

制癌剤の有効濃度に関する組織培養ならびに電子顕微鏡的研究

河村謙二・北川司良・岡本良平・西村耕治

河村章治・中島正温・海老瀬尚文

京都府立医科大学第二外科学教室

(昭和 37 年 5 月 4 日受付)

癌の手術成績向上のためには、早期発見による根治手術施行率の増大も確かに必要であるが、根治手術と永久治癒の間にはなお外科医が解決しなければならない多くの問題が残されている。癌の手術に対する化学療法との併用はこの意味において多くの期待がもたれているが、副作用の少ない有効な投与法を選ぶことは特に重要である。

われわれ^{1,2)}は臨床的にも制癌剤のリンパ管注射や局所動脈内注入を行なつて、残存癌細胞からの再発を制圧するよう努力してきたが、各種の制癌剤はそれぞれ異つた性格をもつており、癌組織に対する有効濃度や作用機序も当然異つてくることが考えられる。しかし *in vivo* の screening でようやく有効と認められた制癌剤の有効濃度を *in vitro* で決定しようというのは極めて困難なことといわねばならない。HIRSCHBERG³⁾によると既に 1,000 種類に近い compound が組織培養法を用いた Screening によつて検査されているというが、その方法は種々であつて、そのうちどれが正鴻を射ているか判定は難しい。

TOPLIN⁴⁾は HeLa cell を 37°C で 5 日間培養し、その中へ種々の制癌剤を加えて細胞増殖に与える影響を調べているが、その結果からみて、こうした簡単で迅速、かつ比較的安価な Tissue culture cytotoxicity test は癌化学療法剤の large scale screening に適当であると述べている。われわれ⁵⁾は抗結核剤の Screening test として Host, Parasite, Drug の 3 者を立体的に取り上げ、これに組織培養を用いて検討を加えたが、本報告においては同様に制癌剤を添加して培養組織の増殖面積を経時的に測定した。これを対照と比較して成長係数を求め、培養全経過を一括して観察するため 4~7 日間に於けるその和を総成長係数とし、対照より 10% 以上大なるものを促進、10% 以上少ないものを抑制とした。

これら培養細胞はもとより正常であるが、幼弱で増殖力の強い点から、制癌剤に対する感受性は或程度癌細胞

に近いのではないかと推定される。

I 各種制癌剤の発育阻止効果

1) Nitromin

本剤の実験的最小有効量は 1 mg/kg とされているが、総成長係数からみた発育阻止効果は第 1 図の如くである。左側は心臓、右側は脾臓の総成長係数で、培養液中に含まれる Nitromin 量は 7/ml で表わしてある。両側の点線はそれぞれ促進、抑制の判定域値を、破線は対照群を基準とした値を示したものである。即ち、Nitromin は心、脾ともに 47/ml で発育の抑制が現われ、500 7/ml で完全な発育停止をみた。動物の体重をすべて体液として換算することは無意味かも知れないが、最小有効量 17/g と比較しておよそ 5 倍の添加量を必要とするということになり、他の薬剤との比較に便であろう。

2) Tespamin (Thio-TEPA)

本剤の臨床使用量は 0.1~0.2 mg/kg とされている。組織培養における有効濃度は第 2 回に見られる如く 47/ml で発育が抑制され、500 7/ml では完全に停止する。

従つて家鶏胎児の心及び脾臓の体外培養細胞に対する影響についてのみ見れば、Nitromin と殆んど同程度の効果を示すということが出来る。

3) Mitomycin C

本剤の一般的使用量は 0.04~0.08 mg/kg とされている。

図 1 NITROMIN

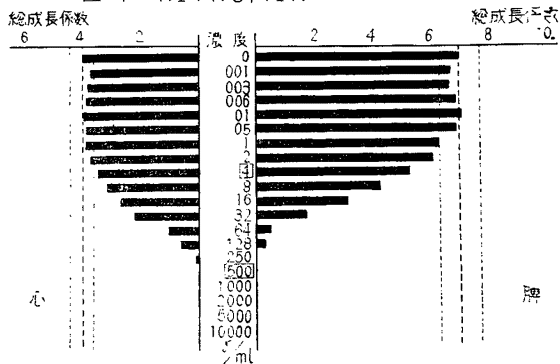


図 2 TESPAMIN

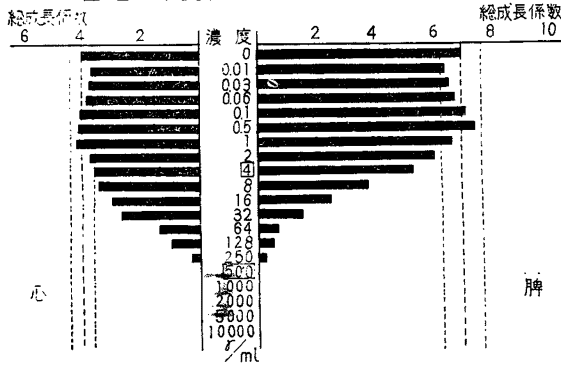


図 3 MITOMYCIN C

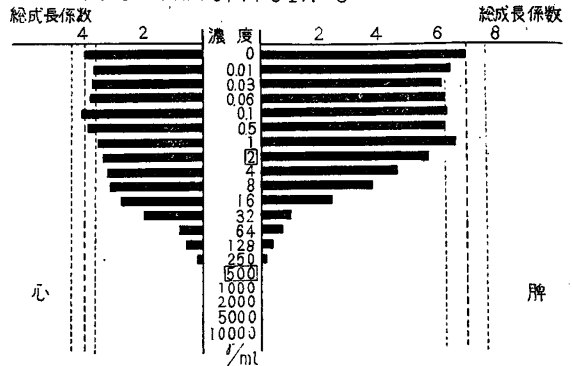


図 4 CARZINOPHILIN

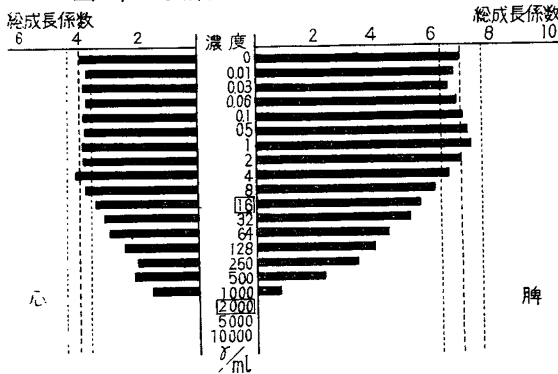
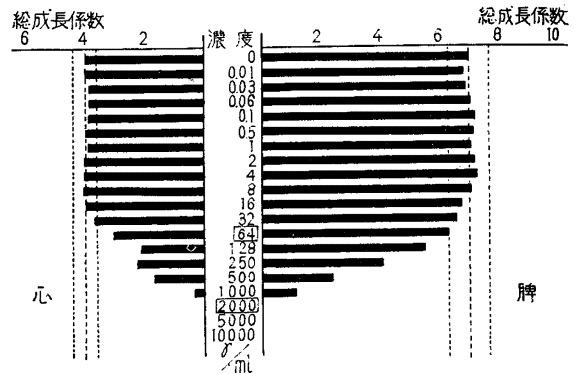


図 5 MERPHILIN



われわれの実験でも第3図の如く、Nitromin, Tespamin にくらべてやや強い作用を示しており、27/ml ですでに発育の抑制があらわれているが、完全な発育の停止には 500 7/ml を要することは前二者と同じであった。

もつともこれらの成績が癌細胞に対する治療的効果を示すというわけではなく、むしろそうした効果を検討するに必要な最小及び最大投与量として理解した方がよいであろう。またこの数値は同時に臨床的副作用とも結びつく可能性のあることを忘れてはならないと思う。

4) Carzinophilin

本剤は臨床的に1回 5,000~10,000 単位が投与されているが、この単位は *Sarcina lutea* の発育を阻止するに足る稀釈単位で、1単位は 0.01 7/cc となっており、5,000 単位は Carzinophilin 純結晶 50 7 に相当する。従つて一般的臨床使用量は 17/kg と考えてよく、前述の各制癌剤よりは極めて少量を用いられているわけである。しかし動物実験に於ける制癌効果 300 7/kg 位の投与で現われているから、本実験の成績を考察するに当つてはこの方の投与量を基準とすべきかと思う。

組織培養の成績は第4図の如く、全体に作用が穏やかであるが、16 7/ml で生長抑制が始まり 2,000 7/ml で

ようやく完全停止に達している。この成績からみると臨床使用量が極めて少量である点に本剤の問題があるように思われる。

5) Merphilin

本剤の臨床使用量は1回 25~50 mg であつて 0.5~1.0 mg/kg と考えられるから、投与量そのものは Nitromin とほぼ匹敵する。

しかし組織培養の成績からみると第5図の如く、相当な高濃度に達するまで影響が現われない。即ち最小有効濃度 64 7/ml、発育停止濃度 2,000 7/ml となつている。

従つて本剤は直接細胞増殖を抑制する作用は低いことが想像され、同時に副作用も少ないものと推定される。

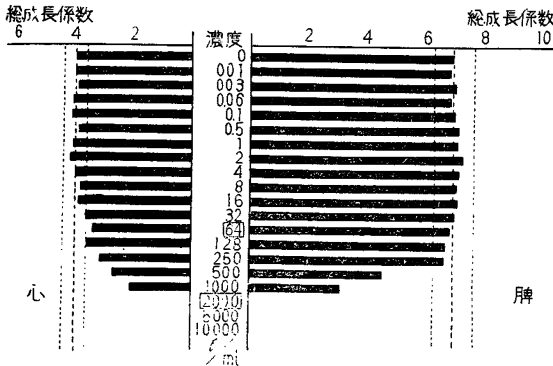
6) Azan

Azan も第6図の通り、Merphilin と同じような pattern を示すが、その作用は更に弱いようである。このことは本剤の臨床的效果が、新しく登場した制癌剤に較べて物足りないものであつた事を裏書しているといえよう。

7) RC-4

本剤の作用は心組織と脾組織とでかなり異つていように見受けられる。即ち第7図の如く、心組織についてのみえは、Carzinophilin と近く、32 7/ml で発育を

図 6 AZAN



抑制し始め、1,000 μ /ml で完全停止に達している。しかし脾組織では極めて微量の 0.01 μ /ml でも抑制を示すに拘らず、完全停止には 10,000 μ /ml を要している。

RC-4 が他の制癌剤と違う点は製剤が極めて不安定で氷室保存を要することであるが、こうしたことも実験成績に幾分影響するであろうことは考えられる。

8) 考 察

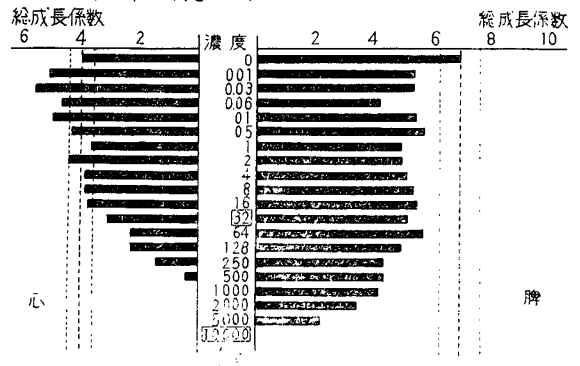
HeLa Cell を用いた Toplin の実験によると Nitromin の Cytotoxic End-point は 6~20 μ g/ml, Lethal End-point は 20~60 μ g/ml で, Thio-TEPA は前者が 5~20 μ g/ml, 後者が 20~100 μ g/ml となっている。また Mitomycin C は前者が 0.1~0.2 μ g/ml, 後者が 0.5~2.0 μ g/ml となっており、これらの成績は大体われわれの実験と同じ傾向を示している。もつとも Lethal-Dosis に於てはやや低い値を得ているようであるが、これはやはり培養細胞株の相違からくるものであろう。

こうした細胞株による制癌剤の増殖阻止作用の相違をみると、正常状態にあると考えられる家鶏胎児の組織を用いるより、人癌に由来する HeLa 細胞を用いた方が適当と考えられないことはない。しかし MCALISTER⁹⁾ は HeLa 細胞の 2 系統の培養株の間には Tumorigenic Activity に明らかな相違があると述べており、制癌剤に対する反応についても培養中に変化を生じてくる可能性は充分考えられる。

従つてその都度 wild cell を用い得るといふ点からすれば、われわれの方法も 1 つの利点をもっているわけで、実際一定の間隔をおいて実験を繰返しても、ほぼ近似の値を得ることが出来た。

近藤⁷⁾ はやはり家鶏胎児体外培養組織の生育に対する諸種制癌剤の影響を観察しているが、TEM は低濃度から脾組織の生長を抑制するわりに高濃度に達しても作用がそれ程強くならず、心に対する影響が各組織中でもつとも軽度であつたと述べている。また Azan は 20 μ /ml 程度でも時に生育促進的に作用すると報告しており、各

図 7 RC-4



種制癌剤の生長抑制作用についてわれわれの成績と共通した傾向を認めている。こうした組織培養による研究は、その成績が一定の数字となつて現われてくるところに生体実験と違つた興味もたれるが、数字のもつ意味についてはなお慎重な分析が必要であらう。

勝田⁸⁾ は培養された細胞株の細胞は元の生体内にある場合より栄養要求が遙かに簡素となつており、この点では腫瘍細胞と似ているが、腫瘍細胞とちがつて組織滲出液が抑制的に働くことは少ないと述べている。

すなわち組織培養に対する制癌剤の影響は、こうしたことから判るように担癌生体に投与した場合と若干異つてくることを当然考えておかねばならない。しかしそれはむしろ生体反応を除外した純粋な制癌剤の作用と考えられないことはない。

II 制癌剤を投与した生体の血清が鶏胚心組織培養に及ぼす影響

前項の如く培養液に直接添加された制癌剤が組織の生長に与える変化は、制癌剤それぞれの有効濃度を推定する 1 つの根拠となるが、これを生体に投与した場合の有効血中濃度判定についても組織培養を用いることが出来るかどうかは面白い問題である。

制癌剤の血中濃度は Carzinophilin などの場合にみられるように、特種な細菌を用いた Bio-assay によることが多い。われわれは嘗て Radio-Isotope で labell した制癌剤を用いて血中および組織内濃度の測定を行なつたが⁹⁾、こうした方法は制癌剤の安定度や RI の分離、排泄などについて充分な予備の実験が必要であり、一般の Chemical-assay も制癌作用との関連性に対する慎重な検討が必要であらう。

組織培養を用いる場合も勿論制癌剤を投与された生体の反応や、培養液に対する血清の混入が問題となるわけで、PETTINEN¹⁰⁾ は 30% の人血清を加えた培養液では HeLa や CAL 細胞は核が小さくなり、multiplication rate も少なくなるという。もつともこの点については

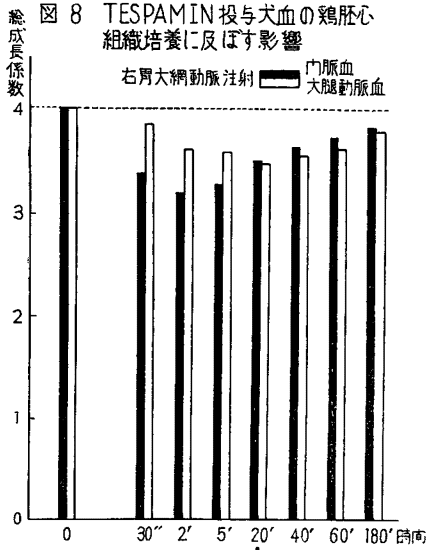
対照をおくことにより一応整理することが出来る。抗癌剤は一般に静脈注射によって与えられる場合が多く、一部は内服によるものもあるが、われわれは抗癌剤の局所的投与について研究している関係上、ここには犬の胃動脈から Trespamin を注入した場合について述べる。

第8図は右胃大網動脈から Trespamin 2 mg/kg を 1,000 mmHg の圧で注入した後、30 秒から3 時間まで時間的に門脈および大腿動脈から採血し、その血清を培地として、前項と同様に培養し、総成長係数を求めた。

この表からも判るように、抗癌剤を注射する前の血清に較べると明らかに発育抑制作用を示しており、しかも時間的にその効果が減少してゆくのがみられる。

また流血中における Trespamin の効果が3 時間以上持続されるであろうことは他の局所的投与法を行なった場合にも認められている。

本表では門脈血と大腿動脈血との間に生長抑制効果の相違が現われているが、これは特に強い圧力で薬を胃動脈内に注入したためで、一般の局所動脈内注入の場合には血液内濃度の推移に部位的差違は認め難く、時間的な減衰曲線はほぼ平行している。



III 白血球増加剤が抗癌剤の発育阻止に及ぼす拮抗作用について

正常細胞に対する抗癌剤の発育阻止効果は抗癌作用の強弱に関する一応の目安には違いないが、一面から考えるとともつとも困つた副作用である造血器官の障害とも無関係ではないと思われる。そのうち顆粒細胞減少症の発生に拮抗する 2, 3 の薬剤については、われわれも既に

実験的ならびに臨床的研究¹⁾を発表しているが、ここには組織培養からみたそれらの拮抗剤の影響について述べる。

1) Adenine の拮抗作用

顆粒細胞減少症の予防および治療の目的でわれわれが最初にとりあげた薬剤は Adenine であるが、その培養組織の生長に及ぼす影響は第9図の如くである。なお培養及び薬剤添加法は第I項と同じであつた。即ち Adenine を 0.5 r/ml~2,000 r/ml 添加した場合は脾組織の成長が著しく促進されるが、心組織では有意の変化なく、1,000 r/ml 以上ではむしろ抑制が現われている。

ところが第10図にみられるように RC-4 と Adenine の等量を混じて同一濃度を添加してみると、RC-4 単独の場合に較べて心組織の成長抑制が著しく緩和されるばかりでなく、脾組織においても同様の拮抗作用が著明に認められた。

2) 綜合アミノ酸の作用

必須アミノ酸混合液は単独で添加しても特に成長係数を増大するような成績は得られなかつたが、第11図の如く Trespamin と併用した場合は著明な拮抗作用を認めた。こ

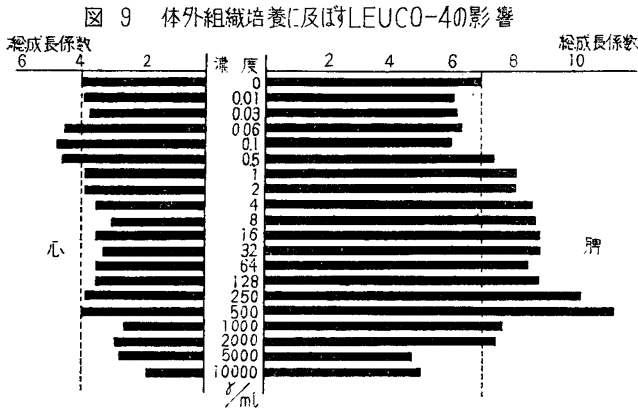


図10 体外組織培養に及ぼすRC-4・LEUCO-4の影響

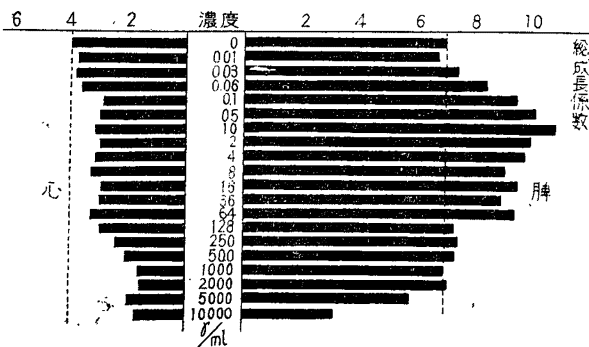
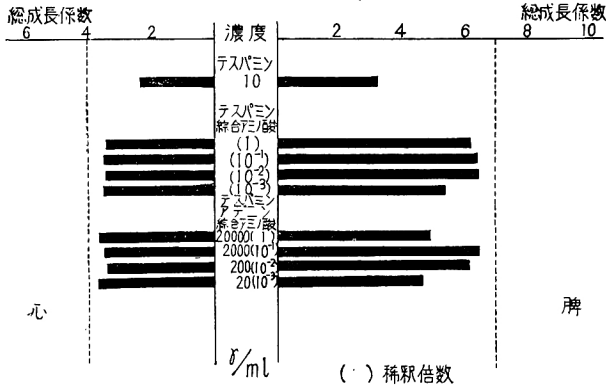


図 11 TESPAMIN ADENINE, 総合AMINO酸



に用いた総合アミノ酸組成は次の通りである。

総合アミノ酸組成 (強力モリアミンS)

L-Arginine HCl	0.800%
L-Histidine HCl·H ₂ O	0.400%
L-Isoleucine	0.550%
L-Leucine	1.230%
L-Lysine HCl·H ₂ O	2.230%
L-Methionine	0.500%
L-Phenylalanine	0.870%
L-Threonine	0.330%
DL-Threonine	0.420%
DL-Tryptophan	0.180%
L-Valine	0.610%
Glycine	1.000%
計	9.120%

図中の数字は本剤の稀釈度を示しているが、本剤を培地に添加した場合、培地作製の関係上稀釈度は更に5倍になる。

Tespamin は 10 r/ml の場合も 100 r/ml の場合も、総合アミノ酸の拮抗作用は同様に現われているが、その上更に Adenine を加えたものには予期したような強い拮抗作用を認めなかつた。

3) 考 察

われわれの用いた培養液が適正であつたとすれば Adenine の添加が鶏胚脾組織の生長を促進するという事は、やはり Adenine が細胞の増殖分裂を増大させるなんらかの作用を有することを意味しており、従来の説によればおそらくそれは細胞核の代謝と関連するものであることが想像される。

しかし総合アミノ酸の単独添加がほとんど組織の成長係数に変化を与えないことは、むしろ培養液成分の合理性を裏書きするものであろう。

もつとも重要な点は制癌剤に対する拮抗作用であるが、幸いに両者とも Tespamin の培養組織に対する成

長抑制を大幅に緩和することが証明された。

ここで幾分問題となるのは拮抗作用の本態である。生体に於ける白血球増加剤の実験が時に中枢性反応の結果や、一時的白血球動員をも含めて有効と判断されるのに較べて、組織培養による実験成績は拮抗剤の効果が細胞分裂そのものに基づくことを示している。しかも拮抗剤それぞれの作用に微妙な相違があることを示唆しているのは興味深い。

なお、こうした白血球増加剤の併用が制癌剤の制癌効果を減殺し、あるいは癌の増殖を促進するのではないかという疑問も当然起つてくるので、この点についても別に実験腫瘍を用いて

検討を加えてある¹²⁾が、ここには省略する。

IV 培養細胞の電子顕微鏡的検討

前述 I 項の方法で制癌剤を添加された培養液で生育した心線維芽細胞の微細構造を、次の方法で薄切し、電子顕微鏡 (J. E. M.-5 型) を用いて観察した。

超薄切片作製法

固定	2% OsO ₄ + Phosphate Buffer pH 7.4		
	氷室内 1 時間		
脱水	70% エタノール	室温	30 分
	90% エタノール	"	"
	100% エタノール I	"	"
	100% エタノール II	"	"
包埋	1:1 エタノール モノマー	"	1 時間
	100% モノマー I	氷室	"
	100% モノマー II	"	"
	100% モノマー III	"	"

重合:ゼラチンカプセルに入れ 60°C 7 時間

薄切:ガラスナイフ

Ultra-Microtome JUM-5

1) 正 常 像

写真 1 は対照で薬剤を添加しなかつた場合の電顕像で、直接倍率は約 4,800 倍である。Mitochondria が多数みられ、その Crista の配列も規則正しい。

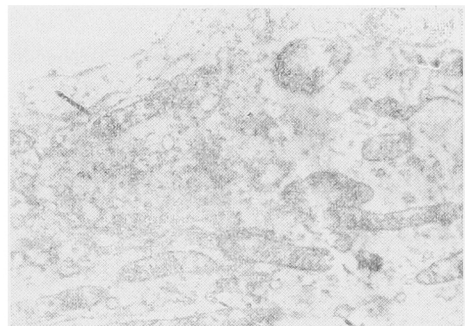


写真 1

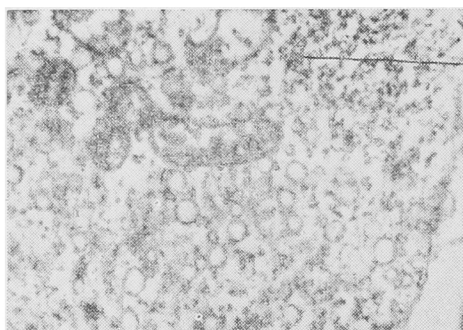


写真 2

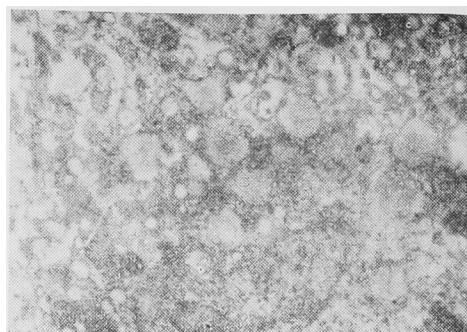


写真 3

2) Trespamin 100 γ /ml 添加群

Trespamin は 4 γ /ml の添加で既に培養細胞の生長が抑制されるが、こころみに 10 γ /ml 添加群の電顕像をとつてみたところ、薬剤添加に特異的と思われる所見をほとんど認めることが出来なかつた。これは後述のごとく細胞の生理的变化は電顕像に現われる形態的变化より先行し、あるいはより微妙であることを示唆している。

Trespamin 100 γ /ml 添加群になると写真 2 の如く Mitochondria における Crista の配列が不規則となつてくる上、Mitochondria 自身の形状にもかなり短縮の傾向が認められるように思われる。

3) RC-4 100 ml 添加群

写真 3 は RC-4 100 ml 添加群で、直接倍率は約 6,400 倍である。培養組織の生長係数からみたこの添加量は Trespamin 100 ml 添加の場合よりも影響が少ないのであるが、電顕像にはかなりの変化がみられる。即ち、Endoplasmic Reticulum には電子透過度の高い空泡様構造が多く現われ、時にはその一部に density の比較的高い物質が含まれているのを認めた。

4) RC-4 10 γ /ml 添加群

ところが RC-4 10 γ /ml 添加群ではこうした electron dense な物質も余りみられないようなので、これらの電顕像上にみられる変化が、或程度発育抑制と平行して現われてくるものであろうことが推定される。

5) その他の制癌剤添加群

Carzinophilin 10 γ /ml 添加群では Mitochondria がこころもち小さくなつていように思われたが、その他には明らかな変化が認められなかつた。Merphilin, Azan 10 ml 添加では電顕像上にほとんど変化がみられない。

6) 考 察

EASTY¹³⁾ は Hamster Kidney を用いて Cortex の normal tissue cells と transplanted tumor cells について、組織培養後の電顕像を比較しているが、彼によると、その metal-shadowed surface における両者の相

違は、current microscopic technics で検討されるよりも更に微細なものであろうということである。

また海老名⁴⁾は吉田肉腫を Rat の腹腔内に移植後 4 日目に制癌剤を注射し、24 時間後に採取した腹水の電顕像を調べている。その結果、Carzinophilin 500 u (5 γ) で細胞質の脂肪顆粒が増加し、時に不明の inclusion が認められるほか、Nitromin 5 mg/kg, Mitomycin 1 mg/kg ではほとんど変化をみなかつたという。

われわれの実験でも培養組織の生長抑制が強く現われ、やがて完全に増殖が停止するくらいの添加濃度にならないと、電顕像における変化は認め難いようである。

これは勿論推定される臨床使用量を遙かに上まわるものと思うが、臨床投与量の極めて低い Carzinophilin が、あるいは生長抑制効果の少ないわりに電顕的变化を起し易いようなことがあるとすれば、そこには更に興味深い問題が残されているであろう。

V 制癌剤を投与した臨床癌の電顕像について

臨床例において最初にみられる制癌剤の効果は、癌細胞の変形、崩壊と癌組織の癒痕化である。こうした変化は主として組織学的に観察されるが、肉眼的にも腫瘍の縮小や壊死が見られないことはない。しかしそれで癌が根治するかというに、大部分の症例に於ては否定的な結果に終るようである。

鶏胚組織の培養に見られた生長の抑制が必ずしも電顕像の変化を伴わないことは、それが制癌剤の影響を受けながらも分裂増殖した細胞であることを考えさせられる。そうした細胞を死滅させるには極めて高い制癌剤の局所濃度を必要とするであろう。

牧野¹⁵⁾は腫瘍細胞が薬物の障害作用を逃れて生き残つた場合、その細胞は一般に小形となり、一見収縮したような状態を呈すると述べている。

写真 4 は放射線治療を耐過したうえ、相当強い制癌剤の影響を蒙つたと思われる癌細胞の電顕像である。

本症例は昭和 33 年に右手背部の放射線潰瘍が癌化して、計 11,000 r 以上の Co⁶⁰ 照射や Sr⁹⁰ 照射を受けな

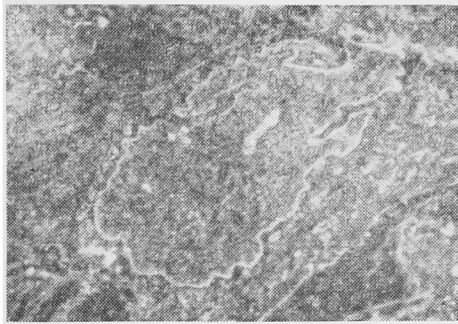


写真 4

がらなお再発をくり返し、最後に Merphilin 1,130 mg の静注, Carzinophilin 15,000 u 及び Trespamin 10 mg の動注を行なったのち、前腕より切断されたものである。切断後ただちに HE 組織標本と電顕標本を作製したが、広く癒痕化した間質の中に散在する multicellular carcinoma であり、電顕像にみられる腫瘍細胞は二重膜構造を有する不規則な核縁を示し、核小体にもほとんど変化が認められないので、なお増殖可能なものと推定される。

本例は幸いリンパ節転移もなく根治したが、あらゆる治療に耐えて厚い結合織の中に漸く生存したと思われる癌細胞も、電子顕微鏡的の微細構造には特別の変化が認められないことは注目に値することと思われる。

む す び

家鶏胚の心および脾組織の体外培養法を用いて制癌剤がその発育におよぼす影響をみるとともに、生育細胞を電子顕微鏡的に観察して次の結果を得た。

1) Nitromin, Trespamin, Mitomycin C は 2~4 γ で発育抑制がみられ、Merphilin, Azan は相当な高濃度まで影響が現われず、Carzinophilin はその中間にあるものと思われる。

2) 犬の胃動脈より Trespamin を投与し、その血清を時間的に採取して組織培養液に加えると対照に較べて

明らかに細胞の発育が抑制される。その結果、投与犬の血中濃度は一時 20 γ に達し、3 時間までは大体有効濃度を維持するものと推定された。

3) Trespamin による発育抑制に対し、Adenine および総合アミノ酸は拮抗的に働くものと思われる。

4) Trespamin を添加した培養液で育成した細胞では Mitochondria の Crista の配列が不規則となり、Mitochondria そのものも短縮の傾向がみられた。

5) 制癌剤を 100 γ /ml 以上添加すると、培養心線維芽細胞において Endoplasmic Reticulum には電子透過度の高い空泡様構造が多くみられ、時にはその中に一部 density の高い物質が含まれており、これは発育抑制の出現と平行して現われてくるものと思われる。

6) 臨床癌に対する制癌剤の投与は、明らかに癌細胞の崩壊と、著明な組織の癒痕化を招くが、その間に残された生存癌細胞を電子顕微鏡的に調べてみると、構造上の変化はあまりみられないので、この点からも充分再発の可能性が認められる。

文 献

- 1) 河村謙二：癌の臨床，3：19，昭 32
- 2) 北川司良：京都医誌，9：177，昭 34
- 3) HIRSHBERG, E.: Cancer Res. 18: 869, 1958
- 4) TOPLIN, I.: Cancer Res. 19: 959, 1959
- 5) 西村耕治：京府医大誌，67：578，昭 35
- 6) MCALLISTER, R. H.: Cancer Res. 19: 1040, 1959
- 7) 近藤 寛：京府医大誌，58：964，昭 30
- 8) 勝田 甫：日本医学会 15 回総会学術集談会記録 1：137，昭 34
- 9) 北川司良：臨床と研究，37：1184，昭 35
- 10) PETTINEN, K.: Nature, 184: 1570, 1959
- 11) 北川司良：外科の領域，9：290，昭 36
- 12) 北川司良：京都医誌，11：122，昭 36
- 13) EASTY, G. G.: Cancer Res. 20: 1608, 1960
- 14) 海老名敏明：Chemotherapy, 8: 527, 1960
- 15) 牧野佐二郎：Chemotherapy, 8: 524, 1960