

胃癌組織培養による制癌剤感受性試験

塩 坂 雅 司

日本大学医学部第3外科学教室(指導:石山俊次教授)

(昭和47年11月28日受付)

目 次

- I 緒 言
- II 実験方法
 - 1) 実験準備
 - a) 培養操作室
 - b) 培養液
 - c) 緩衝塩類液, 細胞分散剤
 - 2) 初代培養
 - a) 材料処理
 - b) 細胞培養法
 - c) 組織片固定法
 - d) 組織片浮遊法
 - e) 静置培養
 - 3) 上皮性細胞群判定
 - 4) 継代培養法
 - 5) 腫瘍性判定
 - a) 位相差顕微鏡による形態観察
 - b) 染色法
 - c) 染色体数測定法
 - 6) 感受性試験
 - a) 細胞核数測定法
 - b) disk 平板法
 - c) 核酸量測定法
 - 7) tritium (³H) による microautoradiography
- III 実験成績
 - 1) 培養成績
 - 2) 上皮性細胞群判定成績
 - 3) 腫瘍性判定成績
 - 4) 小 括
 - 5) 感受性試験成績
- IV 感受性薬剤判定および臨床効果
- V 考 察
- VI 結 語

I. 緒 言

Screening 法で優れた制癌性を示し, 臨床に応用され

本論文の要旨は第8回日本癌治療学会総会(昭和45年10月), 第19回日本化学療法学会総会(昭和46年6月)において発表した。

筆者 昭和38年卒。

ている薬剤はいずれも毒性の高い物質で, 正常細胞にもかなり毒性を示す。生体に無害な制癌剤を発見することが理想であるが, 現在のところ cytostatic action のみの薬剤は抗腫瘍効果が認められていない。一旦, 効果のあつた薬剤も長期使用で抵抗性が出現したり¹⁾, また, 副作用が致死的な方向に進むことがある。それ故に使用上で薬剤の毒性を少なく, かつ増殖抑制を強くするにはその腫瘍の薬剤に対する感受性を測定し, 感受性の高い薬剤を使用すれば効果が望めるのではないかと考える。

近来, 腫瘍の種類, 発生部位, 分化の程度などによる薬剤感受性の相異が広範な臨床経験によつて明らかになりつつあるが^{2,3)}, しかし, その系統的な所見での感受性も個々の腫瘍によつて差異があるので, 症例別に腫瘍細胞に対する *in vitro* での制癌剤感受性試験が必要である。

臨床に使用される制癌剤の感受性試験は次の3方法に大別される。1) 癌組織切片を使用する方法^{4,5)}, 2) 器管培養法^{6,7,8)}, そして, 3) 組織培養を利用する方法⁹⁾である。組織切片を直接使用する方法は, 薬剤接触後における形態学的, 化学的变化を測定する方法であり, 次の器管培養法も本質的には組織培養に含まれるが組織片を直接使用するので, 使用組織の大きさが等量でも生細胞数が等しいとはかぎらず, 判定にむらがある。これらの欠点を取り除く意味で, 一定の条件下で制癌剤を接触させる組織培養法が行なわれている。しかし, 培養細胞の腫瘍性判定方法や感受性試験として種々な技術的な困難さがある。それ故に本研究では継代1代目で染色法および染色体数を測定して形態学的な同定を試み, 腫瘍性細胞群と同定された継代培養細胞を使用して感受性試験を行なつた。実験の対象となつた悪性腫瘍は, 教室で手術を行なつた胃癌症例100例で, 初代培養の結果, 腫瘍性細胞群の出現した13例について継代1代目, および2代目で Mitomycin C(MMC), 5-Fluorouracil (5-FU) を接触後, 形態学的には細胞核数測定を, 生化学的には DNA 量を測定して薬剤感受性を判定し, 臨床的に使用して臨床効果と培養成績とを比較検討した。

II. 実験方法

1) 実験準備

組織培養の実施にあつては細菌感染の防止がまず第

1に重要であり、特に粘膜面より採取した癌組織片は感染が常在すると考え細菌感染防禦に十分な注意をはらい、設備、器具などの処理および培養液の調製を行なった。

1)-a) 培養操作室

操作室内は紫外線殺菌燈と殺菌剤散布を併用し、特に、材料や培養液がこぼれやすい操作台には作業前後に洗浄消毒を逆性石鹼液で行なった。

1)-b) 培養液

合成培地として TC 199 を使用したが、培養方法の変更に伴い EAGLE の処方による minimum essential medium 1959(MEM) 粉末培養液を自家調整し、細菌感染をおさえるためにカナマイシン 50 mcg/ml を加え、pH 調整は NaHCO_3 溶液にて最終的に 7.4 とした。添加血清として 30% 馬血清と 20% 仔牛血清を使用した。主として滅菌済みの組織培養用仔牛血清を使用した。保存は蛋白分解を防ぐために凍結保存とした。

1)-c) 緩衝塩類溶液

組織片洗浄や薬剤溶液希釈用に等張生理的緩衝塩類溶液にエネルギー源として glucose を加え調製した。 NaCl 8.0 g, KCl 0.4 g, Glucose 1.0 g を蒸留水 1 L に溶解、 NaHCO_3 で 7.4 に調節した。細胞分散剤は Difco trypsin を緩衝液で溶解し、濾過滅菌後 0.2% trypsin 緩衝溶液を作製した。

2) 初代培養

細胞培養法と組織片培養法を行ない、特に組織片培養法は固定法と浮遊法の 2 方法を用いた。材料は手術時に肉眼的に癌組織と認められた部位より採取した。

2)-a) 材料処理

切除胃の癌浸潤が漿膜面に達している場合は漿膜面より充実性の腫瘍部分を採取した。粘膜面より採取する時は胃内容を排除し滅菌水でよく洗浄したのちに壊死組織をさけ腫瘍中心部より採取した。また正常粘膜部分を対象として採取した。切除不能症例は転移リンパ節または浸潤組織の試験切除片を材料とした。感染防止のために粘膜面より採取した材料と漿膜面やリンパ節などの清潔な材料とは別々に処理する。カナマイシン 50 mcg/ml を含む培養液約 50 ml 中に培養操作まで 4°C で 2 時間保存した。材料に付着した細菌発育防止と培養液の組織内滲透を目的とした。

材料洗浄は緩衝塩類液に penicillin 100 単位/ml, streptomycin 100 mcg/ml を添加し、pH 調整後、数個のシャーレに分注し、その中に材料を入れよく洗浄しながら次々とシャーレを変え、洗浄中に粘液や壊死組織を除去し出来るかぎり充実性の癌組織塊を作る。漿膜面やリンパ節の材料も同様な洗浄を行ない、脂肪組織や結合組織は除去した。洗浄した材料はシャーレ内で鋭利なハ

サミで細切する。 1 mm^3 以下に細分された組織片がよい発育を示す。

2)-b) 細胞培養法

細切された組織片に細胞分散液を加え、 37°C で 1 時間分散した後、細胞浮遊液を作製し、塩類溶液で 3 回遠沈をくり返して trypsin を除き培養液中に再浮遊させる。次に、0.5% trypan blue 溶液で生細胞を算定して 5×10^4 cells/ml の濃度にて培養ビンに分注して静置培養した。

2)-c) 組織片固定法

Cover slip 上に fibrinogen 溶液を滴下し、その中に細切組織片を入れ、その上に thrombin を滴下し fibrin で組織片を cover slip に附着させる。この cover slip を培養ビン内に入れて培養液をみたま。組織片は fibrin を栄養源として fibrin の網内で増殖する。

2)-d) 組織片浮遊法

シャーレ内の細切組織片に培養液を加えて培養ビンに分注して閉鎖培養する。培養液の量は組織片が静置の状態ガラス面に定着する程度とした。これは浮遊組織片が培養液中に増殖してガラス面に附着するので充分固着するまで移動しにくいように培養液量を調節した。

2)-e) 静置培養

ゴム栓で閉鎖した培養ビンを 37°C のフ卵器に入れて培養した。シャーレを用いる時には、15% CO_2 を入れた嫌気性培養用のビン中にシャーレを置いて pH の変動を防いだ。培養液は最初 2 日目に補充し、4 日毎に交換した。

3) 上皮性細胞群判定

初代培養は、癌組織の上皮性部分と支持組織の混合培養である。そのため、上皮性細胞群の判定が必要となる。位相差顕微鏡を用い、細胞間相互接着性、細胞質内分泌顆粒、集団的な細胞拡大などの形態学的所見より判定した。そのうちで上皮性細胞群が優位な発育を示す培養ビンを選び継代培養した。

4) 継代培養法

上皮性細胞群が発育した培養ビンまたはシャーレに 0.2% trypsin 溶液を加え細胞群をガラス面から剥離する。細胞浮遊液を 800 回転 5 分間遠沈し、さらに塩類緩衝液で 3 回遠沈をくりかえし trypsin を除去して培養液におきかえる。1% trypan blue で生細胞数を測定し、培養ビン分注量を決定する。腫瘍性判定用と感受性試験用の各培養ビンに当量ずつ分注し、細胞数約 5×10^4 cells/ml として静置単層第 1 代目の継代培養を行なった (Plate 1)。特に腫瘍性判定には cover slip を培養ビン底におき、その上に細胞浮遊液を注入して増殖した時期に取り出し、各種の染色法を用いた。

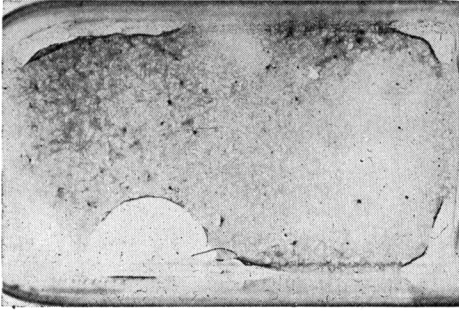


Plate 1. Growing cells in culture bottle. 1st secondary culture.

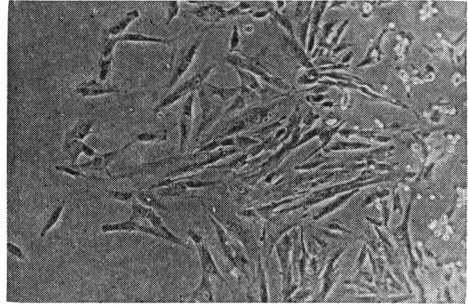


Plate 2. Non epithelial cells group. (phase-contrast $\times 100$)

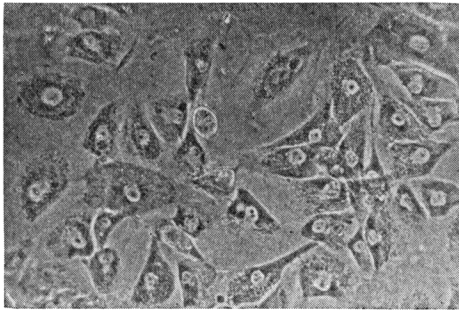


Plate 3. Epithelial cells group. (phase-contrast $\times 200$)

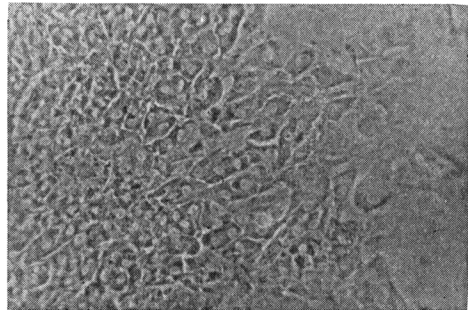


Plate 4. Epithelial cells group showing continuous growing out of colony. (phase-contrast $\times 100$)

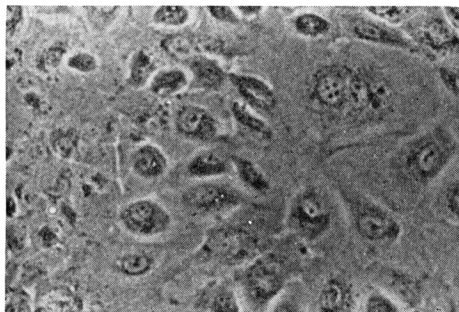


Plate 5. Decision of cancer cells determined by the irregular shape of cells and nuclei of irregular contour which contain granules of chromatin and large nucleolus. (phase-contrast $\times 200$)

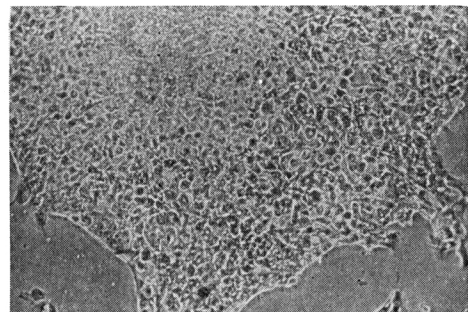


Plate 6. Sheets of cancer cells showing piled up and condensed colony. (phase-contrast $\times 100$)

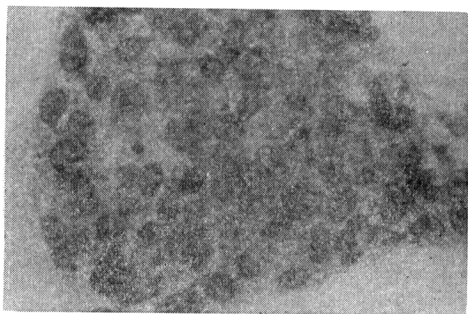


Plate 7. Case 45. Cancer cells of the 1st secondary culture showing irregular shape of the cells and nuclei. (oil immersion $\times 100$)

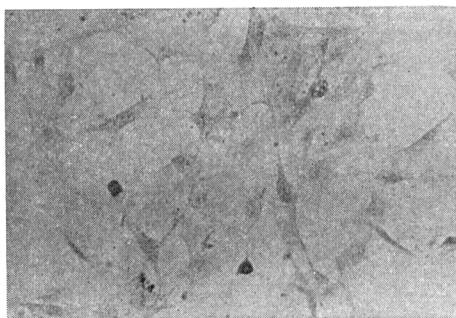


Plate 8. Case 31. Cancer cells of the 1st secondary culture. Contraction of cells and extension of intercellular space by fixing. (H.E. $\times 400$)

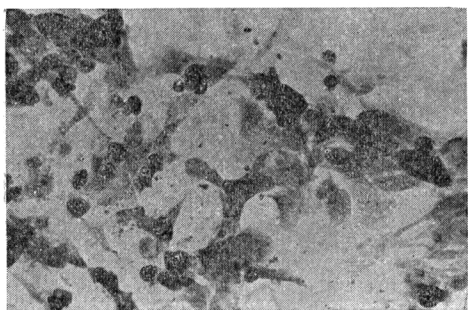


Plate 9. Case 31. Glycogen in cytoplasm by PAS staining. ($\times 400$)

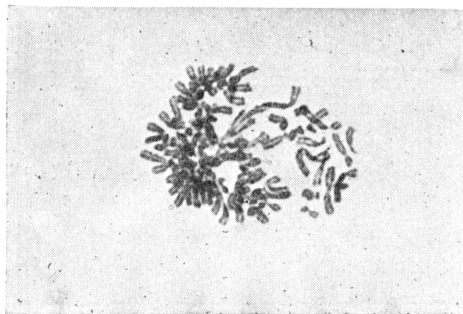


Plate 10. Case 31. Metaphase spread found in the 1st secondary culture cell.

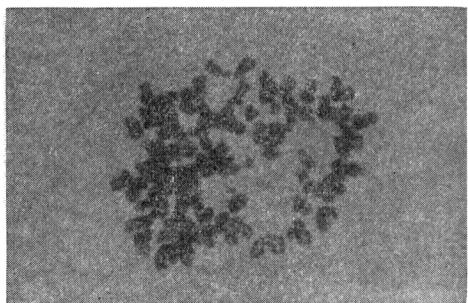


Plate 11. Case 32. 72 chromosomes of the 1st secondary culture cell.

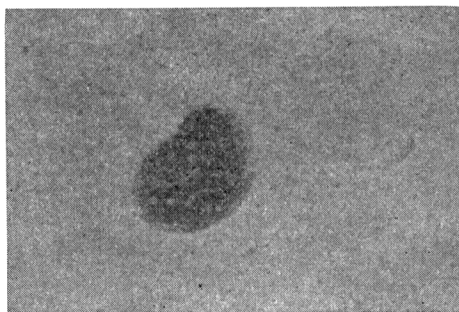


Plate 12. 5-FU-6-T uptake measured by microautoradiography. After 15 minutes contact showing some silver grains in nucleus. (oil immersion $\times 1,000$)

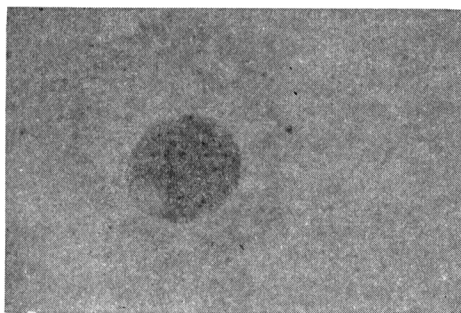


Plate 13. After 1 hour contact with 5-FU-6-T showing gradual increasing of silver grains in nucleus.
(oil immersion $\times 1,000$)

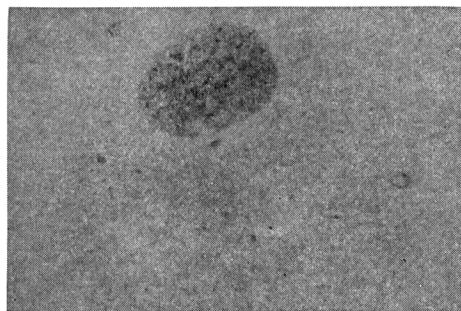


Plate 15. After 3 hours contact, silver grains in nucleus increasing remarkably, however total cells number decreasing by 5-FU toxicity.
(oil immersion $\times 1,000$)

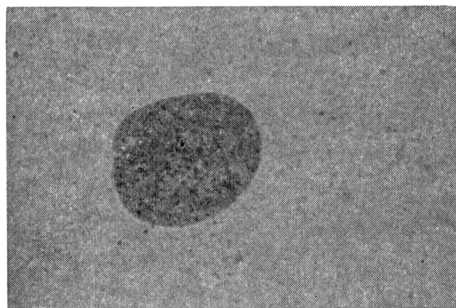


Plate 14. After 2 hours contact, silver grains either in nucleus and cytoplasm found almost equal and total uptake of cell fairly increasing.
(oil immersion $\times 1,000$)

5) 腫瘍性判定

培養細胞の腫瘍性を判定するには、同一胃の正常組織の培養細胞と比較すれば良い理であるが、全症例に正常組織培養で上皮性細胞群の出現を望めない。腫瘍部分の培養で上皮性細胞群が発育すれば当然癌細胞と考えてよいが、明確な判定を求めるために次の3方法を用いた。

5)-a) 位相差顕微鏡による形態観察

継代培養細胞は単層になり相互接着性も少なくなつて細胞の運動も活発化して来るとともに扁平化し、顆粒、空胞、多核化、核優性の状態が明らかになるが、癌細胞の判定には細胞間の結合を主体とした piled up, densed colony の所見を重要視した。

5)-b) 染色法

染色法は Giemsa 染色, hematoxylin-eosin 染色, PAS 染色, mucin 染色の各

方法で、PAPANICOLOAU, GRAHAM の基準を参考にして核の変化、細胞質内泌顆粒、異常分裂像などの所見で判定した。発育がさかんな細胞群のため決定的な所見ではないが、細胞内粘液分泌、glucogen 増加¹¹⁾は腫瘍細胞の所見とした。

5)-c) 染色体数測定法

染色体数異常は諸家によつて述べられている^{12,13)}。継代培養1代目の培養ビンに 50 mcg/ml の colchicine 溶液の 0.2 ml を加え、2時間後に trypsin 溶液で剥離し、低調水で処理した細胞を氷酢酸アルコール(3:1)液で2回固定、冷却した cover slip 上に固定細胞浮遊液の1滴を落とし、1層に拡げ乾燥させる air drying 法により標本作製し、Giemsa 染色により染色体数を測定した。

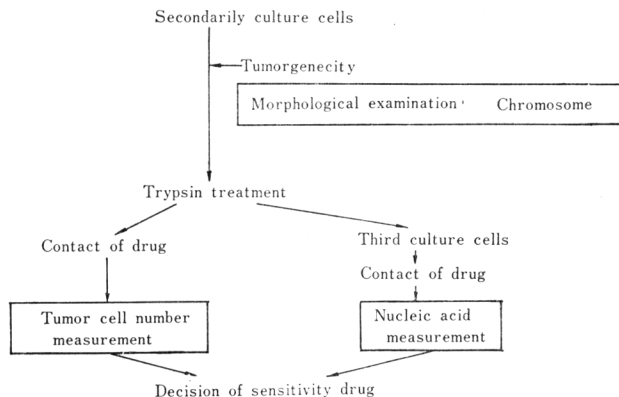
6) 感受性試験 (Fig. 1)

腫瘍性が判定された細胞群を感受性試験に供した。接触薬剤は MMC, 5-FU の2剤を使用し、薬剤に対する感受性の判定には、次の3方法を用いた。

6)-a) 細胞核数測定法

接触濃度は MMC 1, 0.1, 0.01 mcg/ml, 5-FU は

Fig. 1 Sensitivity test



5, 0.5, 0.05 mcg/ml の各 3 段階とした。これらの濃度は臨床血中濃度を上まわらないことを目標とした。薬剤接触は継代培養 1 代目の細胞群を trypsin で剥離し、緩衝液に再浮遊させる時期である。接触時間は最初 1 時間であったが、制癌剤の核内取込みなどの検討により 2 時間とした。接触後の細胞を約 5×10^4 cells/ml, 2 ml ずつ小型培養ビンに分注し、37°C 静置閉鎖培養で、24, 48, 96, 168, 240 時間毎の各培養ビン床に附着増殖した細胞を trypsin で剥離して crystal violet で染色し、血算板を用いて核数を算定¹⁴⁾した。各濃度、各時間の 2 本ずつの培養ビン内細胞核数を平均した。培養液は 3 日毎に交換した。

6)-b) disk 平板法

1×10^5 cells/ml の細胞をシャーレ内に 3 ml 分注し、37°C で 24 時間 15% CO₂ フ卵器で培養した後に、培養液をすて 5 ml の培養液 MEM 寒天で覆い、細胞核数測定法と同濃度の disk を 24 時間作用させた。disk を除去し 2 次寒天を重層し、さらに 3 日間培養した後 Giemsa 染色をして阻止円の直径を測定した^{15,16)}。

6)-c) 核酸量測定法

前述の 2 方法との併用では細胞数が不足なのでさらに継代培養し、2 代目の細胞群を使用した。中角型培養ビンに約 1×10^5 cells/ml を 2 ml 分注し、2 日目の増殖細胞群に MMC 1 mcg/ml, 5-FU 5 mcg/ml を 2 時間静置接触した直後、24 時間後、さらに 48 時間後の細胞群を trypsin で剥離した。microhomogenizer で細胞破壊後、OGUR-RESEN 法にもとづき、4°C, 70% ethanol を加え遠沈沈渣を 0.1% PCA, 70% ethanol で洗浄する。さらにこの沈渣に沸騰 ethanol ether(3:1 v/v) で脂溶性分画を除去し、さらに沈渣に冷 0.2 N PCA を加え 2 回繰り返して酸可溶性分画を除去する。遠沈沈渣に 1 N PCA, 4°C, 18 時間抽出し、1 N PCA で 2 回洗い、この上清を合せて RNA 分画とする。RNA 分画採取後の沈渣を 0.5 N PCA で 70°C, 20 分抽出、これを 2 回繰り返して上清をあわせ DNA 分画とした。この両者の上清を紫外線吸収測定した。RNA 分画, DNA 分画ともに、260 m μ の波長で測定した。RNA, DNA 量は紫外線吸収検量値と正比例する (Table 1)。

7) tritium (³H) による microautoradiography¹⁸⁾

薬剤接触時間の決定のために培養胃癌細胞の ³H-5-FU による microautoradiography で追求した。tritium 標識化合物 5-FU-6-T 5.6 mcg/ml, ³H, 50 mCi/ml の濃度で培養細胞の接触時間ごとの取込みを測定した。cover slip 上に 3 日間単層培養した細胞群に 15 分間、30 分間、1 時間、2 時間、3 時間まで 37°C で静置接触し、直ちに洗浄固定した。さらに薬剤洗浄後 24 時間静

置培養した標本も作製した。方法は液体乳剤 (さくら NR-M 1) 中に培養細胞附着面を浸して coating し、乾燥剤と共に暗箱内で 7 日間露出し、レントゲン現像液で現像、定着、水洗する。乾燥後に Giemsa 染色して、接触時間毎の細胞質内、および核内の silver grain を算定した。

III. 実験成績

1) 培養成績

培養症例は胃原発癌の切除または試験切除した 100 例である。培養材料の病理組織は adenocarcinoma tubulare が過半数をしめ、男女の比は 7:3 で男性が多かった (Table 2)。年齢分布をみると 50 歳台に約 1/3 が集中した (Table 3)。培養方法別の培養成績を比較すると、細胞培養法では細胞採取の trypsin 処理に時間がかかるので感染が起こりやすく、初代培養の成功例が少ない。fibrin 固定法は fibrin の栄養により初代培養の発育は良好であるが上皮性細胞群の出現が遅く、fibrin 網のため継代培養用の細胞採取が出来なかつた。組織片浮遊法では 15 例に初代培養から継代培養が出来た。さら

Table 1. Quantitative analysis of nucleic acid

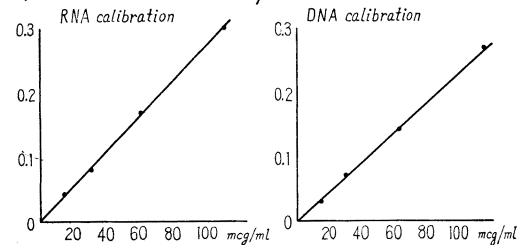


Table 2 Sex distribution and histological classification of culture materials

	man	woman	total
Adenocarcinoma tubulare	46	19	65
acinosum	3	0	3
scirrhosum	1	2	3
papillare	1	1	2
Carcinoma simplex	1	3	4
Metastasis(Adenocarcinoma)	18	5	23
Total	70	30	100

Table 3 Age distribution and culture progress

	20-29	30-39	40-49	50-59	60-69	70-	Total
culture cases	4	13	13	33	27	10	100
primary culture	3	5	6	14	16	5	49
epithelial cell group	1	3		5	6	3	18

Table 4 Culture progress of culture methods

	culture cases	primary culture	epithelial cell group	secondarily culture	sensitivity test
cell culture	11	4	1		
tissue culture fixing	9	8	2		
tissue culture floating	80	37	15	15	13

Table 5 Culture progress and culture materials

	Gastrojejunostomy		Gastrectomy				Total	
	Serosa	Lymphnode	Early cancer	Borrmann				
				I	II	III		IV
Culture cases	19	5	15	7	21	22	11	100
Primary culture	11	1	6	5	9	13	4	49
Epithelial cell group	6			2	5	4	1	18
Secondarily culture	4			1	5	4	1	15
Sensitivity test	4			1	4	3	1	13

にその内の 13 例に制癌剤感受性試験が可能となつた (Table 4)。次に、培養材料別の培養成績をみると、非切除例材料、切除例材料共に初代培養成功例数では大差がないが、上皮性細胞群出現例数では非切除例材料を用いた 24 例中の 6 例 (25%)、切除例材料を用いた 76 例中の 12 例 (15.8%) で、試験切除片を用いたほうが優位であつた (Table 5)。これは培養前の処理が簡単であることと、癌細胞が浸潤あるいは転移した辺縁部から増殖活発な材料を採取出来たためと考える。それに対して、切除例からの材料は、癌組織の少ない早期胃癌より採取し、さらに粘膜部分を切り落すので癌組織片がかなり挫滅され、培養状態が不利となり、非上皮性細胞群が優性に発育して継代培養から感受性試験にいたる症例数が少なかつた。

2) 上皮性細胞群判定成績

初代培養細胞群に対し、上皮性細胞群判定を位相差顕微鏡の観察で判定した。培養初期に、結合組織の線維芽細胞が組織片より、とび出て増殖し、多角形や紡錘形、さらに突起が加わつて複雑な外形を呈してくる (Plate 2)。次に円柱上皮細胞が組織片より上皮性シートを作つておし出るような増殖形態をとり (Plate 3, 4)、扁平化して隣接細胞と比較的に接着し重なり合う。細胞内の構造は線路上皮に多くみられる分泌顆粒、分泌空胞をみると、核内には数個の核小体を持つている (Plate 5, 6)。しかし、個々の細胞は全く一定の所見を有せず重層している場合が多いので細胞レベルで分類することは出来ず、細胞集団で増殖してゆく状態から両者の判別は明らかであつた。培養症例 100 例中、上皮性細胞群が 18 例

に優性に発育した。そのうち、継代培養が出来たのは 15 例で全て組織片浮遊法によるものである。不成功の 3 例は発育の不充分であつた細胞培養法の 1 例と、fibrin 網内から細胞を取り出すことが出来なかつた fibrin 固定法の 2 例であつた。

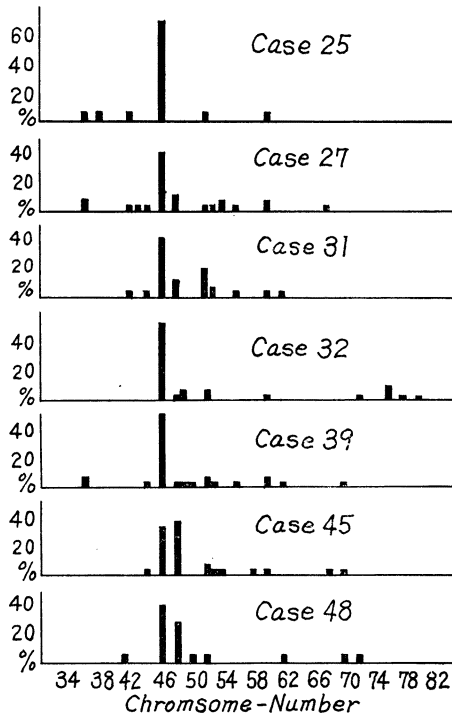
3) 腫瘍性判定成績

上皮性細胞群を継代培養 1 代目で腫瘍性判定した。全症例とも比較判定するのに十分な正常組織の上皮性細胞群を得ることが出来ず、また、継代後の分裂、増殖状態より腫瘍性を判定する目的で映画撮影も用いたが、この方法でも比較する対象がなく決定的な判定法ではなかつた。個々の細胞の染色による癌特性と染色体数異常より判定した。継代 1 代目の細胞群を cover slip 上で培養し、alcohol 固定したのちに染色した。染色後の状態は位相差顕微鏡所見とはかなり異なり、固定による細胞の萎縮から細胞間隙がはつきり分離する。Giemsa 染色、hematoxylin-eosin 染色で細胞同士の piled up, denced colony の状態、核の濃染、多数の核小体、異常分裂像などが判定の基準となり (Plate 7, 8)、glucogen 産生細胞群は PAS 染色 (Plate 9) で証明され、mucin 染色は 3 例に陽性であつた (Table 6)。次に染色体数測定も染色法と同様に、継代 1 代目の培養細胞を用いて測定した。染色体数算定出来たのは、継代培養症例 15 例のうち 7 例であり、各症例とも 4 枚以上の slide glass を作製し、20 細胞以上の染色体数を測定した。異常染色体数は各症例で 10~18% の範囲に認められ、高 2 倍体、3 倍体近辺の染色体数を示した (Table 7, Plate 10, 11)。各症例の測定細胞数が少ないので、染色体構成の

Table 6 Tumorigenicity and contact time of drug

Case	Age	Sex	Operation	Culture material	PAS	Mutin	Chromosome	Contact time
14	25	F	Gastrectomy	Mucosa				45 days
16	35	M	do.	do.				50
24	79	M	do.	do.				21
25	64	M	do.	do.	+	+	+	28
27	53	M	do.	do.		+	+	21
31	56	F	G-Jstomy	Serosa	+	+	+	21
32	59	M	do.	do.			+	14
33	61	F	do.	do.	+			48
37	57	M	do.	do.				60
38	69	M	Gastrectomy	Mucosa				60
39	56	M	do.	do.	+		+	50
45	31	F	do.	do.	+	+	+	50
48	75	M	G-Jstomy	Serosa	+	+	+	50

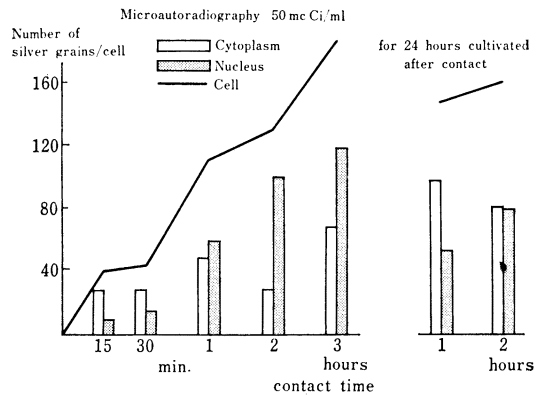
Table 7. Chromosome-number distribution



分析はせず、異数性のみで判定した。

染色法と染色体数測定から腫瘍性判定出来たのは、継代培養 15 症例のうち 13 例で、2 例を除外した。1 例は継代 1 代目の腫瘍性判定時に非上皮性細胞群が優性になって来たので除去した。他の 1 例は異常染色体数が 2% で、染色法でも基準に達しなかつた carcinoma

Table 8. Uptake of 5-F-U-T



simplex の症例である。

4) 小 括

初代培養に種々の培養法を試みたので、それぞれの方法について検討した。細胞培養法は材料の trypsin 処理に時間がかかるので、その間に感染が起りやすく、操作に手間がかかるわりに発育がおそくて成功例が少なく、継代培養から感受性試験に必要な細胞数を短時間に得ることが出来なかつた。次に、細胞より組織単位の培養法が感染に強く発育も早いので、組織片培養法を試みた。混合培養であるから上皮性細胞群を選択的に増殖させる必要がある。組織片培養法の組織片 fibrin 固定法では非上皮性細胞群が fibrin 膜外にとび出て発育し、上皮性細胞群はおおむね fibrin 膜内にとどまり、それ

Case 31		0	24	48	96	168	240	M
		hour						
	Control ×10 ⁴ cells/ml	7.75	10.13	10.44	14.31	16.88	12.19	
MMC	1 mcg/ml	7.56 59.1%	5.81 47.5%	4.81 56.8%	7.88 46.6%	7.63 53.4%	6.31 52.7%	
	0.1mcg/ml	7.56 51.5%	5.06 74.0%	7.50 68.4%	9.50 51.9%	8.50 54.9%	6.50 60.1%	
	0.01mcg/ml	6.69 63.0%	5.50 82.0%	7.38 93.7%	11.56 83.4%	12.13 97.6%	10.25 83.9%	
5-FU	5 mcg/ml	6.94 54.4%	4.92 78.4%	7.31 64.6%	8.25 97.1%	14.63 58.0%	6.31 70.5%	
	0.5mcg/ml	7.69 76.7%	7.69 58.1%	6.00 83.8%	11.88 53.5%	8.94 56.0%	6.75 65.6%	
	0.05mcg/ml	6.79 89.4%	7.94 72.6%	6.65 107.0%	13.44 73.0%	10.81 107.0%	11.44 89.8%	
Case 32	Control ×10 ⁴ cells/ml	5.3	5.0	6.4	8.5	9.0	6.7	
MMC	1 mcg/ml	1.5 30.0%	1.4 21.9%	1.63 19.2%	2.0 22.2%	0.9 13.4%	21.3%	
	0.1mcg/ml	3.6 72.0%	3.3 51.6%	2.36 27.8%	2.2 24.4%	2.1 31.3%	41.4%	
5-FU	5 mcg/ml	2.2 44.0%	1.35 21.1%	1.06 12.5%	1.6 17.8%	0.4 6.0%	20.3%	
	0.5mcg/ml	2.5 50.0%	3.7 57.8%	1.9 22.4%	2.8 31.1%	0.4 6.0%	33.5%	

Case 45		0	24	48	96	168	240	M
		hour						
	Control ×10 ⁴ cells/ml	7.1	10.5	13.8	19.1	20.9	21.5	
MMC	1 mcg/ml	5.9 108.6%	9.5 97.4%	11.2 81.7%	13.0 87.3%	15.2 94.3%	16.9 93.9%	
	0.1mcg/ml	5.6 128.2%	10.6 109.6%	12.6 91.1%	13.7 125.2%	20.6 89.8%	15.2 108.8%	
	0.01mcg/ml	6.2 120.6%	12.1 138.3%	16.6 91.5%	15.2 86.9%	15.8 96.3%	18.0 106.7%	
5-FU	5 mcg/ml	5.8 49.1%	4.3 26.9%	3.1 27.6%	4.4 37.3%	6.5 27.3%	4.9 33.6%	
	0.5mcg/ml	5.7 66.7%	5.6 50.7%	5.6 60.9%	9.3 49.0%	8.2 64.5%	11.1 58.4%	
	0.05mcg/ml	5.9 82.3%	7.2 66.1%	7.6 73.5%	11.7 91.9%	16.0 77.0%	13.8 78.2%	
Case 48	Control ×10 ⁴ cells/ml	9.5	12.4	16.9	22.6	24.8	15.0	
MMC	1 mcg/ml	10.8 41.2%	5.8 28.1%	5.4 35.8%	9.2 28.3%	8.0 56.3%	9.6 37.9%	
	0.1mcg/ml	7.7 90.3%	9.1 85.9%	11.8 93.1%	17.1 83.8%	16.9 80.4%	9.8 86.7%	
	0.01mcg/ml	7.7 113.0%	11.4 116.4%	16.0 118.1%	21.7 107.1%	21.6 100.0%	12.2 110.9%	
5-FU	5 mcg/ml	11.3 46.1%	6.8 22.9%	4.6 35.3%	9.5 35.2%	10.4 41.1%	7.4 36.2%	
	0.5mcg/ml	10.4 58.7%	8.0 40.9%	7.6 49.5%	12.3 52.5%	14.3 73.4%	12.1 55.0%	
	0.05mcg/ml	9.2 93.0%	11.8 76.2%	12.5 89.3%	19.6 66.0%	15.9 120.8%	17.6 90.1%	

以上の増殖が望めず、非上皮性細胞群増殖優性となり継代培養用の細胞を取り出すことが出来なかつた。症例 21 以後は組織片浮遊法を用いた。操作が簡単であり、組織片が新鮮で鋭利に切断されていれば増殖が良好であつた。また、腫瘍の中心部より採取し粘膜面の壊死組織を出来るかぎり除くことで感染を防止でき、培養成功率が上昇した。この方法を用いた中には、早期胃癌症例を多く含んでいるが、処理中に粘膜部分を除去するので、癌成分がなくなり非上皮性細胞群が優性となり、さらに継代培養しても上皮性細胞群は出現しなかつた。

上皮性細胞群は位相差顕微鏡による形態学所見で判定した。非上皮性細胞群の増殖が著明な症例や、発育に長期を要した上皮性細胞群は経過中に除外した。

腫瘍性は、1) 染色法 (Giemsa, hematoxylin-eosin, PAS, musin), 2) 染色体数測定で判定した。染色法では固定による変化で形態は位相差顕微鏡所見とかなり異なるが、細胞配列、核の状態、glucogen 蓄積、mucin 産生細胞の証明などにより腫瘍性を判定した。さらに、培養初期の染色体数異常は癌細胞の特徴とされており、特に胃癌細胞の染色体数は高 2 倍体から 3 倍体に分布す

るといわれる¹⁹⁾。症例 24 以後の継代培養成切例 15 例中、染色体数の測定が出来たのは 7 例であつた。測定細胞数が少ないので、形態学的分析はせずに異数性をみただけであるが、10~18% の異数性のみでは全てが腫瘍細胞と断定できない。しかし、混合培養ではこの範囲が限度と思われる。

5) 感受性試験成績

継代培養、および腫瘍性判定が出来た 13 例について、この研究の主目的である感受性を判定した。13 例のうち継代 1 代目で感受性試験が出来たのは 7 例で、他の 6 例は核酸量を同時に測定するために継代培養を追加した。接触薬剤は胃癌に最も使用されている MMC, 5-FU の 2 剤の単独静置接触法を用いた。接触濃度は臨床使用時の血清内濃度にもとづき、MMC, 5-FU とともに各 3 段階の低濃度とした^{20,21)}。接触時間は 5-FU-6-T による microautoradiography で検討した。100 個の細胞内取込みを算定し、1 個の細胞の平均を取つた。細胞内取込みは接触時間の長さに比例して増加し、特に、合成に関連した核内取込みは 1 時間で細胞質内と等しくなり、2 時間経過すると核内取込みが優位となつた (Table 8,

Table 10 Comparative method

1. MMC 1 mcg/ml 5-FU 5 mcg/ml
MMC: Maximum serum level of 10 mg intraarterial infusion.
5-FU: Average serum level of 250 mg intravenous.
2. MMC 0.1 mcg/ml 5-FU 5 mcg/ml
MMC: Maximum serum level of 4 mg intravenous.
3. MMC 0.1 mcg/ml 5-FU 0.5 mcg/ml
5-FU: Maximum serum level of 250 mg intravenous drip.
4. MMC 0.01 mcg/ml 5-FU 0.05 mcg/ml
MMC, 5-FU, Low serum level

Plate 12, 13, 14, 15)。また、1時間、2時間、3時間接触後、さらに24時間培養した細胞内取込みをみると、2時間接触細胞に5-FU-6-Tの核内取込みが持続し、3時間接触では細胞が死滅し、cytotoxicな作用がみられた。この成績より2時間接触が5-FUの細胞増殖抑制作用を判定するに適当と考えた。MMCも対比上の時間を接触時間とした。

細胞核数測定法は13例すべてに行なつた。症例14, 16では1時間接触であつたが、それ以後の症例は microautoradiographyの結果より2時間接触である。各症例の24~240時間にいたる細胞核数を算定して各濃度別に control と比較し、その抑制率を平均した。抑制平均値はほぼ薬剤濃度差別に段階的に高濃度になると抑制が高くなる。この濃度、接触時間では細胞の死滅はなかつた (Table 9)。感受性薬剤決定には5-FUとMMCの接触濃度3段階の間で、即ち、高濃度間、高濃度と中濃度間、中濃度間、および低濃度間の細胞抑制平均値を対比させ、両薬剤間の有意差検定に供した (Table 10)。有意差検定には下記計算式を用いた²²⁾。

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{\frac{\sum d_1^2 - \sum d_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right)}}$$

$$N = n_1 + n_2 - 2$$

M: 各濃度の10日間の細胞核数平均値

n: 測定回数

d: 偏差

N: 自由度

有意差は、有意水準1%の範囲で比較し、自由度のt分布より算出した値t=3.2よりも上記式のt値が高い時、M₁とM₂の間に有意差があるとした。4方法の濃度別対比で抑制平均値が高く有意差がある薬剤を細胞核数測定法の感受性薬剤と判定した。13例中7例に判定出来た (Table 11)。

核酸量測定は、6例に行なつた。継代2代目の細胞を2日間培養して増殖した細胞群に、2剤をそれぞれ2時間接触した後、時間毎にDNA, RNA量を測定した (Table 12)。MMCの作用機序は直接DNA合成を抑

Table 11 Test of significance in comparative methods

Case	Comparative method			
	1	2	3	4
14	5-FU t-5.2	5-FU 1.6	5-FU 5.2	MMC 0.8
16	5-FU t-0.7	MMC 0.1	5-FU 0.2	5-FU 4.4
24	5-FU t-6.6			
25	5-FU t-3.3			
27	5-FU t-0.7	5-FU 2.7		
31	MMC t-4.8	MMC 1.6	MMC 2.6	MMC 1.4
32	5-FU t-0.3	5-FU 1.5	5-FU 1.6	
33	5-FU t-0.5			
37	5-FU t-1.1			
38	5-FU t-0.6			
39	5-FU t-0.7			
45	5-FU t-21.4	5-FU 12.7	5-FU 18.3	5-FU 5.9
48	5-FU t-0.6	5-FU 12.1	5-FU 25.0	5-FU 4.9

□ significance (+)

制²³⁾、5-FUはRNA合成阻害と共に間接的な作用で thymidilateの合成抑制からDNA合成抑制作用があるとされ、両薬剤にDNA抑制作用があるから、DNA量を測定してcontrolとくらべ抑制率を求めた。薬剤判定は、接触直後、24時間後、さらに48時間後の抑制率を平均して比較し、6例中5例に判定が出来た (Table 13)。disk平板法は、症例16, 38, 45の3例に試みたが、HeLa細胞のように株化していないので寒天内では増殖せず、ガラス底面に接着発育した細胞群への薬剤透過による抑制を見るので明確な阻止門を作らず3例とも判定は不可能であつた。

IV. 感受性薬剤判定および臨床効果

感受性薬剤の判定には、細胞核数測定法と核酸量測定法の両者の成績を総合判定した。薬剤と接触した13例のうち感受性薬剤の判定が出来た症例は10例であつた (Table 14)。2方法による判定が一致しない場合があり、症例45では核酸量測定でMMCに対して感受性

Table 12 Growth inhibitory effect measured by tumor nucleotic acid

Case 33	DNA	RNA	Case 39	DNA	RNA
Just after contact			Just after contact		
Control	0.055	0.472	Control	0.015	0.021
MMC 1mcg/ml	0.046 83.6%	0.240 50.8%	MMC 1mcg/ml	0.013 86.7%	0.022 105.0%
5-FU 5mcg/ml	0.064 116.4%	0.197 41.7%	5-FU 5mcg/ml	0.008 53.3%	0.015 71.0%
24 hours after			24 hours after		
Control	0.046	0.390	Control	0.008	0.043
MMC	0.010 21.7%	0.082 21.0%	MMC	0.004 50.0%	0.016 37.2%
5-FU	0.017 37.0%	0.095 24.0%	5-FU	0.004 50.0%	0.016 37.2%
48 hours after			48 hours after		
Control	0.028	0.396	Control	0.031	0.025
MMC	0.004 14.3%	0.290 73.2%	MMC	0.035 112.9%	0.042 168.0%
5-FU	0.010 35.7%	0.270 68.2%	5-FU	0.022 71.0%	0.023 92.0%
Case 37	DNA	RNA	Case 45	DNA	RNA
Just after contact			Just after contact		
Control	0.060	0.067	Control	0.031	0.027
MMC 1mcg/ml	0.022 36.7%	0.048 71.6%	MMC 1mcg/ml	0.022 71.0%	0.020 74.1%
5-FU 5mcg/ml	0.022 36.7%	0.036 53.7%	5-FU 1mcg/ml	0.032 103.2%	0.022 81.5%
24 hours after			24 hours after		
Control	0.009	0.035	Control	0.326	0.174
MMC	0.003 33.3%	0.010 28.6%	MMC	0.310 95.1%	0.320 183.9%
5-FU	0.003 33.3%	0.011 31.4%	5-FU	0.322 98.8%	0.192 110.3%
Case 38	DNA	RNA	Case 48	DNA	RNA
Just after contact			Just after contact		
Control	0.012	0.028	Control	0.066	0.092
MMC 1mcg/ml	0.016 133.3%	0.017 60.7%	MMC 1mcg/ml	0.042 63.6%	0.047 51.1%
5-FU 5mcg/ml	0.018 150.0%	0.018 64.3%	5-FU 5mcg/ml	0.021 31.8%	0.034 37.0%
24 hours after			24 hours after		
Control	0.013	0.044	Control	0.123	0.134
MMC	0.002 15.4%	0.011 25.0%	MMC	0.046 37.4%	0.085 55.2%
5-FU	0.003 23.1%	0.015 34.1%	5-FU	0.043 35.0%	0.076 56.7%
			48 hours after		
			Control	0.122	0.144
			MMC	0.053 43.4%	0.065 45.1%
			5-FU	0.052 42.6%	0.076 52.8%

Table 13 Decision by inhibitory effect of DNA

Case	Contact drugs	Mean of inhibitory rate	Decision
33	MMC	39.9%	MMC
	5-FU	63.0	
37	MMC	35.0	MMC
	5-FU	35.0	
38	MMC	74.7	MMC
	5-FU	86.6	
39	MMC	83.2	5-FU
	5-FU	58.1	
45	MMC	83.1	MMC
	5-FU	101.0	
48	MMC	48.1	5-FU
	5-FU	36.5	

Table 14 Fitting drugs in the test

Case	Tumor cell number measurement	Nucleic acid measurement	decision
14	5-FU		5-FU
16	5-FU		5-FU
24	5-FU		5-FU
25	5-FU		5-FU
27	non-signif.		non-signif.
31	MMC		MMC
32	non-signif.		non-signif.
33	non-signif.	MMC	MMC
37	non-signif.	non-signif.	non-signif.
38	non-signif.	MMC	MMC
39	non-signif.	5-FU	5-FU
45	5-FU	MMC	5-FU
48	5-FU	5-FU	5-FU

Table 15 Clinical effects

Case	Sensitivity decision	Clinical use	Effect
14	5 -FF	MMC	no response
16	5 -FU	not yet	
23	5 -FU	not yet	
25	5 -FU	not yet	
27	non-signif.	5 -FU	no response
31	MMC	MMC	tumor reduction
32	non-signif.	Combination	tumor reduction
33	MMC	MMC	tumor reduction
37	non-signif.	5 -FU	effective
38	MMC	not yet	
39	5 -FU	5 -FU	no response
45	5 -FU	5 -FU	do.
48	5 -FU	5 -FU	do.

を示し、細胞核数測定では各濃度段階で 5-FU に対してかなりの有意差をもつて感受性を示したので、この場合は後者の結果より 5-FU 感受性と判定した。感受性薬剤が使用された症例は 5 例であった (Table 15)。他の 5 例のうち 1 例は他の薬剤が使用され、4 例は切除例で未使用である。感受性薬剤使用例 5 例中、切除例は 2 例で、非切除例は 3 例であった。さらに、有効症例は 2 例であった。また、総合判定で感受性薬剤の決定が出来なかつた症例 32, 37 は、使用薬剤に反応し腫瘍の縮小などの臨床効果を認め、末期にもかかわらず延命効果があった。感受性薬剤使用例で臨床的に有効とされた症例 31, 33 の 2 例について概要を述べる。

症例 31 は 56 才、女性、食欲不振、上腹部痛、嘔吐あり、上腹部に鶏卵大の腫瘍を触れた。胃 X 線および内視鏡検査の結果、進行胃癌の診断のもとに、開腹術施行した。腫瘍は前庭部小彎側を主体とし所属リンパ節の腫脹、膵臓および肝臓への転移を認め胃腸吻合術を行なつた (Fig. 2)。培養には漿膜浸潤部より材料を採取した。術後 1 カ月目に判定が出来 (Table 16), MMC 感受性の判定にしたがつて 4 mg 静注開始し 10 回計 40 mg 使用し 2 カ月目ごろより腫瘍の縮小と腹水の消失があり、約 2 カ月間持続した。その後腫瘍の再増大があつたが全身症状は約 6 カ月間の長期にわたり軽快した。

症例 33 は 61 才、女性、上腹部痛があり、胃 X 線および内視鏡検査で進行胃癌と診断し、腹部所見より肝転移が疑われ、吻合術の目的で開腹した。腫瘍は胃前庭部から発生し、肝門部へ浸潤するとともに肝転移があつた。胃空腸吻合術を行ない、培養材料は胃漿膜面の癌浸潤部より採取した。感受性判定が遅れたので 5-FU 500 mg を 5 日間使用したが副作用のため一時中止して経過観察していた。臨床的には症状の変化がなく過ぎたが、約 2 カ月後に核酸量測定により MMC 感受性の判定が出たので、週 2 回 4 mg 静注を開始した。MMC 使用后腫瘍の縮小と全身状態の改善がみられ、約 2 カ月間の症状軽快が持続した (Fig. 3)。

次に無効例を 1 例述べると、症例 45 は、胃切除が行なわれ肉眼的および病理学的に治療手術で、adenocarcinoma tubulare, Bormann III 型であつた。感受性試験で 5-FU と判定して、250 mg 隔日 10 回使用した。しかし肝機能障害が出たので中止した。9 カ月目で下腹部に腫瘍をふれ卵巣転移と診断され、腹水貯留も加わり 5-FU の使用を開始したが、臨床的に効果なく速かに増悪し使用後 1 カ月で癌性腹膜炎により死亡した。

なお、感受性薬剤が未だ使用されていない 4 例

Fig. 2 Case 31 56 Female Gastrojejunostomy

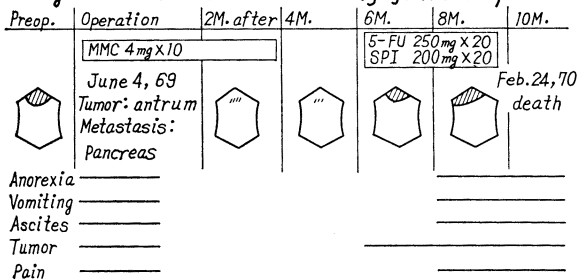


Fig. 3 Case 33 61 Female Gastrojejunostomy

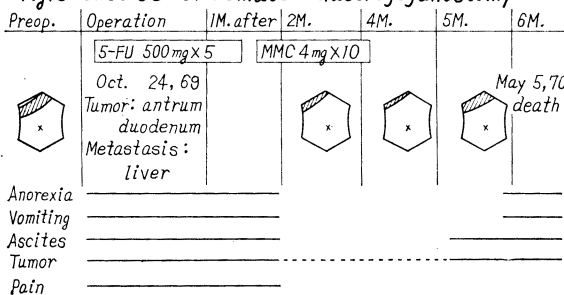
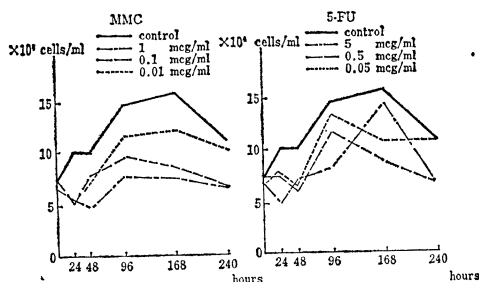


Table 16 Case 31 Growth-inhibitory effect by tumor cell-number in contact for 2 hours



は、いずれも切除例である。

V. 考 察

癌細胞に対する制癌剤感受性試験を *in vitro* で判定する方法として、1) 組織切片を直接使用する方法は、癌組織切片に制癌剤を接触させて、組織学的変化を検討する方法にはじまり²⁴⁾、BLACK の乳癌組織の感受性判定²⁵⁾、西岡による INK 法²⁶⁾、近藤らの SDI 法²⁷⁾、autoradiography を利用して核酸合成阻害で判定する方法²⁸⁻³⁰⁾、などが報告されている。実験操作は簡略化されつつあり、測定が定量的で判定が明確となつてきた。しかし、これらの接触材料は組織切片として切断された直後に接触され、さらに短時間の核酸量の変動を測定するので、薬剤の組織への浸透状態、腫瘍細胞への取りこみなどは一定の条件を作りえないばかりでなく、細切すれば組織の破壊をきたし、核内の thymidine 変動、ひいては DNA の変動が起り、測定値に影響する。2) 組織切片を接触後培養する器管培養法は、YARNELL⁹⁾ らの試験切除切片の器管培養による感受性試験、DICKSON の chamber 法³¹⁾ で乳癌組織の器管培養による癌細胞の反応を観察した報告³²⁾がある。しかし、成績に一貫性がなく、組織切片が等量であつても培養した時に等しい数の生細胞が含まれているとは限らないという欠点がある。3) 組織培養法は癌細胞を培養液中で増殖させ、癌細胞の制癌剤に対する反応を直接検索するので、細胞レベルで観察する利点がある。BIESEL³³⁾ の初代組織片培養による感受性判定、EAGLE、FOLEY³⁴⁾ が腫瘍組織に対する制癌剤の毒性を組織培養で比較して以来、WRIGHT⁹⁾、ANBROSE³⁵⁾、HURLEY³⁶⁾、最近では DENDY³⁷⁾ の初代培養による感受性試験の報告がある。

それぞれの方法には利点、欠点があるので、本実験では基礎実験として、組織培養法で初代培養より継代培養をして十分な細胞を得たのち腫瘍性判定をした。さらに同一条件下で制癌剤と接触させ抑制効果より感受性薬剤を決定することを目標とした。

組織培養による腫瘍細胞の薬剤に対する感受性の測定には主として細胞の増殖を指標とした次の方法がある。接触細胞数を算定して増殖度を測定する形態学的方法³⁸⁾、細胞の発育阻止円の測定^{15,39)}、蛋白質量の測定⁴⁰⁾、直接核酸合成阻害を生化学的⁴¹⁾、または autoradiography で測定する方法などがあり、最近では染色体の変化により判定する報告⁴²⁾もある。実験では、1測定法で判定することは不十分であると考え、細胞核数測定、核酸量測定、阻止円による測定の方法で判定することとした。しかし、阻止円による判定法は寒天上における MMC、5-FU の拡散度の相異が阻止円の大きさを左右し、濃度差で阻止円が得られず、判定不能な数例を経験

した。多量の細胞を使用するので、判定不能例が多い disk 平板法をやめ、細胞核数測定を主体として核酸量測定を併用した。

細胞核数測定では増殖継代した細胞を浮遊状態で薬剤と接触後、長期間にわたる増殖抑制を観察した。浮遊細胞を用いた理由は薬剤の毒性作用を受けて死滅した細胞は培養ビン底への接着能がなくなるので、核数を測定する場合、培養ビン附着細胞の増殖を算定すればよく細胞増殖抑制作用を長期間測定出来る利点がある。培養ビン底で発育している細胞を用いて接触すると死滅細胞の混在があり核数算定には不向きである。

核酸量測定は、継代培養後2日目の培養ビン接着細胞群に、薬剤を接触させて増殖抑制を測定した。前者と接触方法が異なるが、これは核酸量測定には多量の細胞数を必要とすることと、最も増殖がさかんな時期の細胞をどの程度抑制することが出来るかを知る目的もある。しかし、高濃度の測定は単層培養でも死滅細胞の混在で測定上誤差が生じる。

接触薬剤は MMC と 5-FU を用いた。MMC は制癌作用として quinone, urethane, ethylenimine の3つの構造が組合されており、alkylating agent に似かよつた抗生物質である^{43,44)}。5-FU は uracil の isostere である antipyrinidine で antimetabolic action を示す。一般に細胞発育抑制作用は核酸合成抑制から蛋白合成が阻害される結果であり、この2剤とも DNA の合成を抑制する作用を示すが、作用機序は異なっている。即ち、MMC は DNA 合成のみ特異的に阻害するもので、細胞内で還元されて活性分質となり、細胞核、特に DNA と結合する。5-FU は uridine monophosphate から RNA に取込まれ RNA 合成阻害する経路と deoxyuridine monophosphate から methyl 化反応で thymidilate されるところが抑制を受け、基質過剰となり DNA 合成が阻害される経路とがあり、制癌作用としては後者が考えられる。

接触時間について検討してみると、一定時間接触したのち再び算定して培養ビンに分注するのであるが、この操作による細胞の損失は接触時間の長短によつて異なり、1時間で約 16%、2時間で約 30% と時間に比例して増加する。また、1時間以内では操作が不正確になり、増殖も同濃度間でばらつきがあつた。2時間では操作に余裕があり、30% 程度の細胞損失では算定上影響がないが、3時間になると細胞損失が 50% 近くなり、control でも算定が困難となつてきて、3時間の接触は不適当と考えた。一方、microautoradiography による検討でも、2時間以上接触した後の 5-FU-6-T の核内取込みは細胞平均でみると差がなく、接触後 24 時間経過して

も大差がないことより、2時間接触がすべての点で有利と考え、症例 24 以後は2時間とした。

感受性薬剤の決定に正常組織と癌組織を培養し、制癌剤と接触して比較すれば良いと考えたが、FOLEY, EAGLE の報告⁴⁵⁾では、正常細胞と癌由来細胞の間には一定の感受性差異を発見出来ず、継代培養しても癌細胞に特異的に作用する薬剤を見出せなかつたと述べている。これにより同じ細胞で薬剤間の増殖差異を測定すれば薬剤決定が出来る。細胞核数測定は24時間から240時間までの各濃度の細胞増殖を算定し、薬剤間の抑制率を比較して感受性薬剤を決定したが対比方法は臨床使用時の血中濃度に従った。核酸量測定は発育抑制効果の判定法として継代後2日間培養した細胞群に2時間接触させ、48時間までのDNA, RNA量を測定、DNA産生を抑制する薬剤を感受性剤とした。5-FUがDNA合成に影響するまでの時間についてはすでに報告されているが⁴⁶⁾、5-FU-6-Tによるmicroautoradiographyの結果、DNA合成部位である核内取込みは、接触後2時間で細胞質内と等しくなる事実より推測すると、これより以後はDNA合成阻害があるものと考え、接触直後と24時間、48時間の測定値を平均した。

実験症例100例中感受性薬剤の決定出来たのは10例で、そのうち5例が使用されたが2例に明らかな効果があつた。しかし、個々の症例の年齢、性、培養材料、病理組織所見、手術時の腫瘍の浸潤程度などの諸因子を検討しても、臨床効果と特定な関係を見出すことは出来なかつた。

培養胃癌細胞を用いた *in vitro* の制癌剤感受性試験と臨床効果が必ずしも一致しなかつた原因は、担癌宿主を全く除外した実験のためで、これには大別して次の3つの事項が考えられる。第1に、臨床的に得られる制癌剤の組織内濃度とその持続時間の問題で、実験では臨床使用による濃度範囲で2時間接触したが、それぞれの臨床症例ではこの実験条件と一致するとは考えられない。また、使用量や注入速度なども密接に関連することである。第2の事項として、制癌剤が生体内でうける代謝に基づく不活性化の問題で、MMCは肝、腎、脳、心などで不活性化されるといわれ、また、5-FUも肝で最も強く代謝を受け dihydrofluoruracil から最終的には urea, CO₂ などになるといわれている。しかし、この両薬剤はともに腫瘍組織によつては不活性化されないとされており⁴⁶⁾、培養腫瘍細胞と制癌剤との関連だけを考えれば不活性化はほとんどないといえよう。第3として、担癌宿主のもっている抗腫瘍性で、これはリンパ球を主体とする細胞性免疫であるといわれている。したがって *in vitro* の実験ではこの宿主の抗腫瘍性は全く関与してい

ないので、この点も重要な原因と考える。

VI. 結 語

胃癌組織培養より得た癌細胞に制癌剤感受性試験を行ない、細胞核数測定と核酸量測定より細胞増殖率を指標にして感受性薬剤を決定した後に臨床面に使用し、それぞれ、次のような結果を得た。

1) 初代培養症例は100例で18例に上皮性細胞群の出現をみた。この上皮性細胞群を増殖継代培養し、腫瘍性の判定出来たのは15例で、さらに、これ等を継代培養し接触試験が出来るまでに細胞数が確保出来たのは13例であつた。

2) 制癌剤感受性は細胞核数測定と核酸量測定法にて決定した。細胞核数測定は13例に測定可能であつたが、核酸量測定は十分な細胞数が採取出来た6例に行なつた。

3) 制癌剤の接触時間は、5-FU-6-Tを用いた microautoradiography で検討し、2時間にて細胞内の銀粒子数が核内の数と等しくなり、それ以後は有意な差がないので接触時間を2時間と決定した。

4) 制癌剤はMMCと5-FUを使用し、接触濃度は臨床使用時の血中濃度の範囲とした。細胞核数の有意差は8例に認められた。一方、DNA量測定は4例が接触後24時間、2例がさらに48時間までを測定し合成阻害の強いほうを感受性薬剤とし、判定出来たのは5例であつた。

5) 最終的に細胞核数測定法と核酸量測定法の判定を合せ感受性薬剤決定出来たのは、13例中10例であつた。

6) 感受性の決定した10例中切除症例は7例で、非切除例は3例で、実験成績に基づいて制癌剤を臨床的に使用したのは5例であつた。この5例中腫瘍の縮小など臨床効果の認められたのは2例である。5例の未使用例はいずれも切除症例で、現在生存中である。

稿を終えるに臨み、御懇切なる御指導と、御校閲を賜つた、恩師 石山俊次教授に深甚なる感謝の意を捧げます。また、直接御教示いただいた坂部孝助教授に深謝するとともに、御協力をいただいた山形省吾講師ならびに癌研究班各位に感謝致します。

文 献

- 1) HUTCHINSON, D. J.: Cross resistance and collateral sensitivity studies in cancer chemotherapy. *Advances in Cancer Research* Vol. 7: 235~350, 1963
- 2) 黒川利雄, 古江 尚: 癌化学療法の実況。医学のあゆみ 68(3): 97~101, 1969
- 3) 田口鉄男: 抗癌剤。総合臨床 20(7): 1331~1341, 1971

- 4) 五味淵昭夫：制癌剤の感受性試験について。日本臨床 23(4)：114~120, 1965
- 5) FRANCES E. KNOCK: Sensitivity tests for cancer chemotherapy. Arch. Surg. 91(3) : 376~385, 1965
- 6) RÖLLER, M. R., OWEN, S. P., HEIDELBERGER, C. : Studies on the organ culture of human tumors. Cancer Res. 26(1) : 626~637, 1966
- 7) 大西峰雄：Organ culture を応用した制癌剤感受性試験に関する基礎的研究。大阪大学医学雑誌 22(5~6) : 277~284, 1970
- 8) YARNELL, M., AMBROSE, E. J., SHEPLEY, K., TCHAO, R. : Drug assays on organ cultures of biopsies from human tumors. Brit. Med. J. 2 : 490~491, 1964
- 9) WRIGHT, J. C., COBB, J. P., GUMPORT, S. L., SAFADI, D., WALKER, D. G. : Further investigation of the relation between the clinical and tissue cultures response to chemotherapeutic agents on human cancer. Cancer 15 : 284~293, 1962
- 10) MCLIMANS, W. F., DAVIS, E. V., GLOVER, F. L., PAKE, G. W. : The submerged culture of mammalian cells : The spinner culture. J. Immunol. 79 : 428~433, 1957
- 11) 武内忠男：組織化学からみた腫瘍代謝の性状変化とその特徴について。癌の臨床 12(7) : 421~427, 1966
- 12) TAKA AKI ISHIHARA, YASUMOTO KIKUCHI, AVERY A. SANDBERG : Chromosomes of twenty cancer effusions : Correlaton of karyotypic, clinical, and pathologic aspects. J. Nat. Cancer Inst. 30 : 1303~1323, 1963
- 13) SAJIRO MAKINO, MASAO SASAKI, TSUTOMU FUKUSHIMA : Preliminary notes on the chromosomes of human chorionic lesions. Proc. Jap. Acad. 39 : 54~58, 1963
- 14) PUCH, T. T., MARCUS, P. I., CIECIURA, S. : Clonal Growth of mammalian cells *in vitro*. J. Exptl. Med. 103 : 273~283, 1956
- 15) SIMINOFF, P., HURSKY, V. S. : Determination of mammalian cell (strain HeLa) inhibition by an agar diffusion technic. I. Quantitative assay of methods. Cancer Res. 20 : 615~617, 1960
- 16) 山本 正, 古明地隆江, 西岡久寿弥, 竹内富雄, 新田和男：抗癌性検定としての細胞寒天平板法 (CAP 法) とその作用機作解明への応用。Gann 47 : 424~427, 1956
- 17) 三浦義彰, 田中茂男, 須永 清：核酸実験法, 核酸の定量的検出法, 蛋白質核酸編集部編, 共立出版株式会社, 東京
- 18) 加藤四郎：ウイルス学, オートラジオグラフィ, 東 昇, 石田名香雄編集, 朝倉書店, 1964
- 19) SAJIRO MAKINO, MASAO SASAKI, AKIRA TONOMURA : Cytological studies of tumors. XL. Chromosome studies in fifty two human tumors. J. Nat. Cancer Inst. 32 : 741~763, 1964
- 20) 藤田 浩：Bioassay 法による抗癌剤の体内分布排泄, 不活性化の特性について。総合臨床 20(7) : 1350~1359, 1971
- 21) 石山俊次, 坂部 孝, 潮沙都也, 山形省吾, 他：5-Fluorouracil とその制癌効果。癌の臨床 13(3) : 139~150, 1967
- 22) 水野哲夫：統計の基礎と実際。光生館, 東京, 昭和 45 年
- 23) S. SHIBA, A. TERAWAKI, T. TAGUCHI, J. KAWAMATA : Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *E. coli* by mitomycin C. Nature 183 : 1056, 1959
- 24) COHEN, A. L., BORSOOK, H., DUBNOFF, J. W. : The effect of a *Sporosartina ureae* preparation on tumor cells *in vitro*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 66 : 440~444, 1947
- 25) BLACK, M. M., SPEER, F. D. : Effects of cancer chemotherapeutic agents on dehydro genase activity of human cancer tissue *in vitro*. Am. J. Clin. Path. 23 : 218~227, 1953
- 26) 西岡久寿弥, 吉田武彦, 山本 正, 竹内富雄, 宮沢政栄, 西川正夫, 他 9 名：人の悪性腫瘍の制癌剤ウイルス及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 : 1937~1948, 1957
- 27) 近藤達平：制癌剤の適応, 感受性試験。19 : 2304~2311, 1964
- 28) WOLBERG, W. H., BROWN, R. R. : Autoradiographic studies of *in vitro* incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. Cancer Res. 22 : 1113~1119, 1962
- 29) WOLBERG, W. H. : The effect of 5-Fluorouracil on DNA-thymidine synthesis in human tumors. Cancer Res. 29 : 2137~2144, 1969
- 30) 東 弘, 伊藤英太郎, 里見 隆, 大西峰雄, 豊川文雄, 有沢永二：核酸の生合成に対する抑制効果を指標とした制癌剤感受性試験。最新医学 24 : 1778~1780, 1969
- 31) TROWELL, O. A. : The culture of mature organs in a synthetic medium. Exptl. Cell Res. 16 : 118, 1966
- 32) DICKSON, J. A. : Tissue-culture approach to the treatment of cancer. Brit. Med. J. 1 : 817~823, 1966
- 33) BIESELE, J. J. : Assay of carcinolytic and carcinostatic agents. Ann. N. Y. Acad. Sci. 58 : 1129~1145, 1954
- 34) EAGLE, H., FOLEY, G. E. : The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. Am. J. Med. 21 : 739~749, 1956
- 35) AMBROSE, E. J., ANDREWS, R. D., EASTY, D. M., FIELD, E. O., WYLIE, J. A. H. : Drug assays on cultures of human tumour biopsies. Lancet 1 : 24, 1962
- 36) HURLEY, J. D., YONNT, L. J. : Selection of anticancer drug for palliation using tissue cul-

- ture sensitivity studies. *Am. J. Surg.* 109 : 39-42, 1965
- 37) DENDY, P. P., GABRIELLE BOZMANN, WHEELER, T. K.: *In-vitro* screening test for human malignant tumours before chemotherapy. *Lancet* II : 68~72, 1970
- 38) YUKIAKI KURODA, JUNICHI FURUYAMA: Physiological and biochemical studies of effects of mitomycin C on strain HeLa cells in cell culture. *Cancer Res.* 23 : 682~687, 1963
- 39) S. YAMAZAKI, K. NITTA, T. HIKIJI, M. NOGI, T. TAKEUCHI, T. YAMAMOTO, H. UMEZAWA : Cylinder plate method of testing the anticell effect. Studies on anti-tumor substances produced by Actinomycetes. XII. *J. Antibiotics, Ser. A* 4 : 135~140, 1956
- 40) OYAMA, V. I., EAGLE, H.: Measurement of cell growth in tissue culture with a Phenol reagent (Folin-Ciocaltean). *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 91 : 305~307, 1956
- 41) MAKOTO HORI, ETSUKO ITO, TOMIO TAKEUCHI, HAMA O UMEZAWA : Inhibitory effects of antitumor substances on growth and glycolysis of Yoshida rat sarcoma cells. *J. Antibiotics* 16 : 1~6, 1963
- 42) 三戸康郎, 木村範孝: 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 : 89, 1966
- 43) KAZUO NITTA : Studies on the effects of actinomycetes products on the culture of human carcinoma cells (Strain HeLa) (I) The effect of known antibiotics having no or slight tumor inhibitory activity on HeLa cells. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 10(5) : 277~286, 1957
- 44) LYER, V. N., SZYBALOKI, W.: A molecular mechanism of mitomycin C action linking of complementary DNA stands. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 50 : 355, 1963
- 45) FOLEY, G. E., EAGLE, H.: The cytotoxicity of antitumor agents for normal human and animal cell in first tissue culture passage. *Cancer Res.* 18 : 1012~1016, 1958
- 46) 原 弘, 伊藤英太郎, 森 武貞, 野口貞夫, 高井新一郎, 有沢永二, 中林 晟: 制癌剤感受性テストの理論と実際。総合臨床 20(7) : 1360~1367, 1971
- 47) HEIDELBERGER, C.: *Chemotherapy of cancer.* Edited by P. A. PLATTNER. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 1964, 88~98

ANTI-TUMOR SENSITIVITY TEST OF CANCER CELLS OF THE STOMACH IN TISSUE CULTURE

MASASHI SHIOSAKA

The Third Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

(Director : Prof. SHUNJI ISHIYAMA)

Epithelial cell groups, which were growing in primary culture of stomach cancer tissue, were secondarily cultivated, then tumorigenicity was determined by means of morphological examination and chromosome distribution. Thus secondarily cultured tumor cells were contacted with mitomycin C and 5-Fluorouracil in concentrations ranged within serum levels of these drugs in clinical use, and anti-tumor effect of drugs was tested by cell nuclei number and amount of DNA.

As results of this study, in 13 among 100 cases of primary cultures the drug contact test was successfully performed, and drug sensitivity could be determined in 10 cases.

In clinical trial, anti-tumor chemotherapy was carried out in 5 cases and 2 of them showed remarkable clinical responses, and remaining 5 were not yet treated, because of radically resected cases.