

## 人癌培養細胞の *in vitro* 薬剤感受性試験 第1報

再増殖測定法の適応と限界

本 山 悌 一・鈴 木 利 光

新潟大学医学部第一病理学教室

(昭和 54 年 9 月 6 日受付)

人癌細胞の *in vitro* 薬剤感受性測定法の1つとして、ALEXANDER & MIKULSKI の逆挿法を改良した再増殖測定法 (regrowth assay method) の確立を試みた。この方法は、被検細胞の植込み至適細胞濃度の幅によって規定される測定可能範囲があるが、この点に注意して使用するとき、再現性の高い、定量性のある方法であることを確認した。また 応用できる細胞株も極めて多いという利点を有する。Mitomycin C に対するヒト胃癌培養細胞株の感受性を再増殖測定法によって求めたところ、分化型腺癌は感受性が低く、低分化型腺癌は感受性が高いという傾向が認められた。

### 序 文

起炎菌の薬剤感受性試験によって最適薬剤を選択使用するという指導原理が確立されて以来、細菌感染症に対する化学療法の成果にはめざましいものがある。人癌の化学療法の場合にも同様の考え方に基づき癌細胞に最も有効な抗癌剤を選別使用できれば、治療成績のなお一層の向上が期待されよう。しかしながら、現実にはいまだその方法は確立されていない。したがって抗癌剤のスクリーニングは、一般的にはほとんど動物癌を用いて行なわれている。しかも、実験動物の癌においてさえ、その発生や形態に関係なく、それぞれの薬剤に対する感受性に多様性のあることが知られている<sup>1-3)</sup>。つまり個々の癌は、抗癌剤感受性においても優れて個性的な性格を示すのである。人癌においても当然同様の特性が推測される。

人の場合、*in vivo* で薬剤のスクリーニングをすることは許されずかつ不可能でもある。この隘路をいくらかでも克服しようとするれば、目下のところ *in vitro* で人癌細胞の薬剤感受性を検討する以外に手段はないものと思われる。最近では我国でも多数の人癌細胞株が樹立維持されており<sup>4)</sup>、それらの株細胞を用いて人癌細胞の薬剤感受性の特質を解明することが可能となってきた。

従来、*in vitro* の薬剤感受性測定法としては、癌細胞の増殖を 50% 抑制する薬剤濃度 (50% 増殖抑制濃度) を求める増殖抑制法 (growth inhibition method)<sup>5,6)</sup> が広く行なわれてきた。しかし、この方法は、われわれが詳細に吟味したところ全く不適当な方法であることが明らかになった。その理由については統報で詳しく論じたい。また、下山、木村によって確立された軟寒天コロニ

形成法 (soft agar cloning assay)<sup>7,8)</sup> は *in vitro* における抗癌剤の殺細胞作用を定量化する最もよい方法と考えられるが、これを応用できる人癌細胞株は現実には極めて少なく、必ずしも実用的とは言えない。このため、かつて薬剤感受性、放射線感受性の定量的測定法として用いられたこともある ALEXANDER & MIKULSKI の逆挿法 (backward extrapolation method)<sup>9,10)</sup> を改良する試みが下山<sup>11,12)</sup>、著者ら<sup>13,14)</sup> によってなされてきた。下山らはこの方法を再増殖試験 (regrowth assay) として主に浮遊増殖の細胞に応用することを試みている。今回、著者らはこの改良法が浮遊増殖系と付着増殖系とを問わず、大多数の細胞株に応用できること、しかしながら、各株細胞の増殖態度により生残率には測定限界があることの2点を確認した。これらの結果を各種ヒト胃癌培養細胞株と Mitomycin C を用いた実験系で具体的に提示する。

### 材料と方法

培養細胞株：Table 1 に示すようなヒト胃癌由来の細胞株 9 株を用いた。MKN 7 株<sup>15)</sup>、MKN 28 株<sup>15)</sup>、MKN 74 株<sup>16)</sup> は分化型管状腺癌由来、MKN 45 株<sup>15)</sup>、MK 2 株、OKAJIMA 株は低分化腺癌由来、KATO-III 株<sup>17)</sup> は印環細胞癌由来、MKN 1 株<sup>15)</sup> は腺扁平上皮癌由来、SCH 株<sup>18)</sup> は胃絨毛上皮癌由来である。MK 2、OKAJIMA、KATO-III の各細胞は浮遊増殖の形態をとり、他は付着増殖を営む。MKN 1、7、28、45、74 の各細胞は教室の北条晴人により樹立された株細胞である。OKAJIMA 株は国立がんセンター 下山正徳博士、KATO-III 株は東大医科研 関口守正博士、MK 2 株は東京医大 井上仁博士により恵与された。SCH 株は故 大星章一教授が国立

Table 1 Stomach cancer cell lines used in the present study

Cell line	Histological type of origin	Growth pattern
MKN 7	Well differentiated tubular adenocarcinoma	monolayer
MKN 28	Well differentiated tubular adenocarcinoma	monolayer
MKN 74	Well differentiated tubular adenocarcinoma	monolayer
MKN 45	Poorly differentiated adenocarcinoma	monolayer
MK 2	Poorly differentiated adenocarcinoma	suspension
OKAJIMA	Poorly differentiated adenocarcinoma	suspension
KATO-III	Signet-ring cell carcinoma	suspension
MKNI	Adenosquamous carcinoma	monolayer
SCH	Choriocarcinoma	monolayer

がんセンター当時樹立されたものである。

培養液：RPMI-1640 培地(日水製薬)に牛胎仔血清を10%の濃度に加え、さらに20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の硫酸カナマイシン(明治製菓)を添加したものをを用いた。pHは、炭酸水素ナトリウムと炭酸ガスとで7.2に調製した。

細胞は60 $\times$ 15 mmのプラスチックシャーレ(LUX)でふやし、指数増殖期後期の細胞を30 $\times$ 10 mmのプラスチックシャーレ(LUX)にある一定数まきなおし、抗癌剤の実験に供した。各シャーレは5%炭酸ガス加大気中で37 $^{\circ}\text{C}$ 加湿恒温器中で静置培養した。

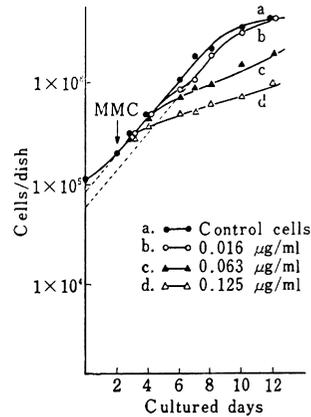
薬剤処置：抗癌剤としてMitomycin C(以下MMC)(協和発酵)を用いた。薬剤は活性を失なわないように常に使用直前に準備した。すなわち、蒸留水に溶解後、新鮮な上述の培養液によって使用濃度に稀釈した。細胞は上述の培養条件下で2時間MMCで処理し、その後直ちにMMCを含まない培養液で1回洗浄し、新鮮な培養液を加え再び静置培養に戻した。

細胞数計算：細胞は0.25%トリプシン(SIGMA)と0.01% Ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA)(和光純薬)によって単個細胞の浮遊液とし、その1 mlに等量のトリパンプルー(CHROMA)を加え、ピペッティング後BÜRKERの血球計算板で不染細胞数を生細胞として数えた。対照およびMMCの各濃度につき各々2シャーレの細胞数を算出し、その平均を得て生腫瘍細胞数とした。

## 成 績

ALEXANDER & MIKULSKI 原法による生残率の測定：MMCで処理した後の腫瘍細胞の増殖曲線は全ての細胞株でほとんど同じ態度を示す。Fig. 1はMKN 45株をMMCで2時間処理した場合の増殖曲線である。植

Fig. 1 Growth curves of MKN 45 cells after 2-hr-treatment with different doses of Mitomycin C. Dotted lines showed backward extrapolation of growth curves.



込み後、付着が安定し、指数増殖期に入った細胞にMMCを作用させている。0.016  $\mu\text{g}/\text{ml}$ という比較的低濃度のMMC処理の場合、細胞の増殖は初期に僅かに抑制されるが、直ぐ対照細胞の増殖速度とほとんどかわりのない増殖速度をとりもどす。増殖曲線をさらに詳細に見ると、対照とMMC処理群間に細胞数の差が出てくるのは、処理時の細胞数が倍加した後であることがわかる。また顕微鏡で観察しても初めの24時間以内にはMMC処理群に高度の変性を示す細胞の増加はほとんど認められない。これらのことはMMC処理後もなお大部分の細胞は少なくとも1回以上の分裂増殖をしていることを示している。多核細胞、空胞細胞等の異常細胞の出現や核崩壊、細胞崩壊は、処理後細胞数が倍加した後に目立ち、同時に増殖速度も低下する。しかし、この後は増殖力を再び回復し、対照と同様の速度で増殖してくる。この新たな増殖曲線は、MMC処理によって致命的な障害を受けなかった細胞から生じてくる新しい細胞群により形成されると考えられる。したがっていわゆる細胞生残率はALEXANDER & MIKULSKI<sup>9)</sup>の方法により、この新しい細胞集団が作り出す再増殖曲線をY軸に逆外挿することによって得られる対数目盛を対照のそれで除することによって求めることができる。Fig. 1の点線は逆外挿を示している。0.063  $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは0.125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ という比較的高濃度のMMC処理では、細胞の増殖速度はより早く抑制されるが、対照との間に差が出るのはやはり細胞数が倍加した後であることがFig. 1からわかる。低濃度の場合と同様に一定の遅滞期を経て再び細胞が増殖してくるが、元の増殖力を回復するまでにかな

りの時間を要する。このため、対照群の細胞濃度が飽和状態になってしまったり、元の増殖速度を回復する前に被検細胞群自体も細胞密度が高まることによって増殖速度が再び低下してしまうという事態が生ずる。したがって、 $0.063 \mu\text{g/ml}$  あるいは  $0.125 \mu\text{g/ml}$  という濃度では逆外挿法を用いることができなくなる。薬剤処理時の細胞数を変えることによって生残率を測定できる薬剤濃度の幅を多少広げることが可能であるが、その幅は極めて狭い。

**ALEXANDER & MIKULSKI 法の拡大(細胞希釈と再植込み法) :** 前述のように ALEXANDER & MIKULSKI の原法では、検索しうる薬剤の濃度がかなり制限され、Fig. 1 のような場合には  $0.063 \mu\text{g/ml}$  以上の濃度の MMC で処理した場合の生残率は測定できない。この制約をとり除くためには Fig. 2 に示すように増殖曲線が定常期に達する前に対照と処置群とをそれぞれ同一の希釈でまきなおせばよい。希釈倍数は、まきなおした細胞が後述する至適範囲内に入るように決める。Fig. 2 の場合は9倍してある。まきなお後の再増殖曲線が対照のそれと平行になるまで増殖曲線を追跡し、平行となったところで前述のようにY軸に逆外挿し、 $0.063 \mu\text{g/ml}$  および  $0.125 \mu\text{g/ml}$  という高濃度処理の際の細胞生残率を求めることができる。

**至適細胞濃度と生残率測定限界 :** ALEXANDER & MIKULSKI の原法およびその拡大操作によって得られる生残率が理論的に正しい値であるためには、各々の植込み細胞の増殖曲線が指数増殖期で互いに平行な関係になったときの細胞数の比率が元の植込み細胞数の比率と一致しなければならない。Fig. 3 に MKN 45 株の例を示す。この細胞では、 $1.1 \times 10^4/\text{dish}$  から  $2.4 \times 10^5/\text{dish}$  程度の細胞を 1.5 ml の培養液を含む  $30 \times 10 \text{ mm}$  の

ラスチックシャーレに植込んだ場合に、最高増殖時の細胞数の比率と植込み時の細胞数の比率はほぼ等しくなる。このように言わば植込み細胞数の至適細胞濃度はどの細胞株にも存在し、測定はこの範囲内で行なわれなければならない。MKN 45 株の場合は、 $1.1 \times 10^4$  を  $2.4 \times 10^5$  で除した数、すなわち 0.046 が生残率の測定限界ということになる。

**生残率曲線 :** 以上のような方法で求めた MMC 2 時間処理時の MKN 45 株の生残率曲線を Fig. 4 に示す。処理時  $7.6 \times 10^4/\text{dish}$  から  $1.2 \times 10^5/\text{dish}$  の細胞数のものに対しては希釈まきなおし操作を加えず、 $1.0 \times 10^5/\text{dish}$  から  $1.2 \times 10^6/\text{dish}$  の細胞数のものに対しては希釈まきなおしを加えた。同一の MMC 濃度で7から11回の測定を行なっているが、被検細胞数の多寡にかかわらずほぼ一定の結果が得られ、再現性に富んでいる。

**薬剤感受性の指標 :** Fig. 4 の生残率曲線に示されたように、MMC の殺細胞作用は、生残率が薬剤濃度に比例して対数的に減少することから、強い濃度依存性をもつ

Fig. 3 Growth curves of MKN 45 cells in different cell numbers inoculated

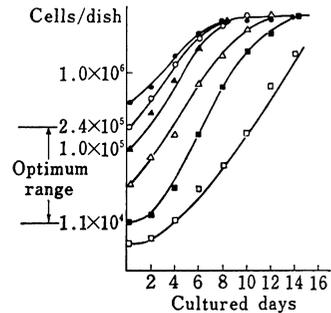


Fig. 4 Survival of reproductive capacity in MKN 45 cells as a function of Mitomycin C dosage. The survival fractions are not influenced by the cell numbers to be treated.

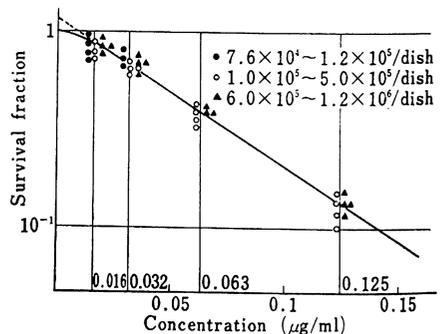


Fig. 2 Growth curves of MKN 45 cells after 2-hr-treatment with Mitomycin C. On the 6th experimental day, cancer cells of the control and test groups were reseeded by the same dilution.

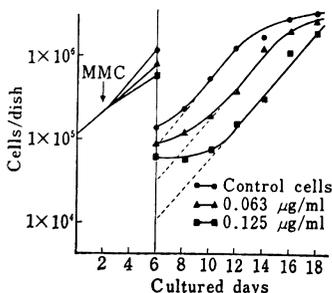
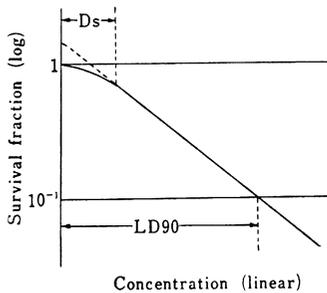


Table 2 Mitomycin C sensitivity of cultured human stomach cancers

Cell line	Histological type of origin	Population doubling time (hr)	LD <sub>90</sub> (μg/ml)
MKN 7	Well differentiated tubular adenocarcinoma	65	0.31
MKN 28	Well differentiated tubular adenocarcinoma	30~34	0.31
MKN 74	Well differentiated tubular adenocarcinoma	44~48	0.27
MK 2	Poorly differentiated adenocarcinoma	52~53	0.32
MKN 45	Poorly differentiated adenocarcinoma	30~35	0.14
OKAJIMA	Poorly differentiated adenocarcinoma	36~38	0.16
KATO-III	Signet-ring cell carcinoma	37~41	0.17
MKN 1	Adenosquamous carcinoma	43~45	0.58
SCH	Choriocarcinoma	36~37	1.32

Fig. 5 Survival curve and 90% lethal dose (LD<sub>90</sub>)

ことがわかる。semi-log plot した場合、MMC 処理時の生残率曲線は一般に Fig. 5 のような濃度反応曲線として得られる。低濃度域では肩の部分 (Ds) をもつことがあるが、Ds 濃度以上になると曲線はほぼ直線状になる。ある細胞群の 90% を死滅させるに必要な薬剤量を 90% 致死量値 (90% lethal dose, LD<sub>90</sub>) と表現できるが、この LD<sub>90</sub> をもって薬剤感受性の 1 つの指標とすることができる。この値は、縦軸の  $10^{-1}$  の点で横軸に平行に引いた直線と生残率曲線との交点の横軸目盛 (薬剤濃度) として得られる。

ヒト胃癌培養細胞株の MMC 感受性: ヒト胃癌由来の 9 株について、MMC 2 時間処理時の LD<sub>90</sub> を求めた結果を Table 2 に示す。分化型管状腺癌由来の MKN 7, 28, 74 の各株の LD<sub>90</sub> はいずれも 0.30 μg/ml 前後の値で比較的感受性が低く、低分化型の MKN 45 株, OKAJIMA 株, KATO-III 株の LD<sub>90</sub> は 0.15 μg/ml 前後の値で比較的感受性が高い。しかし、低分化型のものでも MK 2 株は高分化型のものと同様の感受性の低さを示している。また腺扁平上皮癌由来の MKN 1 株はさらに感受性が低く、胃原発絨毛癌由来の SCH 株に至っては極めて感受性の低いことがわかる。また、これら LD<sub>90</sub> の値は細胞の増殖速度 (倍加時間) とは必ずしも

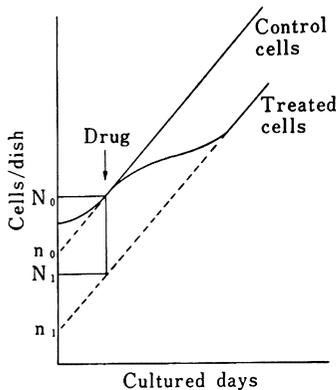
平行の関係にはなく、増殖速度が速ければ速いほど感受性が高いとは言えない。

#### 考 察

抗癌剤処理による死滅細胞と生残細胞とは当然のことながら処理された細胞個々の運命によって決められなければならない。しかしながら、抗癌剤による細胞死には放射線による場合<sup>19)</sup>と同様に間期死 (interphase death) と、何回か分裂増殖を行なってから死に至る増殖死 (reproductive death) の 2 通りがある。前掲の Fig. 1 から明らかなように、MKN 45 株も細胞数が倍加した後初めて増殖曲線に差が出てくること、また形態変化の詳細な観察からも、通常投与しうる MMC 量では増殖死がむしろ大部分を占めている。したがって、薬剤処理後のいわゆる生細胞には、分裂増殖はするが結果的には死に至るべき細胞と、薬剤による致命的な障害を免れ無限に分裂増殖してゆく能力を持った細胞とが混在していることになる。このことは色素吸着法 (dye exclusion method) で不染な細胞が必ずしも増殖能を持った細胞とは限らず、それをもって増殖能を持った生細胞の指標とすることができないことを意味している。

ALEXANDER & MIKULSKI によって開発された逆外挿法 (backward extrapolation method) は、薬剤感受性および放射線感受性の定量的解析に利用され<sup>9,10)</sup>、この方法とコロニー形成法による感受性試験の結果とがよく相関することは NIAS ら<sup>20)</sup>によって既に証明されているが、この点については著者らも統報で明示したい。逆外挿法の原理は Fig. 6 に示すように、薬剤処理時  $N_0$  の細胞数が、薬剤処理によって  $N_1$  に減じたと見なしえ、生残率は  $N_1/N_0$  と表現でき、これは各直線部分を Y 軸に逆外挿して得られる対数目盛の比  $n_1/n_0$  としてより簡単に得られるとするものである。この方法が従来あまり用いられなかった理由の 1 つは、頻回の細胞数算定が必要なためかなりの労力を必要とすることが考えら

Fig. 6 Principle of the backward extrapolation method



れる。もう1つの理由も推測にすぎないが、本法には既に述べたように測定限界がある。実験者がそれに気づかずに本法を用いることによって、得られた結果から再現性の乏しい方法と誤認し、感受性試験法として採用しなかったのではないだろうか。浮遊細胞を主として用いている下山<sup>11)</sup>は、測定可能範囲については言及していないが、充実癌由来の付着細胞は概してこの範囲が狭いため、実験前に範囲の充分な確認が必要である。今回の著者らの研究は、ALEXANDER & MIKULSKI 法による測定可能範囲を明らかにするとともに、稀釈まきなおし操作を加えることによって検索できる抗癌剤の濃度と細胞数の幅を広げることができ、生残率の測定可能範囲を広げることができることを確認した。生残率の測定可能範囲は、植込み細胞数が少ないと増殖速度が低下するような細胞株では狭く、植込み細胞数が少なくても増殖速度に変化のない細胞ではより広くなる。ヒト胃癌培養細胞株では、全例  $10^{-1}$  の生残率を得る濃度、すなわち 90% 致死量値は実測可能であったが、 $10^{-2}$  の生残率を得る濃度、すなわち 99% 致死量値の実測はおおむね不可能であった。

下山<sup>12)</sup>は、稀釈まきなおし操作を行なって測定する方法に対してだけ再増殖試験法 (Regrowth assay method) という言葉を使っているが、ALEXANDER & MIKULSKI の原法においても薬剤処理後の再増殖のパターンをそのよりどころとしているところから、また低濃度の薬剤処理の場合、敢えて稀釈まきなおしを行なう必要もないことから、原法と改良法とを合わせて再増殖測定法 (regrowth assay method) と命名するのが適当かと思われる。

#### 文 献

1) 吉田富三, 井坂英彦, 中村久也, 小田島成和, 佐

藤 博: 腹水肝癌の研究。日病会誌 44: 407~421, 1956

- 2) 大星章一: 癌化学療法における腫瘍スペクトラムおよび腫瘍細胞の薬剤耐性に関する研究。癌の化学療法 (武田勝男編) pp.192~205, 医学出版, 東京, 1957
- 3) 吉田富三: 腹水肝癌の研究——1960年までの成績の総括。東京医学雑誌 68: 715~728, 1960
- 4) 大星章一, 関口守正: 日本で樹立維持されているヒト癌細胞培養株。蛋白質核酸酵素 23: 697~711, 1978
- 5) EAGLE, H. & G. E. FOLEY: The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. Am. J. Med. 21: 739~749, 1956
- 6) MORIWAKI, A.: Studies on carcinostatic substances. XL. Application on cell counting method to the screening of antitumor substances using *in vitro*-cultured Yoshida sarcoma cells. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 10: 462~467, 1962
- 7) 下山正徳, 木村禧代二: 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。Chemotherapy 20: 787~794, 1972
- 8) 下山正徳, 木村禧代二: 人癌細胞培養の医学生物学への応用——化学療法。人癌細胞の培養 (大星章一, 菅野晴夫編) pp.477~499, 朝倉書店, 東京, 1975
- 9) ALEXANDER, P. & Z. B. MIKULSKI: Differences in the response of leukaemia cells in tissue culture to nitrogen mustard and to dimethyl myleran. Biochem. Pharmacology 5: 275~282, 1961
- 10) ALEXANDER, P.: Mouse lymphoma cells with different radiosensitivities. Nature 192: 572~573, 1961
- 11) 下山正徳: がん細胞培養株を利用した抗がん剤スクリーニング法開発に関する研究。昭和52年度文部省科学研究費補助金による「がん」特別研究報告集録 pp.736~738, 1978
- 12) 下山正徳, 田中和彦, 木村禧代二: がん細胞培養株の薬剤感受性度——再増殖試験 (Regrowth assay) による薬剤感受性度測定とその意義。癌の臨床 25: 75~83, 1979
- 13) 本山悌一, 北条晴人, 大星章一: Regrowth assay 法による培養ヒト胃癌細胞の薬剤感受性。第37回日本癌学会総会記事 145, 1978
- 14) MOTOYAMA, T.: H. HOJO, T. SUZUKI & the late S. OBOSHI: Evaluation of the regrowth assay method as an *in vitro* drug sensitivity test and its application to cultured human gastric cancer cell lines. Acta Medica et Biologica 27 (in press), 1979
- 15) 北条晴人: ヒト胃癌細胞培養株の樹立とその形態学的特性。新潟医学会雑誌 91: 737~763, 1977
- 16) 北条晴人, 大星章一: ヒト胃癌細胞の培養——組織型と *in vitro* 増殖形態および分化能との関係について。第36回日本癌学会総会記事 109,

- 1977
- 17) SEKIGUCHI, M.; K. SAKAKIBARA & G. FUJII : Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. Japan J. Exp. Med. 48 : 61~68, 1978
- 18) 大星章一, 清藤 勉, 吉田紘一, 下里幸雄, 小出 勉, 佐野量造 : 胃悪性絨毛上皮腫の組織培養。日病会誌 61 : 146~147, 1972
- 19) 山田 武, 大山ハルミ : エネルギー代謝阻害と放射線による細胞間期死。動物学雑誌 80 : 111~119, 1971
- 20) NISA, A. H. W. & M. FOX : Minimum clone size for estimating normal reproductive capacity of cultured cells. Brit. J. Radiol. 41 : 468~474, 1968

## IN VITRO DRUG-SENSITIVITY TEST OF CULTURED HUMAN CANCER CELLS. I

Regrowth Assay Method ; its Application and Limitation

TEIICHI MOTOYAMA and TOSHIMITSU SUZUKI

First Department of Pathology, Niigata University School of Medicine

Original regrowth assay by ALEXANDER and MIKULSKI and revised one by SHIMOYAMA *et al.* to which they introduced dilution and reseedling of the control and test cells, have been confirmed to be reliable and adequate methods to evaluate *in vitro* drug sensitivity of cultured human cancer cells. These methods, however, have limitation of measurement because speed and pattern of growth of cancer cells depend on the inoculation cell size.

The optimum inoculation cell size, in which growth curves run parallel each other in the exponential growth phase, is variable at every cell line tested. To apply this method successfully, the optimum inoculation cell size should be measured in each cell line prior to starting of drug sensitivity test. Sensitivity tests of 9 human stomach cancer cell lines against Mitomycin C were measured by regrowth assay. In general, cell lines derived from poorly differentiated adenocarcinoma were more sensitive to the test drug than those from well differentiated tubular adenocarcinoma.