

生体内における腫瘍細胞の制癌剤に対する感受性試験に
関する研究 第2報

腫瘍細胞結節型を用いた制癌剤感受性判定について

副島 清治・佐藤 公生

弘前大学医学部第一外科

(昭和 46 年 4 月 26 日受付)

I. はじめに

癌細胞の制癌剤に対する感受性の判定法に関して、CAP 法¹⁾、INK 法²⁾、SDI 法³⁾その他多くの業績がみられる。1954 年 ALGIRE ら⁴⁾は、移植免疫における細胞性抗体と体液性抗体を検討することを目的として、Diffusion chamber を考案しているが、この Diffusion chamber を使用することにより、生体に近い状態に保たせた、一定量の腫瘍に対して、一定量の制癌剤を作用させ、その感受性を検討することが可能である。著者は前報⁴⁾において、ALGIER ら⁵⁾の考案した Diffusion chamber を応用し、実験腫瘍腹水型を用い、Diffusion chamber 内腫瘍細胞数の増減を指標として生体内における腫瘍の制癌剤に対する感受性を検討し、Diffusion chamber 法が制癌剤感受性試験のための1手段として有用であることを認めている。しかし制癌剤感受性試験の目的はあくまでも人癌組織であり、組織塊を free cell type とするための方法としては、Trypsin 液中で攪拌する方法が一般的であり、その外、近藤ら⁶⁾のクラッシュャーを用いる方法、山根ら⁷⁾の精製プロテアーゼを用いる方法等いくつかの方法があるが、手技の面倒さと、多くの living free cell を得るための技術的困難性を伴ない、1つの大きな問題点となる。できれば人癌結節のままで制癌剤感受性の判定が可能であることが望ましい。著者は、1) Diffusion chamber が生体内において結節型腫瘍の制癌剤に対する感受性試験のための1手段となりうるかを明らかにすること、および 2) 生体内において制癌剤感受性試験を施行するためには、癌患者自身の生体を利用するか、または他の生体を利用するかを意味することであるので、Diffusion chamber を挿入する宿主を同種の宿主(本文中では rat)および異種の宿主(本文中では mouse)として、Diffusion chamber による制癌剤感受性試験を検討することを目的として、次の実験を試みた。

II. 実験材料および方法

実験腫瘍は、MMC 感受性弘前肉腫、吉田肉腫および MMC 耐性 AH 66 を用い、各々の純培養状態の累代移

植細胞腹水型を Donryu rat 背部皮下に注入して腫瘍皮下結節を作成し、摘出後極小細片として Hanks 液と共に Diffusion chamber 内に封入した。

実験動物は、100~120 g の Donryu rat および 20~30 g の dd mouse を用い、腫瘍を封入した Diffusion chamber は Donryu rat 背部皮下に同種挿入され、また dd mouse 背部皮下に異種挿入された。

制癌剤は MMC を用い、0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mg の各量を Diffusion chamber 周辺に局所投与した。

観察項目は、組織像、酵素活性、放射性同位元素標識率であり、実験動物背部皮下に挿入 24 時間後に摘出された Diffusion chamber 内腫瘍細胞の変性、壊死等の組織像の変動、乳酸脱水素酵素 (LDH)、コハク酸脱水素酵素 (SDH) の変動、³H-Thymidine 標識率の変動を指標として制癌剤の感受性を判定しようとした(第1図)。

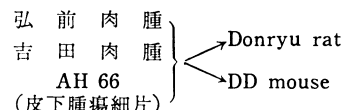
乳酸脱水素酵素は NACHLUS ら¹¹⁾の方法、コハク酸脱水素酵素は森¹²⁾の方法に従い、³H-Th. 標識率の検討は津屋¹³⁾の方法を参照し、腫瘍組織極小細片を ³H-Th. 10 μc/3 ml Hanks 液中に 2 時間 incubate 後遠心洗滌、捺印標本作成、固定後 Stripping 法により Autoradiograph を作成し施行した。

III. 実験結果

1. 弘前肉腫結節型の制癌剤感受性試験について

弘前肉腫皮下結節を極小細片として Diffusion cham-

第1図 実験方法



制癌剤 Mitomycin	0.01 mg
	0.05
	0.1
	0.2
	0.5

観察項目 組織像
酵素活性
Thymidine 標識率

ber に封入し, Donryu rat および dd mouse 背部皮下に同種および異種挿入後 MMC を局所投与 24 時間後に摘出, Diffusion chamber 内弘前肉腫の組織像, LDH, SDH, ³H-Th. 標識率の変動を観察した。

組織像では, 同種挿入群において 24 時間対照および MMC 投与群とも挿入前に比して, やや腫瘍細胞の変性, 壊死の増加を認めるが, とくに MMC 0.5 mg 投与例に壊死が進行的である。異種挿入群も同種挿入群とほぼ同様の傾向を示すが, 同種挿入群に比して MMC 投与例に腫瘍細胞の変性, 壊死がさらに進行的であり, MMC 0.2 mg, 0.5 mg 投与例に壊死に陥つた腫瘍細胞の増加をみる。

LDH では, 同種挿入群において 24 時間対照に活性の低下を示し, MMC 投与群に挿入前および 24 時間対照に比してさらに活性の低下を示した。異種挿入群においては, 同種挿入群とまったく同様の傾向を示し, 24 時

間対照に比して, 投与群に活性の低下は進行的であった。

SDH では, 同種挿入群において 24 時間対照にやや活性の低下を認め, MMC 投与群にさらに進行的に活性の低下を認め, とくに MMC 0.2 mg, 0.5 mg 投与例に活性の低下は著しい。異種挿入群においては, 24 時間対照に明らかに活性の低下を認め, MMC 投与群にさらに著しい活性の低下が認められた (第 1 表)。

³H-Th. 標識率では, 同種挿入群において 24 時間対照に比し, MMC 投与群に標識率の低下が進行的であり, 挿入前に比して対照および MMC 0.01 mg, 0.05 mg 投与例がほぼ同程度の標識率の低下を示し, MMC 0.1 mg, 0.2 mg, 0.5 mg 投与例がほぼ同程度ではあるがさらに標識率の低下を示している。異種挿入群においては, 標識率の低下は同種挿入群に比してさらに進行的であり, 挿入前に比して 24 時間対照に標識率の明らかな低下を

第 1 表 Diffusion chamber 内弘前肉腫組織像と酵素活性
(Mitomycin 局所投与後 24 時間)

		necrosis		LDH		SDH	
		A.	X.	A.	X.	A.	X.
0		—		卅		卅	
24 hours	control	+	+	卅	卅	卅	卅
	MC 0.01 mg	+	+	+	+	卅	+
	0.05	+	+	+	+	卅	+
	0.1	+	+	+	+	卅	+
	0.2	+	卅	+	+	+	+
	0.5	卅	卅	+	+	+	+

A : in Donryu rat, X. : in DD mouse
0 : Pre implant

第 2 表 Diffusion chamber 内弘前肉腫 Thymidine 標識率
(Mitomycin 局所投与後 24 時間)

		Allo.	Xeno.
0		28.8	
24 hours	control	23.8%	12.6%
	MC 0.01 mg	24.2	10.8
	0.05	23.2	10.0
	0.1	16.0	7.8
	0.2	15.0	4.0
	0.5	14.2	4.2

Allo : in Donryu rat, Xeno. : in DD mouse
0 : Pre implant

第 3 表 Diffusion chamber 内吉田肉腫組織像と酵素活性
(Mitomycin 局所投与後 24 時間)

		necrosis		LDH		SDH	
		A.	X.	A.	X.	A.	X.
0		—		卅		卅	
24 hours	control	+	+	卅	卅	卅	卅
	MC 0.01 mg	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.05	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.1	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.2	+	卅	卅	卅	卅	+
	0.5	卅	卅	卅	+	+	+

A. : in Donryu rat, X. : in DD mouse
0 : Pre implant

第 4 表 Diffusion chamber 内吉田肉腫 Thymidine 標識率
(Mitomycin 局所投与後 24 時間)

		Allo.	Xeno.
0		33.2	
24 hours	control	29.6%	9.8%
	MC 0.01 mg	21.4	6.0
	0.05	20.0	6.0
	0.1	17.4	4.8
	0.2	10.6	4.0
	0.5	7.2	3.0

Allo. : in Donryu rat, Xeno. : in DD mouse
0 : Pre implant

認め、MMC 投与群の標識率の低下はさらに進行的であり、MMC 0.01 mg, 0.05 mg 投与例および MMC 0.1 mg 投与例および MMC 0.2 mg, 0.5 mg 投与例と階段状に明らかな低下を示した (第2表)。

2. 吉田肉腫結節型の制癌剤感受性試験について

弘前肉腫の場合と同様の方法と観察項目により吉田肉腫結節型の MMC に対する感受性を観察した。

組織像では、同種挿入群において弘前肉腫の場合と全く同様に、24 時間対照および MMC 投与群とも挿入前に比してやや腫瘍細胞の変性、壊死の増加を認め、異種挿入群も弘前肉腫の場合と全く同様に同種挿入群とはほぼ同様の傾向を示すが、同種挿入群に比して MMC 投与例に腫瘍細胞の変性、壊死がさらに進行的であつた。

LDH では、同種挿入群において 24 時間対照にやや活性の低下を示し、MMC 投与群にさらに活性の低下を示した。異種挿入群においては、同種挿入群とはほぼ同様の傾向を示し、24 時間対照に比して MMC 投与群でやや活性低下の進行を認めた。

SDH では、同種挿入群において 24 時間対照にやや活性の低下を認め、MMC 投与群にさらに活性の低下を認めた。異種挿入群においては 24 時間対照に明らかに活性の低下を認め、MMC 投与群では MMC 0.2 mg, 0.5 mg 投与例に著しい活性の低下をみた (第3表)。

³H-Th. 標識率では、同種挿入群において 24 時間対照に比して MMC 投与群に標識率の低下が進行的であり、MMC 0.01 mg, 0.05 mg 投与例および MMC 0.1 mg 投与例および MMC 0.2 mg, 0.5 mg 投与例と階段状に標識率の低下を示し、異種挿入群においては標識率の低下は同種挿入群に比してさらに進行的であり、対照に比して MMC 0.01 mg, 0.05 mg 投与例および MMC 0.1 mg, 0.2 mg, 0.5 mg 投与例と階段状に明らかな標識率の低下を示した (第4表)。

3. AH 66 結節型の制癌剤感受性試験について

AH 66 皮下結節を極小細片として Diffusion chamber に封入し、弘前肉腫、吉田肉腫の場合と同様 AH 66 結節型の MMC に対する感受性を観察した。

組織像では、同種挿入群、異種挿入群ともに同様の傾向を示し、24 時間対照および MMC 投与群とも、挿入前に比してやや腫瘍細胞の壊死の増加を認めるがその程度は両者とも同程度であり、同種挿入群、異種挿入群とも MMC 0.5 mg 投与例に壊死の程度がやや増加した。

では、同種挿入群、異種挿入群とも挿入前、24 時間対照および MMC 投与群、各群いずれも同程度の活性を示し MMC 投与による影響は認めなかつた。

SDH では LDH と同様、同種挿入群、異種挿入群とも、挿入前、24 時間対照および MMC 投与群、各群い

第5表 Diffusion chamber 内 AH 66 組織像と酵素活性

(Mitomycin 局所投与後 24 時間)

		necrosis		LDH		SDH	
		A.	X.	A.	X.	A.	X.
0		—		卅		卅	
24 hours	control	+	+	卅	卅	卅	卅
	MC 0.01 mg	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.05	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.1	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.2	+	+	卅	卅	卅	卅
	0.5	卅	卅	卅	卅	卅	卅

A. : in Donryu rat X. : in DD mouse

0 : Pre implant

第6表 Diffusion chamber 内 AH 66 Thymidine 標識率

(Mitomycin 局所投与後 24 時間)

		Allo.	Xeno.
0		24.6	
24 hours	control	20.0%	14.6%
	MC 0.01 mg	20.2	10.0
	0.05	18.0	8.8
	0.1	16.6	7.2
	0.2	14.0	6.6
	0.5	14.4	6.0

Allo. : in Donryu rat Xeno. : in DD mouse

0 : Pre implant

ずれもほぼ同程度の活性を示し、異種挿入群 MMC 0.5 mg 投与例にやや活性の低下を示すのみで、MMC 投与による影響はほとんど認めなかつた (第5表)。

³H-Th. 標識率では、同種挿入群において 24 時間対照に比し、MMC 投与群に標識率の低下がやや進行的であり、挿入前に比して対照、MMC 0.01 mg 投与例および MMC 0.05 mg, 0.1 mg 投与例および MMC 0.2 mg, 0.5 mg 投与例と階段状に各々軽度標識率の低下を示し、異種挿入群においては標識率の低下は同種挿入群に比して進行的であり、対照に比して MMC 0.01 mg, 0.05 mg 投与例および MMC 0.1 mg, 0.2 mg, 0.5 mg 投与例と階段状に軽度標識率の低下を示した (第6表)。

IV. 考 按

著者は第1報⁴⁾において、実験腫瘍腹水型を用い、Diffusion chamber による制癌剤感受性判定の可能性について検討したが、臨床例を検討するに際しては、腫瘍

の結節型を検討しなければならないので、基礎実験として実験腫瘍結節型に関して検討を試みた。

皮下移植腫瘍に対する制癌剤の効果に関しては、SUGIURA¹⁴⁾の mouse, rat, hamster の各種腫瘍に対する広範な研究、白淵ら⁸⁾の弘前肉腫に対する検討等がみられるが、いずれも皮下腫瘍結節型に対する制癌剤の有効性を認めている。桜井¹⁵⁾は screening tool としての腹水腫瘍への批判として、腹水腫瘍を用いる screening の最大の利点は、癌細胞が薬物によつて蒙る障害を形態学的にも組織化学的にも明確にかつ容易に観察することができること、1つの実験経過を通じて経時的にそれらを観察することが可能であること、細胞数を一定にし、移植およびそれに続く増殖の条件を比較的一定に保ちうるために実験結果の再現性が高く、効果の定量的表現が容易であること等を述べており、また screening tool としての固形癌への批判として、固形腫瘍では、いずれの形式によつて投与された薬物も腫瘍細胞との接触に至る場合の経過が腫水腫瘍に比較してはるかに複雑であること、腫瘍の部位と組織構造の個性差による薬剤の distribution の違いが予測されること、腫瘍の量と条件を一定にするという点で腹水腫瘍に比して困難を伴うこと、対照動物群の腫瘍経過に不同が起こりがちであり、効果の再現性がやや劣ること、組織細胞像の顕微鏡的観察に技術と時間を要すること等を述べている。秦ら¹⁶⁾も一般に移植固型癌を用いる screening に必要なこととして、腫瘍が安定して再現性があること、自然治癒がなく 100% 腫瘍死すること、薬剤に対する感受性があまり偏していないこと、移植する動物が容易に入手できること等をあげており、これら腫瘍の結節型に対する短所をおぎない、腹水型の長所をいかすため、結節型から free cell を得る手段が講じられているが^{6,7)}、未だ完全なものはない。前述の結節型への批判は、生体皮下結節型の制癌剤感受性の検討に対する批判であるが、Diffusion chamber を用い、結節型腫瘍極小細片を封入して生体内に挿入後制癌剤の感受性を検討することにより、結節型の感受性検討に対する問題点はかなり緩和されると考える。我々の実験においては、弘前肉腫、吉田肉腫および AH 66 の結節型を Diffusion chamber に封入し、Donryu rat 皮下に挿入、MMC 感受性を検討したが、弘前肉腫、吉田肉腫の MMC 高感受性、AH 66 の MMC 低感受性がよく表現された。

腫瘍の制癌剤感受性を表現する指標として薬物による腫瘍細胞の形態学的変化を検索するのも 1 法である。秦¹⁷⁾は MMC の吉田肉腫に対する影響を、腫瘍細胞の核および原形質の著明な膨化、崩壊および 24~48 時間の異常分裂像の出現を特徴としてあげ、白淵ら⁸⁾は MMC の

弘前肉腫に対する細胞効果として、注射後 3 時間で起こる腫瘍細胞の有糸分裂像の著明な減少等を認め、また秦ら¹⁶⁾は形態学的判定法として、細胞突起の消失、原形質、核の顆粒の増加、核、核仁の変形、崩壊、細胞の崩壊、巨大細胞の出現などをあげているが、ただしこれらの方法には、はつきりした基準がなく、客観性に乏しい欠点があることも指摘している。腫瘍細胞の酵素活性の変動を指標とするのも 1 法であり、西岡ら²⁾、近藤ら⁹⁾、山本ら¹⁾の研究が酵素活性の変動を指標とするものであり、その他、染色体への影響をみた三戸ら¹⁸⁾の研究、核酸合成能に対する影響をみた MC DONALD¹⁹⁾、東²⁰⁾の研究等の報告がみられるが、腫瘍の制癌剤感受性を確実にかつ明確に表現する指標として充分なものは未だにないようである。我々は腫瘍の制癌剤感受性判定のため、いちおうの目安として癌細胞の形態学的変化、さらに酵素活性の変動として LDH, SDH, LDH 核酸合成能の変動として ³H-Thymidine 標識率を指標として合せて観察したが、Diffusion chamber 内腫瘍の各観察項目の変動は、弘前肉腫、吉田肉腫の MMC 高感受性、AH 66 の MMC 低感受性をよく表現した。

制癌剤感受性試験の終局目的は臨床例にあることはいうまでもない。従がつて、生体内における癌細胞の制癌剤に対する感受性試験を目的とした場合、生体内とは、患者自身の体内(自家)、他人の体内(同種)、他動物の体内(異種)を意味するが、同種体内を使用するのは事実上不可能であり、自家体内の場合、患者の協力が得られぬことがある点、また挿入する Diffusion chamber の数が制限されるため多数の制癌剤の感受性試験ができない点で難点があるため、異種体内で制癌剤感受性をよく表現することが可能であれば、はなはだ都合である。腫瘍の異種移植に関しては、TOOLAN¹⁹⁾の X 線照射 rat に対する人扁平上皮癌の移植、GREENE²⁰⁾の脳内異種移植、GREENE²¹⁾の前眼房内異種移植の報告等、幾多の異種移植の好成績の報告をみる。さらに ALGIRE ら²²⁾は Diffusion chamber を用いて、HeLa 細胞、人の表皮細胞、人の melanoma 細胞、人胎児の卵巣と副腎皮質、人の白血病白血球、Rous 肉腫等を mouse 腹腔内で長期間生存させている。これら先人の業績から異種生体内でも腫瘍をよく生存させることが可能であること、および前述のような制癌剤感受性試験における異種生体の必要性を含めて、同種および異種生体内における制癌剤感受性試験の基礎実験を試みたが、同種生体内においてはもちろん、異種生体内においても同種生体内に比してやや劣るが、両者ともに、弘前肉腫、吉田肉腫の MMC 高感受性、AH 66 の MMC 低感受性の低感受性をよく表現した。

V. 総 括

以上, Diffusion chamber を用いての生体内における腫瘍結節型に対する制癌剤感受性試験に関する基礎実験の結果をまとめてみると,

1) 腫瘍結節型を Diffusion chamber に封入して, 制癌剤感受性を検討したが, 腫瘍結節でも制癌剤の有効性, 無効性をよく表現した。

2) 制癌剤感受性の判定として, 腫瘍細胞の形態学的変動, 酵素組織化学的変動, 核酸合成能の変動を指標として検討したが, いずれも Diffusion chamber 内腫瘍結節の制癌剤の有効性, 無効性をよく表現した。

3) 人癌の生体内における制癌剤感受性試験のための基礎実験として, 同種生体および異種生体を用いて制癌剤感受性試験を検討したが, 異種生体内は同種生体内に比してやや劣るが, 両者とも腫瘍結節の制癌剤感受性をよく表現した。

この論文内容の一部は, 第 27 回日本癌学会総会, 第 1 回制癌剤適応研究会において発表した。

参 考 文 献

- 1) 山本 正, 他: 抗癌性検定としての細胞寒天平板法 (CAP 法) とその作用機序解明への応用。癌 47 : 424, 1956
- 2) 西岡久寿弥, 他: 人の悪性腫瘍の制癌性ウイルスおよび化学療法剤に対する感受性試験のこころみ。日本臨床 15 : 1937, 1957
- 3) 近藤達平, 他: 制癌剤の適応一感受性試験。最新医学 19 : 2304, 1964
- 4) 副島清治, 他: 生体内における腫瘍細胞の制癌剤に対する感受性試験に関する研究。第 1 報。Diffusion chamber を用いての, 制癌剤感受性判定の可能性について。Chemotherapy 19 : 147, 1971
- 5) ALGIRE, G. H., *et al.*: Growth of cells *in vivo* in diffusion chambers. I. Survival of homografts in immunized mice. J. Nat. Cancer Inst. 15 : 493, 1954
- 6) 近藤達平, 他: 制癌剤適応判定法について。癌の臨床 10 : 17, 1964
- 7) 山根 績, 他: 組織培養のための種々臓器内細胞遊離法の検討。医学と生物 68 : 104, 1964
- 8) 白淵 勇, 他: Mitomycin の実験腫瘍に対する治療効果。Chemotherapy 6 : 378, 1958
- 9) HATA, T. *et al.*: Mitomycin, a new antibiotic from streptomycetes. I. J. Antibiotics, Ser. A 9 : 141, 1956
- 10) 佐藤 博: ヘパトーマ・スペクトラムについて。最新医学 20 : 1600, 1965
- 11) NACHLUS, M. M. *et al.*: Cytochemical demonstration of succine dehydrogenase by the use of a new *p*-nitro-phenyl substituted ditetrazole. J. Histochem. Cytochem., 5 : 420, 1957
- 12) 森 昌彦: 腫瘍酵素組織化学, 349, 医学書院, 東京, 1966
- 13) 津屋 旭: *In vivo* 及び *In vitro* Autoradiography. 総合臨床 14 : 62, 1965
- 14) SUGIURA, K.: The effect of mitomycin C on the growth of a variety of mouse, rat and hamster. Cancer Res. 19 : 438, 1959
- 15) 桜井欽夫: 動物実験による制癌剤の検討。最新医学 19 : 2277, 1964
- 16) 秦 藤樹, 他: 抗癌剤のスクリーニング。癌化学療法: 35, 医歯薬出版社, 東京 1966
- 17) 秦 藤樹: 抗生物質の吉田肉腫細胞に及ぼす影響。武田編, 癌の化学療法: 78, 医歯薬出版社, 東京 1957
- 18) 三戸康郎, 他: 染色体から見た癌細胞の制癌剤感受性について。癌の臨床 12 : 80, 1960
- 19) TOOLAN, H. W.: Growth of human tumors in the subcutaneous tissues of X-irradiated laboratory animals. Cancer Res. 12 : 302, 1952
- 20) GREENE, H. S. N.: The transplantation of tumors to the brains of heterologous species. Cancer Res. 11 : 529, 1952
- 21) GREENE, H. S. N.: The significance of the heterologous transplantability of human cancer. Cancer 5 : 24, 1952
- 22) ALGIRE, G. H., *et al.*: Studies of heterografts in diffusion chambers in mice. J. Nat. Cancer Inst. 20 : 1187, 1958

SENSITIVITY TEST OF ANTICANCER DRUG FOR TUMOR CELL *IN VIVO* II

Sensitivity Test of Anticancer Drug for Solid Tumor in Diffusion Chamber

SEIJI SOEJIMA and KIMIO SATO

First Department of Surgery, Hirosaki University, School of Medicine

(Prof. YOSHINOBU ISHIKAWA)

In the author's experiment with diffusion chamber technique the morphological histochemical changes as well as the change in DNA synthesis of experimental solid tumor of rat proved to be available as

indicating the sensitivity of the tumor to anticancer drug in diffusion chamber inserted in homologous and heterologous host.

This technique contributed also to the evaluation of mitomycin on solid type of Hirosaki sarcoma, Yoshida sarcoma and AH 66. Hirosaki sarcoma, Yoshida sarcoma were highly sensitive and AH 66 was low sensitive to mitomycin.

This experiment is a basic study to gain access to the investigation on sensitivity test of anticancer drug for human tumor cell *in vivo*.