



## マイクロプレート培養・生存細胞染色法による簡便な制癌剤感受性試験の開発

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-23 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 本郷, 輝明 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1306">http://hdl.handle.net/10271/1306</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 29号	学位授与年月日	昭和62年 7月17日
氏名	本郷輝明		
論文題目	マイクロプレート培養・生存細胞染色法による簡便な制癌剤感受性試験の開発		

## 論文の内容の要旨

多数ある制癌剤の中から腫瘍細胞に対する有効な薬剤を選択することは、治療をはかる上で非常に重要である。本研究は、制癌剤選択のためのスクリーニング法としてマイクロプレート培養・生存細胞染色法を開発し、種々の培養細胞株と臨床材料を用いてその有効性を検討することを目的として行った。

## 〔方法〕

1. 制癌剤の準備：各種制癌剤のうち1回の assay には16ないし18種を選び使用した。濃度は5段階希釈（1倍から $10^{-4}$ 倍）とした。1倍希釈とは常用量を静脈投与し、均等に循環血液中に拡散したと仮定したときの血中濃度を原則とした。
2. 腫瘍細胞：基礎実験には白血病細胞株であるMOLT-4, K-562, U-937を用いた。骨髓血等の浮遊性の臨床材料はFicoll-Paqueを用い通常比重遠心法にて分離し、95%以上腫瘍細胞であることを確認し使用した。
3. 培養方法：96穴マイクロプレートの各ウエルに腫瘍細胞と制癌剤を入れ、 $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  の条件下で2日及び4日間培養した。培養中制癌剤のwash outは行わなかった。
4. 生存細胞数算定法：培養後プレートを700G 5分間遠心し上清を急速に吸引し乾燥、99%メタノール固定後0.2% crystal violet 0.1 ml 分注し15分間染色した。染色後色素を洗い流し、1% sodium lauryl sulfate を0.2 ml/well 入れ30分静置させ溶出した crystal violet の吸光度を波長540 nm で測定した。Cytotoxicity index (CI) を次式により求めた。

$$\text{CI} (\%) = (1 - \text{制癌剤入り実験群の吸光度} / \text{対照群の吸光度の平均}) \times 100$$

## 〔結果〕

1. 細胞数と吸光度の関係：同じ細胞数でも細胞の種類により吸光度に差が認められた。しかし、同一細胞内では細胞数と吸光度は0.4～1.7の範囲で良い相関関係を示し、この範囲で吸光度から細胞数を予測することができた。また、各wellの細胞数を同一にし、死細胞と生存細胞の割合を種々に変え、吸光度は生存細胞数と比例関係にあることがわかった。
2. 白血病細胞株の制癌剤感受性試験：対照群の生存率も高く、吸光度は0.851～1.722の範囲にありすべて判定可能であった。CI 60%以上を感受性ありと設定し、3種類の細胞株の感受性一覧表を2日と4日で作成してみると、感受性の特徴が異なることがわかった。
3. 臨床例における検討：白血病・悪性リンパ腫15例（のべ24回）施行し、判定不能例はNHL 2例（リンパ節）、ALL初発例4例であった。これは培養開始2日目に対照群で死細胞が急速に増加するためであった。in vitro-in vivo ともに効果判定が可能であった16回の検討では、true positive rate 71%、predictive accuracy 69%で満足できる成績であった。また、より感度の高いMTT dye 還元法を開発し判定不能例を少なくし応用範囲を広げることができた。

## 〔考察と結論〕

本法の特徴は、(1)腫瘍に応じて多種類の制癌剤を選び、濃度別に感受性を調べることができること。(2)96穴マイクロプレートを使用することで培養が簡単になったこと。(3)培養期間を2点とることにより時間依存性制癌剤の評価も可能であること。(4)CI 60%以上をeffective rangeとして、制癌剤別、濃度別、培養日数別に一覧表を作成すると、制癌剤相互の比較が容易となり感受性のある制癌剤の選択が可能になったことである。

以上より本法は再発例の白血病・悪性リンパ腫や易遊離性固形腫瘍の制癌剤選択に有用な方法である。

## 論文審査の結果の要旨

申請者の研究の目的は多数の制癌剤の中から、腫瘍細胞に対して有効な薬剤を選択するための方法を開発し、白血病を中心とした小児癌に対して寛解治療を得るための、より効果のある化学療法を確立することである。そのために申請者は制癌剤選択のためのスクリーニング法としてマイクロプレート培養・生存細胞染色法を開発した。この方法を用いて種々の培養細胞株にて基礎的な検討を行い、臨床材料を用いた結果にて化学療法剤の有効性と治療効果の関連性を検討した。

この方法はマイクロプレートを用いるので同時に多数の制癌剤をスクリーニング出来る長所を持っている。1回の測定には16ないし18種を選び検索し濃度は5段階希釈(1倍から $10^{-4}$ 倍)として検索している。1倍希釈とは常用量を静脈投与し、均等に循環血液中に拡散したと仮定したときの血中濃度である。

腫瘍細胞は基礎実験には白血病細胞株であるMOLT-4, K-562, U-937を用いており、臨床例では骨髓血等の浮遊性の細胞を用いFicoll-Paqueを用い通常の比重遠心法にて細胞を分離し95%以上腫瘍細胞であることを確認し使用している。

測定方法は96穴マイクロプレートの各ウェルに腫瘍細胞と制癌剤を入れ、 $37^{\circ}\text{C}$  5% $\text{CO}_2$ の条件下で2日及び4日間と日数を変えて培養し、生存細胞数を算定してCytotoxicity Index (CI)とCI Tableを作成し制癌剤の効果を判定している。生存細胞数算定は培養後プレートを700G 5分間遠心し上清を急速に吸引し乾燥した後99%メタノール固定後0.2% crystal violetを0.1 ml分注し15分間染色し、その後、1%のsodium laurylsulfateにて溶出したcrystal violetの吸光度を波長540 nmで測定して求めている。生存細胞数は、ある吸光度の範囲で吸光度に比例するので容易にCytotoxicity Index (CI)を求めることが出来る。さらにこのCIが60%以上を感受性ありと判断し、濃度別、時間依存性別にCI Tableを作成して制癌剤の選択を容易とした。

申請者はこの方法を臨床例に応用し、True positive rateにて71%、予測値にて69%の満足すべき結果を得ている。更に感度のよいMTT法なども開発しこの方法を制癌剤スクリーニング法として確立すべき努力をしている。本研究は効率のよい制癌剤の簡便なスクリーニング法をCI Tableとして濃度別、時系列別に観察する方法を確立したこと、およびこのCI Tableを制癌剤の投与量、投与期間を推定する物差しとして臨床例に応用が可能であることを示したことで評価すべき論文である。従って審査委員は全員一致でこの論文を学位論文としてふさわしい論文と判定した。

論文審査担当者	主査	教授	菅野剛史		
	副査	教授	五十嵐良雄	副査	教授
	副査	教授	白澤春之	副査	助教授
					小出幸夫