得られた新抗腫瘍剤である。

本剤は、脂溶性で cytidine deaminase に抵抗性であり、血中および細胞内濃度が持続性で、動物実験では抗腫瘍効果は総投与量に比例し、投与スケジュールに依存しないという特徴を有する⁶⁴⁾⁶⁵⁾。本剤による synchronization は著者ら²⁹⁾により臨床的に試みられ、Ara-C と同様の成績を得、その synchronization の機序としては S 期延長作用が示唆された。BH-AC の cell cycle progression におよぼす影響は、Ara-C と同じものと考えられるが、本実験では、synchronization の持続が長期におよぶことと、Ara-C よりも低い濃度で synchronize される点が特徴と思われる。これは本剤が Ara-C に比較して、きわめて血中半減期が長い点から説明できる。

MTX は Ara-C とは生化学的にはその作用機序を異にするが、細胞回転におよぼす影響はほぼ同様であると考えられている。Skipper ら⁹⁾は S shase specific with self limitation と分類したが、Wheeler ら¹¹⁾は S 期での進行の阻害と G₁-S 移行部の synchronization を報告している。一方、臨床的には、G₁から S への移行は阻止されず、S 期に入って進行を阻害されるために S 期 synchronization がおこると報告されている²²⁾²³⁾。本実験では Ara-C と同様に一過性の S-inf の減少と持続性の S-eff の減少が見られこのために S 期に synchronize されることが示された。

VCR の cell cycle progression に対する影響については、metaphase arrest が報告されている⁶⁶⁾⁶⁷⁾。これは、S 期で短時間薬剤と接触させた場合でも、G₂期から M 期へは正常に進行し、M 期で不可逆的に阻止されるとされている⁶⁸⁾。Klein ら²⁵⁾⁶⁹⁾は Ehrlich 腹水癌細胞に、殺細胞効果の見られない量の VCR を 1 回投与して M 期に synchronize し、これが S 期へ進行した時点で cyclophosphamide (CY) を投与して VCR と CY の同時投与と比較して効果の増強が見られたと報告している。本実験では、VCR の M 期同調作用は Ara-C、MTX とは異なり薬剤の投与量の影響は少なく、広い範囲で見られた。G₁期から S 期、S 期から M 期への進行は影響を受けないようであるが、metaphase arrest のため anaphase や telophase の細胞が消失するのが特徴的であった。

DNR は LI および MI の変化の経時的な観察では synchronization をとられることはできず、DNA ヒストグラムにより G₂期に synchronize されることが示された。DNR が MI を減少させることは当初より報告されており⁷⁰⁾、Brehaut は⁴¹⁾DNA 合成をほとんど阻害しない濃度で G₂期進行に遅延を来たし、したがって G₂期の蓄積を起こし、MI の低下を来たと報告している。このような G₂ block は臨床的にも Whang-

Peng ら⁷¹⁾、Ernst⁷²⁾、Stryckmans ら⁷³⁾により報告されている。また FMF を用いて Göhde ら⁴⁶⁾、Linden ら⁴⁹⁾が G₂ block を報告し S 期は影響を受けないとしている。本実験では LI の低下のない投与量で、MI の減少と G₂期細胞の増加がみられ、また S-eff はほぼ正常なことより G₂ arrest が示され、これによる synchronization が成立しているものと考えられた。本剤による G₂ arrest は、DNR の DNA への結合とこれによる RNA 合成障害によるためと考えられる。

本実験で用いた 5 つの薬剤では、synchronization の成立機序として考えられる前記 3 つの可能性のうち、第 2 の可能性つまり、細胞周期にブロックがおこり、その相に細胞が蓄積されて成立することが示され、またこれはその細胞周期において流入量が、流出量を上回る不均衡が生ずるためによることが明らかになった。したがって synchronization の程度は腫瘍細胞自身の細胞周期上の動態（流量）に依存し、腫瘍細胞の世代時間や増殖分画の大きさに影響される。このことは、増殖分画が小さく、世代時間の長いヒトの腫瘍細胞に synchronization を応用するにあたっては、十分に注意すべき点であると考ええる。また、正常骨髄細胞の世代時間は、悪性腫瘍細胞のそれよりも短かく、増殖分画は大きいため synchronization も強くおこることが予想される。この点に関して臨床的な成績から吉川ら²⁷⁾、Clavel ら⁷⁴⁾は腫瘍細胞以上に正常細胞の障害が強かったと、非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 synchronize 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、synchronization は、細胞回転の理論から見た至適投与方法であり、より強い殺細胞効果を期待できるのは確かである。rapid autoradiography²⁸⁾や FMF を用いても synchronization をモニターしながら、最も効果的に薬剤の作用する時期を選んで治療を行い、さらに、化学療法後の補助療法を強化するなどの配慮が必要であろう。

結 論

細胞回転の理論からみた抗腫瘍剤の至適投与方法である synchronization について、その成立に至る細胞回転の詳細な動態を明らかにする目的で、Ehrlich 腹水癌細胞移植マウスを用いて Ara-C、BH-AC、MTX、VCR および DNR による synchronization を試みた。それぞれの薬剤について LI、MI および autoradiography を併用した cytophotometry による DNA ヒストグラムを検討し次の成績を得た。

1. Ara-C 0.5 mg/kg 投与では 6～8 時間後に、

BH-AC 0.1 mg/kg 投与では 6~20 時間後に, MTX 0.25 mg/kg 投与では 6~8 時間後にそれぞれ一過性の LI の上昇が見られた。VCR は 0.0025 mg/kg より 0.25 mg/kg までの投与量で MI の増加が認められ, DNR 1.0 mg/kg では 4 および 8 時間後に G₂ 期細胞の増加が見られた。したがって Ara-C, BH-AC, MTX は S 期に, VCR は M 期に, DNR は G₂ 期に synchronize していると考えられた。

2. 5 剤ともにこの投与量では殺細胞効果は見られなかった。

3. Ara-C, BH-AC, および MTX は投与後 4 時間までは S-inf, S-eff ともに抑制を示した。4~8 時間後には S-inf は回復し対照を上回るのに反して, S-eff は更に抑制され S-inf は S-eff を大きく上回る結果, S 期に細胞の蓄積がおこると考えられた。

4. VCR は metaphase arrest を示し, G₁ 期から S 期および S 期から M 期への移行には影響を与えなかった。

5. DNR は, S-inf, S-eff ともに影響せず, MI を減少させ, DNA ヒストグラム上 G₂ 期細胞を増加させた。

6. これらの薬剤の synchronization の機序は, 各細胞周期における流入量と流出量の不均衡により引き起こされることが確認された。

7. 以上の結果より synchronization の成立を決定する大きな要因として, 腫瘍細胞自身の細胞動態が重要であることが示唆され, このことが synchronization の臨床応用の障害となっていると考えられた。

稿を終るにあたって, 御指導, 御校閲を賜った服部絢一教授, ならびに直接の御指導, 御助言をいただいた中村忍, 吉田喬岡博士に深く感謝いたします。併せて種々の御協力を得ました研究室の各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Skipper, H. E., Schabel, F. M. Jr. & Wilcox, W. S.: Experimental evaluation of potential anti-cancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemotherapy Reports*, **35**, 1-111 (1964).
- 2) Clarkson, B. D.: Review of recent studies of cellular proliferation in acute leukemia. *Natl. Cancer Inst. Monograph*, **30**, 81-119 (1969).
- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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 tumor cell line. *Br. J. Cancer*, **31**, 68-74 (1975).
- 6) Bhuyan, B. K., Scheidt, L. G. & Fraser, T. J.: Cell cycle phase specificity of antitumor agents. *Cancer Res.*, **32**, 398-407 (1972).
- 7) Sinclair, W. K.: Hydroxyurea: Effects on chinese hamster cells grown in culture. *Cancer Res.*, **27**, 297-308 (1967).
- 8) Mauro, F. & Madoc-Jones, H.: Age responses of cultured mammalian cells to cytotoxic drugs. *Cancer Res.*, **30**, 1397-1408 (1970).
- 9) 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 chemotherapy Reports*, **54**, 431-450 (1970).
- 10) 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).
- 11) 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).
- 12) Crowther, D., Beard, M. E. J., Bateman, C. J. T. & Sewell, R. L.: Factors influencing prognosis in adults with acute myelogenous leukaemia. *Br. J. Cancer*, **32**, 456-464 (1975).
- 13) Murphy, S. B., Aur, R. J. A., Simone, J. V., George, S. & Mauer, A. M.: Pretreatment cytokinetic studies in 94 children with acute leukemia. Relationship to other variables at diagnosis and to outcome of standard treatment. *Blood*, **49**, 683-691

(1977).

- 14) **Amadori, S., Petti, M. C., Francesco, A. D., Chierichini, A., Mastrovincenzo, C., Testa, M. G. & Mandelli, F.** : Lack of prognostic significance of the pretreatment labeling and mitotic indices of marrow blasts in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer*, **41**, 1154-1160 (1978).
- 15) **Burke, P. J. & Owens, A. H. Jr** : Attempted recruitment of leukemic myeloblasts to proliferative activity by sequential drug treatment. *Cancer*, **28**, 830-836 (1971).
- 16) **Zittoun, R., Bouchard, M., Facquent-Danis, J., Percie-Du-sert, M. & Bousser, J.** : Prediction of the response to chemotherapy in acute leukemia. *Cancer*, **35**, 507-513 (1975).
- 17) **Hart, J. S., George, S. L., Frei, E. III, Bodey, G. P., Nickerson, R. C. & Freireich, E. J.** : Prognostic significance of pretreatment proliferative activity in adult acute leukemia. *Cancer*, **39**, 1603-1617 (1977).
- 18) **Sulkes, A., Livingston, R. B. & Murphy, W. K.** : Tritiated thymidine labeling index and response in human breast cancer. *J. Nat. Cancer Inst.*, **62**, 513-515 (1979).
- 19) **Kremer, W. B., Vogler, W. R. & Chan, Y.** : An attempt at synchronization of marrow cells in acute leukemia. Relationship to therapeutic response. *Cancer*, **37**, 390-402 (1976).
- 20) **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).
- 21) **Hayes, F. A., Green, A. A. & Mauer, A. M.** : Correlation of cell kinetic and clinical response to chemotherapy in disseminated neuroblastoma. *Cancer Res.*, **37**, 3766-3770 (1977).
- 22) **Lampkin, B. C., Nagao, T. & Mauer, A. M.** : Synchronization and recruitment in acute leukemia. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2204-2214 (1971).
- 23) **Ernst, P. & Killmann, S. A.** : Perturbation of generation cycle of human leukemic myeloblasts in vivo by methotrexate. *Blood*, **38**, 689-705 (1971).
- 24) **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).
- 25) **Klein, H. O. & Lennartz, K. J.** : Chemotherapy after synchronization of tumor cells. *Seminars in Hematology*, **11**, 203-227 (1974).
- 26) **Barranco, S. C., Luce, J. K., Romsdahl, M. M. & Humphrey, R. M.** : Bleomycin as a possible synchronizing agent for human tumor cells in vivo. *Cancer Res.*, **33**, 882-887 (1972).
- 27) 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・山田一政・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).
- 28) **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).
- 29) 大竹茂樹・小林三郎・吉田喬・中村忍・谷本一夫・服部絢一 : 成人急性非リンパ性白血病治療における N⁴-Behenoyl-1-β-D-arabinofuranosylcytosine による S-phase partial synchronization の試み, *臨床血液*, **22**, 1-10 (1981).
- 30) **Klein, G. & Révész, L.** : Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vivo. I. growth curves of the Ehrlich and MCIM ascites tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, **14**, 229-272 (1953).
- 31) **Cooper, E. H., Frank, G. L. & Wright, D. H.** : Cell proliferation in Burkitt tumours. *Europ. J. Cancer*, **2**, 377-384 (1966).
- 32) **Bianchi, N., Lima-DE-Faria, A. & Jaworska, H.** : A technique for removing silver grains and gelatin from tritium autoradiographs of human chromosomes. *Hereditas*, **51**, 207-211 (1965).
- 33) 吉田喬 : がん細胞の変性過程の研究—エールリッヒ腹水がんの DNA 量と形態との対比. *十全医学会誌*, **87**, 458-480 (1978).
- 34) **Trapp, L.** : Instrumentation for recording microspectrophotometry. *In* G. L. Wied (ed), *Introduction to Quantitative Cytochemistry*, p 427-435, Academic Press Inc., New York, 1966.
- 35) **Olsson, L. & Mathé, G.** : A cytokinetic analysis of Bacillus Calmette-Guérin-induced growth control of a murine leukemia. *Cancer Res.*, **37**, 1743-1749 (1977).
- 36) **Van Putten, L. M., Keizer, H. J. & Mulder, J. H.** : Perspectives in cancer research, synchroni-

- zation in tumor chemotherapy. *Europ. J. Cancer*, **12**, 79-85 (1976).
- 37) **Tobey, R. A.** : Effects of cytosine arabinoside, daunomycin, mithramycin, azacytidine, adriamycin and camptothecin on mammalian cell cycle traverse. *Cancer Res.*, **32**, 2720-2725 (1972).
- 38) **Quastler, H. & Sherman, F. G.** : Cell population kinetics in the intestinal epithelium of mouse. *Exp. Cell Res.*, **17**, 420-438 (1959).
- 39) **Wimber, D. E. & Quastler, H. A.** : ^{14}C and ^3H thymidine double labeling technique in study of cell proliferation in *Tradescantia* root tips. *Exp. Cell Res.*, **30**, 8-22 (1963).
- 40) **Brehaut, L. A. & Fitzgerald, P. H.** : The effects of cytosine arabinoside on the cell cycle of cultured human leucocytes : A microdensitometric and autoradiographic study. *Cell Tissue Kinet.*, **1**, 147-152 (1968).
- 41) **Brehaut, L. A.** : A delay in the G_2 period of cultured human leucocytes after treatment with rubidomycin (daunomycin). *Cell Tissue Kinet.*, **2**, 311-318 (1969).
- 42) 高木滋・太田和雄 : FMF による細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法*, **5**, 727-736 (1978).
- 43) **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).
- 44) **Yataganas, X., Strife, A., Perz, A. & Clarkson, B. D.** : Microfluorimetric evaluation of cell kill kinetics with 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, **34**, 2795-2806 (1974).
- 45) **Alabaster, O. & Bunnag, B.** : Flow microfluorimetric analysis of sensitive and resistant leukemia L1210 following 1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, **36**, 2744-2749 (1976).
- 46) **Göhde, V. W. & Dittrich, W.** : Die cyto-statische Wirkung von Daunomycin im Impuls-cytophotometrie-Test. *Arzneim Forsch.*, **21**, 1656-1658 (1971).
- 47) **Linden, W. A., Baisch, H., Canstein, L. V., König, K. & Canstein, M. V.** : Impulscytophotometric studies on the effects of daunomycin on synchronised L-cells. *Europ. J. Cancer*, **10**, 647-651 (1974).
- 48) **Fujita, S.** : Analysis of cytokinetics by means of Feulgen cytofluorometry combined with ^3H -thymidine autoradiography. *Exp. Cell Res.*, **88**, 395-401 (1974).
- 49) **Ris, H. & Mirsky, A. E.** : Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with the Feulgen nuclear reaction. *J. Gen. Physiol.*, **33**, 125-146 (1949).
- 50) **Di Stefano, H. S.** : A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. *Chromosoma*, **3**, 281-301 (1950).
- 51) **Caspersson, T.** : Über den chemischen Aufbau des Strukturen des Zellkernes. *Skand. Arch. Physiol.*, **73**, Supple. 8, 3-151 (1936).
- 52) **James, J.** : Constancy of nuclear DNA and accuracy of cytophotometric measurement. *Cytogenetics*, **4**, 19-27 (1965).
- 53) **Fried, J.** : Analysis of deoxyribonucleic acid histograms from flow cytofluorometry : Estimation of the distribution of cells within S phase. *J. Histochem. Cytochem.* **25**, 942-951 (1977).
- 54) **Sheck, L. E., Muirhead, K. A. & Horan, P. K.** : Evaluation of the S phase distribution of flow cytometric DNA histograms autoradiography and computer algorithms. *Cytometry*, **1**, 109-117 (1980).
- 55) **Graham, F. L. & Whitmore, G. F.** : The effect of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine on growth, viability and DNA synthesis of mouse L-cells. *Cancer Res.*, **30**, 2627-2635 (1970).
- 56) **Karon, M. & Shirakawa, S.** : Effect of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine on cell cycle passage time. *J. Nat. Cancer Inst.*, **45**, 861-867 (1970).
- 57) **Bertalanffy, F. D. & Gibson, M. H. L.** : The in vivo effects of arabinosylcytosine on the cell proliferation of murine B16 melanoma and Ehrlich ascites tumor. *Cancer Res.*, **31**, 66-71 (1971).
- 58) **Verbin, R. S., Diluio, G., Liang, H. & Farber, E.** : Synchronization of cell division in vivo through the combined use of cytosine arabinoside and colcemid. *Cancer Res.*, **32**, 1489-1495 (1972).
- 59) **Neil, G. L. & Homan, E. R.** : The effect of dose interval on the survival of L1210 leukemic mice treated with DNA synthesis inhibitors. *Cancer Res.*, **33**, 895-901 (1973).
- 60) **Edelstein, M., Vietti, T. & Valeriote, F.** : Schedule-dependent synergism for the combination of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin. *Cancer Res.*, **34**, 293-297 (1974).
- 61) **Aglietta, M. & Colly, L.** : Relevance of

- recruitment-synchronization in the scheduling of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine in a slow-growing acute myeloid leukemia of the rat. *Cancer Res.*, **39**, 2727-2732 (1979).
- 62) Ernst, P., Faille, A. & Killmann, S. A.: Perturbation of cell cycle of human leukaemic myeloblasts in vivo by cytosine arabinoside. *Scand. J. Haemat.*, **10**, 209-218 (1973).
- 63) Straus, M. J. & Moran, R. E.: Dose-dependent cytokinetic changes following 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and hydroxyurea in L1210 and S-180 in vivo. *Cell Tissue Kinet.*, **11**, 529-542 (1978).
- 64) Aoshima, M., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y., Oh-ishi, J., Ishida, T. & Kobayashi, H.: Antitumour activities of newly synthesized N⁴-Acyl-1- β -D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res.*, **36**, 2726-2732 (1976).
- 65) Aoshima, M., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y., Oh-ishi, J., Ishida, T. & Kobayashi, H.: N⁴-behenoyl-1- β -D-arabinofuranosylcytosine as a potential new antitumor agent. *Cancer Res.*, **37**, 2481-2486 (1977).
- 66) Palmer, C. G., Livengood, D., Warren, A. K., Simpson, P. J. & Johnson, I. S.: The action of vincalukoblastine on mitosis in vitro. *Exp. Cell Res.*, **30**, 198-201 (1960).
- 67) Cutts, J. H.: The effect of vincalukoblastine on dividing cells in vivo. *Cancer Res.*, **21**, 168-172 (1961).
- 68) 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).
- 69) Klein, H. O., Lennartz, K. J., Habicht, W., Eder, .: & Gross, R.: Synchronization von Ehrlich-Ascites-Tumor-zellen und ihre Bedeutung bei der Anwendung eines alkylierenden Cytostaticum. *Klin. Wschr.*, **48**, 1001-1005 (1970).
- 70) Di Marco, A., Soldati, M., Fioretti, A. & Dasdia, T.: Activity of daunomycin, a new antitumor antibiotic, on normal and neoplastic cells grown in vitro. *Cancer Chemotherapy Rep.*, **38**, 39-47 (1964).
- 71) Whang-Peng, J., Leventhal, B. G., Adamson, J. W. & Perry, S.: The effect of daunomycin on human cells in vivo and in vitro. *Cancer*, **23**, 113-121 (1969).
- 72) Ernst, P.: Perturbation of generation cycle of human leukaemic blast cells in vivo by daunomycin. *Scand. J. Haemat.*, **11**, 13-22 (1973).
- 73) Stryckmans, P. A., Manaster, J., Lachapelle, F. & Socquet, M.: Mode of action of chemotherapy in vivo on human acute leukemia. I. Daunomycin. *J. Clin. Invest.*, **52**, 126-133 (1973).
- 74) 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).

Cytokinetic Analysis of Cell Synchronization by Antineoplastic Agents *in Vivo* Shigeki Ohtake, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - *J. Juzen Med. Soc.*, **92**, 434-451 (1983)

Key words: Cell synchronization, Cell cycle progression, Cytokinetic analysis, Antineoplastic agents.

Abstract

Synchronization of Ehrlich ascites tumor cells in vivo was attempted by some antineoplastic agents such as 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (Ara-C), N⁴-behenoyl-1- β -D-arabinofuranosylcytosine (BH-AC), methotrexate (MTX), vincristine (VCR) and daunorubicin (DNR). Cell cycle progression on synchronization was analyzed by the use of ³H-thymidine labeling index (LI), mitotic index (MI) and DNA histogram prepared by cytophotometry combined with autoradiography. S phase influx (S-inf) and S phase efflux (S-eff) were estimated semiquantitatively.

Ara-C (0.5 mg/kg), BH-AC (0.1 mg/kg) and MTX (0.25 mg/kg) were found to effectively synchronize the tumor cells in S phase from observation of transient increase of LI beyond control level. VCR (0.0025-0.25mg/kg) also synchronized them in M phase and DNR (1.0mg/kg) in G₂ phase. There was no cytotoxic effect of the five agents at a dose of synchronization. Ara-C, BH-AC and MTX profoundly inhibited S-eff during the period from 0 to 8 hours after their administration and also S-inf during the period from 0 to 4 hours. However, S-inf increased beyond the control level during the later period from 4 to 8 hours. VCR, as was expected, caused metaphase arrest and did not affect S-eff. S-inf was not able to be estimated because of lack of ana- or telophasic cells, but changes in the patterns of DNA histograms suggested no effect on S-inf. DNR decreased MI and increased G₂ phasic cells, but gave no change to either S-inf or S-eff.

These observations suggest that synchronization is induced as the net result of unbalance between inflow and outflow of a given phase of cell cycle. Accordingly it is suggested that success of synchronization of the tumor cells depends not only on perturbation of cell cycle progression caused by antineoplastic agents but also on their own cytokinetic behaviors such as generation time and size of growth fraction.