

悪性腫瘍の化学療法に関する研究

—初代培養吉田肉腫に対する低温の影響と化学療法の効果について—

金沢大学医学部第一外科学講座（主任：卜部美代志教授）

宮 下 徹

（昭和48年1月23日受付）

本論文の要旨は、昭和42年10月第26回日本癌学会総会において報告した。

悪性腫瘍の化学療法にはじめて nitrogen mustard が用いられて¹⁾²⁾から30年に満たない。この間に地球上の無数の物質の抗癌性が検討され、そのいくつかは化学療法剤として登場し使用されたが、未だ満足すべき薬剤は得られていない現状である。

現在までに知られた主要な化学療法剤の作用機作の解明はほとんど終わっており³⁾⁴⁾、また、腫瘍細胞の核酸代謝等⁵⁾⁶⁾⁷⁾についての研究も、放射性同位元素の利用などにより著しい進展をとげた。にもかかわらず、今日、化学療法のみによる悪性腫瘍の根治が期待できない理由として次のようなことがあげられよう。

1. 腫瘍、ことに、solid tumor 中には、薬剤感受性を持たない resting cell の部分が多く存在していること⁸⁾⁹⁾。
2. 増殖細胞の cell cycle も区々で (asynchrony) あって、しかもその世代時間は長く¹⁰⁾、化学療法の有効な phase の細胞はわずかしかないこと。
3. 腫瘍よりさらに分裂の旺盛な組織（骨髄、胃腸管上皮など）が存在し、化学療法の影響をうけ易く、副作用が出現すること⁹⁾¹⁰⁾。
4. 腫瘍組織に薬剤耐性が生ずること¹¹⁾¹²⁾。
5. 腫瘍組織の血行が乏しく薬剤の到達が妨げられること¹³⁾¹⁴⁾。
6. host-tumor relationship の複雑な関係が存在し、細菌感染にみられるような host の免疫力の応援が少なく、化学療法によりかえって免疫力の低下する可能性が強いこと。

このような事実をふまえて、比較的 short-acting で安全域の狭い今日の化学療法剤をもって治療を行

い、好結果を期待することは、はなはだ困難であり、“化学療法の行き詰り”が云々されるゆえんになっている。

それ故に、種々の工夫が試みられ、a) 投与法の改善¹⁵⁾¹⁶⁾、b) 多剤併用療法^{17)~19)}、c) 高酸素療法の併用²⁰⁾²¹⁾、d) steroid hormone との併用²²⁾、e) 免疫療法との併用²³⁾、f) 温度処理²⁴⁾などが臨床的に真剣に検討されてきたのである。

冷却による癌患者の治療を行ったのは1938年 Fay and Henny²⁵⁾にはじまる。その後も冷却による腫瘍抑制を試みる者もあったが、効果は不定で次第に行われなくなった。しかるに、化学療法が注目されはじめると、その効果の増強を計って再び温度処理がとりあげられ、実験的に併用による効果増強が報告された。辻²⁶⁾は、担癌ラットにおいて、低体温と mitomycin C, nitromin の併用が著しい延命効果をもたらしたとのべ、deep あるいは moderate の低体温を12時間行くと、そのみで80%強の担癌ラットが長期生存したと報告した。高橋ら²⁷⁾、三浦ら²⁸⁾は、マウスを用い、20°C、6時間の低体温を行い、復温後に分裂指数における同調化を観察し、制癌剤の効果増強をみた。低体温のみによる延命はみとめられなかった。

著者も、はじめ低体温の制癌効果と化学療法に及ぼす影響を研究する目的で Adolph²⁹⁾、Popovic³⁰⁾の低体温装置を改良して担癌ラットに18°~20°C、6時間の低体温を施した。そして腹水内の腫瘍細胞の軽度の減少と、分裂指数の変動を観察したが、延命効果をもとめず、実験中途に死亡する動物も多く、冷却復温などの温度条件の設定にも、かなりのあいまいさが持ち込まれてくる危険を察知した。そこで、腹水中の吉

Studies on Chemotherapy for Malignant Tumor With Special Reference to Examination about Influence of Low Temperature and Effect of Chemotherapeutics to Yoshida Sarcoma Which was Treated with Primary Tissue Culture. Toru Miyashita, Department of Surgery (I), School of Medicine, Kanazawa University.

肉腫細胞を用いて、いわゆる、初代培養 (primary tissue culture) を行うことにより、実験条件の設定を正確に、かつ、容易にしたのち、低温が腫瘍細胞に及ぼす影響と、化学療法に対する効果について検討し、二三の知見をあげたので報告する。

〔I〕 吉田肉腫細胞の試験管内初代培養について

I. 実験材料および実験方法

1 実験動物および腫瘍

実験動物として体重100~150gの雄性純系Donryu¹⁾ラットを使用した。

腫瘍は佐々木研究所より入手した吉田肉腫細胞²⁾を当研究室において、ラット腹腔中に継代移植し4~5

日目の腹水を無菌的に採取し、培養液に混和浮遊させ、試験管に分注し37°Cで細胞浮遊培養法による初代培養³⁾を試みた。原則として初代培養のみを行い、培地を変えて再使用することはしなかった。

2 培養液

文献的^{15)~18)}、実験的に検討を加えた結果、最も増殖に適する培養液として牛血清40%を含む Earle balanced salt solution¹⁹⁾を使用した。培養液は塩類液と血清からなり、次のごとく作製した。

1) Earle's balanced salt solution は表1の組成である。この培地に0.4%になるように lactalbumin hydrolysate (NBC 4338) を混入した。溶液の変質、沈澱等为避免、実験に便利のように表2のごとく、塩類液等は別々の ampule に滅菌保存し、実験に際し無菌的に調合した。塩類液の最終混合比を表3に示す。

2) 牛血清

金沢市宮屠場より入手した牛全血を氷室に24時間放置して、血漿部分を分離させ、2,000r.p.m., 10分間遠沈し、得た血清を Seitz filter で濾過し、滅菌後、56°C30分間加熱して非働化し、-20°Cの氷室内に凍結保存した。

3) 最終培養液 (表3)

Earle 塩類液50%, 牛血清40%, 0.85%生理食塩水10%の比で混合作製した。抗生物質を使用しない。

4) pHの調整

最終培養液のpHが7.4になるように1/10N HClで補正した。

3 分注方法

ラットより腹水を無菌的に採取し、少量の培養液に混和浮遊させ、白血球算定用メランジールを用いて細

表1 Earle and Hanks balanced salt solution.

	Earle	Hanks
NaCl	6.80 g/l	8.00 g/l
KCl	0.40	0.40
CaCl ₂	0.20	0.14
MgSO ₄	0.10	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	—	0.20
NaH ₂ PO ₄	0.125	—
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	—	0.06
KH ₂ PO ₄	0.06	—
glucose	1.00	1.00
NaHCO ₃	2.20	0.35
gas phase	5% CO ₂ 95% air	air

表2 Earle balanced salt solution

溶 液	処 方	消 毒	使 用 量
solution 1	NaCl 68.00 } KCl 4.00 } to 500 ml NaH ₂ PO ₄ 1.25 }	オートクレーブ	10 ml
solution 2	CaCl ₂ 2.00 } MgSO ₄ 1.00 } to 500 ml	"	10 ml
solution 3	7% NaHCO ₃ (メイロン)*	—	6.3 ml
solution 4	5% glucose (5%ブドウ糖)*	—	4.0 ml
solution 5	4% lactalbumin hydrolysate	Seitz	20.0 ml
solution 6	0.125% phenol red	Seitz	8.00 ml
Aq.	ad.	オートクレーブ	200.00 ml

*は市販品

胞数を概算して、のぞむ細胞濃度になるように培養液に混和し、内径15mm、長さ200mmの硬質滅菌試験管に分注器を使用して手早く分注した。各試験管の細胞数のバラッキを少なくするため、1ml宛の注入を反復5回行った。分注後、試験管口をゴムW栓で被い、37°Cの孵卵器に収納し air phase 下で直立静置培養を行った。分注操作は室温下で行い、平均所要時間は20~30分であった。なお、使用したガラス器具等は、すべて組織培養法^{34) 40)}にしたがって洗滌、滅菌したものである。

4 腫瘍細胞数算定法

腫瘍細胞数算定にはクエン酸処理法^{34) 41)}を使用した。すなわち、直立静置培養中の試験管を軽く振盪混和したのちピペットでさらに十分混和しつつ、1ml宛小試験管にとり分け0.05%に crystal violet を混じた0.4Mクエン酸液を2ml重畳し、Warburg 検圧計で37°C、30分恒温振盪したのち Bürker-türk 血算板に入れ細胞数を算定した。1ml中の細胞数は、全区画の細胞数を1/9×3×10,000倍すれば得られる。測定値の誤差を少なくするためつぎの方法をとった。培養試験管5mlは3本を使用し、各試験管につき3本の小試験管を用意し、クエン酸処理後、各々6回の

算定を行い、最大値と最小値をすて、残りの平均値を求めて、その小試験管の細胞数とした。そして3本の小試験管の平均値をもって培養試験管内の細胞数とした。培養試験管3本の平均値をその時間における細胞濃度とした。

5 腫瘍細胞の分裂指数の測定

培養中の腫瘍細胞浮游液をスピッツグラスに移し1,000r.p.m., 5分間の遠沈ののち、管底の沈渣細胞を acetogentiana violet (AGV) 法⁴²⁾で染色して直ちに鏡検した。なお、永久標本の場合は塗抹標本を作製し Giemsa 染色を施した。

細胞数1,000個中の prophase より telephase までの細胞の100分率を測定して分裂指数とした。

6 培養液のpH, 糖, 乳酸の測定

1) pH: 培養液中に pH 指示薬として phenol red が入れられているので標準比色液を作製し、これと対比してpHの変動を知ることができた。しかし、実際のpH値はガラス電極 (Hitachi-Horiba, F5) を用いて測定した。

2) 糖: 腫瘍細胞浮游液を遠沈し、その上澄について glucose-oxydase 法⁴³⁾を用いて測定した。

3) 乳酸: 腫瘍細胞浮游液の上澄につき Barker-Summerson⁴⁴⁾の方法を用いて測定した。

II. 実験成績

1 同一培養液における各種腫瘍細胞の増殖度 (図1)

Earle balanced salt solution 50%, 牛血清40%, 生理食塩水10%の培養液に、3種の腹水系腫瘍細胞を浮游させ、初代培養を行って増殖度を検討した。使用する腫瘍は dds マウスより得た Sarcoma 180, Ehrlich 腹水癌, および, Donryu ラットの吉田肉腫である。この培養液においては、吉田肉腫のみが分注後24時間で対数的増殖を示したのに反し, Sarcoma 180, Ehrlich 腹水癌は全く増殖を示さない。

2 初代培養における吉田肉腫細胞の増殖度

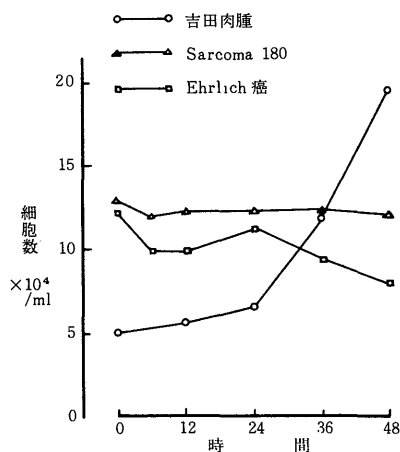
対数増殖期にあると考えられる移植後4日のラット腹水を室温下分注し、初代培養を行った時の腫瘍細胞数の変動を求めた (図2)。

多くの場合、分注直後の腫瘍細胞数は計算による予測値より少なく、しかも、分注後4時間までは細胞数はむしろ減少する。細胞数の減少はその後、徐々に回復するが、分注20~24時間までは増殖の抑制がみられる。その後にはっきりした増殖傾向がみとめられ、24~48時間では、ほぼ対数増殖に入るものとみられる。分注時の細胞濃度が高いときには、24時間までの増殖はやや良好であるが37~48時間で、増殖度が鈍化し、

表3 最終培養液混合比

Earle BSS	50 %	100 ml
Bovine sera	40 %	80 ml
Phys. saline	10 %	20 ml
total	100 %	200 ml

図1. 牛血清加Earle培養液における腫瘍細胞の増殖度



peak に達したのち減少する場合が多い。培養液のpHは6.6~6.8に低下して、培養液の性状が変化している。したがって、以後の実験では、分注時の細胞数は $5 \sim 10 \times 10^4$ 個/mlとなるように浮遊させることにした。

3 腫瘍細胞の分裂指数の変動

培養開始後の腫瘍細胞の分裂指数の変動を経時的に測定した(図3)。

培養開始直後より24時間まではかなりの変動を示したが、これは分注操作による影響と思われる。しかし、30時間前後より分裂指数の変動は小さくなり、安定している。

4 腫瘍細胞増殖に伴う培養液のpH, 糖, 乳酸の

変動

分注時の培養液のpHは7.4に調整してあるが、腫瘍細胞の増殖に伴って低下する。ガラス電極を用いて測定した(図4)。

培養開始後24時間までの培養液のpHの低下は軽い。24時間頃よりの腫瘍細胞増加に伴ってpHの低下は著しい。この原因が腫瘍細胞の解糖代謝による乳酸生成量の増加に基くものと推定される。そこで、培養液中の糖、および、乳酸の定量を行った。培養開始時の糖濃度は80mg/dlであり、これは時間と共に低下する。しかし、腫瘍増殖が exponential growthを示しても糖の濃度は急激に減少することはない。一方、乳酸生成量は腫瘍細胞増殖と極めて密接に相関しつゝ増加するのが観察された。この乳酸量の増加がpHの低下に関係していることは明らかである。

5 初代培養腫瘍細胞の viability

1) 培養開始後72時間を経て、もはや増殖のみられない腫瘍細胞を採集し、新しい培養液に分注した(図5)。

図2. 吉田肉腫細胞初代培養における細胞数変動

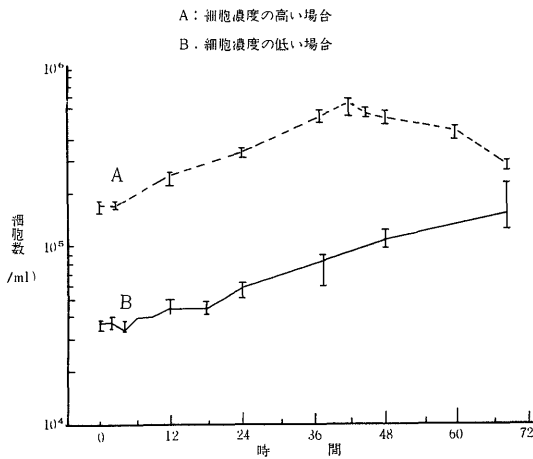


図3. 吉田肉腫細胞の初代培養における分裂指数の変動

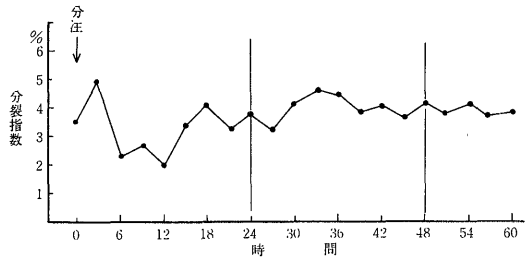
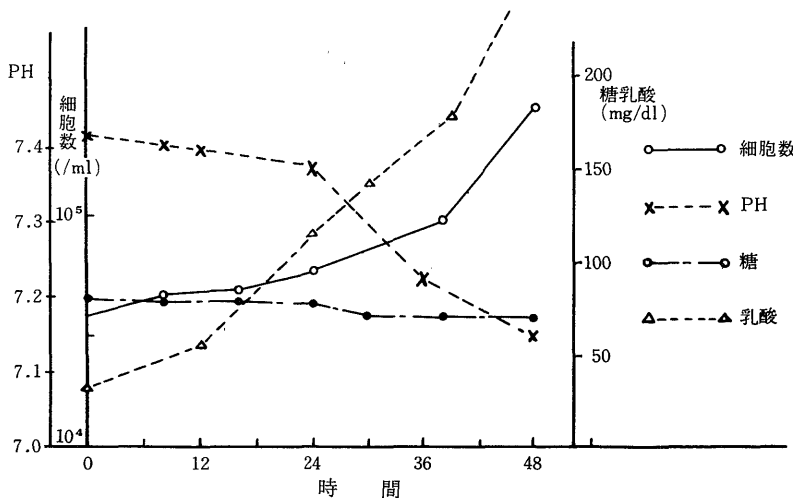


図4. 吉田肉腫細胞初代培養における細胞増殖と培養液のPH, 糖, 乳酸の変動



分注直後の細胞数減少はみとめられたが、その後の増殖抑制は、腹水より行う初代培養の場合に比べ軽く、増殖度も高い。また細胞の形態の変化はみとめられない。

2) 同様の腫瘍細胞を 10×10^6 個、ラット腹腔にもどし移植を行った(図6)。

移植を受けたラット10匹は9~14日で全て腫瘍死し、その平均生存日数は11.7日であった。

Ⅲ. 小 括

in vitro において腫瘍細胞の生物学的、生化学的検査を行う場合、「細胞がたゞ生きている。」という状態では不適当で、盛んに増殖している状況下で行われねばならない。それゆえ本章では *in vivo* の吉田肉腫細胞を試験管内培養の状態に変えた時の増殖度について、基礎的な検討を加えたのである。

培養液中(牛血清40%, Earle 塩類液50%, 生理食塩水10%)に少量の腹水系腫瘍を浮遊させ、細胞浮游法にしたがって培養したところ、吉田肉腫細胞のみが対数的増殖を示し、本培養液が吉田肉腫細胞の初代培養の培地として適当であることが判明した。

培養後の腫瘍細胞数、および、分裂指数を経時的に検索したところ、24時間前後までの培養初期の段階で

は、腫瘍細胞の増殖度の抑制、軽度の階段状増殖、腫瘍細胞の分裂指数の変動が観察された。この成績は室温下における分注操作、培養液のpHの高値などの影響によるものと考えられる。この影響が消滅するのは培養開始後24~48時間であって、この時期には腫瘍細胞は対数的増殖を示し、盛んな増殖を営むものと考えられる。解糖代謝に伴う乳酸が培養液中に蓄積してくるとpHは低下し再び腫瘍細胞の増殖度の低下が現われ、遂には細胞数の減少がみられた。この現象は細胞濃度が高いとき早期に出現するもので、本実験法のように、途中で培地を交換しない方法を採用の場合には、分注時の細胞濃度を $5 \sim 10 \times 10^4$ 個/mlにするのが適当である。そして培養開始後20~24時間以後に種々の実験を行うのが適当と思われた。

なお、培養後の腫瘍細胞について、もどし移植により *viability* を検したところ、腫瘍活性は十分に保持されていることが確認された。

〔Ⅱ〕 吉田肉腫細胞の初代培養における温度処理による同調化*について

前章において吉田肉腫細胞の初代培養における増殖度を検討した。

細胞数 $5 \sim 10 \times 10^4$ 個/mlの濃度で、pH7.4の培地に室温下で分注し、浮游培養を行なう時、培養初期の段階で腫瘍細胞の増殖度の抑制、部分的同調化(partial synchronization) がみとめられた。この現象は、室温下分注、*in vivo* から *in vitro* への環境の変化などの影響によるもので、それが消滅して滑らかな exponential growth を営むのは培養24時間以後である。従って、以下の実験はすべて培養開始後24時間のものについて行われた。

Ⅰ. 実験材料および実験方法

前章と同じ培養液に、吉田肉腫細胞を浮遊し、各試験管5mlの分注量で37°Cの直立静置培養を行った。なお ^3H -thymidine が使用される場合には、のちに生理食塩水1mlが注加されるので、培養開始時に除き、Earle 塩類液60%、牛血清40%の培養液で培養を開始した。

培養開始後24時間の細胞数算定により、腫瘍細胞の増殖が順調であることを確認したうえ、0°C、30分間、および60分間、20°C、3時間、および、6時間の条件を設定した冷凍恒温槽中に浸し、細胞に cold shock を与えたのち、直ちに37°Cの恒温槽にもどし10分間 incubate して復温し、孵卵器中で、直立静

図5. 初代培養72時間を経た吉田肉腫細胞の培養液変換後の増殖度(第2回培養)

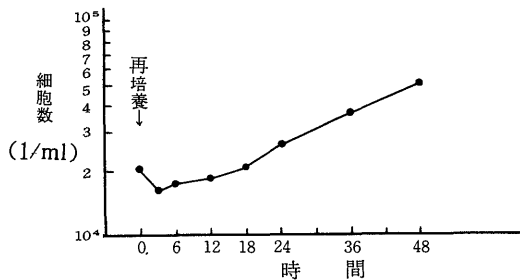
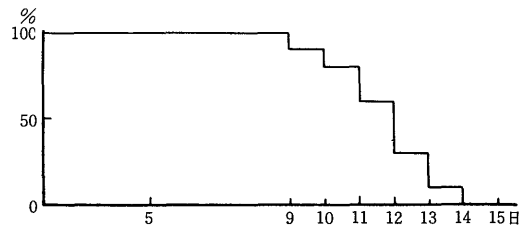


図6. 初代培養を経た吉田肉腫細胞の戻し移植によるラットの生存日数 Donryu (10匹)



* 本論文では、同調=synchrony, 同調した=synchronic, 同調化= synchronization, の意で用いている。

置培養を続行し、次の検索を行った。

- 1 細胞数算定
- 2 分裂指数測定
- 3 培養液のpH, 糖, 乳酸の測定
 - 1~3の検査方法はすべて前章におけると同じ方法を用いた。
- 4 ³H-thymidine による autoradiogram の作製

³H-thymidine (³H-TdR)〔第一化学薬品製〕による autoradiogram は dipping 法^{45) 46) 47)} により作製した。すなわち、³H-TdR 0.5 μ c/ml を含む生理食塩水 1ml を培養液 4ml に加え、腫瘍細胞に対し ³H-TdR 0.1 μ c/ml の濃度で接触させる。37 $^{\circ}$ C, 30分間 incubate し、非放射性 thymidine の 20 μ g/ml を加えた Hanks 液¹⁸⁾ で洗滌し 1,000r.p.m. 5分間の遠沈を 2 回行う。上澄をすて、管底の細胞をあらかじめゼラチン液加工したスライドガラスに塗抹する。ether-methanol 等量液で固定し、さらに純 methanol と水で過剰の ³H-TdR を洗ったのち、さくらオートラジオグラフ乳剤 NR-MI-G〔小西六写真工業K.K.〕を塗布し、約 2 週間 4 $^{\circ}$ C の氷室内で露出感光せしめ、現象定着を施し、Giemsa 染色の上、鏡検した。各標本において、腫瘍細胞中に銀粒子 5 コ以上を含むものを標識細胞 labeled cell とした。

labeling に二つの方法を用いた。

1) puls labeling の実施

腫瘍細胞を分注量 4ml で培養し、24時間後に温度処理し、その後 1 時間毎に、あらかじめ 37 $^{\circ}$ C に加温した ³H-TdR 0.5 μ c/ml を含む生理食塩水 1ml を加えて 30分間 incubate し、上記の方法で autoradiogram を作製した。この方法によれば、復温後一定時間における細胞集団中の DNA 合成を営む細胞はすべて標識されるはずで、S 期の細胞の占める percentage が経時的に求められる。

2) continuous labeling の実施

腫瘍細胞を分注量 4ml で培養し、24時間で温度処理し、復温と同時にすべての試験管に ³H-TdR を加え 0.1 μ c/ml で接触させ、以後は経時的に試験管をとり出し dipping 法で autoradiogram を作製した。この方法では、S 期に移行する細胞は ³H-TdR によってつぎつぎに標識されていくはずである。

II. 実験成績

1 温度処理による腫瘍細胞数の変動

0 $^{\circ}$ C, および、20 $^{\circ}$ C の冷却による腫瘍細胞数の経時的変動を算定した (図 7, 8)。

一般に温度処理後、腫瘍細胞数の軽度の減少がみら

れた。ことに 0 $^{\circ}$ C, 60分間の cold shock を与えた場合に著明であり、復温後 3 時間で約 25% の減少を示した。その後も、増殖抑制がみられるが復温後 9~15 時間に著しい増殖がみられる。すなわち、増殖曲線に階段状の変化がみとめられた。これに比べて、0 $^{\circ}$ C, 30分間の冷却の場合、腫瘍細胞数減少も軽度であり、階段状変化も著しくなく対照に近い型を示している。20 $^{\circ}$ C の冷却によっても直後に同様な細胞減少がみられるが、この温度条件では、復温直後に細胞増殖がみられる。階段状の増殖曲線は示されず、直ちに

図 7. 吉田肉腫細胞初代培養24時間後冷却・復温後の細胞数変動(0 $^{\circ}$ C)

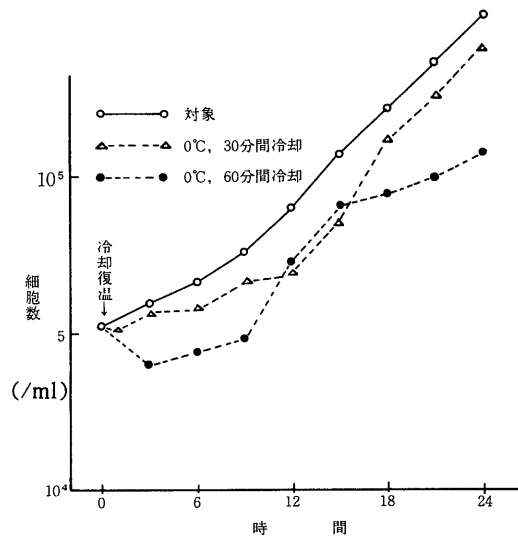
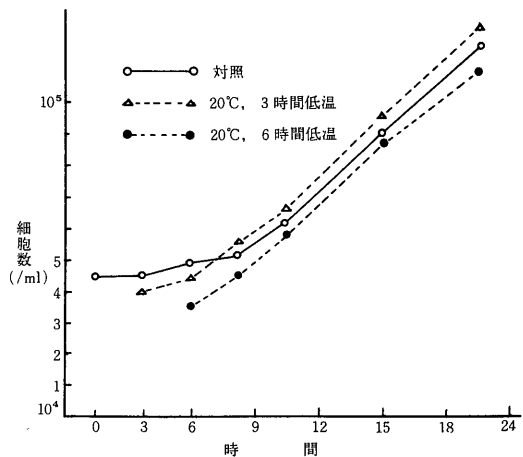


図 8. 吉田肉腫細胞初代培養24時間後低温・復温後の細胞数変動(20 $^{\circ}$ C)



exponential growth をとり、24時間後には細胞数は対照と全く変わらない。

すなわち、0℃の冷却によれば細胞数の減少は期待できるが、20℃の低温によっては、cytotoxicな効果は期待できない。ただ、20℃、6時間による細胞数の減少度は20℃、3時間のそれより大きい。細胞数の減少度が低温持続時間と相関する点で興味深い。

2 温度処理による腫瘍細胞の分裂指数の変動

0℃、30分間、および、60分間の冷却後の腫瘍細胞の分裂指数の経時的変動を測定した(表4、図9)。

図9. 吉田肉腫細胞初代培養における冷却・復温後の分裂指数の変動

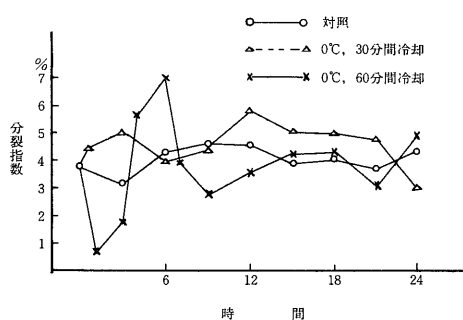


表4 吉田肉腫細胞初代培養における冷却・復温後の分裂指数の変動 (培養後24時間, 0℃ 30分間, 0℃ 60分間冷却)

時 間	0	* 0.5	* 1	3	4	6	7	9	12	15	18	21	24	平均値	
対 照	3.8	—	—	3.2	—	4.4	—	4.6	4.5	3.8	4.1	3.6	4.8	4.09	%
0℃ 30分間	—	4.5	—	5.1	—	4.0	—	4.3	5.8	5.0	4.9	4.6	3.0	4.58	%
0℃ 60分間	—	—	0.6	1.8	5.6	7.0	3.9	2.8	3.5	4.2	4.3	2.9	4.8	3.76	%

※は冷却直後

表5 吉田肉腫細胞初代培養における冷却・復温後の細胞増殖とPH・糖・乳酸の変動 (培養24時間後, 0℃ 30分間冷却)

復 温 後 時 間		0	4	8	15	24
細胞数 (×10 ⁴ /ml)	冷却群	6.8	6.2	8.0	9.6	16.9
	対 照		7.3	8.6	9.9	15.9
PH	冷却群	7.371	7.315	7.254	7.116	7.021
	対 照		7.351	7.293	7.195	7.163
乳酸 (mg/dl)	冷却群	116		143	178	300
	対 照			143	156	292
糖 (mg/dl)	冷却群	78.3	77.0	75.7	73.5	70.8
	対 照		77.3	76.3	75.0	73.3

二つの場合、全く相違した経過をとった。0℃、30分間の冷却処理では、復温直後より速やかに分裂指数の増加がみられたが、0℃、60分間の冷却処理では、復温直後、分裂指数は著減(0.6%)し、5時間後に最大の peak (7%) に達した。0℃、30分間の冷却処理の場合には復温後10時間に最大の peak (5.8%) に達している。

3 培養液のpH, 糖, 乳酸の変動(表5)

0℃、30分間冷却の場合の培養液のpHと腫瘍細胞数の関係は図10の如くなる。この実験において、分注開始時の培養液のpHはやや高かったため、培養開始24時間で7.35であった。腫瘍細胞増殖に伴い、培養液のpHは低下し、酸性に傾くが、冷却処理群の低下度が顕著である。しかも冷却処理群では、復温後3時間で腫瘍細胞数がむしろ減少している時に、培養液のpHが低下している。phenol redを指標とすると、細胞増殖度が最もよいのは培養液のpHが7.0~7.2の時であるが、ガラス電極による測定によってこれが確認された。

同時に測定した培養液の糖と乳酸の変動をみると、糖は腫瘍細胞の増殖度と関係なく、ほぼ直線的に培養液で減少するが、乳酸は腫瘍細胞の増殖度と密接な相関を保ちつつ増加する(図11)。

4 autoradiogram による冷却の腫瘍細胞に対する影響についての解析, DNA合成期への影響

1) 経時的 puls labeling による腫瘍細胞標識指数 (LI) の変動

0°C, 30分間, 0°C, 60分間, および20°C, 3時

間の冷却復温後におけるS期の腫瘍細胞の変動を経時的に検べた (図12A, B).

復温後1時間毎に ³H-TdR とincubate すると, その時間にS期にある腫瘍細胞はすべて標識され labeled index (LI) として求められる。

吉田肉腫初代培養における冷却・復温後の細胞数と培地PH, 糖, 乳酸の関係 (0°C, 30分間冷却)

図10. 細胞数とPH

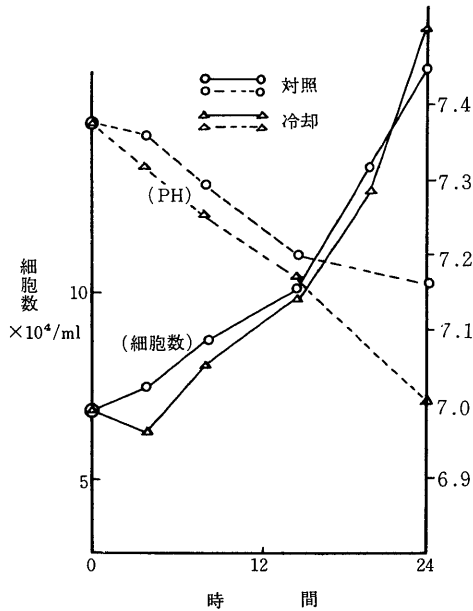


図11. 細胞数と糖・乳酸

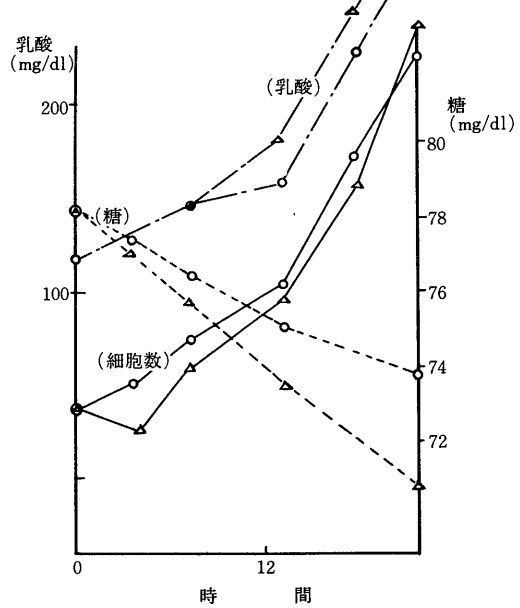


図12A. 吉田肉腫細胞初代培養における冷却・復温後の標識指数 (LI) の経時的変動 (puls labeling による)

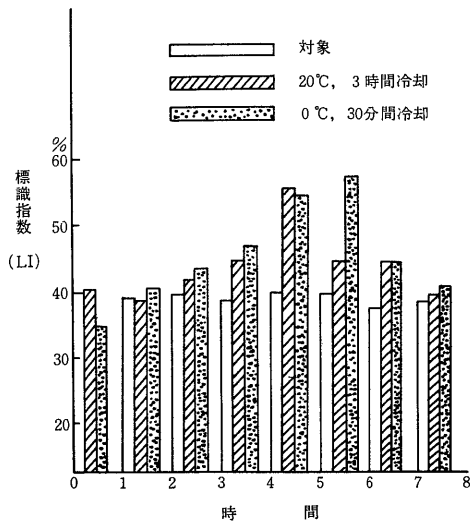
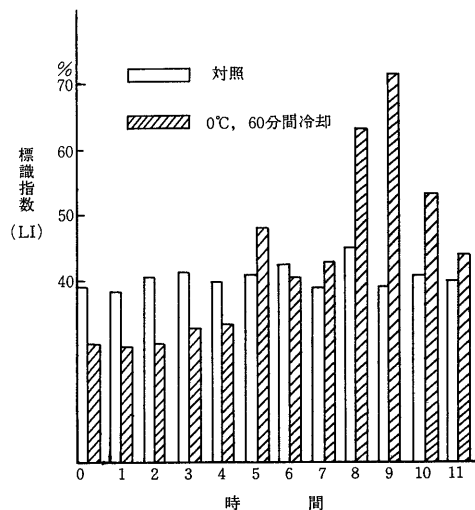


図12B. 吉田肉腫初代培養における冷却・復温後の標識指数 (LI) の経時的変動 (puls labeling による)



この実験における対照群のL.Iは平均39.8%であって、変動は軽度であり、いわゆる asynchronic growth を営んでいるとみなし得る。

0°C、30分間冷却の場合、L.Iは復温後3時間で上昇し始め、5時間で peak (58%) に達し、冷却によりS期への部分的同調化がひき起されているのが観察された。

20°C、3時間の冷却によっても同様な傾向がみられるが、この場合のL.Iの peak は復温後4時間にあり、S期への同調化はやや低い。

0°C、60分間冷却の場合、L.Iの最大の peak が復温後8~9時間後に出現し、そのS期の同調率は72%となった。この場合、復温後4時間までの間のL.Iの低下が目される。

2) continuous labeling による腫瘍細胞の標識指数 (L.I) の変動

0°C、30分間冷却の場合、復温と同時に ³H-TdR を培養液に加え、そのまま培養を続けて、30分間隔で autoradiogram を作製しL.Iを求めた (表6A, B,

図13A. 吉田肉腫初代培養における冷却・復温後の標識指数(LI) continuous labeling

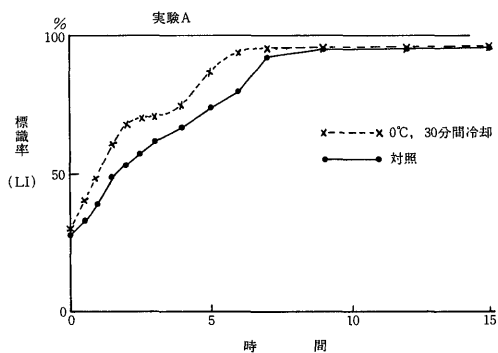


図13B. 吉田肉腫初代培養における冷却復温後の標識指数(LI) continuous labeling

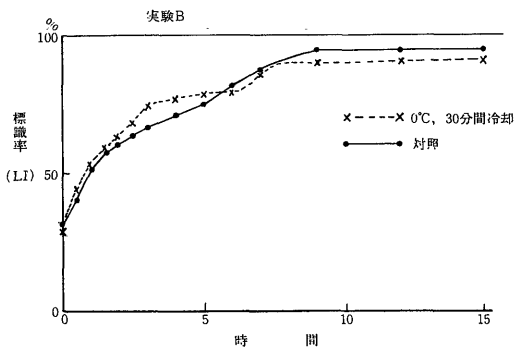


表6 continuous labeling による標識指数 (L 1)

A 実験AにおけるL 1

時間	0°C 30分間冷却		対 照	
	実測値 (%)	補正值 (%)	実験値 (%)	補正值 (%)
0	30.8	32.3	28.5	29.7
0.5	40.5	42.5	33.0	34.4
1.0	47.8	50.1	38.3	39.9
1.5	61.0	63.9	49.5	51.6
2.0	68.5	71.8	53.0	55.2
2.5	70.4	73.8	57.5	59.9
3.0	71.3	74.7	63.2	65.8
4.0	74.8	78.4	65.8	68.5
5.0	87.8	92.0	74.9	78.0
6.0	94.0	98.5	78.3	81.6
7.0	95.4	100.0	92.6	96.6
8.0	—	—	—	—
9.0	95.3	99.9	96.0	100.0
10.0	—	—	—	—
12.0	96.4	101.2	96.4	100.4
15.0	96.7	101.4	96.4	100.4

表6 continuous labeling による標識指数 (L 1)

B 実験BにおけるL 1

時間	0°C 30分間冷却		対 照	
	実測値 (%)	補正值 (%)	実測値 (%)	補正值 (%)
0	29.6	32.9	32.6	34.6
0.5	44.5	49.4	38.3	40.6
1.0	54.7	60.8	51.4	54.5
1.5	58.3	64.8	58.9	63.5
2.0	63.1	70.1	61.0	64.7
2.5	68.3	75.9	63.3	67.1
3.0	75.1	83.4	67.9	72.0
4.0	77.0	85.6	71.0	75.3
5.0	78.1	86.8	75.0	79.5
6.0	78.8	87.6	—	—
7.0	86.8	96.4	88.6	100.0
8.0	—	—	—	—
9.0	90.0	100.0	94.3	100.7
12.0	90.6	100.7	95.0	99.8
15.0	91.1	101.2	94.1	—

図13A, B) (写真参照).

完全な exponential growth を示す場合には, LIは直線になるはずで, その勾配はS期に入る細胞の“流れ”の速さを示す. 実験Aで, 冷却処理をした後に, 二峰性の変化が得られた. この傾向は軽度であるが対照にもみとめられる. また, すべての細胞が分裂増殖していればLIは100%に達するはずであるが, 実際には90~96%で plateau になり, non-dividing cells が4~10%存在することを示した.

実験Bにおける勾配はさらに複雑な曲線となったが, これにも二峰性の変化がみられる. しかし, 勾配は実験Aに比べて緩徐である.

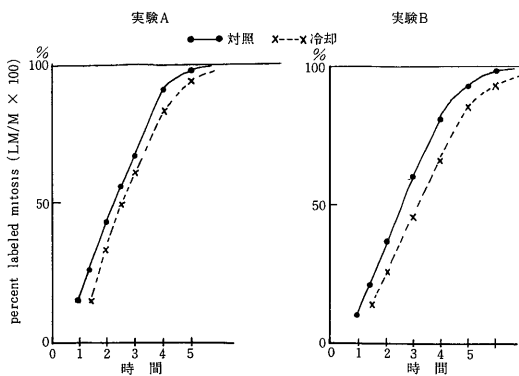
3) 腫瘍細胞の labeled mitosis の変動

continuous labeling で作製した同一標本について腫瘍細胞中で分裂期にあるもののうち, 標識されたものゝ比率を図14A, Bに示した. すなわち percent labeled mitosis=labeled mitosis/mitosis \times 100 labeled mitosis が最初に出現した時間は最少のG₂の長さ, TG_{min}とされる. 実験A, Bにおいて対照で1時間, 冷却処理群では1.5時間となった. 一般には平均G₂が求められる. すなわち, percent labeled mitosis が50%に達した時間をもってG₂の長さ= TG₂とする. TG₂は実験A, Bにおいてそれぞれ対照では2.3時間, 2.6時間, 冷却処理群では2.5時間, 3.1時間であった.

III. 小 括

低温の細胞増殖に及ぼす影響については既に研究されているが, その多くは細菌⁴⁹⁾, 植物細胞⁵⁰⁾⁵¹⁾, または組織培養株^{7) 52) 53)} についてであり, 腫瘍細胞の初代培養についての詳細な検討はない. 本章では四つの温度条件を設定して初代培養吉田肉腫細胞について低温

図14. 吉田肉腫細胞の初代培養における冷却・復温後のpercent labeled mitosis (0°C, 30分間冷却)



の影響を検討した.

冷却復温という条件下で腫瘍細胞は, 培養開始時と同様に細胞数を減少する. この減少は冷却温度と時間に関連して大きくなる. 復温後の腫瘍細胞の増殖曲線に同調化を示す階段状変化がみられたが, Newtonら¹⁾が Hela 細胞で4°C, 1時間の冷却後に観察したような, はっきりした階段状変化ではなく曖昧な部分的同調化であった. その後の腫瘍細胞数は対照と同程度か, あるいは, それ以上の増加率を示し, 結局, 低温処理のみで細胞を減少させることは期待できないことが示された.

腫瘍細胞の分裂指数も, 低温により synchrony を示すように変動する. 温度設定が0°Cで30分間と60分間の冷却時間の差異により, その後の分裂指数に著しい差異がみられたことは, 臨界温度³³⁾というより, 臨界時間ともいふべき臨界点が存在し, M期附近にある細胞を affect している可能性を示唆している.

分裂指数よりみた同調度も0°C, 60分の冷却処理で最大値7.0%であって10%に満たない.

培養液の乳酸量の増加, pHの低下, 糖の消費量の増加のいずれも冷却処理群に強くみられ, 復温後においては腫瘍細胞がより活動的でありその解糖代謝も亢進しているものと考えられる.

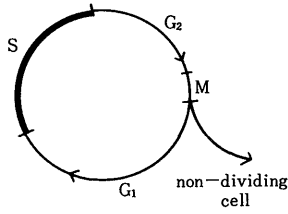
次に puls labeling による冷却復温後の腫瘍細胞のDNA代謝をみると, S期(DNA合成期)の細胞の増加は, 0°C, 30分間処理の場合, 復温後4~5時間に, 20°C, 3時間処理の場合, 復温後4時間に, 0°C, 60分間処理の場合, 復温後8~9時間にあることが判明した. 次に, autoradiogram によって, 初代培養中の吉田肉腫細胞の phase の解析と, 低温処理によりうける影響について検討した.

一般に, *in vivo* における cell cycle の解析は puls labeling 後の percent labeled mitosis の値を経時的にグラフにプロットして, 得られた曲線より容易に推定できる^{5) 54)~58)} (図15).

in vivo において腹腔内に注入された ³H-TdR は20~30分で腫瘍細胞を labeling したのち腹水中より消失するので, 完全な puls labeling が成立する. ところが, *in vitro* においては培養液中に残留した ³H-TdR は, その後S期に移行する腫瘍細胞をすべて標識していくため continuous labeling が成立する. 従って *in vivo* と同じ方法を用いようとするならば, 培地を更新し, さらに非放射性 thymidine を加えるなどして ³H-TdR のとり込みを完全に抑えねばならない^{59) 60)}. このことはすでに検

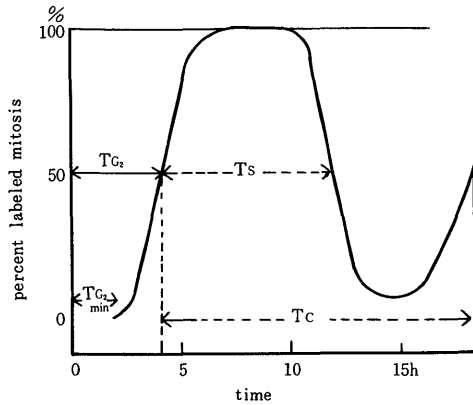
図15. puls labelingとcell cycleの関係(模型図)

A. cell cycle模型図



B. puls labelingの実験

percent labeled mitosisの変動



討したように、その後の腫瘍細胞に影響を与え、同調化や増殖の抑制を招く危険がある。そこで continuous labeling の結果を用いて数式により cell cycle を推計する方法が行われている^{6) 54) 61) 62)}。

いま、かりに培養中の全細胞が asynchronous な exponential growth を営んでいるとすると、continuous labeling によるLIは図16の如く直線になるはずである。時間0でS期にある細胞はすべて標識され、その後S期に移行してくるG₁, M, G₂期の細胞もつぎつぎに標識されていきT(G₁+M+G₂)の後にはLIは100%に達するであろう。そしてこの直線のなす勾配はS期に移行してくる細胞の速さを示し、それはG₁, M, G₂の細胞の順に画かれたものである⁶³⁾。

ところが、実験により得られたLIは、図13の如く、複雑な曲線の変化を示した。そしてLIは100%に達することなく90~96%で plateau に達し、non-dividing cell が4~10%存在していることを示している。

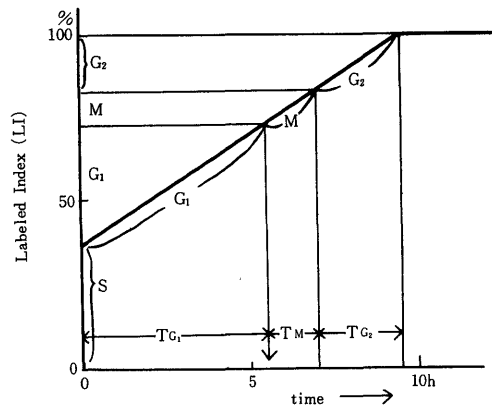
真の labeled index は、non-dividing cell を除かねばならないので⁵⁴⁾⁶¹⁾、各測定値のLIに対して、測定値LI×100/90~96の補正を行う(表6, A, B)。Till⁶¹⁾らがS期の算定に用いた数式は

$$S = 1/a \ln(L(t)_{\text{corr}} + e^{aG_2}) - (G_2 + t)t < G_1 \dots \dots \dots (1)$$

であるが、千ヶ崎⁵⁴⁾が用いている計算式はさらに簡単である。すなわち、

$$L(t)_{\text{corr}} = S/T \quad T - S = T(G_1 + M + G_2) \dots \dots \dots (2)$$

図16. continuous labelingの実験(模型図)
(exponential, asynchronous growth)



但し L(t)corr は補正せるLIである。

T(G₁+M+G₂) は、LIが plateau に達した時間であり L(t)corr=100% となった時間である。

(2)式より求めたTsは表7の如くなる。但し plateau に達した時間の判定は容易でない。この値はTsのみならず、Tc(世代時間)の値に大きくひびいてくるので、この数式より得られる結果には誤差が多いと考えねばならない。また分裂期の長さTMは

$$T_M = m \cdot T / 0.693 \dots \dots \dots (3)$$

で与えられる。(但しmは分裂指数)⁶¹⁾⁶³⁾

時間0~12の分裂指数の平均値は、実験Aで、冷却群4.74、対照4.05、実験Bで冷却群4.53、対照4.15で

表7 continuous labeling による推計値
世代時間 T_c , および各期の長さ
(0°C 30分間冷却)

	実験 A		実験 B	
	冷却	対照	冷却	対照
T_{G_2}	2.5	2.3	3.1	2.6
T_M	0.7	0.8	0.9	0.8
T_S	3.4	3.8	4.4	4.8
T_{G_1}	3.8	5.5	5.0	5.6
T_c	10.4	12.8	13.4	13.8

単位：時間

あるので式(3)に代入すると各 T_M は表7の如くなる。 T_{G_2} は図14より求められ、 T_{G_1} は $T_c - T_{(G_2+M+S)}$ により得られる。

以上A, B二つの実験における T_c は対照で、12.8時間、13.8時間で約1時間の差がみとめられた。cell cycle, および各期の長さは同一腫瘍においても、増殖の条件により変動し易い。また同一個体における測定でも時間により大きな差がある。従って、世代時間は、腫瘍特異のものでなく、むしろその時点における腫瘍の増殖を示すパラメータに過ぎないとも云える。実際に、その値は報告者により一定せず、これは他の腫瘍細胞でも吉田肉腫でも同様である^{(64)~(68)}。培養系細胞においては T_c は、exponential growth の状態が基準になる。

著者の実験Aと実験Bの成績を比較すると実験Bにおいては腫瘍細胞の増殖度が、何らかの原因で劣っていたといえる。

さて実験A, 実験Bにおいて冷却により T_c は短縮をみた。これは T_{G_2} が延長したにもかかわらず T_S , T_{G_1} が短縮して起ったと思われる。

対照において腫瘍細胞のLIの変化は、理論的には直線になるはずである。しかるに軽度の二峰性曲線の変化がみられた。これは標識のため、孵卵器より室内に出したり、 3H -TdRを加えた操作により生じた同調化の結果であろう。

冷却群においては、腫瘍細胞のLIの変化は二峰性の曲線を示す顕著なものである。最初の急勾配は、復温後2.0~2.5時間にS期に入る細胞の多いことを示し、冷却復温により G_1 期よりS期への転入が促進されることを示している。計算において T_{G_1} は短縮していた。S期に入った細胞は T_S (3.4と4.4時間)の間は、DNA合成期にあるので、復温後4~5時間はS期の細胞集団は高い population を維持する(図12, A参照)。

復温後2~3時間より4~6時間の腫瘍細胞のLIの変化を示す曲線の勾配はゆるやかになりほぼ平坦になる。この時間にS期に入る細胞は減少している。この変化を構成するものは冷却時に G_1 前期, あるいはM期にあった細胞であり、 G_2 期が延長したためさらに減少したものと考えられる。その後、おくれた G_2 期の細胞がS期に達すると再びLIは増加しはじめて、二峰性変化の第2の峰を形成するのであろう。

すなわち、冷却により最も影響をうけるのは分裂直後の若い G_1 期細胞とM期、 G_2 期の細胞である。 G_1 後期の細胞は復温と同時に速度を速めてS期に入るが、冷却により affect された G_1 前期の細胞はおくれ、M期あるいは G_2 期の細胞とともにS期に入るものと推定され、同調がきたされたと考えられる。

冷却の影響が強いのは、M期にある細胞であるとの報告は多い。Spear⁽⁶⁹⁾, Newton ら⁷⁾は冷却後にみられる分裂指数の低下を、分裂期に入る細胞がなくなるためと考えている。しかし、0°C, 30分間の冷却では復温直後すでに分裂指数は増加していた。一方、0°C, 60分間の冷却では復温直後に分裂指数の著しい低下(0.6%)が観察され、30~60分間の冷却によってM期の細胞が破壊された結果と考えられる。すなわち、冷却時間によってはM期の細胞の破壊が起り得るのであり、 T_{G_2} の延長もあり、著しい分裂指数の低下を来すのである。冷却後の細胞数の減少もこれにより説明できる。

non-dividing cell の出現率は、0°C, 30分間の冷却処理の場合対照と余り変わらず、細胞を強く障害するためには、さらに低い温度か、長い時間の冷却作用が必要であろう。

〔Ⅲ〕 吉田肉腫細胞の初代培養における 温度処理と化学療法の併用効果

前章において温度処理の吉田肉腫細胞に及ぼす影響について検討した。

冷却により腫瘍細胞のうける影響は cytotoxic というより cytostatic なものに近い。冷却によっても細胞数減少は著しくなく、復温後の同調化がやや目立つが、その程度は partial synchrony というべきもので顕著なものではない。しかし、比較的長いDNA合成期=S期には、ある程度の細胞集団が増加し、同調化がみられた。そこで、DNA合成阻害剤として知られる nitrogen mustard, mitomycin C と、metaphase に対し特異的に阻害するといわれる vincristine sulfate を、温度処理を行った細胞に投与してその効果を検討した。

I. 実験材料および実験方法

前章に使用した培養液 (Earle 塩類液60%, 牛血清40%) で, 分注量 4 ml で初代培養し 24 時間を経た吉田肉腫細胞に, 0 °C, 30 分間の冷却を加え, 一定時間後, 低濃度の化学療法剤を投与して, その後の細胞数を算定し, 同時に形態学的観察を行った.

使用薬剤はDNA合成阻害剤として alkylating agents の nitrogen mustard (NH₂) [吉富薬品K.K.製], 抗生物質の mitomycin C (MMC) [協和醗酵K.K.製] vinca rosea Linn の alkaloid で spidele poison として知られる vincristine sulfate (VCR) [Lilly CO.] を用いた.

NH₂は0.001NHClで溶解し 2 μg/mlの濃度で使用し, MMCとVCRはそれぞれ生理食塩水に溶解し, 1 μg/ml, および, 10⁻⁷g/mlの濃度になるようにして細胞浮游液に加えた. 溶解液は実験のたびに新製し, 使用前まで氷浸して使用した.

II. 実験成績

1. 0 °C, 30分間冷却とNH₂の併用

0 °C, 30分間の冷却復温後 1, 3, 6, 時間にNH₂を 2 μg/mlになるように細胞浮游液に加えたのち, 1, 3, 6 時間後の細胞数をクエン酸処理法により算定した. 対照とした非冷却群にも同量のNH₂を加えた (表 8, 図17A).

対照の非冷却群においてはNH₂投与直後より腫瘍細胞数は減少し, 投与前の細胞数に比して, 1 時間で平均69%, 3 時間で60.5%, 6 時間には19%に減少している. 冷却処理群で復温後 1, 3 時間の投与では対照にくらべて腫瘍細胞減少率は低く, 6 時間投与例において, 対照に近い値が示された. この結果からみて, 復温後 1, 3, 6 時間のNH₂投与では, 冷却処理とN

H₂投与の相乘ないし相加効果はなく, かえって効果低下がみとめられた.

しかし, 上記の細胞減少度は, 薬剤投与時の細胞数で除したものであり, 非投与群においては復温後の時間の経過と共に, 細胞数はかなり増加している. そして, 復温後 2, 4, 6, 7, 9, 12 時間の非投与群の細胞数の実測値, あるいは推計値をもって, 制癌剤投与後の細胞数を除して細胞減少率を計算した (表 9, 図17B).

細胞減少率は, やや著しくなるが, やはり冷却とNH₂投与の併用による効果増強はみられない.

図17. 初代培養吉田肉腫細胞における冷却・復温後 nitrogen mustardの效果 (0 °C, 30分間 NH₂ 2 μg/ml)

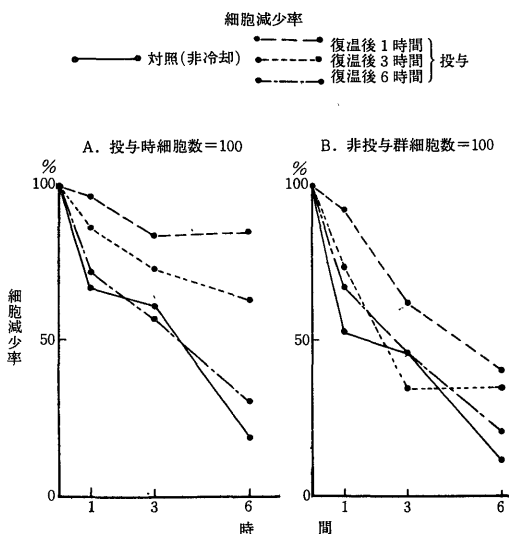


表 8 冷却・復温後NH₂投与による細胞数(×10⁴)の変動及び減少率 (0 時間細胞数を 100%とした場合) 培養開始後24時間0 °C 30分間冷却

NH₂ 2 μg/ml

() 内は減少率%

NH ₂ 投与時間	投与後時間	0 時間	1 時間	3 時間	6 時間
復温後・1 時間	対 照	10.2 (100)	9.8 (96.0)	8.5 (83.3)	8.6 (84.3)
	対 照	12.0 (100)	7.9 (65.8)	7.1 (59.2)	1.5 (12.5)
復温後・3 時間	対 照	11.7 (100)	10.0 (85.5)	6.1 (72.7)	7.5 (62.5)
	対 照	14.2 (100)	10.6 (74.6)	8.8 (62.0)	2.6 (18.3)
復温後・6 時間	対 照	17.6 (100)	12.6 (71.6)	10.0 (56.8)	5.4 (30.7)
	対 照	19.2 (100)	12.7 (66.1)	11.6 (60.4)	5.0 (26.0)
対照減少率平均		(100)	(68.8)	(60.5)	(18.9)

形態学的変化をみると、細胞の変形、核の膨化などは軽い。NH₂との接触1時間の場合破壊された細胞以外の細胞の核は正円形であり、核染色性も良好である。NH₂との接触6時間の場合、破壊された細胞は増加し、巨大な核を有する細胞も出現してくるが総体的に形態学的変化は極めて軽微といわれなければならない。

2. 0°C, 30分間冷却とMMCの併用

0°C, 30分間冷却, 復温後1, 3, 6時間においてMMC 1 µg/mlとなるように細胞浮游液に加え, 1, 3, 6時間後の腫瘍細胞数を算定した(表10, 図18, A)。

MMC 1 µg/ml 濃度のものを用いた場合の腫瘍細胞減少率は, NH₂ 2 µg/mlを用いた場合の效果に劣る。MMC投与後1~3時間で腫瘍細胞数は約70%に減少するが, 6時間後には再び細胞数増加の傾向がみられる。これは冷却群, 非冷却群の両者にみられるが, 冷却復温後1, 6時間のMMC投与群において6時間後の細胞数の回復は著しい。

MMC非投与群の経時的の細胞数により, 同時刻の

投与群細胞数を除すと(表11, 図18B), 投与1時間後の細胞減少効果とあまり変らない。MMC 1 µg/ml濃度では, 細胞数の減少度からみた吉田肉腫細胞の障害は軽く, 冷却処理により, わずかな作用増強効果がみとめられる。

MMC投与後の腫瘍細胞の形態学的変化は著しい。核の変形, 核染色性の低下, 細胞質の膨化と空胞化, 超大型細胞の出現などが観察されたが, この変化は, 冷却処理を併用したものに著明であった。

3. 0°C, 30分間冷却とVCRの併用

0°C, 30分間冷却, 復温後1, 3, 6時間において, VCR 濃度 10⁻⁷g/ml と接触させ, 1, 3, 6時間後の腫瘍細胞数を算定し, 細胞減少度を計算した。NH₂, MMC投与の場合と異なる結果が得られた(表12, 図19A)。

対照群ではVCR投与後, 腫瘍細胞数は急速に激減し, 1時間後に約30%となる。その後は順調な回復がみられる。冷却処理群では, VCR投与1時間後の腫瘍細胞減少は軽度である。ことに, 復温後6時間にVCRを投与した場合, その影響は極めて軽微であり,

表9 冷却復温後NH₂投与による細胞減少率
(非投与群細胞数を100%とした場合)

NH₂ 2 µg/ml

() 内は減少率%

NH ₂ 投与時間 \ 投与後時間	1 時 間	3 時 間	6 時 間
復温後 1 時間	(91.6)	(62.0)	(45.5)
復温後 3 時間	(73.0)	(34.7)	(34.9)
復温後 6 時間	(66.7)	(46.5)	(21.9)
対照減少率平均	(62.7)	(46.1)	(11.7)

表10 冷却復温後MMC投与による細胞数(×10⁴/ml)の変動
および減少率(0時間細胞数を100%とする)
培養開始後24時間 0°C 30分間冷却

MMC 1 µg/ml

() 内は減少率%

MMC投与時間 \ 投与後時間	0 時 間	1 時 間	3 時 間	6 時 間
復温後 1 時間	8.6 (100)	6.4 (74.4)	5.9 (68.6)	8.3 (96.5)
対 照	10.4 (100)	7.4 (71.2)	8.1 (77.9)	8.9 (85.6)
復温後 3 時間	11.7 (100)	7.7 (65.8)	8.9 (76.1)	7.8 (66.7)
対 照	13.1 (100)	9.1 (69.5)	9.0 (68.7)	9.6 (73.3)
復温後 6 時間	15.3 (100)	12.9 (84.3)	10.1 (66.0)	13.9 (90.8)
対 照	18.2 (100)	12.7 (69.8)	13.2 (72.5)	15.1 (83.5)
対照群減少率平均	(100)	(70.2)	(73.3)	(80.8)

図18. 初代培養吉田肉腫細胞における冷却・復温後 Mitomycin 投与の効果 (0°C 30分, MMC 1 μ g/ml)

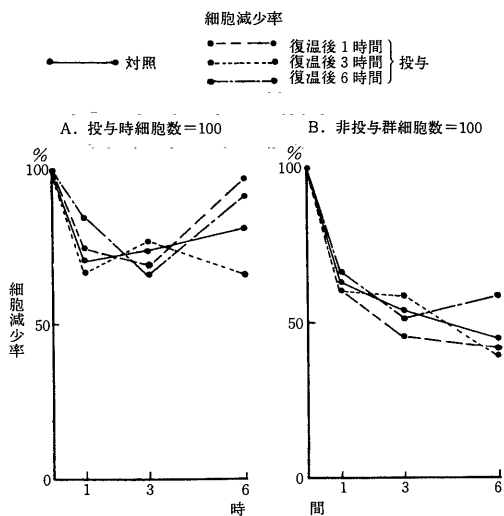


図19. 初代培養吉田肉腫細胞における冷却・復温後 Vincristine 投与の効果 (0°C 30分, VCR 10⁻⁷g/ml)

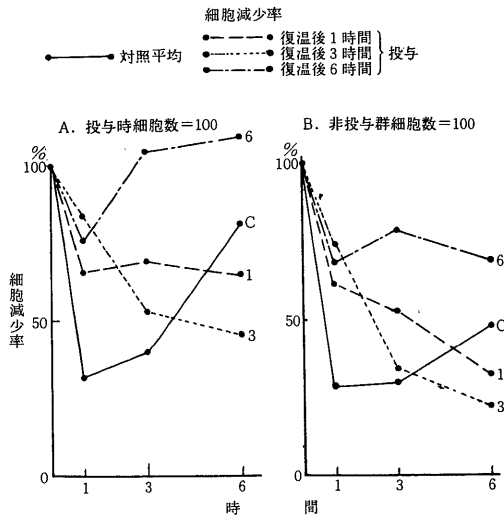


表11 冷却復温後 MMC 投与による細胞減少率 (非投与群細胞数を 100%とした場合)

MMC 1 μ g/ml

() 内は減少率%

MMC投与時間 \ 投与後時間	1 時 間	3 時 間	6 時 間
復温後 1 時間	6.4 (66.0)	5.9 (46.5)	8.3 (41.9)
復温後 3 時間	7.7 (60.6)	8.9 (58.2)	7.8 (39.4)
復温後 6 時間	12.9 (65.2)	10.1 (51.0)	15.2 (58.2)
対 照 群 平 均	(62.9)	(53.6)	(44.5)

表12 冷却復温後 VCR 投与による細胞数($\times 10^4$ /ml)の変動 および減少率 (0時間細胞数を 100%とする) 培養開始後24時間 0°C 30分間冷却

VCR 10⁻⁷ g/ml

() 内は減少率%

VCR投与時間 \ 投与時間	0 時 間	1 時 間	3 時 間	6 時 間
復温後 1 時間	9.0 (100)	5.9 (65.6)	6.2 (68.9)	5.8 (64.4)
対 照	10.8 (100)	3.5 (32.4)	5.1 (47.2)	9.8 (90.7)
復温後 3 時間	10.4 (100)	8.7 (83.6)	5.5 (52.9)	4.7 (45.2)
対 照	13.1 (100)	4.4 (33.6)	4.4 (33.6)	9.5 (72.5)
復温後 6 時間	15.8 (100)	11.9 (75.3)	16.3(103.2)	17.1(108.2)
対 照	17.9 (100)	5.1 (28.5)	6.7 (37.4)	14.1 (78.8)
対照減少率平均	(100)	(31.5)	(39.4)	(80.7)

3, 6 時間後には投与前細胞数の103, 108%の減少度を示し, 却って細胞数の増加がみとめられる。しかし, 冷却, 復温後の時間における非投与群の細胞数を基準とすると, 冷却復温後1~3時間にVCRを投与した場合, 投与後6時間には対照に比べ明らかに減少率が高い, 従って冷却処理とVCR投与との相乗効果をもとめてよい(表13, 図19B)。

VCRによる metaphase における arrest が報告されている。しかし著者のみるところでは分裂指数の増加がみとめられた程度で arrest を十分に確認できなかった。細胞質の一部が, コブ状に隆起した変形細胞の出現をみた。

4. 復温後の経時的薬剤投与による影響

0°C, 30分間冷却, 復温後1~8時間に, 毎時, NH₂ 2µg/ml, MMC 1µg/ml, VCR 10⁻⁷g/mlの濃度で投与し, 1~3時間後の腫瘍細胞数を算定した。細胞減少度は投与前を100として計算した(表14)。

1) NH₂投与は, 冷却復温後4時間以降に与えた場

図20A. 初代培養吉田肉腫細胞に及ぼす冷却・復温後の化学療法剤の効果(0°C 30分間冷却)

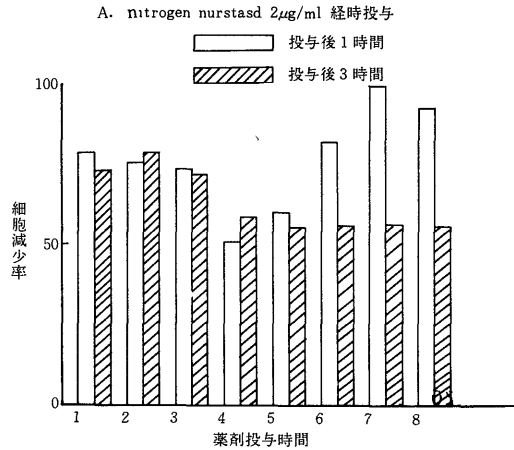


表13 冷却復温後 VCR 投与による細胞減少率 (非投与群細胞数を 100とした場合)

VCR 10⁻⁷ g/ml

()内は減少率%

VCR投与時間 \ 投与時間	1 時 間	3 時 間	6 時 間
復温後 1 時間	(61.5)	(52.2)	(32.8)
復温後 3 時間	(73.7)	(34.8)	(22.5)
復温後 6 時間	(67.2)	(78.0)	(68.1)
対 照 群 平 均	(28.5)	(29.7)	(47.6)

表14 初代培養吉田肉腫細胞に及ぼす冷却復温後の化学療法剤の効果 (0°C、30分間冷却)

化学療法剤の経時投与による細胞数および細胞減少率

()内は細胞減少率

投与時間	投与前細胞数 ×10 ⁴	NH ₂		MMC 1µg/ml		VCR 1×10 ⁻⁷ g/ml		
		1 時間	3 時間	1 時間	3 時間	1 時間	3 時間	
復 温 後	1	11.1	8.7(78.4)	8.2(73.9)	7.6(68.5)	6.5(58.6)	7.7(69.4)	6.6(59.5)
	2	10.1	7.6(75.2)	7.9(78.2)	7.7(76.2)	7.8(77.2)	10.0(99.0)	6.4(63.4)
	3	10.9	8.0(73.4)	7.8(71.6)	7.4(67.9)	8.2(75.2)	9.5(87.2)	5.5(50.5)
	4	11.4	5.8(50.9)	6.7(58.8)	6.9(60.5)	8.1(71.1)	8.5(74.6)	4.9(43.0)
	5	12.8	7.6(59.4)	7.1(55.5)	8.8(68.8)	9.0(70.3)	7.7(60.2)	6.8(53.1)
	6	15.1	12.3(81.5)	8.4(55.6)	13.3(88.1)	9.3(61.6)	11.7(77.5)	9.3(61.6)
	7	17.2	17.1(99.4)	9.6(55.8)	11.8(68.6)	14.7(85.5)	14.7(85.5)	10.8(62.8)
	8	19.9	18.4(92.5)	11.0(55.3)	16.6(83.4)	21.5(108.0)	18.9(95.0)	15.6(78.4)

図20B. 初代培養吉田肉腫細胞に及ぼす冷却・復温後の化学療法剤の効果 (0°C, 30分間冷却)

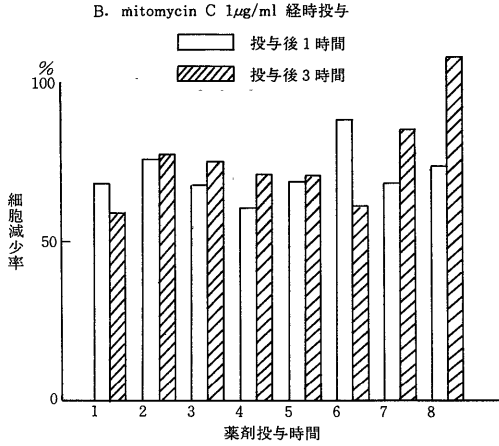


図20C. 初代培養吉田肉腫細胞に及ぼす冷却・復温後の化学療法剤の効果 (0°C, 30分間冷却)

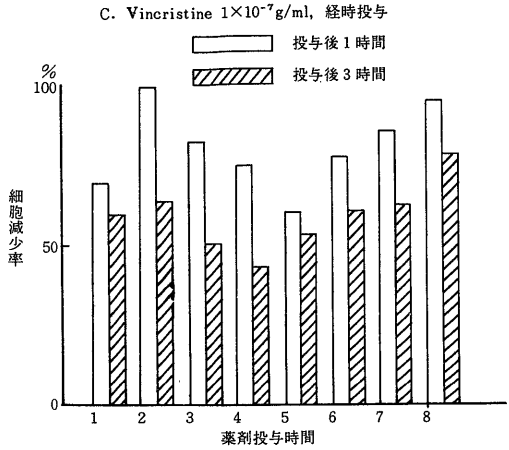
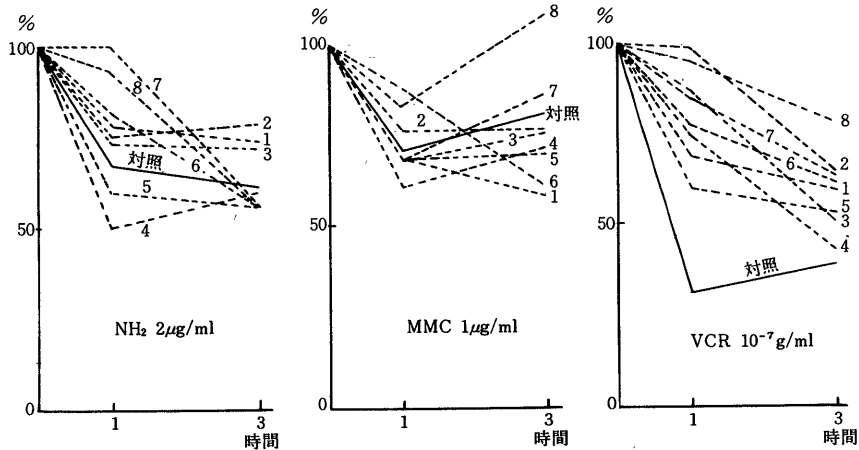


図21. 初代培養吉田肉腫細胞の冷却・復温後の化学療法剤の効果 (0°C, 30分間冷却) 細胞減少率 (数字は復温後の投与時間を示す)



合にはその効果が著しい. とくに, 復温後 4, 5 時間に投与した場合, その後 1 時間の細胞減少が著しく, 3 時間後においても回復しない. 冷却復温後 1~3 時間にNH₂を投与した場合は, 明らかにNH₂の効果が軽減される(図20A, 図21). 冷却復温後 4~8 時間にNH₂を投与した場合, 3 時間後の腫瘍細胞の減少率はほぼ一定して, 平均44%であった.

2) MMC投与は, とくに, 冷却処理との併用効果はみとめられないが, 冷却復温後 1~5 時間にMMCを投与した群に軽度の相加効果がみられ, 後温後 6~8 のMMC投与の場合, かえって効果の低下がみられた(図20B, 図21).

3) VCRを冷却復温後 3, 4 時間に投与した場合に対照に近い細胞数減少が得られるが, 投与後, 3 時間までの観察に限ると, 冷却とVCR投与の併用効果を示す所見は全くみられない(図20C, 図21).

Ⅲ. 小 括

初代培養吉田肉腫細胞を, 冷却処理により同調化させたのち, 作用機作の判明している 3 種の化学療法剤を低濃度で作用させ, 効果の増強を期した.

吉田肉腫細胞にNH₂を冷却復温後 4, 5 時間に投与すると, 有意の差をもって効果の増加をみるが, その他の時間に投与した場合にはその効果は却って減弱する.

MMC 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度においては、吉田肉腫に対し十分な効果を発揮することが難かしい。これを冷却復温後 6~8 時間に投与した場合、腫瘍細胞数は不定であるか、あるいは増加した。吉田肉腫に対し、冷却復温後 VCR を投与した場合、非冷却群と異った態度が示された。すなわち、対照群では VCR 投与後 1 時間に約 70% の細胞減少がみられたが、冷却群では細胞減少はきわめて軽微であり、VCR の効果が妨げられていると考えられる。

考 案

1. 初代培養について

組織培養法の進歩により細菌学の諸技法が哺乳動物細胞、ことに、腫瘍細胞の培養に応用されることになり、細胞の生物、化学的研究に幾多の解明を与えてきた。

温血動物用の塩類溶液³³⁾³⁴⁾として処方者の名を附した数種の溶液が知られているが、増殖培地として使用される際には、アミノ酸、あるいは、蛋白源として、哺乳動物の血清や、lactalbumin hydrolysate が混入される。

初代培養法の培地も、ほぼ同様の組成からなり、栄養源と buffer 作用を兼ね備えている血清は必ず用いられているようであるが、他方、血清中の未知の物質が培地に持ち込まれる、欠点もあり、完全な合成培地に対する地味な研究開発が続けられている現状である。一方、細胞レベルの追求が試験管内で可能であるという大きな利点を有する組織培養化への試みは、多くの組織、細胞に対して試みられ、ヒト、実験腫瘍のいくつかは細胞株として確立されている。

Graff & McCarty⁷⁰⁾ は馬血清を含む独自の medium 中で L 細胞、Clone 925 fibroblasts, Hela 細胞、KB 細胞、chang liver cells, Ehrlich 腹水癌が順調に発育するのをみとめ、Ely ら⁷¹⁾ は Ehrlich 腹水癌の初代培養において No. 858 と馬血清が最も適していたと述べている。その他、Walker 256 carcinosarcoma⁷²⁾, mouse P388⁷³⁾, AH 13, AH 130⁷⁴⁾ などの初代培養が行われているが、すべての腫瘍細胞を増殖できる共通の培地は、未だ発見されていない。

吉田肉腫の培養も古くから試みられた⁷⁵⁾。その後、基礎培地、血清の種類や配合比等に、種々の検討が行われ、いくつかは初代培養に成功している。Katsuta ら³⁸⁾ は Saline D と馬血清、松岡⁴¹⁾ は Hanks 変法と馬血清で、Utagawa³⁵⁾ は吉田肉腫の増殖に及ぼす種々な条件を設定し検討して、基礎培地で Earle

と Hanks では差がなく、血清は馬牛のいずれでもよいとしている。しかし、最も増殖のよかったものは 0.3% に lactalbumin hydrolysate を含む Earle BSS と血清の等量培地であったと述べている。Ebina ら³⁷⁾、Kuroki ら³⁶⁾ 等もほぼ同様な培養液を用いている。このように、種々の組成の培養液中で割合容易に成功する吉田肉腫は、viability が高く環境の変化に対する順応性を有する数少ない実験腫瘍であり、培養中にガラス壁に附着したり、集塊をつくる性質がなく⁷⁶⁾、細胞浮游法による初代培養に最も適した腫瘍といえよう。

初代培養 (primary tissue culture) とは、生体において *in vivo* で増殖中の組織、細胞を試験管内の *in vitro* の状態で培養し、増殖させんという試みであるが、比較的操作の容易な腹水癌であっても、採取、分注、培養といった極めて大きな物理化学的变化に細胞をさらすことになる。とくに、培養初期の誘導期 (lag phase) においては、新しい環境への適応と選択が行われ、細胞数減少、分裂指数低下、増殖度の抑制がみられる。著者の実験でも、分注後の細胞数は常に予測値より 10~20% の減少を示し分注操作等で失われる細胞の多いことを示していた。培養開始直後にも細胞が減少する場合が多い。吉田肉腫細胞では 24 時間前後より対数増殖期 (logarithmic growth phase) に入るようである。ほぼ 72 時間を経過すると、もはや同一培地での増殖率は次第に低下してくる。そこで、安定した増殖が示される 24~48 時間において各種の検討を加えたわけである。世代時間より推計して、この時間帯における細胞は培養開始時の娘細胞ないしその子になり、新しい環境に順応する性質を獲得しているものといえる。このことは増殖の低下を示した培地より新しい培養液に移したとき、すみやかな順応が得られたことにより明らかである。

lag phase が長い⁷⁶⁾ ことのほかに初代培養のもつ大きな特徴は、宿主のもつ種々な要素が腹水や細胞と共に培養液に持ち込まれることである。従って *in vivo* と *in vitro* の中間的存在ともいえる。一般に *in vitro* の実験では、宿主を全然除外しているため、成績をそのまま *in vivo* に当てはめて考えることに大きな危険がある⁷⁷⁾。しかも、系列化された細胞株においては transformation のため腫瘍性を喪失する場合が多いと警告されている⁷⁸⁾。この点、初代培養には、多少なりとも宿主由来の性質が残っていると考えられ、*in vivo* に近い成績が生れるはずである。

悪性腫瘍の化学療法を行うにあたって常に問題にな

るのは、最も効果的な薬剤の撰択であろう。現在、子どもの臨床で用いられている方法は、組織型を形態学的に知った上で、経験的に“よく効く”と云われる薬剤を中心に併用療法を行う位であり、人癌の複雑多岐にわたる個体差の中で適切な薬剤を撰択することは、まことに困難といわねばならない。このため細菌における感受性試験の如きものの出現が切望される。しかし、すべての人癌を *in vitro* で培養増殖させることは容易ではない。腫瘍組織の活性を細胞生化学的に判定しようとする試みがなされ、山崎、山本⁷⁹⁾のCPA法、西岡ら⁸⁰⁾、太中ら⁸¹⁾のINK法、近藤⁸²⁾のSDI法が考えられ臨床的に応用されて、よい成績を得ているといわれる。しかし、今後は人癌を *in vitro* で増殖させ得るような初代培養法の開発が望まれるわけである。

2. 温度処理と同調分裂について

かって低温が腫瘍増殖を妨げるのではないかと考えられ、臨床的に応用されたり²⁵⁾²⁶⁾、実験動物について検討されたが、*in vivo* において動物、あるいは、臨床例に用いられる程度の低温では、腫瘍抑制効果はみとめられないという。むしろ温度処理により起る細胞増殖と分裂の関係が注目され、古くから植物細胞などについて実験されていた⁵⁰⁾⁵¹⁾。Spear⁶⁹⁾は chick embryo を用い0.5°C、4時間の冷却を行うと、復温後5時間30分は分裂指数が低下し、その後急に上昇することを知った。ところが、1950年頃よりの組織培養法の進歩により哺乳動物細胞を容易に望む温度に冷却することができるようになり、細胞 level における観察も極めて容易になった。さらに Howard & Pelc⁵⁾が³²Pを用いて、autoradiogram に成功し、続いて³Hや¹⁴Cの如くβ線 energy の低いものが使用されて、鮮明な autoradiogram が得られるようになると、細胞のDNA合成の解析、哺乳動物の cell cycle の解明に急速に採り入れられ、素晴らしい進展をみた。それと同時に、細胞を同調化させ、ある一定の細胞令を揃えた集団を用いて、cell cycle 究明や、化学療法剤の screening が行われている。

同調培養法には二つの方法がある。ある特定の phase の細胞を集める selection synchrony と、細胞をある phase に集める induction synchrony である。前者は、培養細胞がガラス管壁に附着し増殖しがれ難いのに、分裂期に近づくとその附着力を減ずるといった性質を利用して分裂期の細胞を浮遊させ採集するという方法であり、技術的な難点はあるが、確実な同調化を期待できるという⁸³⁾。Bruchovsky ら⁸⁴⁾は、³H-TdR 2 μc/ml の濃度で一定時間作

用させ、S期に入る細胞を放射能により選択的に破壊し去り、窓“window”をあけるという方法で、同令の細胞を集めている。

induction synchrony のために大体二つの方法がとられる。

温度処理による synchrony が簡単な方法として古くから知られているが、著者の実験にもみられた通り、十分な synchrony になることは少なく、部分的同調 (partial synchrony) に終ることが多い。

Newton & Wildy⁷⁾は Hela 細胞で、4°C 1時間の cold shock ののち37°Cに復温すると、細胞数は18~20時間増加しないが、その後2時間のあいだに爆発的に分裂が起り、平均90%の同調化 (parasynchrony) がみとめられたと報告した。なお細胞あたりのDNA量は分裂の前後2時間に急激に増加し、細胞の viability には終局的には影響がなかったとしている。この Newton らの成績に対して Hela による追試⁵²⁾、FL細胞⁵³⁾、L細胞について行われた実験においても、それほどの同調化はみとめられていない。このように冷却の試みは主に、細胞株について検討されてきたが、温度処理が、細胞に与える影響の詳しい mechanism について解明されていない。

著者の初代培養における成績では部分的同調が得られたに過ぎないが ³H-TdR による autoradiogram の成績などから、低温が affect するのは、分裂直後の若いG₁期あるいは、M期の細胞であり、G₂期が延長することもある。synchrony が生ずるものと考えた。いずれにせよ温度処理による同調については、細胞の性質、培養液の組成が大いに関係するし、冷却温度、冷却時間の長さ、復温の速度などが重要な問題として討議されなければならない。

同調化に用いられる他の方法は、必須栄養の欠乏と補充により得られる増殖度の調整である。栄養欠乏培地 (deficiency medium)、または代謝拮抗剤を添加した培地中では、細胞は、代謝が阻害され、細胞回転は停止する。(G₁期で停止すると推定される)。この時突然に欠乏せる栄養が与えられると synchrony をとって増殖がおこる。このため糖を添加する⁴⁹⁾、無蛋白培地に蛋白を加える⁸⁵⁾などの試みが、細菌を用いて、行われた。Barner ら⁸⁶⁾は E. coli の培地に代謝拮抗剤を加え thymidine 生成を抑制し、DNA合成を中断せしめると、細菌はRNA、および、蛋白のみを合成する“unbalanced growth”の状態になり、この時 thymidine を与えると同調化がおこる実験を行った。Ruekert and Mueller⁸⁷⁾はこの方法を Hela 細胞に応用して、同じような同調化を証

明した。Walker and Helleiner⁸⁸⁾ はL細胞を用い、同じ方法で同調化させたのちに、経時的に nitrogen および sulfa mustard と接触させ、薬剤のD₅₇を検討した。thymidine を加えて1~3時間後の細胞中では、S期の細胞が90%を占めているので、exponential growth の約1/2量の濃度の薬剤で十分な効果があるとしている。

3. cell cycle よりみた化学療法

化学療法剤の作用機作が解明され、さらに autoradiogram の導入により cell cycle の解析がすゝむと、cell cycle にのっとった癌治療法が考えられるようになった⁸⁴⁾⁸⁹⁾⁹⁰⁾。

腫瘍細胞を含めて、細胞は cell cycle をもって分裂、増殖する。cell cycle (division cycle) を構成する四つの phase には、特定の薬剤や放射線に対して感受性が異なる性質があり、この事実にとつた化学療法、あるいは、放射線療法⁹¹⁾⁹²⁾が、実験的に臨床的に行われている。放射線に感受性を示すのはG₁期の細胞といわれる。化学療法剤の多くは核酸代謝を阻害する薬剤である。

nitrogen mustard は、2個の β -chloroethy 基を持ち、DNAの Guanin のN-7の alkylating により、強くDNA合成を阻害するが、同時にRNAにも作用する可能性がある。Levis ら⁸⁹⁾ は cell cycle とDNA代謝とに及ぼすNH₂の作用を検討し、Layde and Baseage⁹³⁾ は Ehrlich 腹水癌においてH-化合物を用いた autoradiogram によりNH₂の効果を検討し、G₁期にある細胞を阻害し、これらの細胞はいずれも細胞分裂を行わずに再びDNA合成を開始するためDNA量は50%も増加し、細胞が大型化すると報告した。脇坂ら⁹⁴⁾ も、SN36 mouse leukemia において、nitromin によりTcが約3倍に延長するのを観察し、G₂期、S期が延長するためとしている。一方、Pittillo ら⁹⁵⁾ は、細菌の resting cell と、dividing cell の薬剤の感受性の差異を調べた報告のなかで、E. coli にNH₂を作用させる場合、resting cell に用いる時は、dividing cell の時の3~6倍量を要したとのべている。

以上、NH₂は分裂細胞のS期、G₂期に affect しDNA、RNA合成を障害する⁹⁶⁾。

著者の成績では冷却復温後4、5時間に投与した場合に、効果が増強された。すなわち、冷却復温後4~8時間において、NH₂に感受性の強いS期、G₂期の細胞が増加していたことを示し、冷却後の puls labeling で得られた結果と合致した。また冷却復温後1~3時間においてはNH₂の効果は減少する。これは温

度処理によりおくれたG₂期、M期、G₁初期の細胞群が、ちょうどG₁期にあってNH₂の作用を免れたため起った現象と考えられる。

mitomycin C は Streptomyces caespitosus の培養濾液中より秦ら⁹⁷⁾ により得られた抗生物質で、強いDNA合成阻害作用を有する。その作用機作は、細胞中で酵素的にまた化学的に還元され、この不安定な還元型がDNAと結合して DNA-polymerase の反応を阻止し、DNA合成を障害する一方、DNase の活性化も行うとされ、臨床的に多く用いられている⁸⁸⁾。細胞形態学的には、静止核にある細胞に作用して、核のDNA、仁のRNAの変性をおこし、核染色体に異常な変形と変質をもたらす、細胞質内の空胞形成が著しい。

動物腫瘍についての検討を加えた Sugiura⁹⁸⁾、白淵¹⁰⁰⁾ によれば、腫瘍によりMMCに対する感受性にかんがりの差異がみとめられ、吉田肉腫においては500 μ g/kgの最大耐容量の投与によりはじめて治療効果がみとめられ、吉田肉腫はMMCに対し感受性が低いことが示された。神前¹⁰¹⁾ は、1 μ g/mlの濃度で Hela 細胞に強い影響をみとめたとしたが、この濃度では吉田肉腫細胞にはやや希薄すぎたと思われる。

吉田肉腫細胞に MMC 1 μ g/ml で作用させると、1時間後には30~40%の細胞が減少するが、3~6時間後には腫瘍細胞数の増加傾向がみとめられた。ことに、冷却復温後7~8時間を経たものに投与した場合、細胞の回復率は著しい。これはMMCの作用時間がS期前半にあることから考えて、復温後4~5時間で peak に達していたS期の細胞集団が、7~8時間後にはG₂にあってMMCの影響をうけずに分裂するためと考えられる。

vincristine sulfate (VCR) はC₄₆H₅₄N₄O₁₀・H₂SO₄の化学式をもつ alkaloid で vinblastine (vincal-eukoblastin, VLB) と共に、急性白血病、小児がん、lymphosarcoma などに臨床的に繁用される。

その作用機作は、十分解明されてはいないが、細胞分裂を metaphase で不可逆的に arrest することが知られているが⁸⁴⁾、Johnson ら¹⁰²⁾ によれば細胞内の代謝経路を障害する作用ももつという。また、Cutts ら¹⁰³⁾ はマウスの腫瘍において、有効量に腫瘍差をみとめている。

著者の使用した10⁻⁷g/mlの濃度は Bruchovsky, Johnson らが培養細胞に用いているVLBの量を参考にしたものであるが、これを作用させると培養吉田肉腫細胞において、約1時間で70%の細胞が減少した。この減少率はVCRが metaphase にのみ特異的に作

用するものと考えては説明できず、他の phase にある細胞も十分に障害することを示唆する。温度処理を行ったものすべてにおいてVCRの効果が劣る結果となった。これは冷却復温そのものが、VCRの影響を軽減したと考えられ、興味を持たれる。しかし、投与後6時間を経過したものについての細胞減少率からみると、冷却復温後早期の1~3時間に投与した場合に、細胞減少が対照に比し著るしくみられ、冷却と薬剤の相加効果がみとめられた。おそらくG₂が延長したために、M期の細胞が増加して起った結果と考えられる。

これらの実験からみて、薬剤の効果判定を *in vitro* で行う時にも、やはり長時間の追求を必要とすることが痛感される。とくに、VCRのような cytostatic の作用を示す薬剤においては重要なことと考えられる。

4. 併用化学療法について

cell cycle にのっとり化学療法を行う場合に腫瘍細胞の asynchrony と resting cell が大きな障害となる。ことに、solid tumor における resting cell の存在は臨床上まことに重大な意味を有する³⁾。dividing cell においてすら cell cycle がそれぞれ異なるため、薬剤の影響をうける細胞の percentage はますます減少する¹⁰⁴⁾。そこで、細胞に synchrony を起させ、より多くの細胞に damage を与える方法が理論的に考えられてよい。先にのべたように、腫瘍細胞に induction synchrony を起させる方法が二つある。

温度処理は、実験的にはよい方法であるが、生体に用い得る限度¹⁰⁵⁾である15°C前後の低温により生ずる同調化は部分的同調であって不完全なものである。従って、低体温による同調化の方法は臨床的には使用できない。

代謝拮抗剤を使用して同調化を図る場合、アルキル化剤の如き cytotoxic な作用を持つ、cell cycle specific drug を組合せる方法は、Walker ら⁴⁸⁾の実験結果からみて、直ちに臨床に応用してよいものと考えられる。実際、臨床でしばしば優れた成績を示す併用組合せには代謝拮抗剤と cytotoxic な作用を持つ薬剤の組合せであることが多い。また、三つ以上の薬剤の組合せで行う多剤併用療法は、実験的にも臨床的にも効果が確認され、現在における癌化学療法の主流をなしている¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。

多剤併用療法は薬剤の頭文字をとって略称で呼ばれている。木村¹⁸⁾のFAMT*、太田ら¹⁰⁶⁾、中尾ら¹⁰⁷⁾のMFC**は臨床的にもよく用いられ、好成績を得つつある。教室の奈良¹⁰⁸⁾はSN36に対して actinomycin D (AMD) と MMC の併用、あるいは、AMD, MMC と predonine の併用について、生存率、核酸代謝面などから検討し、優れた併用効果を強調した。福田¹⁰⁹⁾は sarcoma 180 に対して10種類の制癌剤を用いた組み合わせについて、核酸代謝などから併用効果を検討し、その幾組かの組み合わせで、すぐれた相乗効果のみとめられている。

多剤併用療法の目的と意図することは次のようである。

- 1) 作用機作の異なる薬剤の併用によって単独薬剤の制癌効果を互いに補って制癌 spectrum を拡大する。
- 2) 腫瘍細胞の cell cycle にのっとり、薬剤感受性の異なる各 phase に対し、各種の薬剤を併用させる。
- 3) 特定の薬剤の組合せによる相乗効果を期待する。
- 4) たがいに異なる種類の副作用を持つ組合せにより、副作用の分散をはかる。

癌の併用療法には、上記のほか、同調化による効果増強を意図した組合せが考慮されるべきであろう。腫瘍の同調化に合わせた、最も適切な時間において、有効な薬剤が使用されるならば、最少の副作用をもって最大の効果を期待することができる。

それと共に、Brunner⁸⁾が指摘している resting cell に考慮をはらう必要がある。そして、

- 1) cell specific drug の効果を高めるため resting cell を activate し同調化させる方法。
- 2) resting cell にも有効な薬剤の新開発。
- 3) resting cell をそのままの状態に抑制し、増殖させない方法。

などが、今後の研究課題として提言されている。

結 論

初代培養に付した吉田肉腫細胞に対して温度処理の影響について検索し、さらに化学療法剤の効果について検討して、次の結果を得た。

1. 0.4% lactalbumin hydrolysateを含む Earle 塩類液50%、非働化牛血清40%、生理食塩水10%

* FAMT : 5Fu, Endoxan, MMC, Toyomycin.

** MFC : 5Fu, MMC, Cytosine arabinoside.

の培養液において、初代培養した吉田肉腫細胞は順調な増殖を遂げる。この培養液で Ehrlich 腹水癌、sarcoma 180 は発育しない。

2. 吉田肉腫の培養初期の lag phase において、腫瘍細胞数減少、分裂指数変動、増殖抑制がみられる。培養開始後24時間前後から腫瘍は対数増殖に入り、これは48時間以上継続する。増殖により腫瘍細胞濃度が上昇すると、充進した解糖代謝により生成された乳酸量の増加に伴う培養液のpH低下が起り、ついに増殖は停止する。初代培養を経た吉田肉腫をもどし移植するとよく発育するので、初代培養による腫瘍性の変化はないものと考えられる。

3. 初代培養に付した吉田肉腫に対し、0°C、30分間、0°C、60分間の冷却、並びに、復温の処理を施すと、腫瘍細胞の一過性の減少、腫瘍細胞の分裂指数の変動、増殖曲線の階段状変化を招来し、腫瘍細胞の cell cycle の同調化が惹起される。しかし、それは、軽度の部分的同調化である。

4. 冷却、復温処理による腫瘍細胞数の減少の程度は、冷却持続時間が長いほど強くなる傾向がみられる。しかし、その後起きる急速な分裂、増殖により、終局的には腫瘍細胞数に変わりがない。実験に用いられた0°C、30分～60分間の冷却条件による腫瘍抑制作用はみとめられない。0°C冷却直後の腫瘍細胞分裂指数には、0°C、30分間と0°C、60分間の条件の間に著しい差異がある。従って、冷却持続時間30分と60分の間に分裂期の細胞に作用する臨界時点があり得ると考えられる。

5. 初代培養に付した吉田肉腫に冷却復温処理を施し、その後経時的に ³H-thymidine を用いて puls labeling を行い、一定時刻における cell cycle, S 期の細胞比率を検べた。0°C、30分間冷却の場合には4～5時間後に、0°C、60分間冷却の場合には8～9時間後に、20°C、3時間冷却の場合には4時間後に、標識細胞出現のピークがみとめられ、DNA合成期の細胞集団における同調化が証明された。

また、continuous labeling を行なうと、標識細胞を経時的に追求すると、冷却・復温後の標識細胞の出現状態は2峰性の曲線で示された。この現象を解析して、低温処理により、cell cycle のG₂期の延長、G₁期細胞のS期に移行する速度の増加を招来し、分裂直後のG₁期の娘細胞並びに分裂期細胞が影響されることを知った。細胞の世代時間は冷却処理によって短縮する。これはG₂期の延長はあっても、G₁期、S期が短縮する結果である。

6. 初代培養の吉田肉腫に0°C、30分間の冷却お

よび復温処理を施し、その後一定時間に低濃度の化学療法剤を投与して、腫瘍細胞の数、および、形態学的変化を観察して効果を判定した。

nitrogen mustard 2 μg/ml の濃度を用いる場合、冷却復温後4～5時間に投与すると制癌効果の増強がみとめられた。他の時間に投与すると非冷却の対照の成績より劣っている。

mitomycin C 1 μg/ml の濃度を用いる場合、吉田肉腫細胞は著るしい影響を示さない。この濃度では、腫瘍のもつ抵抗性に打ち勝つことができないものと考えられる。冷却・復温処理を施して後4～5時間にこの濃度の mitomycin を投与すると、冷却と薬剤投与の相加効果がみとめられたが、冷却復温後7～8時間に投与すると、著るしい効果の減退がみられた。

vincristine sulfate 10⁻⁷g/ml の濃度を用いる場合、冷却・復温処理を施したものに投与すると、投与後1時間で効果が著減しているのを見る。冷却処理が腫瘍細胞、あるいは、培養液に変化をもたらし、vincristine の効果を減ずる方向に働くものと考えられる。しかし、冷却・復温後早期に vincristine を投与し、投与後6時間の結果では冷却と薬剤投与の相乗効果がみられた。

7. 化学療法剤の効果増強のための方法として、腫瘍細胞の cell cycle の同調化を組み入れた多剤併用療法を計画すべきであることを強調する。

稿をおわるにあたり、終始ご懇切なご指導、ご鞭撻を頂いた、恩師ト部美代志教授に深く感謝の意を捧げるとともに、ご協力頂いた教室各位に感謝致します。

文 献

- 1) Gilman, A. & Philips, F. S. : Science 103, 409 (1946).
- 2) Rhoads, C. P. : J. Am. Med. Assoc. 131, 656 (1946).
- 3) 桜井欽夫：癌・化学療法，癌の臨別刷（石川ら編），17 (1966).
- 4) 三浦義彰・福井紀子：癌・化学療法，癌の臨別刷（石川ら編），44 (1966).
- 5) Howard, A. & Pelc, S. E. : Exp. Cell Res. 2, 178 (1951).
- 6) Baserga, R. : Cancer Res. 25, 581 (1965).
- 7) Newton, A. A. & Wildy, P. : Exp. Cell Res. 16, 364 (1959).
- 8) Brunner, K. W. : Cancer Chemotherapy, 1st,

- ed. 138, Netherlands, Leiden Univ. 1971.
- 9) **Steel, G. G.** : Cancer Chemotherapy, 1st, ed., 16 Netherlands, Leiden Univ. 1971.
- 10) **Meyler, L.** : Cancer Chemotheraps, 1st, ed., 105, Netherlands, Leiden Univ. pub. 1971.
- 11) **Skipper, H. E.** : Cancer Chemother. Rep. 22, 1 (1962).
- 12) 網村史朗 : 十全医会誌, 68, 173 (1962).
- 13) **Tannock, I. F.** : Br. J. Cancer 22, 256 (1968).
- 14) **Folkman, J.** : Ann. Surg. 175, 409 (1972).
- 15) 田口鉄夫 : マイトマイシンの基礎と臨床 (芝ら編). 115頁, 東京, 医学書院 1967.
- 16) 白淵 勇・大星章一・菅原道義・吉田順之助・本郷敏郎・傍島行雄 : 癌の臨, 9, 17 (1963).
- 17) 黒川利夫 : 診と療, 51, 310 (1963).
- 18) 木村禰代二 : 癌の臨, 14, 184 (1967).
- 19) 太田和雄 : 最新医学, 23, 631 (1968).
- 20) **Krementz, E. T. & Knudon, L.** : Surgery 50, 266 (1961).
- 21) 漆崎一郎・井林 淳・池田成之・小山隆三・高沢敏浩 : 日癌治, 4, 186 (1969).
- 22) 佐藤泰雄・木山 敏 : 癌の臨, 6, 309 (1960).
- 23) 服部孝雄・藤井源七郎・岡田清資・関口 守正・芦川和高・元谷喜久夫・遠藤幸夫・市川洋一 : 治療, 45, 568 (1963).
- 24) 岡田 進・服部竜夫・早瀬友博・小松克己・森澄・川村陽一 : 第24回日本癌学会総会記事, 296 (1965).
- 25) **Fay, T. & Henny, G. C.** : Surg. Gynec. Obstet. 66, 512 (1938).
- 26) 辻 公美 : 日外会誌, 66, 579 (1965).
- 27) 高橋 勝・伏木信夫・加藤忠雄・三浦律男・横山育三 : 第21回日本癌学会総会記事, 40 (1962).
- 28) 三浦律男・加藤忠雄・横山育三 : 癌の臨, 10, 222 (1964).
- 29) **Adolph, E. F.** : Am. J. Physiol. 161, 359 (1950).
- 30) **Popovic, V.** : Am. J. Physiol. 199, 463 (1960).
- 31) 吉田富三 : 実験動物, 7, 85 (1958).
- 32) 吉田富三 : 吉田肉腫, 1~218頁, 東京, 寧楽書房, 1949.
- 33) 中井準之助他 : 組織培養基礎と応用, 96頁, 東京, 朝倉書店, 1964.
- 34) 堀田 進・大山照夫 : 組織培養の基本と実際, 71頁, 大阪, 永井書店, 1963.
- 35) **Utagawa, K.** : Sci. Rept. Res. Inst. Tohoku Univ. Ser. C. 11, 20 (1961).
- 36) **Kuroki, T., Goto, M. & Sato, H.** : Gann, 56, 35 (1965).
- 37) **Ebina, T., Okamura, N., & Sato, K.** : Gann, 53, 59 (1962).
- 38) **Katsuta, H., Takaoka, T., Hattori, K., Kawada, I., Kuwabara, H. & Kuwabara, S.** : Jap. J. Exp. Med. 29, 297 (1959).
- 39) **Earle, W. R.** : J. Natl. Cancer Inst., 4, 165 (1943).
- 40) 国立予防衛生研究所編 : ウイルス実験学, 17頁, 東京, 丸善出版, 1964.
- 41) 松岡健司 : 日外会誌, 66, 941 (1965).
- 42) 石岡国春 : 胃癌細胞診の臨床, 36頁, 東京, 金原出版, 1964.
- 43) 丹羽正治・土村元仕・斉藤正行 : 臨床化学分析Ⅲ, 22頁, 東京化学同人, 1966.
- 44) **Barker, S. B., & Summerson, W. H.** : J. Biol. Chem. 135, 535 (1941).
- 45) **Messier, B. & Lablond, C. R.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 7 (1957).
- 46) **Groftes, D. D.** : Lab. Invest. 8, 131 (1959).
- 47) 加藤四郎 : ウイルス学, 554頁, 東京, 朝倉書店, 1964.
- 48) **Hanks, G. O. & Wallace, R. E.** : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196 (1949).
- 49) **McNairscott, D. B. & Chu, E.** : Exp. Cell Res. 16, 364 (1958).
- 50) **Savage, J. R. K. & Evans, H. J.** : Exp. Cell Res. 16, 378 (1958).
- 51) **Scherbaum, O.** : Exp. Cell Res. 13, 11 (1957).
- 52) **Miura, T. & Utakoji, T.** : Exp. Cell Res. 23, 453 (1961).
- 53) 宇多小路正 : 解剖誌, 34, 809 (1959).
- 54) 千ヶ崎裕夫 : 脳と神経, 15, 767 (1963).
- 55) 橋 貞亮 : 十全医会誌, 76, 355 (1968).
- 56) **Fox, M. & Fox, B. W.** : Cancer Res. 27, 1805 (1967).
- 57) **Yankee, R. A., de Vita, V. T. & Perry, S.** : Cancer Res. 27, 2381 (1967).
- 58) 松沢大樹・佐藤春郎・黒木登志夫 : 第25回日本癌学会総会記事, 98 (1966).
- 59) **Painter, R. B. & Drew, R. M.** : Lab. Invest.

- 8, 278 (1959).
- 60) Terasima, T. & Talmach, L. J. : *Exp. Cell Res.* **30**, 344 (1963).
- 61) Stanners, C. P. & Till, J. E. : *Biochim. Biophys. Act.* **37**, 406 (1960).
- 62) Simpson-Herren, L. & Lloyd, H. H. : *Cancer Chemother. Rep.* **54**, 143 (1970).
- 63) 寺島東洋三 : 遺伝情報 I, 日本生物物理学会編, 190頁, 京都, 吉岡書店, 1965.
- 64) 佐藤春郎・熱海 明・佐藤 博・中村久也 : *Gann.* **43**, 303 (1952).
- 65) 岡田重文・牟田信義 : *日医放線会誌*, **14**, 79 (1956).
- 66) 松本健二 : *日医放線会誌*, **17**, 1281 (1958).
- 67) 新井正美 : *日外会誌*, **60**, 1785 (1960).
- 68) 一万井卓四郎 : *日医放線会誌*, **17**, 6 (1957).
- 69) Spear, F. G. : *Arch. Exp. Zellforsch.* **7**, 348 (1928/29).
- 70) Graff, S. & McCarty, K. S. : *Exp. Cell Res.* **13**, 348 (1957).
- 71) Ely, J. O. & Gray, J. H. : *Cancer Res.* **20**, 918 (1960).
- 72) Neuman, R. E. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **98**, 303 (1958).
- 73) Herzenberg, L. A. & Roosa, R. A. : *Exp. Cell Res.* **21**, 430 (1960).
- 74) Katsuta, H., Takaoka, T., Mitamura, K., Someya, Y. & Kawada, I. : *Jap. J. Exp. Med.* **29**, 143 (1959).
- 75) Lettré, H. und Schleich, A. : *Naturwissenschaften*, **41**, 505 (1954).
- 76) 黒木登志夫 : 生物学的技術 I, 295頁, 京都, 吉岡書店, 1968.
- 77) 秦 藤樹・梅沢 巖 : 癌・化学療法, 癌の臨別冊 (石川ら編) 35, (1966).
- 78) Foley, G. E., : *Cancer Res.* **25**, 1254 (1965).
- 79) 山本 正 : *Gann.* **47**, 424 (1956).
- 80) 西岡久寿弥・吉田武彦・山本 正 他12名 : *日臨*, **15**, 1937 (1957).
- 81) 太中 弘・五味測照夫 : 癌・化学療法, 癌の臨別冊 (石川ら編) 38, (1966).
- 82) 近藤達平 : *最新医学*, **19**, 2304 (1964).
- 83) 寺島東洋三 : 生物学的技術 I, 307頁, 京都, 吉岡書店, 1968.
- 84) Bruchovsky, N., Owen, A. A., Becher, A. J. & Till, L. E. : *Cancer Res.* **25**, 1232 (1965).
- 85) Katsuta, H. & Takaoka, T., : *Jap. J. Exp. Med.* **32**, 279 (1962).
- 86) Barner, H. D., & Cohen, S. S. : *Bacteriol.* **72**, 115 (1956).
- 87) Rueckert, R. R. & Mueller, G. C. : *Cancer Res.* **20**, 1584 (1960).
- 88) Walker, I. G. & Helleiner, C. W. : *Cancer Res.* **23**, 735 (1963).
- 89) Levis, A. G., Danieli, G. A. & Piccinni, E. : *Nature*, **207**, 608 (1965).
- 90) Mueller, G. C., Kajiwara, K., Stubblefield, E. & Rueckert, R. R. : *Cancer Res.* **22**, 1084 (1962).
- 91) Hahn, G. M. : *Nature*, **217**, 741 (1968).
- 92) Berry, R. J., Hall, E. J., & Cavanagh, J. : *Br. J. Radiol.* **43**, 81 (1970).
- 93) Layde, J. P., & Baserga, R. : *Br. J. Cancer*, **18**, 150 (1964).
- 94) 脇坂行一・中村 徹・白川 茂 他7名 : 癌・化学療法, 癌の臨別冊, 50 (1966).
- 95) Pittillo, R. F., Schabel, F. M. & Skipper, H. E. : *Cancer Chemother. Rep.* **54**, 135 (1970).
- 96) Ritzl, F., Bolt, W., Nahrman, H. : *Klin. Wochenschr.* **40**, 834 (1962).
- 97) Hata, T., Sano, Y., Sugawara, R., Matsu-mae, A., Kamamori, K., Shima, T., & Hoshi, T. : *J. Antibiot. Ser. A.* **9**, 141 (1956).
- 98) 若木重敏・石川宗作 : マイトマイシンの基礎と臨床 (芝, 田口編) 1頁, 東京, 医学書院 1967.
- 99) Sugiura, K., : *Cancer Res.* **19**, 438 (1959).
- 100) 臼淵 勇 : マイトマイシン基礎と臨床 (芝, 田口編) 40頁, 東京, 医学書院 1967.
- 101) 神前五郎 : 第25回日本癌学会総会記事, 239 (1966).
- 102) Johnson, I. S., Wright, H. F., Svoboda, G. H. & Vlantis, J. : *Cancer Res.* **20**, 1016 (1960).
- 103) Cutts, G. H., Beer, C. T. & Noble, R. L., : *Cancer Res.* **20**, 1023 (1960).
- 104) 菱本文太郎 : *日外会誌*, **66**, 1551 (1965).
- 105) Popovic, V. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **80**, 320 (1959).
- 106) 太田和雄・栗田宗次・西村 穂・杉山雄一・村上 巖・小川一誠・中村有行・亀井良孝・今井邦之・有吉 寛 : 第24回日本癌学会総会記事, 299 (1965).

- 107) 中尾 功・吉江 尚・古川一介・鑑江隆夫・原 (1972).
 島三郎・久保明良・服部隆延・小泉博人・横山 正 : 108) 奈良高明 : 十全医会誌, 74, 1 (1966).
 大橋泰彦・金 孟和・舟田 彰 : 癌の臨, 18, 138 109) 福田明史 : 十全医会誌, 75, 371 (1967).

Abstract

The influence of low temperature and the effect of chemotherapeutics on the Yoshida sarcoma cells, which were taken into the primary tissue culture, were examined. The following results were obtained.

1) The Yoshida sarcoma cells grew in an active proliferation after they were taken into the primary tissue culture in the media which consisted of 50 per cent of Earle solution containing 0.4% lactalbumin hydrolysate, 40 per cent of inactivated bovine serum and 10 per cent of physiological saline. Ehrlich astites tumor and Sarcoma 180 did not grow in that media.

2) In the lag phase, the initial stage of culture of Yoshida sarcoma, there occurred a decrease in the number of the tumor cells, a change in mitotic index and inhibition of tumor proliferation. However, after 24 hours inoculation, tumor showed a logarithmic growth, continuing for 48 hours. When the tumor cells increased through proliferation, lowering of PH of the media appeared which was caused by the increasing production of lactic acid via glycolytic metabolism, resulting in the cessation of tumor proliferation.

The Yoshida sarcoma cells, taken into the primary tissue culture, grew vividly after they were inoculated reversly into the peritoneal cavity of the rats. Therefore, they did not lose the activity of tumor through the culture.

3) When Yoshida sarcoma cells, taken into the primary tissue culture, were exposed to cooling of 0°C, 30 minutes or 0°C, 60 minutes, there occurred a transitory decrease in the number of tumor cells, a changes in mitotic index and a stairlike figure of proliferation curve of tumor cell. The latter represented occurrence of the synchronization of the tumor cell cycle, though a partial synchronization.

4) Decrease of the number of tumor cells through chilling was parallel to the period of cooling applied. But, rapid division and proliferation of tumor cell after the return to normal temperature, ultimately, no change was seen in the number of cells. Consequently, there was no inhibition of tumor by chilling of 0°C 30-60 minutes. So that, it was possible to establish the critical point between 0°C-30 minutes and 0°C-60 minutes, periods of cooling thich affected dividing cells.

5) After the Yoshida sarcoma cells, taken into the primary tissue culture were exposed to chilling and rewarming to 37°C, puls labeling of the cell employing ³H-thymidine was done through the course of subsequent observation and per-centage of S-stage cell of cycle was checked up at a certain time schedule. Appearance of labeled cells exhibited a peak 4-5 hours aiter the recovery to normal temperature in the case of chilling 0°C-30 minutes, 8-9 hours in the case of chilling 0°C-60 minutes and 4 hours in the case chilling 20°C-3 hours.

This was a proof of synchronization to the cell group of DNA-synthetized stage.

When the labeled cell was pursued by the continuous labeling, the behavior of the labeled cell subsequent to cold was shown by the curve with 2 peaks. Analysing this phenomenon, cold shock caused to prolong G_2 -stage of cell cycle and to promote turning from G_1 -to S-stage.

Also it affected the daughter cell immediately after her division and cell in the dividing stage. Low temperature shortened the cell cycle.

This was due to that G_1 -and S-stage were shortened though G_2 -stage was prolonged through chilling.

6) The Yoshida sarcoma cells, taken into the primary tissue culture were exposed to chilling 0°C -30 minutes and return to 37°C , and then were given with chemotherapeutics of low concentration. The effect was determined by observing the changes of the number and morphological evidence, of the cell.

When nitrogen mustard of $2\mu\text{g}$ per ml., was given 4-5 hours after return to 37°C , inhibitory effect on tumor was intensified. However, an administration of the drug at different times caused lesser effect than those of the control (non-chilling).

When mitomycin C of $1\mu\text{g}$ per ml. was given to the Yoshida sarcoma cells, they received no significant influence. The drug of this concentration did not overcome the resistance of tumor.

However, mitomycin of $1\mu\text{g}$ per ml. given 4-5 hours after replacement to 37°C , brought the duplicated effect of both treatments, while the drug given 7-8 hours had significantly decreased the effect.

Vincristine sulfate of 10^{-7}g per ml. was given following the return to 37°C , the effect much decreased 1 hour after administration.

Chilling seemed to reduce the effect of the drug. However, vincristine was given early following rewarming, then duplicated effect of both treatments were seen 6 hours after administration.

7) In order to intensify the effect of chemotherapeutics, combination therapy of many drugs should be scheduled with an induction of synchronization of the cell cycle of tumor.

(The Authors Abstract)

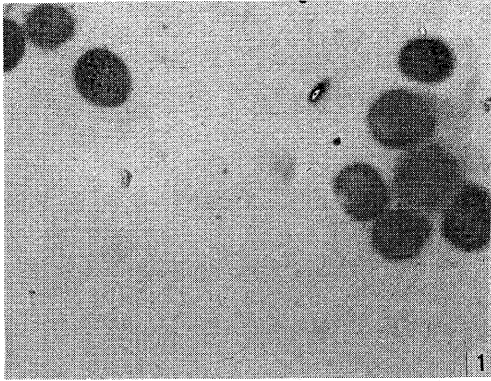


写真1. continuous labeling の実験

^3H -TdR 投与後30分間 incubate した直後に、標識細胞が出現している。標識指数は30%。

Giemsa 後染色， $\times 1,000$ 。

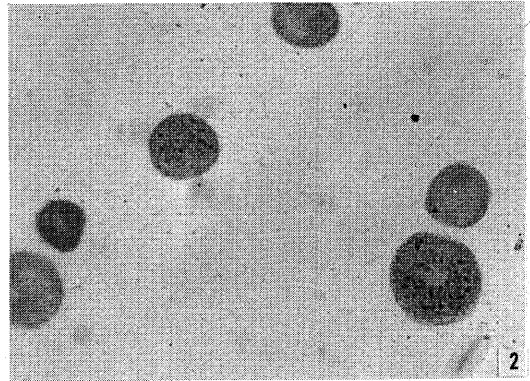


写真2. continuous labeling の実験

^3H -TdR 投与後30分間 incubate し、1時間後の標識細胞、標識指数約50%である。

Giemsa 後染色， $\times 1,000$ 。

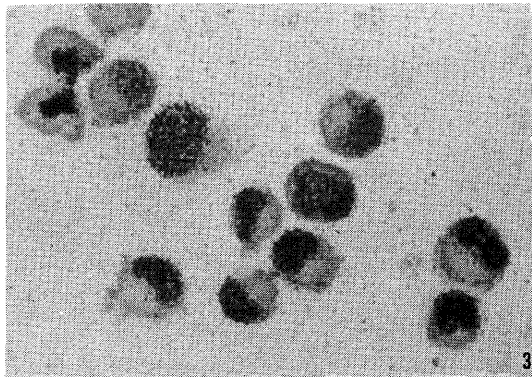


写真3. continuous labeling の実験

^3H -TdR 投与後、9時間後の標識細胞。標識指数90~96%と算定された。

Giemsa 後染色， $\times 1,000$ 。

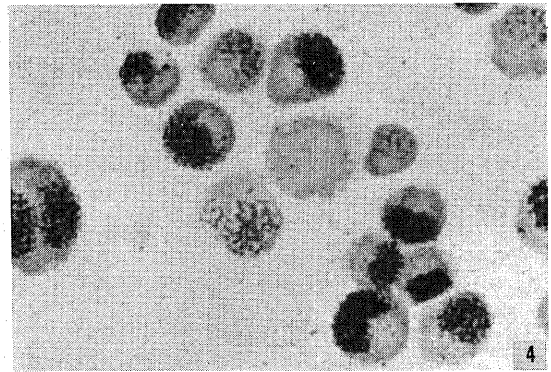


写真4. continuous labeling の実験

^3H -TdR 投与後、9時間後の標識細胞。標識指数90~96%と算定される。

Giemsa 後染色， $\times 1,000$ 倍