

HeLa 細胞の増殖におよぼす制癌剤の併用効果

—とくにマイトマイシンCを中心として—

井 槌 進・大吉繁男・佐藤陽一

九州大学産婦人科学教室

(主任 古賀康八郎教授)

(昭和 40 年 9 月 16 日受付)

はじめに

悪性腫瘍の治療における現在の化学療法剤の効果は必ずしも期待できず、現段階においては、臨床的には副作用の軽減をはかるとともに、効果的な投与法の検討が最も重要なものと思われる。清水ら¹⁾は人癌の世代時間は1~3カ月で、制癌剤の世代時間投与法が動物実験において他のどの投与法よりも優れていると述べている。われわれはこの考え方を *in vitro* の HeLa 細胞に適用し、制癌剤の時間的、量的因子が HeLa 細胞の増殖におよぼす影響について報告した²⁾。すなわち、HeLa 細胞の世代時間は約 24 時間であるが³⁻⁵⁾、Nitromin (NMO), Mitomycin C (MMC) では、1回の投与量が大きければ、2~8日の長期間投与でなくても3~12時間の短期間投与で著明な増殖抑制効果のみとめられたが、Methotrexate (MTX) では、長期間投与群に抑制効果が大きく、量的因子より時間的因子が重要であることをみとめた。これらは主に各制癌剤の作用機序が異なることによるものと思われる。

今回は MMC を中心として、これに NMO, MTX および Toyomycin (TYM) を併用し、さらに時間的、量的因子も考慮のもとに HeLa 細胞の増殖曲線におよぼす影響について検討した。

I. 実験材料および実験方法

1) 実験材料

HeLa 細胞：九大細菌学教室から譲りうけ、大型角瓶に継代したものをを用いた。

培養液：Hank's BSS 80%, 5% lactalbumin hydrolysate 10%, bovine serum 10% に PC 100 u/ml, SM 100 mcg/ml を加えた。すなわち、bovine serum は屠殺直後の新鮮血を静置して血清を分離し、3,000 rpm 45分間遠沈後 Seitz 濾過器で滅菌し、56°C 30分間で不働化して4°Cに保存し、使用にあたっては1.4% NaHCO₃ で pH 7.4 に調整した。

Trypsin 液：細胞核数算定には Trypsin「モチダ」を Trypsin 溶解液(1L中 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ 1.15g, KH₂PO₄ 0.2g, 蒸溜水 1L)に400 H.U.M./ml とおとしたものを、植え継ぎならびに分注には Hank's

BSS に Trypsin「モチダ」を 200 H.U.M./ml とおとして使用した。

細胞核染色液：染色液の組成はクエン酸 21g, クリスタル紫 0.5g, ホルマリン原液 10 滴, 蒸溜水 1L である。

2) 実験方法

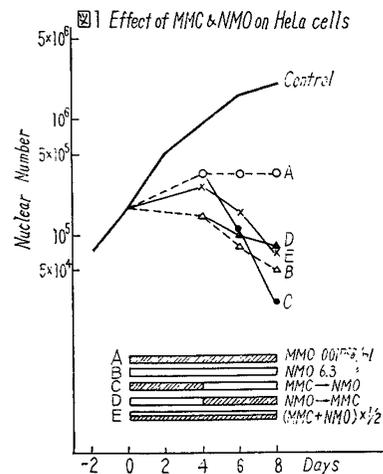
培養術式、細胞核数算定法、短冊標本作製、制癌剤稀釈法ならびに細胞形態の鑑別の基準については前回の報告²⁾ で記載したので省略する。

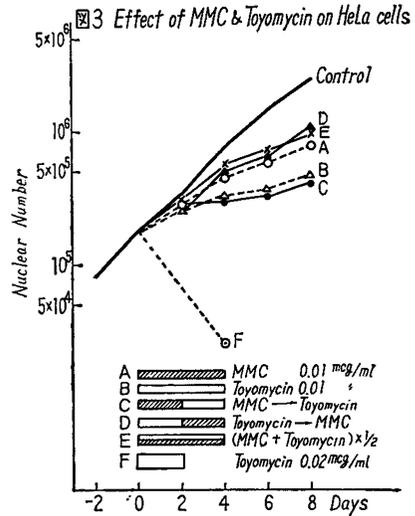
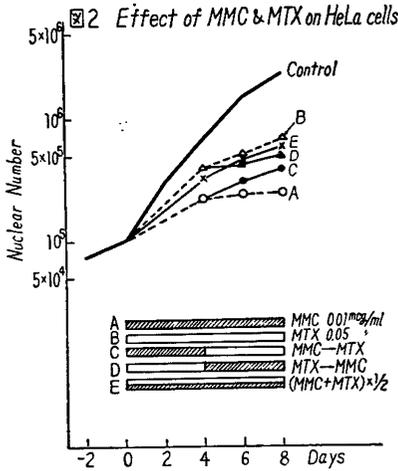
制癌剤投与法：制癌剤の投与に際しては、培養2日目に制癌剤添加培養液 1.5 ml を注入交換し、以後は隔日に培養液を交換した。MMC および他の制癌剤を単独に連日投与したものをそれぞれA群およびB群とし、併用投与にあたって、MMC 投与後に他の制癌剤を併用したものをC群、他の制癌剤投与後に MMC を併用したものをD群とし、MMC と他の制癌剤を各々の単独投与時の 1/2 量ずつ同時に併用したものをE群とした。

II. 実験成績

1. MMC と NMO との併用

増殖曲線における併用効果の判定は難しいが、われわれは近藤ら⁶⁾ の考え方にしたがって、A, B 群の中間点を基準として、それより増殖曲線の勾配が低い場合を併用効果ありとし、高い場合を併用効果なしと考えた。





併用投与の (NMO 前投与 - MMC 後投与) のD群と (MMC, NMO の各 1/2 量同時投与) のE群の間では殆んど差異がみられず、ともに MMC, NMO 各々の単独投与の A, B 群の間に位置し、しかも A, B 群の中間点より勾配が低く軽度併用効果がみとめられた。しかし (MMC 前投与 - NMO 後投与) のC群は著明な併用効果を示した (図1)。

形態学的には、培養最終日にはC群に多数の矮小型細胞の出現がみられたが、D, E, B 群には膨化、巨細胞が多く、また異常分裂細胞の出現率が高かつた。

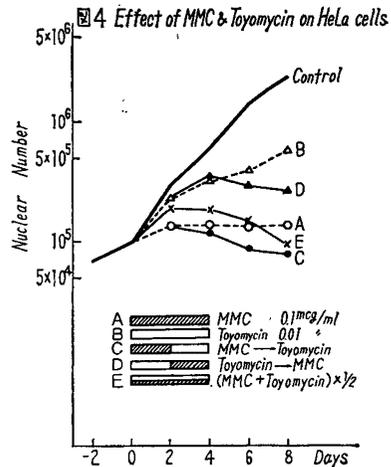
2. MMC と MTX との併用

併用投与の C, D, E 群は増殖曲線において、単独投与の A, B 群の中間にあり、殆んど併用効果はみられなかつたが、形態学的にもこれに一致して膨化、巨細胞や異常分裂細胞の出現は極めて少なかつた (図2)。

3. MMC と TYM との併用

0.01 mcg/ml の MMC と 0.01 mcg/ml の TYM との併用で、増殖曲線において最も増殖抑制を示したのはC群で、各単独投与群よりまさり、これと反対に併用投与でも D, E 群は単独投与より増殖抑制効果が劣っており、併用したことにより、むしろ逆効果を示した。しかし、増殖曲線で抑制効果の最も強いC群と最も弱いD群との差は軽微であるため、形態学的にはC群にのみ僅かの膨化、巨細胞の増加がみとめられたにすぎなかつた (図3)。

さて、MMC のみを 0.1 mcg/ml に増加すると、増殖抑制効果は併用投与の C, E 群が単独投与の A, B 群より大きく、明らかに併用効果を示した。しかし、D群は増殖曲線において単独投与群の中間にあり、併用効果は殆んどみられなかつた (図4)。形態学的には、A, E, C 群に異常分裂細胞および膨化、巨細胞の出現が多く、さらにC群では矮小型細胞も多数、出現するのをみとめ



た。

総括ならびに考察

作用機序の異なる数種類の制癌剤を併用することによって、その有効スペクトラムの幅を広げるとともに副作用を軽減することも当然考えられる。

1949年、SKIPPER⁷⁾がマウス白血病に対して Uretan と Nitrogen-mustard の併用効果をみたのがこの方面の研究の嚆矢であるが、臨床的にも、1954年、BURCHENAL⁸⁾が小児急性白血病に 6-MP と Azaserine を併用し、6-MP 単独療法に比較して 1~4 カ月長い寛解期間がえられたことを報告している。

最近になつて、癌に対してもアルキル化剤、抗生物質、代謝拮抗剤、ステロイドホルモンなどの 3~4 者併用が試みられ、ある程度の効果がみとめられている⁹⁻²¹⁾。そのうち、MMC と他の制癌剤との併用では効果をみとめたものとみとめないものがあり、必ずしもその成績

は一致していない、*In vitro* では、HeLa 細胞を使用して、和田²⁰⁾は MMC と TYM、木村²¹⁾は MMC と Carzinophilin との併用でその効果をみとめているが、ともに同時併用投与のみであり、交互投与の検討についてはまだ報告がない。

われわれはアルキル化剤として NMO、抗生物質として TYM、代謝拮抗剤として MTX を選び、これらの制癌剤と MMC との同時併用および交互併用投与が HeLa 細胞の増殖におよぼす影響について検討した。MMC と NMO はともに radiomimetic substance といわれているように、ある程度、作用機序が似ており、交叉耐性があるとの報告もある²²⁻²⁶⁾。MMC と TMO はともに抗生物質であるが、MMC が殆んど選択的に DNA 合成を阻害するの比して、TYM は主に RNA 合成を、一部に DNA 合成を阻害するといわれている^{27,28)}。MMC と MTX とは作用時期の異なるものの組み合わせである。すなわち、MMC は分裂休止期の DNA 合成準備期と DNA 合成期に作用し²⁸⁾、MTX は分裂期に作用し、folic acid から folinic acid への転化を阻害し、間接的に DNA と RNA 合成を阻害する²⁹⁻³⁰⁾。このように制癌剤の作用機序、作用時期などを考慮してそれらの併用効果を検討することは興味あることであろう。

MMC と NMO との併用では、(MMC 前投与—NMO 後投与)が最大の併用効果がみられ、ついで (MMC, NMO の各 1/2 量同時投与)、そして (NMO 前投与—MMC 後投与)の順になつた。さらに MMC と TYM との併用について、相対的抑制効果と投与方法について検討した。相対的抑制効果は MMC 0.01 mcg/ml < TYM 0.01 mcg/ml であるが、併用効果は (MMC 前投与—TYM 後投与) > (MMC, TYM の各 1/2 量同時投与) > (TYM 前投与—MMC 後投与) であるので、相対的抑制効果の小さい制癌剤を前投与した場合に抑制効果が最大となるとも推定された。そこで、MMC を 0.1 mcg/ml にすると、相対的抑制効果は MMC 0.1 mcg/ml > TYM 0.01 mcg/ml となるが、これらの併用による抑制効果は前と同じ順序となつた。したがって併用効果は相対的抑制効果の強弱に関係なく、投与順序に依存することが推定される。

一方、MMC と MTX との併用においては、いずれの併用方法でもその効果は殆んどみとめられなかつたが、その中でも、MMC 前投与—MTX 後投与が最大の抑制効果を示した点は他の併用時と共通している。

制癌剤の投与時にみられる HeLa 細胞の形態学的変化は、膨化、巨細胞、矮小型細胞の出現、異常分裂細胞の増加、正常分裂細胞出現率の低下などで、すでに報告³⁾した制癌剤の単独投与の場合と同様の所見を示し

た。すなわち膨化、巨細胞の出現頻度は細胞増殖曲線の水平線をやや下まわる付近に最大となり、それ以下では矮小型細胞が優位を占めることを観察しえたが、この成績は野獄³¹⁾、若松³²⁾らのそれと類似している。

このように、制癌効果は *in vitro* においてさえ投与方法によつて差異を生じており、臨床的にはこの他に癌細胞の制癌剤感受性、耐性、宿主の抗腫瘍性、あるいは免疫などの諸因子が関与するので、有効な併用方法の確立は非常に困難な問題である。

併用療法の多くの場合、作用機序の異なる 2 種以上の制癌剤を使用することによつて、単独療法ではえられない相加的～相乗的效果を期待し、且つ副作用をも軽減せしめようとするにあり、これらの研究は将来、さらに展開されるべき重要な問題と思われる。

文 献

- 1) 清水健太郎、他：抗癌剤世代時間投与方法とエンドキサン。エンドキサン文献集、1: 36~39, 1963.
- 2) 井雄 進、大吉繁男、佐藤陽一：HeLa 細胞に対する Nitromin, Mitomycin C および Methotrexate の影響、Chemotherapy 14: 323~330, 1966.
- 3) 山田正篤：ガン細胞の増殖サイクル。蛋白質核酸酵素 9: 1153~1161, 1964.
- 4) YAMADA, M. *et al.*: Growth curve of HeLa strain cells in tissue culture. Jap. J. Med. Sc. Biol., 9: 27~39, 1956.
- 5) KOZUKA, S. *et al.*: Cell size with special reference to multiplication of HeLa strain *in vitro*. II. Measurement of mitotic and intermitotic duration with special reference to size of nucleus. Nagoya J. Med. Sci., 24: 190~196, 1962.
- 6) 近藤光雄、他：諸種制癌剤の哺乳動物細胞放射線感受性におよぼす影響。医学のあゆみ 53: 375~378, 1965.
- 7) SKIPPER, H. E.: Carbamates in the chemotherapy of leukemia. Cancer 2: 475~479, 1949.
- 8) BURCHENAL: 田崎勇三：悪性腫瘍の化学療法。綜合臨床 11: 851~858, 1962. より引用.
- 9) 徳山英太郎、他：制癌剤 (2 者ならびに 3 者) 併用について。癌の臨床 6: 312, 1960.
- 10) LI, M. C. *et al.*: Effects of combined drug therapy on metastatic cancer of the testis. J. A. M. A. 174: 1291~1299, 1960.
- 11) 山形敏一、他：Toyomycin の使用成績。Toyomycin symposium, No. 3: 30~35, 1964.
- 12) 小山善之、他：トヨマイシンと他の制癌剤との併用効果。トヨマイシン文献集 33~35, 1963.
- 13) SHAPIRO, D. M.: Combination chemotherapy with 8-Azaguanine and sex-hormones on a mouse mammary carcinoma. Cancer Res. 12: 713~715, 1952.
- 14) 中島佐一、他：癌化学療法における併用療法の実

- 験的研究. *Chemotherapy* 13 : 52~53, 1965.
- 15) 黒川利雄, 他: クロモマイシンとプレドニソロンによる癌の併用療法に関する実験的研究. *癌の臨床* 6 : 220~231, 1960.
黒田恭一, 他: 前立腺癌に対する制癌剤および副腎皮質ホルモン併用療法. *癌の臨床* 10 : 736~744, 1964.
- 16) 鋸柄賢一. 悪性腫瘍の化学療法に関する実験的研究 (補遺). *Chemotherapy* 7 : 420~435, 1959.
- 17) 福井 享, 他: 制癌剤の交互使用方法に関する実験的研究. *阪大医誌* 12 : 89~97, 1960.
- 18) 吉村輝久雄: Mitomycin C と他の抗腫瘍剤との併用に関する実験的研究. *Gann (Suppl.)* 33, 1959.
- 19) 海老名敏明, 他: Mitomycin C あるいは M. H. と 2, 3 のアルキル化剤の併用に関する実験的検討. *癌の臨床* 8 : 492, 1962.
- 20) 和田義夫, 他: Toyomycin と他の制癌剤との併用. Toyomycin symposium, No. 3 : 54, 1964.
- 21) KIMURA, Y.. Cytological effect of chemicals on tumors. XVII. Effect of Mitomycin C and Carzinophilin on HeLa cells. *Gann* 54 : 163~169, 1963.
- 22) 白淵 勇, 他: Mitomycin-C の実験腫瘍に対する効果. *最新医学* 14 : 1837~1845, 1959.
- 23) 芝 茂: マイトマイシンの作用機作. *最新医学* 14 : 1831~1837, 1959.
- 24) 川俣順一: 作用機構から見た抗癌剤の使用法に関する考察. *Chemotherapy* 10 : 306, 1962.
- 25) 陣内伝之助: HeLa 細胞に対するマイトマイシン C の増殖抑制作用. 第 12 回日本化学療法学会総会講演, 1964.
- 26) 酒井克治, 他. Mitomycin C の抗腫瘍性に関する研究. *Chemotherapy* 5 : 322~323, 1957.
- 27) WAKISAKA, C. *et al.*: Selective inhibition of ribonucleic acid in mammalian cells by chromomycin A₃. *Nature* 198 : 385~386, 1963.
- 28) 道 健一: 培養細胞に対するクロモマイシン A₃ の作用, 第 2 報, HeLa-S3 細胞の核酸代謝に対する影響. *口腔病誌* 31 : 239~251, 1964.
- 29) DELMONTE, L. *et al.*: Folic acid antagonists in cancer chemotherapy. *Pharmacological Reviews* 14 : 92~125, 1962.
- 30) WILMANN, W.: Die Bedeutung von Folsäure und Vitamin B₁₂ für den Zelloffwechsel. *Dtsch. med. Wschr.* 89 : 2093~2098, 1964.
- 31) 野獄幸雄: 細胞水準における放射線制癌剤効果判定の基準私見. *産婦の世界* 13 : 1879~1896, 1961.
- 32) 若松市郎: ⁶⁰Co, Mitomycin-C, Thio-TEPA, Nitromin の影響下に於ける HeLa 細胞の細胞病理学的並びに増殖曲線に関する比較研究. *臨婦産* 15 : 111~122 : 213~224, 1963.