

人癌培養細胞の *in vitro* 薬剤感受性試験 第3報

各種測定法の吟味とその評価

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* 薬剤感受性試験として従来から用いられてきた、いくつかの方法について、各面から吟味し、評価を加えた。

個々の癌細胞の増殖能を直接検定しうるコロニー形成法が最も望ましい測定法と考えられたが、採用するコロニーの大きさに注意を要することを再確認した。また、コロニー形成法には多くの制約があり、応用できる人癌培養細胞株が極めて限られているため、その場合、コロニー形成法ともよく相関する再増殖測定法を用いることが適当である。この方法は多くの労力を必要とするが、コロニー形成法と同様、培養癌細胞の薬剤感受性を定量的に解析することが可能である。多くの細胞株に適用できることが第1の利点である。

増殖抑制法は、定量的な感受性試験としては全く不適當であり、また形態学的変化から癌細胞の薬剤感受性を推定することも不可能であった。

序 文

著者らは、前2報において、*in vitro* 薬剤感受性試験としての再増殖測定法 (regrowth assay method) の適応と限界、さらに、その方法による培養ヒト胃癌細胞の Mitomycin C および Carboquone に対する感受性について報告した^{1,2)}。

今回は、従来用いられてきた3種の *in vitro* 薬剤感受性試験——コロニー形成法、増殖抑制法および再増殖測定法——について相互に比較検討した。その結果、それぞれの方法に内在する幾つかの問題点を明らかにすることができた。本報ではそれらの成績を報告するとともに、人癌培養細胞の応用研究にまつわる体制上の問題点について論じたい。

材 料 と 方 法

人癌細胞培養株：用いた人癌培養細胞株は、前2報と同様、ヒト胃癌由来の培養細胞株、MKN 1, MKN 7, MKN 28, MKN 45, MKN 74, MK 2, KATO-III, OKAJIMA, SCH の9株である。コロニー形成法と再増殖測定法の両測定法を応用しうる細胞株として、秋田大学 加藤哲郎博士から恵与されたヒト膀胱癌由来細胞株 MGH-U 1³⁾を用いた。

培養方法：前2報と全く同じ方法であり、MGH-U 1株も牛胎仔血清を10%の濃度に加えた PPMI-1640 培地で培養した。

薬剤処理：抗癌剤としては Mitomycin C (以下 MMC)

を用い、癌細胞の処理方法は前2報と全く同じである。

感受性試験：コロニー形成法 (Cloning assay, Colony formation method) は、PUCK & MARCUS⁴⁾の方法を用いたが、feeder layer は必要としなかった。判定は10日後に行なった。再増殖測定法については第1報¹⁾で詳述した。増殖抑制法 (growth inhibition method) は森脇⁵⁾の方法を用いた。すなわち、薬剤作用後 (何日目に) 対照群の細胞数に対する処理群の生細胞数の比により増殖抑制度を求め、その細胞増殖度が50% inhibition concentration (IC₅₀) とした。形態学的な変化は、95% エタノール、ユーテル等量液で固定後、Papanicolaou 染色を施し、光学顕微鏡で観察した。付着細胞は、固定前0.25% トリプシン溶液で剥離し、ピペッティングにより単離細胞とした。

成 績

コロニー形成法による感受性試験：MMC で2時間処理したヒト膀胱癌由来 MGH-U 1株の生残率をコロニー形成法で求めると、Fig. 1 のようになる。低濃度域ではほとんど差はないが、高濃度域では50個以上の細胞からなるコロニーを採用するか、100個以上の細胞からなるコロニーを採用するかによって生残率にかなりの差が生ずる。この例では再増殖測定法によって求めた値は前2者のほぼ中間に位置している。しかしながら、どちらかといえば50個以上の細胞からなるコロニーによって判定したコロニー形成法の結果にほぼ平行する傾向が

Fig. 1 Survival of reproductive capacity in MGH-U 1 cells as a function of Mitomycin C dosage. The survival fractions are obtained by the cloning assay and the regrowth assay

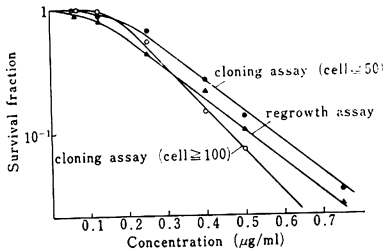


Table 1 50% Inhibition concentration (IC_{50}) of Mitomycin C

Cell line	No. of cells at Mitomycin C treatment (cells/dish)	Population doubling time (hr)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
MKN 45	2.1×10^5	30	0.08
MKN 28	1.9×10^5	32	0.10
OKAJIMA	1.9×10^5	36	0.10
KATO-III	2.0×10^5	40	0.18
MKN 74	2.2×10^5	46	0.24
MK 2	2.0×10^5	53	0.29
MKN 7	1.8×10^5	65	0.35
MKN 1	2.2×10^5	43	0.50
SCH	2.2×10^5	37	0.62

Fig. 2 Inhibition curves of MKN 45 cells after 2-hr-treatment with Mitomycin C. The difference in cell numbers to be treated results in the different values of IC_{50}

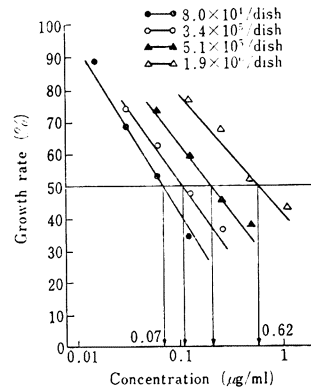
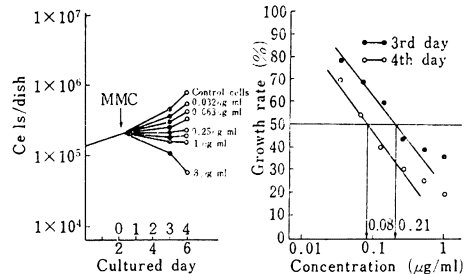


Fig. 3 Growth and inhibition curves of MKN 45 cells after 2-hr-treatment with Mitomycin C



ある。

増殖抑制法による感受性試験：ヒト胃癌由来の9株について、先ず MMC 処理時の細胞数がほぼ 2×10^5 /dish と一定になるように調整して2時間処理し、4日後の IC_{50} を求めると、Table 1 のようになる。MKN 1 株と SCH 株を除くと、 IC_{50} 値は倍加時間、すなわち増殖速度と密接な関係にあり増殖の速い細胞ほどその IC_{50} 値は小さい。

次に、薬剤と細胞とが一定条件で接触している限り、被検細胞数の多寡にかかわらず薬剤効果も一定のはずである。ところが増殖曲線および IC_{50} の値は薬剤処理時の細胞数によって違ってくる。Fig. 2 は、MKN 45 株を MMC で2時間処理した場合の4日後の増殖曲線であるが、被検細胞数が増すほど IC_{50} は高くなる。例えば 8.0×10^4 /dish の細胞を処理したときの IC_{50} は $0.07 \mu\text{g/ml}$ 、 1.9×10^6 /dish を処理したときの IC_{50} は $0.62 \mu\text{g/ml}$ となり、数値に約9倍の開きが出る。

また、増殖抑制法は、薬剤処理後の増養日数によっても増殖抑制曲線および IC_{50} の値が全く変わってくる。

すなわち、Fig. 3 に示すように、薬剤処理後3日目の増殖抑制曲線と4日目の増殖抑制曲線とは全く異なり、 IC_{50} の値も各々 $0.21 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.08 \mu\text{g/ml}$ となり約3倍も値が違ってくる。これらの間に一定の関係は得られない。

以上のように、 IC_{50} は、薬剤効果の本質とは異なるところのいくつかの要素によって容易に変動する。とくに、 IC_{50} 値は、癌細胞の増殖速度に強く影響される傾向があり、癌細胞の真の薬剤感受性を反映するとはみなし得ない。したがって IC_{50} の意味するところも極めて不明確である。

形態学的変化からみた薬剤感受性度の推定：先ず、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ の MMC で2時間処理し、24時間後、48時間後、96時間後の形態学的変化をヒト胃癌由来9株で観察した。MMC に対する感受性の極めて低い SCH 株と MKN 1 株、とくに SCH 株がいずれの MMC 濃度、どの観察時期においても形態上の変化は他に比べて乏しかったが、残る7株においては一定し

Fig. 4 Morphological changes of KATO-III cells after 2-hr-treatment with 0.15 µg/ml Mitomycin C

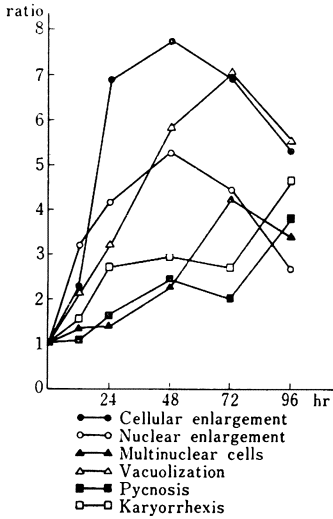


Fig. 6 Nuclear enlargement of MKN 45 cells and MK 2 cells after 2-hr-treatment with each LD₉₀ dose of Mitomycin C

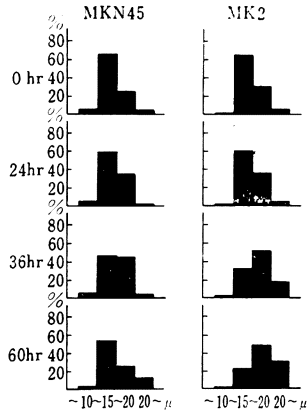
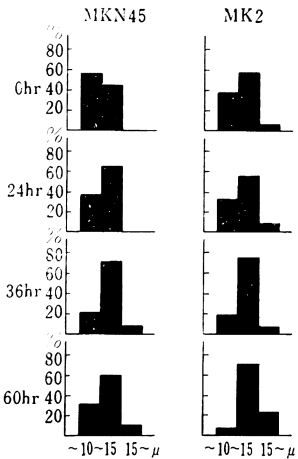


Fig. 5 Cellular enlargement of MKN 45 cells and MK 2 cells after 2-hr-treatment with each LD₉₀ dose of Mitomycin C



最も認識されやすい変化である。このことは他の細胞株においても同様である。しかし、後続変化としての多核化、空胞化、核濃縮、核崩壊等が出現してくる時期は各細胞株によって異なる。そこで増殖速度の速い MKN 45 株と増殖速度の遅い MK 2 株とを各々の LD₉₀ 値に近い 0.15 µg/ml と 0.30 µg/ml の MMC で 2 時間処理した後の細胞質と核の大きさの変化を見ると、Fig. 5, Fig. 6 のようになる。増殖速度の速い MKN 45 株では細胞腫大、核腫大とも処理後 24 時間には既に著明となり、60 時間後には元のパターンに復活しつつあるのに対し、増殖速度の遅い MK 2 株では 36 時間後に漸く変化が明らかになり、60 時間後も変化はなお進行している。つまり、生物学的に同等の効果をもつ薬量を投与しても、現われてくる形態学的変化は細胞の増殖速度に強く影響されることを示している。

考 察

PUCK & MARCUS⁽⁶⁾ が HeLa 細胞によって 1 個の細胞が個のコロニーを形成することを証明し、さらに、この方法を用いて放射線照射後の増殖能をもった生残細胞の測定に成功して以来、コロニー形成法は主として放射線感受性試験として利用されてきた。下山、木村^(7,8) は、軟寒天コロニー形成法 (soft agar cloning assay) を考察することによりコロニー形成法を浮遊培養系に用いることを可能とし、多くの抗癌剤の作用を定量的に解析することに成功した。

一般にコロニー形成法を用いる場合、10 日から 20 日後に 50 個以上の細胞からなるコロニーを 1 個のコロニーと見なしている。しかし、均一な細胞集団を用いても、コロニーの大きさはかなり広範な分布を示し、放射線等で処理した場合には、そのモードが低値に移動するだけでなく、分布もさらに幅広くなること、すで

た傾向は認められなかった。すなわち、形態学的変化を指標とした場合も、判定日時により各株細胞間の感受性度の順位が変わってくるという結果が得られた。

KATO-III 株を例にとって薬剤作用後の異常形態を示す細胞の経時的出現率を見ると、Fig. 4 のようになる。Fig. 4 は、前 2 報で述べた 90% 致死量値 (LD₉₀) に近い 0.15 µg/ml の MMC で 2 時間処理した例で腫大細胞、腫大核、多核細胞、空胞細胞、核濃縮、核崩壊等の異常形態の出現を、指数増殖期にある無処置の細胞群においても見られる頻度を 1 とし、処理後の出現比を見たものである。初期変化としては細胞腫大と核腫大とが

Table 2 Comparison of three methods

Method	Regrowth assay (new extrapolation method)	Cloning assay (colony formation method)	Growth inhibition method
1. Meaning of index (Index)	clear (LD ₉₀)	clear (MLD ₉₀ , LD ₉₀)	unclear (IC ₅₀)
2. Reproducibility	good	good	bad
3. Application	wide	narrow	wide
4. Measurable range of survival fraction	narrow	wide	—
5. Labor	most	much	little

NIAS ら^{9,10})によって詳細に報告されている。したがって、大きなコロニーだけをとりあげると生残率は低くなるし、小さなコロニーもとりあげると生残率は高くなる傾向がある。われわれの成績でもコロニー形成法による生残率は、採用するコロニーの大きさによって異なっていた。したがって、コロニーの判定基準を如何に設定するかが問題となる。しかし、今回の我々の成績からは、コロニー形成法による薬剤感受性試験の結果は適当なコロニーの大きさを採用することにより再増殖測定法の結果とよく相関することを示している。逆に言えば、コロニー形成法では、再増殖測定法との相関性を考慮して、適当な大きさのコロニーを選ぶ必要がある。しかし、このコロニーの大きさの問題と適用できる細胞株の問題とを除けば、いくつかの理由でコロニー形成法は再増殖測定法に比し薬剤感受性試験として適していると考えられる。先ず労力の面で、頻回に細胞数計算を必要とし、さらに稀釈まきなおしをも必要とする再増殖測定法に比べ、コロニー形成法はより少ない労力で済む。2番目には、再増殖測定法において逆外挿が必ずしも容易ではない場合がある。3番目には、コロニー形成法では個々の細胞の再増殖能を測定できるのに対し、再増殖測定法では細胞集団全体の増殖を取扱わざるを得ない。4番目には、コロニー形成法では、*in vivo*での癌細胞の存在様式に近いとされる定常期での分析が可能であるのに対し、再増殖測定法ではそれができない、等である。

コロニー形成法最大の欠点は、第1報¹⁾でも述べたように、細胞単離率が100%に近いこと、コロニー形成能が高いこと、植込んだ細胞数に比例してコロニーが形成されることなどが必須の条件となるため、応用できる人癌細胞株が極めて少ないことである。その点、再増殖測定法は、より多くの細胞株に応用できる利点がある。

一方、腫瘍細胞の増殖を抑制する程度によって薬剤感受性を調べようとする方法は、EAGLE & FOLEY¹²⁾の仕事以来、多くの研究者¹³⁻¹⁵⁾によって愛用されてきた。原法は細胞蛋白量を測定するものであったが、森脇⁵⁾によって生細胞数を数える方法も開発され、現在ではむし

る後者が広く用いられている。増殖抑制法は LEITER ら¹⁵⁾の仕事に代表されるように抗癌性物質のスクリーニング法としては意味があり、今なおその価値を失なわない。しかし、今回の著者らの研究が明らかにしたように、指標として用いられる IC₅₀ という値は薬剤に対する真の感受性を表わしえない。これは、第1報¹⁾で述べたように、薬剤の効果が処理された細胞自体の運命によって決められねばならないのに対し、増殖抑制法では、分裂増殖はするがやがて死すべき細胞と無限に増殖してゆく能力をもった細胞とを全く区別しえず、一緒に取扱わざるをえないことに起因する。したがって、増殖抑制法では細胞株相互の感受性の比較、あるいは同一細胞株での感受性の変化などを定量的に分析することはできない。

薬剤処理後の形態学的変化をもって感受性を推定しようとする試みも古くからなされている。真の感受性に非常に差がある場合はともかくとして、その差が2倍前後の範囲内のときには、形態学的変化は細胞の増殖速度に左右され、通常の条件設定では感受性の高低は判別しえない。著者らの成績からは、形態学的変化から細胞に対するおおよその毒性濃度が判定でき、その作用機作の推定も可能とする梅田¹⁶⁾の説は納得しえない。形態学的変化を定量的な解析に結びつけようとする試みは、極めて慎重を要し、十分な基礎的検討が必要であろう。

感受性を表わす指標として、放射線感受性の分析では、D₀線量 (quasi-threshold dose) あるいは D₀線量が一般に用いられてきた¹⁷⁾。抗癌剤に対する感受性は下山⁸⁾によって90%平均致死量値 (90% mean lethal dose, MLD₉₀) が採用されていた。著者らは前2報^{1,2)}において90%致死量値 (90% lethal dose, LD₉₀) を用いた。抗癌剤の場合、放射線の場合と異なり、作用時間という要素が入るため、これによって生残率曲線は変動し、D_q線量に相当する薬剤量をもって感受性の指標とすることは不適當である。MLD₉₀もD₀線量も生残率曲線の直線部分の傾きによって決まり、ほぼ対応する意味をもつと考えられるが、再増殖測定法ではその測定限

界のために MLD_{90} を求めえないことがしばしばある。生残率曲線が必ずしも直線性を示すとは限らないという実験事実を重視すると、コロニー形成法でも、増殖測定法でも容易に求めることができる LD_{90} が抗癌剤感受性の指標として適当と考えられる。

増殖測定法、コロニー形成法、増殖抑制法の3法を比較した結果をまとめると、Table 2 のようになる。薬剤感受性測定法として、増殖抑制法は全く不相当であり、コロニー形成法か、増殖測定法を用いるべきであることが明らかになったが、この2法はともに被検細胞が安定した増殖態度を示すことを必要とし、株化された細胞にしか用いられない。したがって、個々の患者材料を培養して、短期間に薬剤感受性を調べようとする目的には不向きである。しかしながら、第2報において示したように、分化型管状腺癌由来の MKN 28 株と MKN 74 株とは MMC に対しても CQ (Carboquone) に対しても同様な態度を示し、かつ、これらの培養細胞は培養開始後3年以上を経た現在なおヌードマウスに植込み材料と同様の組織像を再現する。このことは、由来組織が特徴的な方向への分化を示し、培養細胞もその性格を保持している場合、薬剤に対する感受性も同じ傾向を示す可能性があることを意味する。現在用いられている組織型分類は、全てとはいえないがかなりの部分において薬剤感受性ともよく対応するものと推察される。

1977年11月末現在で、日本で樹立維持されている人癌細胞株は140株を超えている(リンパ芽球様細胞株を除く)¹⁸⁾。これらの細胞株の保存維持を各施設の情熱と労力に依存する時代はすでに終わっていると考えねばならぬ。また、理論的に正しい方法で、多くの薬剤に対する多くの細胞株の感受性を測定することは、ひとり一施設の力でなし得ることはない。癌化学療法の研究あるいは臨床応用には、癌細胞自体の薬剤感受性の検定という問題が常に眼前にあり、そのためには *in vitro* における人癌細胞の培養という大前提が存在する。株化培養細胞の保存維持に関する公的機構の設立と、そこでの集中的な抗癌剤感受性の検討を切望する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、一連の本研究に御指導、御鞭撻を頂いた故 大星章一教授に心から感謝いたしますとともに御冥福をお祈りいたします。また感受性測定法について有意義な御助言を賜わり、OKAJIMA 株を分与していただいた国立がんセンター病院内科 下山正徳博士に深謝いたします。貴重な培養細胞株を快く分与していただいた東京大学医科学研究所外科 関口守正助教授、東京医科大学外科 井上仁博士、岡山大学医学部癌源病理 佐藤二郎教授、秋田大学医学部泌尿器科 加藤哲郎助教

授に厚く御礼申し上げます。なお、本研究は文部省がん特別研究費、厚生省がん研究助成金によって行なわれたことを付記し、謝意を表します。

本研究の一部は基礎医学研究会の補助をうけて行なわれた。

文 献

- 1) 本山悌一, 鈴木利光: 人癌培養細胞の *in vitro* 薬剤感受性試験。第1報。増殖測定法の適応と限界。Chemotherapy 28: 142~147, 1980
- 2) 本山悌一, 鈴木利光: 人癌培養細胞の *in vitro* 薬剤感受性試験。第2報。培養ヒト胃癌細胞の Mitomycin C および Carboquone に対する感受性。Chemotherapy 28: 148~153, 1980
- 3) KATO, T.; K. ISHIKAWA, R. NEMOTO, A. SENOO & Y. AMANO: Morphological characterization of two established cell lines, T 24 and MGH-U 1, derived from human urinary bladder carcinoma. Tohoku J. Exp. Med. 124: 339~349, 1978
- 4) PUCK, T. T. & P. I. MARCUS: Action of X-rays on mammalian cells. J. Exp. Med. 103: 653~669, 1956
- 5) 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
- 6) PUCK, T. T. & P. I. MARCUS: A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S. 41: 432~437, 1955
- 7) 下山正徳: 木村禎代二: 抗がん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: 人がん細胞培養株の化学療法への応用。医学のあゆみ 90: 273~283, 1974
- 9) NIAS, A. H. W.; C. W. GILBERT, L. G. LAJTHA & C. S. LANGE: Clone-size analysis in the study of cell growth following single or during continuous irradiation. Int. J. Rad. Biol. 9: 275~290, 1965
- 10) NIAS, A. H. W. & M. FOX: Minimum clone size for estimating normal reproductive capacity of cultured cells. Brit. J. Radiol. 41: 468~474, 1968
- 11) MAURO, F.; B. FALPA, G. BRIGANTI, R. ELLI & G. ZUPI: Effects of antineoplastic drugs on plateau-phase cultures of mammalian cells. I. Description of the plateau-phase system. J. Natl. Cancer Inst. 52: 705~713, 1974
- 12) EAGLE, H. & G. E. FOLEY: The cytotoxic action of carcinolytic agents in tissue culture. Am. J. Med. 21: 739~749, 1956

- 13) SMITH, C. G.; W. L. LUMMIS & J. E. GRANDY :
An improved tissue culture assay, I. Methodology and cytotoxicity of anti-tumor agents. *Cancer Res.* 99 : 843~846, 1959
- 14) SMITH, C. G.; W. L. LUMMIS & J. E. GRANDY :
An improved tissue culture assay. II. Cytotoxicity studies with antibiotics, chemicals, and solvents. *Cancer Res.* 19 : 847~852, 1959
- 15) LEITE, J.; A. R. BOURKE, D. B. FITZGERALD, M. M. MACDONALD, S. A. SCHEPARTZ, & I. WODINSKY : Screening data from the cancer chemotherapy National Service Center Screening Laboratories. XI. *Cancer Res.* 22 (Suppl.) : 919~1020, 1962
- 16) 梅田 誠 : 薬物の細胞毒性。医学のあゆみ 89 : 767~777, 1974
- 17) ALPER, T.; J. F. FOWLER, K. L. MORGAN, D. D. VONBERG, F. ELLIS & R. OLIVER : The characterization of the "Type C" survival curve. *Brit. J. Radiol.* 35 : 722~723, 1962
- 18) 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

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

Comparative Study on the Assay Methods

TEIICHI MOTOYAMA and TOSHIMITSU SUZUKI

First Department of Pathology, Niigata University School of Medicine

Comparative study on three kinds of assay method of *in vitro* drug sensitivity has been performed. Among them, the cloning assay has been revealed be most reliable as an *in vitro* drug sensitivity test, since the method can evaluate the reproductive capacity of individual cancer cells which were previously exposed to an anticancer drug. The cloning assay, however, has several limitations; the cell line to be applied should have such characteristics as almost 100% single cell rate, high colony forming rate and colony formation in proportion to the number of inoculated cells. Therefore, very few human cancer cell lines, in fact, are capable of employing this method. In that case, the regrowth assay, which requires much labor, should be recommended for *in vitro* drug sensitivity test, since this method is closely coincident with the cloning assay and can be employed in many cell lines which are not adaptable to the cloning assay. The growth inhibition method is quite unsuitable as an *in vitro* drug sensitivity test, since the value of IC_{50} by this method is changeable with the difference in the number of cells treated and with reference to the date of judgment. The value of IC_{50} seems to have relation to the growth rate of test cells. Drug sensitivity of cancer cells cannot be also estimated by their morphological changes after exposure to an anticancer drug.