

## 抗癌剤の殺細胞作用の定量法

—Mitomycin C の殺細胞作用について—

下山正徳・木村禧代二

国立がんセンター病院内科

(昭和47年6月29日受付)

## はじめに

抗癌剤の殺細胞作用を定量的に表現できる方法は少なく、従がつてその方面の研究も系統的になされていない。放射線の場合、古くから培養細胞のコロニー形成能を利用してその殺細胞作用が定量的に検討され<sup>1)</sup>、また最近では、Spleen colony method を利用して *in vivo* でも放射線の効果が定量的に検討されている<sup>2)</sup>。これらの研究により、放射線の場合、線量が増加するに従って細胞の生残率は対数的に減少することが知られている。すなわち放射線の殺細胞作用は線量に比例して対数的に増加する。このことは、放射線治療に於いて照射線量を増せば増す程より優れた腫瘍効果が得られるという治療理論を示すと共に、また放射線感受性や修復に関する基礎的問題の研究に寄与している。

いつばう抗癌剤では残念なことに、放射線で行なわれたような殺細胞作用の定量が充分に検討されていないため、抗癌剤の適切な投与方法を示す確実な治療理論は未だ示されていない。現在まで多くは *in vivo* での抗癌剤の効果、すなわち宿主の生存期間や腹水中の腫瘍細胞数の算定<sup>3)</sup>、end point survival assay<sup>4)</sup>、spleen colony method<sup>5)</sup> を利用した臓器内腫瘍細胞数の定量等から抗癌剤の殺細胞作用が検討されてはいるが、その定量範囲に限界があり不充分である。この点から、*in vitro* に於ける抗癌剤の殺細胞作用の定量法は癌化学療法に於ける治療理論の展開に、また薬剤感受性の基本的問題の解決に、有用であると思われる。

## 実験材料ならびに方法

培養液：増殖培地として RPMI-1640 培地(日本製薬)(pH 7.4)に仔牛血清(千葉血清)を20%に加えたものを用いた。抗生物質は通例添加しないが、時により硫酸カナマイシンを60 mg/lの濃度に加えて用いた。軟寒天培地を用いる場合、増殖培地に Bacto-agar(Difco)を適量添加して用いる。すなわち Bacto-agar を Eagle-MEM(日本製薬)に溶き3.0%にする。これを高圧滅菌して保存し、使用時に約60°Cに溶解し、増殖培地にその約1/8量を加えて軟寒天培地とした。

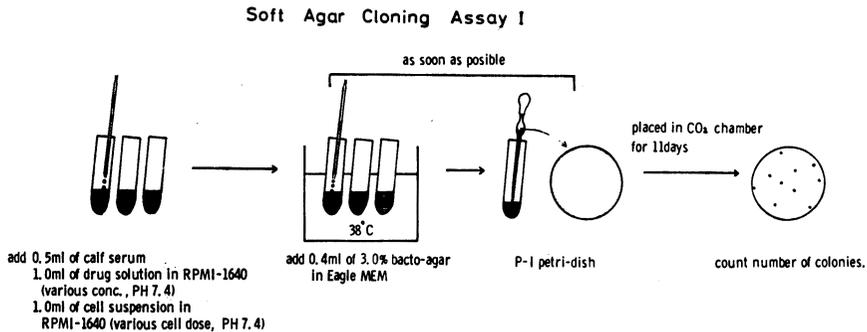
細胞培養法：細胞の培養は水蒸気飽和した5%炭酸ガ

スを含む空気を持続的に流している37.5°Cの培養器(炭酸ガス培養器)中でシャーレによる静置培養を行なう。また軟寒天培地の場合もシャーレ中で固まらせて静置培養する。

腫瘍細胞培養株：実験に用いた腫瘍細胞は *in vitro* で浮遊培養される吉田肉腫細胞(YAS/C)、L 1210 マウス白血病細胞(L 1210/V/C)、L 5178 Y/CA 55 マウス白血病細胞(L 5178 Y/C)である。吉田肉腫細胞(佐々木研究所由来)は腹水型として呑竜ラットに継代維持されたもの(国立がんセンター、仁井谷久陽博士から分与)から培養樹立した。L 1210 マウス白血病細胞(L 1210/V)(Sloan-Kettering Institute, Dr. D. J. HUTCHISON 由来)は腹水型として BDF<sub>1</sub> マウスに継代維持されたもの(愛知がんセンター、星野章博士から分与)から培養樹立した。L 5178 Y/CA 55 マウス白血病細胞は L 1210/V 細胞と同じ由来の腹水型として BDF<sub>1</sub> マウスに継代維持されたものから培養樹立した。これらの細胞はそれぞれ軟寒天培地による colonial cloning を1~2回行なつて長期継代培養されたクローン株である。

Cell viability: 生細胞の指標として次の3方法を用い検討した。1) Dye exclusion method すなわち trypan blue 0.5% で染色されない細胞を viable cell として算出。2) Growth curve から算出する方法、すなわち増殖培地で増殖させながら、ある一定時間おきに細胞数を血球計算板で算出し、その増殖曲線を最小2乗法から求め、その式から分裂増殖可能な細胞が最初にいくつあったかを外挿法により算出する。3) Soft agar cloning assay から算出、すなわち軟寒天培地でコロニー形成能ある細胞を生細胞として算出する。その方法は培養液中の細胞を RPMI-1640 培地で希釈し、適量の細胞数を含む cell suspension 2 ml に仔牛血清を0.5 ml 加え38°Cに保つ。さらに約60°Cに溶解された3.0% Bacto-agar を0.4 ml 加え、直ちに P-I 型シャーレに移しかえ、固まらせて、炭酸ガス培養器内で11日間培養し、11日目に生じたコロニー数を肉眼で算出し、原液中にあるコロニー形成能ある細胞を生細胞として算定する。以上の3方法は同じ材料を用いてそれぞれ triple に行

図1 薬剤と細胞が常時接触している条件での薬剤の殺細胞作用の Assay Method



なつて検討した。

抗癌剤：Mitomycin C の適当量を RPMI-1640 培地に溶解，ミリポアフィルター (0.45 μ) による濾過滅菌後必要濃度に希釈して使用した。いずれも使用直前に調整し，常に pH 7.4 で使用した。

抗癌剤による殺細胞作用の定量法：抗癌剤の濃度の他，抗癌剤と細胞の接触時間も問題になると思われるため，soft agar cloning assay 法を利用して次のような2通りの定量法を用いた。なお，この実験で用いられる“survival”，“viable”，“killing”という言葉はすべて各々の細胞の軟寒天培地での増殖能力，すなわち肉眼的なコロニー形成能力の有無で判定し使用した。

1) Assay I。図1に示すように適当な薬剤濃度を含んだ RPMI-1640 培地 1.0 ml，仔牛血清 0.5 ml，適当量の細胞数を含んだ cell suspension (RPMI-1640) 1.0 ml を加え，小試験管中で 38°C に保ちながら約 60°C に溶解された 3.0% Bacto-agar を 0.4 ml 加えて後，直ちに室温中で P-I 型シャーレに移し込む。寒天を固まらせて後炭酸ガス培養器内で 11 日間培養し，11 日目に生じたコロニー数を肉眼で算定し，植え込んだ細胞数との比，すなわち colony forming efficiency (CFE) を求める。この CFE 値に原液中の総細胞数を掛けて，生細胞数を算定し，生残率 (S) および致死率 (“log kill”) を次式から求める。

$$S = \frac{\text{treated CFE} \times \text{total cell counts}}{\text{control CFE} \times \text{total cell counts}}$$

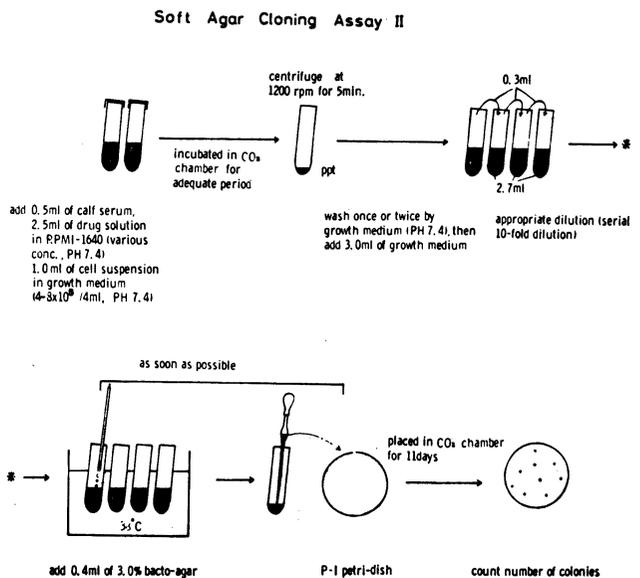
$$\log \text{ kill} = \log \frac{1}{S}$$

通例，抗癌剤は高濃度から倍々希釈し，8~20 段階の濃度勾配を作る。また細胞数は約 10<sup>6</sup>/ml から 10 倍希釈し約 10 コ/ml までの 6 段階の細胞濃度を作り，薬剤濃度と細胞濃度をそれぞれ縦横に組合せて実験を行なう。すなわち 1 つの薬剤濃度に対し 6 段階の細胞濃度が組合せられる条件で

実験を行ない，殺細胞作用が定量的に表現されるように実験を行なつた。従がつてこの場合，薬剤は不活化されない限り常に細胞と接触しているという条件で assay されたことになる。

2) Assay II。ある一定時間細胞と薬剤を接触させて後，生き残つた細胞数を soft agar cloning assay 法を利用して定量する方法で，図2に示すように行なつた。すなわち適当な薬剤濃度を含んだ RPMI-1640 培地 (pH 7.4) 2.5 ml，仔牛血清 0.5 ml，増殖培地に浮遊された細胞液 (4~8×10<sup>6</sup>/ml) を 1.0 ml 加え，モルトン栓をした小試験管を約 20° の角度に静置し，炭酸ガス培養器内で incubation した。その後，一定時間毎に取り出し，細胞を遠心分離し，薬剤を含まない RPMI-1640 培地 (pH 7.4) で 1~2 回細胞を充分洗つた後，薬剤を含まない増殖培地 3.0 ml に浮遊させる。この細胞液

図2 薬剤と細胞が単位時間当たり接触している条件での，薬剤の殺細胞作用の Assay Method



0.3 ml をとり 2.7 ml の増殖培地の入った小試験管に加え、以後同様に 10 倍希釈を連続 6 段階に行なう（従がつてこの時の各細胞液量は 2.7 ml となつている）。さらに各試験管を 38°C に保ちながら約 60°C に溶解してある 3.0% の Bacto-agar を 0.4 ml ずつ加え、直ちに P-I 型シャーレに移し込む。以下 Assay I 法と同様に培養し、11 日目にコロニー数を算定し、preincubation で用いた各薬剤濃度毎に CFE を求め、対照群の CFE と比較して生残率および致死率を Assay I と同様の方法で求める。従がつて、この方法では各薬剤濃度に於ける細胞と薬剤との接触時間当りの生残率および致死率が求められることになる。

結 果

1) 培養細胞の viability の検討

Exponential growth をしている YAS/C および L 1210/V/C 細胞を、それぞれ連続 10 倍希釈して、各細胞濃度から培養した場合の増殖曲線は図 3, 4 に示される。すなわち両細胞群とも、1~数コ/ml という希釈条件で

も、それぞれの増殖曲線の勾配はほとんど変わらない。すなわちこれらの細胞群では、たとえ 1 コ/ml という少数コになつたとしても全く同様に増殖可能であることを示し、またこれらの増殖曲線から最小 2 乗法で計算された細胞の平均分裂時間は YAS/C 細胞で  $13.6 \pm 1.4$  時間、L 1210/V/C 細胞で  $12.2 \pm 1.2$  時間である。

同様の実験で、約  $10^4$ /ml の細胞濃度から出発した細胞の増殖曲線を血球計算板で算出される総細胞数、trypan blue 不染の viable cell および軟寒天培地でコロニー形成能ある細胞数を同一材料をもとにして検討した結果、YAS/C 細胞では図 5 に、L 1210/V/C 細胞では図 6 a に示すようになる。すなわち培地を交換しない条件では、約  $10^4$ /ml に調製された細胞は 4 日後に  $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml にまで増殖するが、その後 trypan blue 不染の viable cell ならびに colony forming cell は減少してくる。その減少傾向に差があり colony forming cell の減少が最も著しい。とくに YAS/C 細胞にその傾向は著明にみとめられる。さらに同一材料を用い、それぞれの細胞液を適当に希釈し増殖曲線をかかせると、YAS/C 細胞では図 5 b に、L 1210/V/C 細胞では図 6 b に示されるようになり、やはり第 5 日以降の培養液中の増殖可能な細胞数は激減していることが分る。この場合、原液中にある増殖できる細胞数は、これらの増殖曲

図 3

Growth Curve (YAS/C)

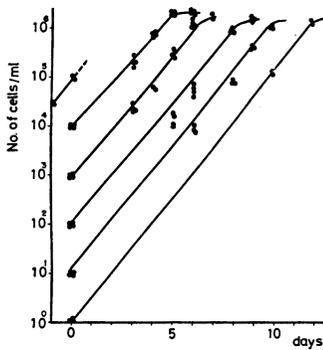


図 4

Growth Curve (L1210/V/C)

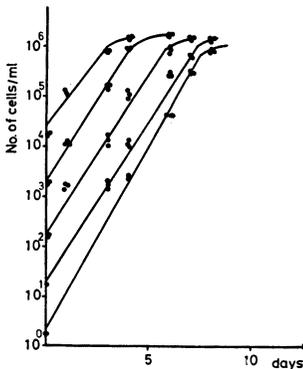


図 5

Colony Forming Capacity, Growth Capacity and Viability (YAS/C)

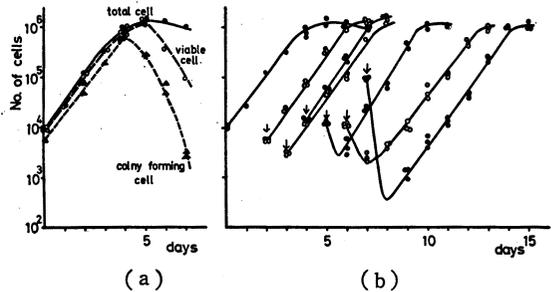


図 6

Colony Forming Capacity, Growth Capacity and Viability (L1210/V/C)

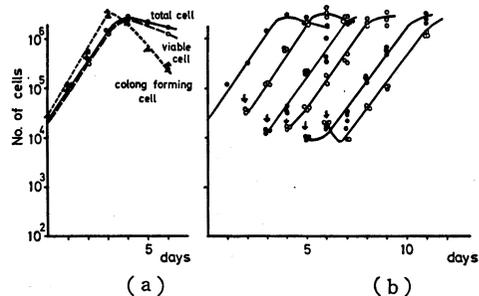
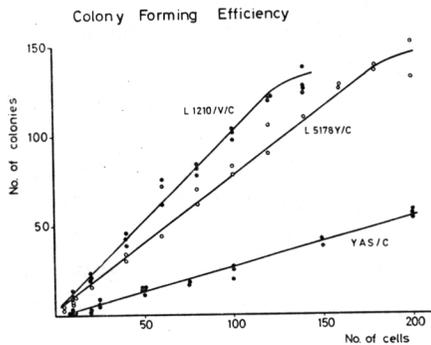


表 1 Colony forming capacity, growth capacity and viability of *in vitro* cultured YAS/C cells

Day	Total No. of cell	Viable cell (%)	Colony-forming cell (%)	Cell with growth capacity (%)
0	$1.0 \times 10^4$	98		
1	$2.9 \times 10^4$	98		
2	$1.2 \times 10^5$	99	21	98
3	$3.4 \times 10^5$	98	32	105
4	$7.0 \times 10^5$	97	24	100
5	$1.3 \times 10^6$	90	10	7.4
6	$1.2 \times 10^6$	33	2.5	3.2
7	$1.0 \times 10^6$	9.7	0.1	0.08

図 7



線から外挿法で計算されるが、その値は表 1 に示すように、trypan blue 不染の viable cell 数, colony forming cell 数と比較すると colony forming cell 数と定量的に合致し、viable cell 数とは合致しない。

2) 軟寒天培地に於ける colony forming efficiency

対数的増殖をしている培養細胞を、soft agar cloning assay によりコロニー形成させる。このばあい植え込んだ細胞数と生ずるコロニー数との関係は、図 7 に示されるとおり、直線関係にある。最小 2 乗法で算出される直線の勾配から、colony forming efficiency は L 1210/V/C 細胞では 99.5%, L 5178 Y/C 細胞では 75.4%, YAS/C 細胞では 28.0% である。また、このことは各コロニーは 1 コの細胞から形成されて来ることを示している。コロニーの顕微鏡写真ならびに肉眼写真はそれぞれ写真 1 および 2 に示される。

3) Mitomycin C による殺細胞作用の dose response curve

YAS/C 細胞を用いた Assay I での殺細胞作用の定量的 1 例は図 8 に示される。すなわち、Mitomycin C (MMC) の最終濃度として  $3.57 \times 10^{-3}$  mcg/ml から連続倍々希釈して  $2.77 \times 10^{-5}$  mcg/ml までの 8 段階の薬剤濃度を含む各濃度系列および対照に対し、それぞれ

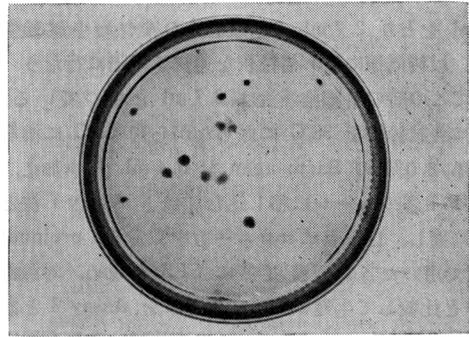


写真 1

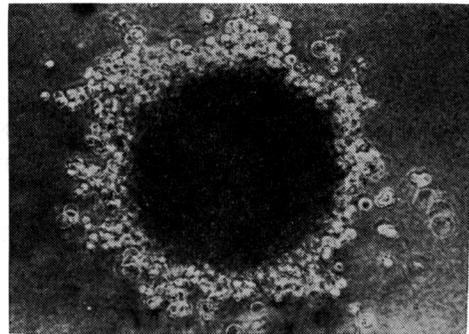
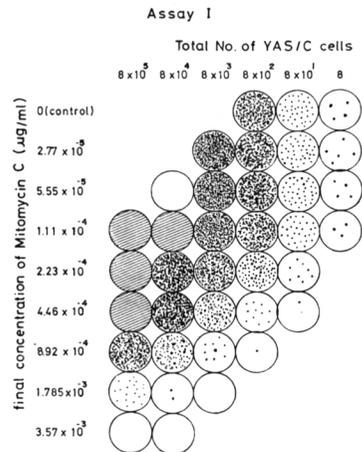


写真 2

L 1210/V/C 細胞の軟寒天培地に於けるコロニー形成、写真 1 は 11 日目の肉眼所見、コロニーの大きさは 1~2 mm。写真 2 は 8 日目のコロニーの顕微鏡所見、コロニーの大きさは 0.4 mm。

図 8 Assay I 法による Mitomycin C の殺細胞作用の定量的 1 例。YAS/C 細胞使用



YAS/C 細胞を  $8.0 \times 10^5$ /シャーレを最高に連続 10 倍希釈して 8.0 コ/シャーレまでの 6 段階の細胞数を含むように組合せて軟寒天培地とし、11 日間培養した場合のコロニーの出来方は、薬剤濃度が濃くなるにつれ減少し

図 9 YAS/C 細胞に対する Mitomycin C の殺細胞作用。薬剤接触時間別 (log-log plot)

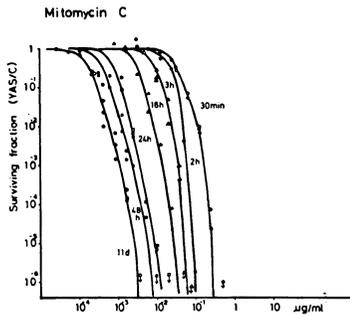
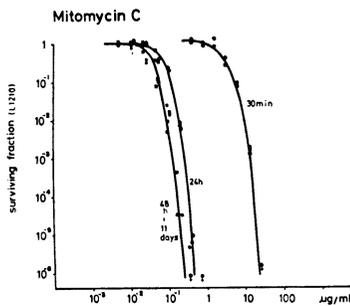


図 10 L 1210/V/C 細胞に対する Mitomycin C の殺細胞作用。薬剤接触時間別 (log-log plot)



3.  $57 \times 10^{-3}$  mcg/ml 以上の濃度ではコロニーは全く形成されなくなる。また各薬剤濃度に於ける細胞の surviving fraction を算出し dose response curve として plot することが可能であり、これは図9の 11 d. の dose response curve として図示される。また、Assay II の方法を用いて、各薬剤濃度での各一定時間接触させた後の、surviving fraction、すなわち 30 min, 2 h, 3 h, 16 h, 24 h, 48 h, 等の一一定時間接触させた後の surviving fraction も同様に求められ、これらは図9のそれぞれの時間での dose response curve として図示される。以上のことは L 1210/V/C 細胞に於いても全く同様に実験され、その dose response curve は図10に示される。このように Mitomycin C の殺細胞作用の dose response curve は薬剤と細胞の接触時間が短くなるにつれ、高濃度のほうへ移動するだけであり、その dose response curve の形はほぼ同一である。

以上は薬剤濃度幅が大きいので log-log の scale で表現したが、さらに薬剤の殺細胞作用を詳細に分析するため、surviving fraction を薬剤量に対し semi-log で plot すると L 1210/V/C, YAS/C いずれの細胞でも、その dose response curve は直線関係にあることが分

図 11 YAS/C 細胞に対する Mitomycin C の殺細胞作用。薬剤接触時間別 (Semi-log plot)

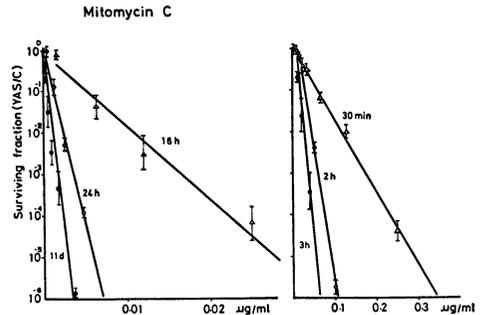
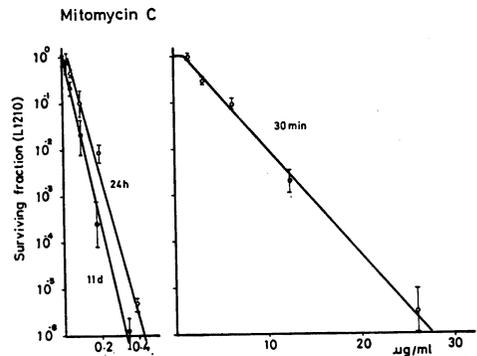


図 12 L 1210/V/C 細胞に対する Mitomycin C の殺細胞作用。薬剤接触時間別 (Semi-log plot)



る (図 11, 12)。そして薬剤との接触時間が長くなるにつれ、その直線の勾配は急峻となり、最大に達する (11 d. の直線)。従がつてこの直線の勾配から薬剤の感受性を表現することが可能となる。すなわち Mitomycin C の殺細胞作用の dose response curve は

$$\log S = \log n - kD \quad \left( \begin{array}{l} S : \text{生残率} \\ D : \text{薬剤濃度} \\ n \text{ および } k : \text{constant} \end{array} \right)$$

で表現し得る。その勾配  $k$  の逆数は生残率を 10% にす

表 2 Sensitivity of tumor cell to mitomycin C : Mean lethal dose (10%)

Exposure time	L 1210/V/C	YAS/C
30 min.	4.32 µg/ml	$5.81 \times 10^{-2}$ µg/ml
2 hours		$1.58 \times 10^{-2}$
3 hours		$1.02 \times 10^{-2}$
16 hours		$6.10 \times 10^{-3}$
24 hours	$6.71 \times 10^{-2}$	$1.20 \times 10^{-3}$
11 days	$5.68 \times 10^{-2}$	$5.41 \times 10^{-4}$

Mean lethal dose で表現。Surviving fraction が 10% に減少する薬剤濃度 (MLD<sub>10</sub>)。すなわち 90% の細胞が殺される濃度。

量、すなわち 90% の細胞を殺す薬剤濃度を表わしていることになり、細胞の感受性の指標となる。この値は放射線の場合と同様に平均致死量 (10%) [mean lethal dose (10%)] として表現され、L 1210/V/C 細胞および YAS/C 細胞について測定された結果は表 2 に示される。この平均致死量から細胞の薬剤感受性を比較すると、YAS/C 細胞は L 1210/V/C 細胞より約 100 倍も Mitomycin C に対し感受性が高い。また Mitomycin C に関し、平均致死量は薬剤と細胞の接触時間が長い場合は短い場合より少量となる。両細胞群とも 11 日間の接触の場合の平均致死量は、30 分間の接触の平均致死量の約 100 分の 1 である。

### 考 案

放射線や薬剤による殺細胞作用を定量的に測定するために、腫瘍細胞の生死を判定する方法として、細胞の増殖能力の有無で区別する方法が最も確からしいことは、腫瘍細胞の性格から充分考えられることである。その内 soft agar cloning assay 法は古くから PUCK<sup>1)</sup> により HeLa 細胞を用いて、放射線の作用の研究に用いられて来た。しかし残念なことには、この方法は薬剤、とくに抗癌剤の殺細胞作用の研究には用いられることが少なく、最近になつて 2, 3 の報告<sup>6,7)</sup> がなされているにすぎない。とくにこの方法は浮遊培養細胞にも容易に適用され得るもので、コロニー形成能を持つた細胞数を比較的簡単に定量できる方法である。放射線の場合と異なり、抗癌剤を用いる場合には、薬剤と細胞との接触時間が問題となるので、monolayer で増殖する細胞を用いると、広範な薬剤濃度勾配をとつて実験を行なう場合には、ある一定接触時間ごとに迅速に sampling することが困難となり使用しにくい欠点があり、この点浮遊培養される細胞はこれらの実験目的に適しており、使用しやすい。従がつてこの実験ではすべて浮遊培養される腫瘍細胞を用いて実験を行なつた。

各種抗癌剤の殺細胞作用を明確に把握することは total cell kill を目ざす抗癌剤の投与方法や、最適な投与形式を示す治療理論の一端を展開するのに有用と思われるし、また細胞の薬剤に対する感受性や耐性の程度を定量的に示し得る方法として、化学療法の基礎的問題の解決にも有用である。これらのことは一般の細菌学に於いて、抗菌性物質の研究では常識的な方法として用いられ、臨床的には感受性の測定に広く応用されている。抗菌性物質の場合、一定の血中濃度が保たれるような投与方法が取られ得るが、抗癌剤のばあい副作用が強いため、血中濃度を一定に保つような投与方法をすべての抗癌剤に無条件に適用することは出来ない。この意味から言つて、抗癌剤の殺細胞作用の dose response を定量的に

極めることは、それぞれの抗癌剤の作用機作、至適投与方法を考える上に極めて重要である。しかし現在まで、抗癌剤の殺細胞作用がこれらの方法を用いて定量的に検討されたことは HIMMELFARB<sup>8)</sup> ら、THAYER<sup>9)</sup> ら、および下山ら<sup>7,9,10)</sup> の報告を除いてはない。HIMMELFARB<sup>8)</sup> や THAYER<sup>9)</sup> らは spin filter culture device<sup>11)</sup> を用いているため、広範な濃度勾配をとつた実験はなされていない。この点、我々の方法は広範な薬剤濃度と色々な接触時間を組合せて実験を行なうことが可能である点すぐれていると思われる。しかし細胞と薬剤との incubation 中、薬剤が不活化される場合、薬剤濃度が一定に保たれないという欠点はある。この点、HIMMELFARB<sup>8,9)</sup> らの方法は、常に同一薬剤濃度で細胞が infusion を受けているので、stock medium 中で、薬剤が不活化される場合を除き、薬剤濃度を一定に保ち得る方法としてすぐれている。従がつて実験規模や目的により、いずれか、または場合により両者の方法を併用して検討することも必要であろう。

放射線の場合と同様、抗癌剤の場合でも増殖抑制作用がみられる。このためコロニーの大きさが小さい場合とか、大小不同が生じ、コロニー数の算定に多少の困難性が伴なう。さらに、細胞が死に到るまで数回の分裂を行なうという reproductive death があり、この場合 abortive colony としてみられる。この abortive colony と slow growing colony との鑑別は長期培養してコロニーの大きさが増すかどうか、または顕微鏡による観察で小コロニーでありながらコロニー構成細胞が変性崩壊を示しているかどうかによつて決定され得る。すなわち、経験的には 11 日目にコロニー数を肉眼判定し、さらに疑わしいコロニーについては、検鏡により判定することで鑑別は比較的容易となる。

Mitomycin C の殺細胞作用の dose response curve は一部放射線の場合と類似している。すなわち細胞の生残率は薬剤濃度が増すごとに、対数的減少を示す。従がつてその殺細胞作用は concentration dependent であり、cytotoxic であると言える。興味あることは放射線の場合と異なり、低濃度範囲での lag phase、すなわち dose response curve の convex portion がみられず、最初から semi-log で直線関係にある点である。放射線の殺細胞作用の dose response curve は multi-hit survival curve で表わされることが実験的に証明されている<sup>1,12)</sup>。すなわち、 $S=1-(1-e^{-kD})^n$  の式にあてはまる ( $S$ : 生残率,  $D$ : 線量,  $n$ : hitness number)。 $D$  が小の場合 survival curve には initial shoulder、すなわち convex portion があり、 $D$  が大となるに従がいて semi-log plot で直線関係にある。すなわち理論的にも

$D$ が大の場合、上記の式は  $\log S = \log n - kD$  で表わされ、この式から  $D=0$  の時の  $S$  の外挿値は  $n$  となり、hit number  $n$  は簡単に求められる。Diploid cell で典型的なものは  $n=2$  で、2 hit survival curve を示すことが知られているように、放射線の作用点は chromosome<sup>1)</sup> であり、2本鎖 DNA の両鎖とも放射線により障害を受けて初めて増殖能が失なわれるとされている<sup>1,12,13)</sup>。Mitomycin C の場合、最初から  $\log S = \log n - kD$  で表わされ、semi-log で直線関係にあるが原点を通らない。また放射線でみられる少量範囲での convex portion の消失がみられる。Mitomycin C の作用機作は DNA の合成阻害<sup>14)</sup> であり、DNA の相補的塩基対の間に Mitomycin C が cross link を形成することにより DNA 複製が不可能となる点にあるとされている<sup>15)</sup>。すなわちアルキル化剤と類似の作用を持ち、1分子の Mitomycin C は bifunctional な作用を行なっていると考えられ target である DNA に達した Mitomycin C の分子は、同時に2重鎖 DNA のいずれにも作用し、cross link を形成する。この意味から、Mitomycin C の殺細胞効果が最初から semi-log で直線関係にあり、one hit survival curve と一致することが理解できないことはない。このばあい原点を通らない理由として、おそらく薬剤の細胞内への取込みが active transport またはその他何らかの制約を受けているために、target(DNA) への到達がある一定の薬剤濃度以上にならないと達成されないということが考えられる。すなわち放射線の作用は monofunctional であり、細胞内の target に対し、ほぼ自由に到達し得るのに反し、薬剤の場合、細胞内の target への到達はある濃度以上にならないと達成されないという制約を受け、かつ Mitomycin C の場合1分子は同時に bifunctional な作用を行ない得る点等の相違が、これらの dose response curve の形の相違として現われて来るのではないかと考えられる。

以上の議論はともかく、細胞の薬剤に対する感受性は、かなり明確に表現できる。すなわち殺細胞作用の dose response から、その生残率の減少直線の勾配の逆数は常用対数を用いた場合は 90% の細胞を殺し、生残率を 10% へ減少させる量に相当し、自然対数で表現すれば放射線の感受性の指標としてよく用いられる平均致死量、すなわち 63% の細胞を死滅させ、生残率を 37% へ減少させる量に相当する。この論文では、前者の表現を用いたが、今後薬剤の殺細胞作用を統計数学的に解析していく上に於いては、後者の表現を用いたほうがよいのかも知れない。

#### 結 論

L 1210 マウス白血病細胞, L 5178 Y マウス白血病細胞,

吉田肉腫等の腹水型より浮遊状態で増殖し、長期継代培養される培養株を樹立し、さらに軟寒天法によりコロニーングして高率にコロニーを形成する細胞株をそれぞれ樹立した。これらの細胞株を用い、soft agar cloning assay の方法により、抗癌剤の殺細胞作用(肉眼的なコロニー形成の有無で判定)を定量的に測定する方法を考案した。

この方法を用いて Mitomycin C の殺細胞作用を定量すると、細胞の生残率は薬剤濃度に対し semi-log で直線的に減少するが、この直線は原点を通らない。この理由は、おそらく薬剤の細胞内への取込みに制約があるため、ある濃度以上にならないと細胞内へ取り込まれず、その作用点である DNA へ到達し得ないことが、ある薬剤濃度以上から作用が表われることと関係しているらしい。また Mitomycin C は bifunctional な作用があり、1分子で2重鎖 DNA に同時に作用し、DNA 間に cross link を作るということが Mitomycin C の殺細胞作用は single hit theory に従いがい exponential survival curve を示すことに関与していると思われる。

Mitomycin C の殺細胞作用が linear logarithmic line を示すことから、細胞の薬剤感受性はその直線の勾配により現わすことが出来る。勾配係数の逆数は平均致死量(mean lethal dose, MLD)を示し、常用対数を用いた場合は生残率を 10% に減少させる(致死率 90%)濃度、また自然対数を用いて表わした場合は生残率を 37% に減少させる薬剤濃度を示す。Mitomycin C の MLD(10%) で感受性を比較すると、YAS/C 細胞は L 1210/V/C 細胞より約 100 倍も感受性が高い。また両細胞系とも長時間接触(11日間)の場合の MLD(10%)は、短時間接触(30分間)の MLD(10%)の約 100 分の 1 の濃度である。

(本論文の一部は第 29, 30 回癌学会総会に於いて発表した。本研究中、有益な御助言をいただいた国立がんセンター 仁井谷久暢博士、大星章一博士に謹んで感謝の意を表します。また本研究は文部省および厚生省のがん研究費の助成を受けた。)

#### 文 献

- 1) PUCK, T. T. & P. I. MARCUS: Action of X-rays on mammalian cells. J. Exp. Med. 103: 653~666, 1956
- 2) TILL, J. E. & E. A. McCULLOCH: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiation Res. 14: 213~222, 1961
- 3) SKIPPER, H. E., F. M. SCHABEL & W. S. WILCOX: Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with curability of experi-

- mental leukemia. *Cancer Chemotherapy Rept.* 35: 1~111, 1964
- 4) HEWITT, H. B.: Studies on the dissemination and quantitative transplantation of a lymphocyte leukemia of CBA mice. *British J. Cancer* 12: 378~401, 1958
  - 5) BRUCE, W. R. & H. C. VAN DER GAAG: A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation *in vivo*. *Nature* 199: 79~80, 1963
  - 6) HIMMELFARB, P., P. S. THAYER & H. MARTIN: Growth of colonies of murine leukemia L 1210 *in vitro*. *Cancer Chemotherapy Rept.* 51: 451~453, 1967
  - 7) 下山正徳, 木村禱代二: 培養細胞を用いた癌化学療法の研究 (1), 培養吉田肉腫細胞に対する各種制癌剤の殺細胞作用。日本癌学会総会記事 29: 237, 1970
  - 8) THAYER, P. S., P. HIMMELFARB & D. ROBERTS: Effects of perfusion with amethopterin on L 1210 leukemia cells in spin filter culture. *Cancer Res.* 30: 1709~1714, 1970
  - 9) 下山正徳, 木村禱代二: 培養細胞を用いた癌化学療法の研究 (2), L 1210 mouse leukemia 培養細胞に対する各種制癌剤の殺細胞作用に就て。日本癌学会総会記事 30: 189, 1971
  - 10) 下山正徳, 木村禱代二: 培養細胞を用いた癌化学療法の研究 (3), L 1210 mouse leukemia 培養細胞の *in vitro* 感受性と *in vivo* 治療効果の相関について。日本癌学会総会記事 30: 178, 1971
  - 11) HIMMELFARB, P., P. S. THAYER & H. E. MARTIN: Spin filter culture: The propagation of mammalian cells in suspension. *Science* 164: 555~557, 1969
  - 12) PUCK, T. T., D. MORKOVIN, P. I. MARCUS & S. J. CIECIURA: Action of X-rays on mammalian cells. II. Survival curves of cells from normal human tissue. *J. Exp. Med.* 106: 485~500, 1957
  - 13) PUCK, T. T.: Action of radiation on mammalian cells. III. Relationship between reproductive death and induction of chromosome anomalies by X-irradiation of euploid human cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 44: 772~780, 1958
  - 14) SHIBA, S., A. TERAWAKI, T. TAGUCHI & T. KAWAMATA: Selective inhibition of formation of DNA in *Escherichia coli* by mitomycin C. *Nature* 183: 1056~1057, 1959
  - 15) IYER, V. N. & W. SZYBALSKI: A molecular mechanism of mitomycin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 50: 355~362, 1963

## QUANTITATIVE CLONAL GROWTH OF MAMMALIAN CELLS

Its Application for Quantitative Study of Cytocidal Action of Mitomycin C

MASANORI SHIMOYAMA and KIYOJI KIMURA

National Cancer Center Hospital

The soft agar cloning assay has been successfully applied to suspension-grown mouse leukemia L 1210(L 1210/V/C), L 5178 Y(L 5178 Y/C), and YOSHIDA ascites sarcoma (YAS/C) cells.

The effects of mitomycin C have been quantitatively studied on single cells of L 1210/V/C and YSA/C cells under conditions such that almost 100% cells of L 1210/V/C and about 30% cells of YSA/C produce in isolation to form macroscopic colonies. Survival (S) of single cells (defined as the ability to form a macroscopic colony within 11 days) yields a typical exponential or single hit survival curve when plotted against mitomycin C concentration(D). The survival curve fits the following equation:  $\log S = \log n - kD$ . The reasons for exponential survival curve obtained by mitomycin C are discussed in comparison with the sigmoid, multi-hit survival curve observed in irradiation.

The sensitivity of cell to mitomycin C can be expressed by mean lethal dose, the reciprocal of slope coefficient  $k$ . On this basis, YAS/C cells is 100 times more sensitive to mitomycin C than L 1210/V/C cells.