

## 培養細胞株 KU-1 に対する各種制癌剤の効果 (1)

## Cytosine arabinoside の作用について

田 崎 寛

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室

吉 田 叔 子

特別研究員

(昭和 51 年 4 月 23 日受付)

## 1. 緒 言

膀胱移行上皮癌由来の KU-1 細胞株を使用して Cytosine arabinoside の増殖抑制効果を Growth curve と微速度映画撮影による観察により検討し併せて他の制癌剤 Thio Tapa, Mitomycin C, 5 FU の作用と比較したので報告する。

## 2. 研究材料および方法

膀胱移行上皮癌由来の KU-1 細胞は 1966 年 12 月に初代培養を行なった grade III の手術による摘出組織を培養したもので、8 年半を経過してなお Original の性

Fig.1 KU-1 cells in monolayer culture, Polygonal cells are arranged showing pavement-like structures with preimorphism and atypysm.

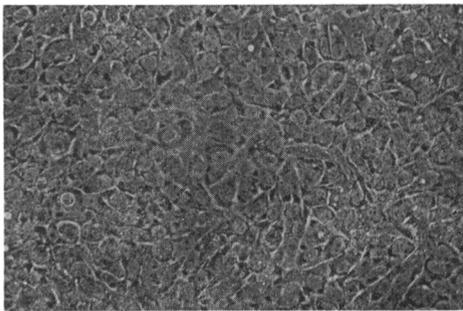
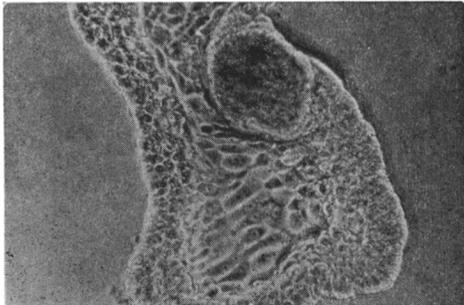


Fig.2 KU-1 cells 24 hours after passage demonstrate two different types of cells such as proliferating basal cells and resting polygonal cells.

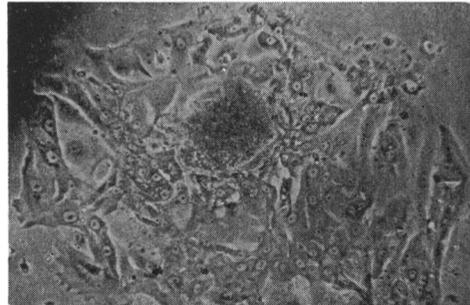


質を維持したまま順調な発育を続けている細胞株である。

位相差顕微鏡によって観察すると KU-1 細胞は、Fig. 1 のとおり多角形の石垣状配列を示しかかなりの大小不同異形成を示し、細胞内には多数の顆粒を認める。核は大型楕円形、核小体が著明で上皮性細胞の持つ特徴をそなえている。継代培養を行なった時の細胞の発育態度をみると、Fig. 2 に示すとおり細胞塊を中心に out growth は基底層の細胞に類似した細胞の増殖と小型で resting phase と思われる細胞の 2 種類が認められるが、時間の経過とともに Fig. 3 に示すように両者が移行して区別が明らかでなくなり、個々の細胞は三角形ないし多角形、大型化して cell sheet を形成する。

このような性格は正常の移行上皮の性格をよく模倣しそれを継承しているものようであり、これを模式的に表現すると Fig. 4 のような発育の regulation が行なわれていると考えられる<sup>1)</sup>。すなわち basal cell においては resting phase を経て dividing phase に至る cycle のなかで細胞の増殖が行なわれているが、いっぽうではしだいに分化の方向に向かっての形態学的な変化が認められる。しかし大型多角形化するこの形態の変化は feedback 機構によって control されていると考えられ、この control 外になった細胞は剥離し去ってしまう。

Fig.3 KU-1 cells 36 hours after passage alter the appearance being mixed the two cellular types.



各種の制癌剤の作用機序が KU-1 の growth regulation model のどこに作用するかはまだ完全に明らかにはされていない。

Cytosine arabinoside の 1.0, 10.0, 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で継代時に培養液に添加し、細胞の増殖抑制効果を検討した。

(1) 培養細胞の発育曲線 (growth curve) 抑制の検討

KU-1 に対して HeLa 細胞を control として使用し、Thio Teka の細胞増殖抑制をもって比較してみた。

そのうえで KU-1 に対し Thio Teka と cytosine arabinoside による抑制効果を比較検討した。

(2) 微速度映画撮影による観察

1 秒間 1 コマの自動露出による顕微鏡位相差写真装置 (Nikon MDS) によりまず Thio Teka と比較検討し、そのうえで cytosine arabinoside 単独による抑制, Mitomycin C, 5FU との併用による効果を検討した。

Fig.4 KU-1 growth regulation model showing proliferation and differentiation under control of feedback mechanism.

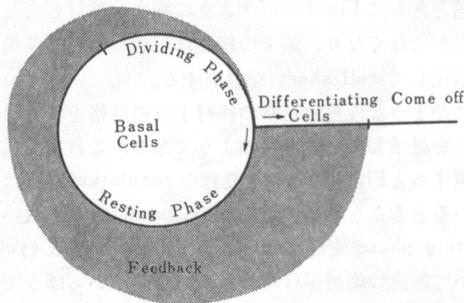
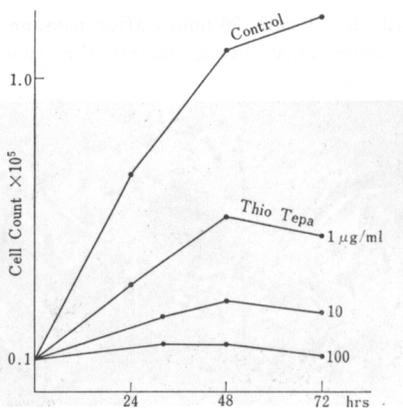


Fig.5 Cytostatic effects of Thio Teka on HeLa growth curve at various doses. Initial cell count  $0.1 \times 10^5$



3. 研究結果

(1) Cytosine arabinoside の KU-1 細胞株発育曲線に対する影響

まず Thio Teka を使用して HeLa 細胞に対する発育抑制を検討すると, Fig.5 のとおり Thio Teka の 1  $\mu\text{g/ml}$  で HeLa 細胞は 48 時間まではかなりの増殖を示すが, その後増殖は 72 時間までの間に下降する。10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では発育抑制が認められる。100  $\mu\text{g/ml}$  ではほとんど増殖は認められない。同じ濃度で KU-1 で行なってみると control の曲線は, Fig. 6 に示すとおり明らかに低く, 増殖が極めて slow であることが判明した。しかし slow growing な tumor に対する Thio Teka の作用は比較的には抵抗性であるが, 濃度の増加とともに明らかな抑制を示した。

この発育曲線は KU-1 を  $0.2 \times 10^5$  にした場合でも同様の傾向を示した (Fig.7)。

いっぽう KU-1 に cytosine arabinoside を加えてみ

Fig.6 Cytostatic effects of Thio Teka on KU-1 growth curve at various doses. Initial cell count  $0.1 \times 10^5$

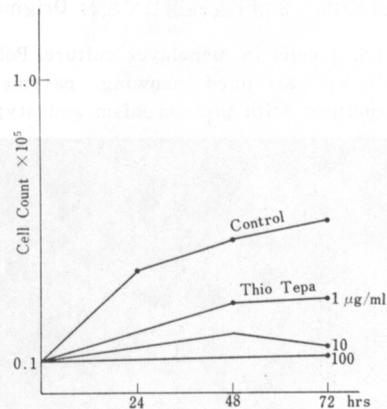


Fig.7 Cytostatic effects of Thio Teka on KU-1 growth curve at various doses. Initial cell count  $0.2 \times 10^5$

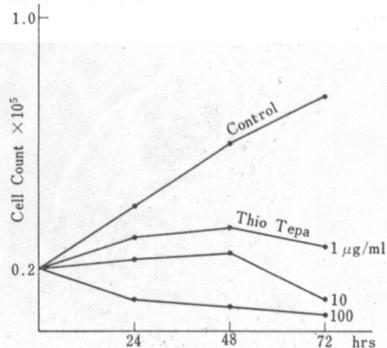
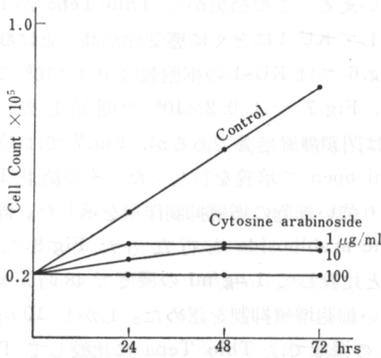


Fig.8 Cytostatic effects of cytosine arabinoside on KU-1 growth curve at various dosis. Initial cell count  $0.2 \times 10^5$



ると同じく  $0.2 \times 10^5$  の数で  $1 \mu\text{g/ml}$  で著明な抑制を示すが、これが  $10 \mu\text{g/ml}$  のとき Fig.8 のとおり極めて類似したカーブを描く。もちろん  $100 \mu\text{g/ml}$  では細胞の増殖は全くみられない。しかし Thio Teka の  $100 \mu\text{g/ml}$  では、24 時間から元の細胞数を下廻る (cytotoxic) のに比較すれば cytosine arabinoside の作用は終始細胞増殖の抑制 (cytostatic) にとどまった。

(2) Cytosine arabinoside の KU-1 細胞株に対する増殖抑制効果の微速度映画撮影による観察  
a. 対照

細胞増殖の抑制効果を比較するために Thio Teka の結果を対照として示す。Fig.9 の左端は KU-1 細胞の継代後 48 時間経過したもので、多角形の細胞が石垣状に配列して増殖している。これに Thio Teka  $1.0 \mu\text{g/ml}$  を添加し、48 時間経過した時の微速度映画撮影は中央の列に示した。すなわち石垣状の配列を示す cell sheet は全く消失し、コロニーは極めて縮小し少数の細胞塊と化している (cytotoxic)。Fig.9 の右の列はその後 14 日

Fig.9 Timelapse cinematographs of KU-1 cells following exposure to Thio Teka.  $1.0 \mu\text{g/ml}$  Cell sheet shrinks after 48 hours but recovery is shown in 14 days.

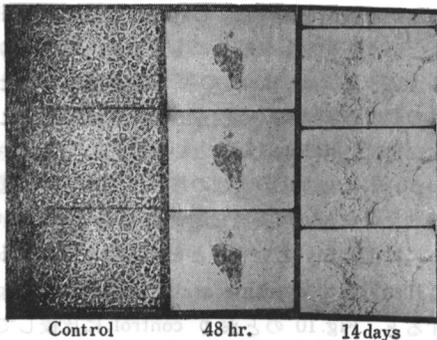
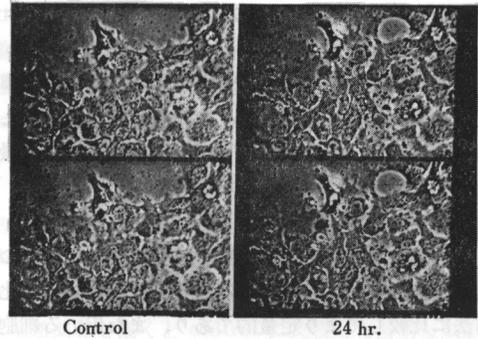


Fig.10 Timelapse cinematographs of KU-1 cells following exposure to cytosine arabinoside  $1.0 \mu\text{g/ml}$ . Cytostatic effects are seen after 24 hours. Cells come off totally thereafter.

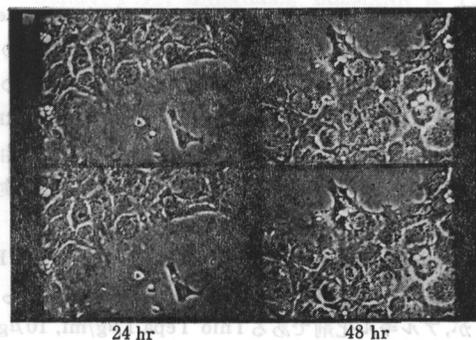


間培養を継続し、その間3回の Thio Teka を含まない control の培養液の交換を行なって 14 日間経過したものであるが、同じ視野を観察すると再び細胞は増殖を始め cell sheet を形成しつつあることが判明した。

b. Cytosine arabinoside の効果

Cytosine arabinoside を  $1.0 \mu\text{g/ml}$  添加し24時間、48時間まで微速度映画撮影で観察した。Fig.10 の左の列は control で、継代培養を行なって 48 時間後のものである。これに cytosine arabinoside  $1.0 \mu\text{g/ml}$  を添加し24時間経過したものが Fig.10 の右の列である。細胞数の著明な減少は認められないが、細胞のとくにコロニーの表面の部分の細胞は細胞における突起を出して激しく運動していたものが運動を停止し、突起は消失し変性を起こしている像が認められる (cytostatic)。48 時間では24 時間の変化と大差なくその後培養液を交換して培養を続けたが、細胞はガラスの表面から全く剥離して微速度映画撮影による観察は不能となった。

Fig.11 Timelapse cinematographs of KU-1 cells following exposure to cytosine arabinoside  $1.0 \mu\text{g/ml}$ , Mitomycin C  $1.0 \mu\text{g/ml}$  and 5FU  $10 \mu\text{g/ml}$ . Cytostatic effects are unremarkable but cells totally come off after 48 hours.



#### c. 他の制癌剤との併用効果について

Cytosine arabinoside 1.0  $\mu\text{g/ml}$  に加えて Mitomycin C 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , 5FU 10  $\mu\text{g/ml}$  を前回と同様に継代培養後 48 時間の状態に対して添加し、微速度映画撮影で観察した。結果は、Fig. 11 に示すとおり 24 時間でコロー表面に近い細胞の動きが停止し変性像が認められたが、48 時間では細胞数はやや増加し、表面に近い細胞の運動は停止したままである。その後、培養液を変えて観察を続けたが、細胞は剥離してしまい微速度映画撮影による観察の継続は不可能となった。

#### 4. 考 察

組織培養を応用した制癌剤の感受性試験は細胞の増殖を直接指標として判定できる点で器管培養法や生化学的方法に比較してより定量的であり、また用いる細胞株が original の性格を維持しているのであれば癌細胞の特異性も加味し、その意義は大きいといえる。われわれが樹立した膀胱移行上皮癌由来の KU-1 は従来用いられている吉田肉腫や HeLa 細胞と比較してかなり特異な性格を維持しており、制癌剤の感受性試験の基本的材料として重要視されてきている。KU-1 は下記の 4 つの特徴を維持している<sup>2)</sup>。

1. 極めて緩徐ながら安定した増殖を示すこと (slow and steady growing)
2. 重層化しながら表面は剥離しつつ重積していく (wear and tear, pile up)
3. 増殖しすぎると大量に剥離してしまう (massive decidual by overgrowth)
4. 薬剤および放射線に抵抗性 (drug and radio resistant)

これらの性格のうち 1, 2, 3 に関してはある意味で膀胱の移行上皮癌の増殖の基本的な形態を維持しているものともいえる。4 は臨床上の治療成績を代表する性質でもあるが、薬剤に関しては抵抗性であるがゆえに新しい薬剤の感受性試験にはこの細胞株を使用することの意味が大きいといえる。

細胞株 KU-1 を薬剤感受性テストの材料として使用する場合に、Fig. 4 に示した増殖の regulation model を理解することが必要である。これは前述の KU-1 の 1, 2, 3 を総合的に示したものにほかならないが、この模式図の基本は正常扁平上皮の増殖動態を表現した IVERSEN の理論<sup>1)</sup>に基づくもので、同様に扁平上皮癌由来の細胞株である HeLa 細胞をまず対照として比較検討した。

すなわち、Fig. 5, 6 を比較すると明らかなように HeLa 細胞と KU-1 の差は増殖速度の点で明らかに異なっているが、アルキル化剤である Thio Teka 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$ ,

100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で比較する限りは基本的には同じパターンをとっている。つまり薬剤の濃度対細胞数の抑制細胞の数の上での抑制の比率に関しては、ほとんど同様であるといえる。この結果から Thio Teka が HeLa 細胞と比較して KU-1 にとくに感受性が高いとは断言できない。Fig. 6 では KU-1 の細胞数は  $0.1 \times 10^5$  で開始しているが、Fig. 7 では  $0.2 \times 10^5$  で開始した。Fig. 6 の KU-1 は閉鎖静置培養であるが、Fig. 7 では  $\text{CO}_2$  培養器で semi-open で培養を行なった。その結果 Thio Teka はかなり強い細胞の増殖抑制作用を示した。同じ条件で cytosine arabinoside を行なった Fig. 8 では、Thio Teka と比較して 1  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 48 時間までは明らかに強い細胞増殖抑制を認めた。しかし 10  $\mu\text{g/ml}$ , 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では Thio Teka に比較して Thio Teka ほどの増殖抑制を示さなかった。この実験では最長 72 時間までしか観察しなかったが、後の微速度顕微鏡映画撮影による観察と比較してみるとさらに長い時間の検討が必要になるものと考えられる。

細胞増殖曲線で薬剤の感受性をテストする場合<sup>3,4)</sup>には基本の細胞数に対して一定の濃度の薬剤を培養液中に混入しているが、微速度顕微鏡映画撮影による観察では継代培養し少なくとも 48 時間経過した後には充分の細胞増殖が得られたところに制癌剤を添加することになる。すなわち前者では細胞がばらまかれてガラスの表面に定着する以前から薬剤の作用が開始されているので、微速度映画撮影とは start から条件が異なっているといえる。したがってこれを直接比較することはできないが、Fig. 9 に示すとおり視野一面に sheet 状に増殖した KU-1 が Thio Teka 1  $\mu\text{g/ml}$  の添加後 48 時間で中央の列に示すような少数の細胞塊に縮小してしまうことが示された。もしこれをしいて細胞増殖曲線との関連を求めれば、Fig. 7 において control の 48 時間後の細胞数  $0.6 \times 10^5$  が start line ということになり、もしここから増殖曲線を描くとすれば 96 時間後には急激な下降を示すことが推定される。微速度映画撮影では、その後 14 日間まで 3 回の制癌剤を含まない培養液交換を行ないながら観察を続けた。これはむしろ瀕死の細胞を救おうという努力をした結果にもなるが、Fig. 9 の右の列に示すように cell sheet の蘇る像が観察された。もしもこの間の培養液にひき続き Thio Teka が加えられていたならば total cell kill という結果になったかもしれないが、0.1  $\mu\text{g/ml}$  の 1 回の接触で 72 時間経過した後には薬剤を含まない培養液を変えた場合では、total cell kill には至らないということを示したものである。

これに対して cytosine arabinoside を 1.0  $\mu\text{g/ml}$  添加すると、Fig. 10 のとおり control に比較して 24 時

間後の像は細胞数の減少では著明なものはないが、映画観察によって細胞の動きが減弱ないし停止している像は明らかに観察され、この変化が48時間でもほとんど同様であることが示された。これは Thio Teka と比較すると cytotoxic すなわち殺細胞効果としては低いが、細胞増殖を停止することないし細胞活性の抑制によって cytostatic の変化は十分に確認することができた。これは Fig. 8 の増殖曲線に対する影響と比較しても興味あるところである。

しかしながら cytosine arabinoside を加えた顕微鏡微速度映画撮影をさらに続けた場合には、1週間以内に cell sheet は完全にガラスの表面から剥離し去り観察を続けることが不可能になった。これは Thio Teka 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を加えて培養液を薬剤を含まない培養液で交換していった場合に、2週間後に再び cell sheet を形成するのに対して極めて対照的な結果であった。すなわち KU-1 の薬剤抵抗性 (drug resistant) の性質は薬剤の作用機序によって必ずしも一定ではないことを示唆するものである。

Fig. 4 の細胞増殖の regulation model を引用するならば、Thio Teka はおそらく dividing phase に直接作用して細胞を死に至らせるが、生き残った細胞は再び増殖を開始しうるので濃度によっては total cell kill には至らないと考えられる。いっぽう、cytosine arabinoside ではむしろ resting phase の細胞における feedback 機構をより推進することが考えられ、増殖は抑制しても分化の方向に向かっては急速に進行し、KU-1 の性質の2の項で述べた regulation は消失し直ちに3の特徴である大量の細胞の剥離に至るものと推定される。

以上の結果から cytosine arabinoside の効果について断定的なことは言えないが、ひとつの方法としてはただ薬剤との併用療法によってより効果を上げることの期待が存在する。Mitomycin C, 5FU との併用を微速度映画撮影で試みたが、48時間までの観察では、Fig. 11 のとおり明らかな相乗効果をみるには至らなかった。しかし濃度を変え条件を変えて検討しなければ、この結論をうることはできない。

培養細胞株を用いる制癌剤の *in vitro* のテストは直接定量的に増殖抑制効果を得ることの利点があるいっぽう、KU-1 のような特殊な性質をそなえた細胞株では増殖曲線だけによって薬剤の作用のすべてを断定するわけにはいかない。KU-1 はくり返し述べるように増殖は緩徐であるにもかかわらず分化 (differentiation) への方

向への regulation が働いていることは明らかで、これには微速度映画撮影による観察あるいはそれ以上の研究方法を併用して初めて結論を得られるものと考ええる。

以上の培養細胞株を用いた *in vitro* の実験結果が直ちに臨床的に応用できるとは言いがたく、そこには宿主と腫瘍細胞との関係、その他の外的、内的因子の関係を考慮する必要がある。また長年 *in vitro* に飼いならされた細胞が人癌由来とはいいながら、その性質を変えている可能性についても充分検討する必要がある。

## 5. 結 語

膀胱移行上皮癌由来細胞株 KU-1 を用いて cytosine arabinoside の効果を検討した。Cytosine arabinoside は *in vitro* で 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で増殖曲線を描くと control に比較して著明な細胞増殖の抑制を示した。これは Thio Teka の抑制効果に充分匹敵するものであるが、殺細胞効果に関しては72時間までの観察では Thio Teka に及ばない。

しかしながら顕微鏡微速度映画撮影によって観察した場合、Thio Teka 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で48時間までに著明に縮小した細胞が14日後には再び cell sheet を形成して増殖を開始することが認められたのに比し、cytosine arabinoside の同濃度では48時間までに cell sheet の縮小は認められなかったが細胞活動の停止が観察され、その後1週間以内には、cell sheet は完全にガラスの表面から剥離し去った。

以上の結果から、cytosine arabinoside は膀胱癌由来細胞株 KU-1 に対して特異的な抑制効果があるものと考ええる。

## 文 献

- 1) IVERSEN, O. H. : Discussion in session on growth regulation. Cellular Control Mechanism and Cancer. (ed. by EMMELOT, P. and MUHLBOCK, O.) p.167, Elsevier Publishing Co., Amsterdam-London-New York, 1964
- 2) 田崎 寛: 膀胱癌, 人癌細胞の培養 (大星章一, 菅野晴夫編集). 185~191, 朝倉書店, 東京, 1975
- 3) DENDY, P. P.; GABRIELLE BOZMANN & T. K. WHEELER : *In-vitro* screening test for human malignant tumour before chemotherapy. Lancet II : 68~72, 1970
- 4) 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

## ACTION OF CYTOSINE ARABINOSIDE ON CULTURE CELL LINE KU-1

HIROSHI TAZAKI and TOSHIKO YOSHIDA

Department of Urology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan

Effects of cytosine arabinoside on culture cell line KU-1, which was derived from human transitional cell carcinoma of the urinary bladder, were evaluated. The cell growth was remarkably inhibited by cytosine arabinoside at concentration of 1.0, 10.0 and 100.0  $\mu\text{g/ml}$  in this system, which was almost equal effect of Thio-Tepa in the same condition *in vitro*, however, the cytotoxic action was not stronger than that of the latter.

On the other hand, time lapse studies of microscopic cinematography on these experiments observed complete detachment of cell sheet from glass surface in 10 days following interruption of cell activity without shrinkage of cell sheet by 1.0  $\mu\text{g/ml}$  of cytosine arabinoside, while in 14 days recovery of growth was observed from temporarily collapsed cell sheet exposed by Thio-Tepa at same dosis.

The results conclude that a specific inhibition effect of cytosine arabinoside on culture cell line KU-1, derived from human bladder carcinoma was suspected.