

クリスタルヴィオレット取り込みを指標とした 簡便な制癌剤感受性試験

浜松医科大学産科婦人科学教室

藤井 俊朗 前田 真 川島 吉良

A Simple and Rapid Crystal Violet Uptake Sensitivity Test for Anticancer Agents

Toshiro FUJII, Makoto MAEDA and Yoshiro KAWASHIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu

概要 化学療法を成功させるために近年各種の制癌剤感受性試験が開発、実施されている。しかしそれらの方法も判定までに長時間を要したり、技術的に容易ではないなど実際の治療に役立つことは少ない。そこで今回我々は、従来の clonogenic assay 法などとは違い、短期間で判定でき、また放射性同位元素も使用しない簡便な制癌剤感受性試験を開発した。

方法：手術により得られた卵巣癌、絨毛癌の腫瘍組織からトリプシン処理にて、単一細胞浮遊液を作製した。この癌細胞浮遊液と制癌剤（4-hydroperoxy cyclophosphamide, Etoposide, Adriamycin, Cisplatinum）とを96wellのマイクロプレート内にて37℃、5%CO₂下で48時間培養した。培養終了後、上清を捨て、リン酸緩衝液（PBS）にて洗浄後、メタノール固定し、死細胞を除去した。制癌剤にて死滅せず、メタノール固定を受けた付着細胞をクリスタルヴィオレットにて染色した。更にラウリル硫酸を加え、染色された細胞を破壊し、上清中に溶出した色素量をオートリーダー（OD 540nm）にて測定した。吸光度の変化より制癌剤に対する感受性を判定した。

結果：

- 1) 本方法は制癌剤に対する感受性を $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ の少ない細胞数で、しかも48時間で判定可能であった。
- 2) 本方法による薬剤感受性の結果は isotope uptake を指標とした制癌剤感受性試験の結果と類似性を示した。
- 3) 卵巣癌19例、絨毛癌3例に本方法を施行し、薬剤に対する感受性を判定可能であったのは17例、77%であり、他の感受性試験に比べて高率であった。

Synopsis Hitherto, the selection of anticancer drug has been based on clinical experience. But to succeed for chemotherapy to succeed, effective drugs must be selected for individual patients with cancer.

- 1) We have developed the following new in vitro micromethod.
- 2) Method. In brief, tumor cells obtained by surgery were incubated with anticancer drugs for 48 hrs at 37°C in 5% CO₂ in a microplate. After incubation, the surviving cells were fixed with methanol and stained with crystal violet. Then the stained cells were solubilized with 1% lauryl sulfate and the absorbance of each well was measured at 540 nm with a multiscan spectrophotometer. In this method, cytotoxicity was quantitated by the absorbance.
- 3) The method is simple, rapid (48 hrs) and reproducible, and it requires only a small amount of cells ($5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$).
- 4) This method correlates well with sensitivity tests using isotopes.
- 5) We have examined the chemosensitivity of 22 specimens from gynecologic malignancies by this method. The success rate is 77% and higher than with any other in vitro method.

This method will be widely utilized in several fields of cancer treatment in the near future.

Key words: In vitro drug sensitivity test • Anticancer agent • Gynecologic malignant tumor

緒 言

近年各種の優れた制癌剤が開発され、婦人科悪

性腫瘍に対する化学療法も進歩を遂げている。しかし制癌剤は抗腫瘍効果のみならず、同時に正常

細胞に対する毒性をもつことから、更に化学療法による治療成績を向上させるためには個々の腫瘍に適した制癌剤を適確に選択し、使用することが必要である。そのために近年各種の制癌剤感受性試験が行われるようになった。特に Hamburger et al.⁶⁾⁷⁾及び Salmon et al.¹⁰⁾によつて報告された human tumor clonogenic assay は臨床との相関も認められ、広く実施されている。しかしその方法にも欠点がある。特に培養技術が容易ではなく、コロニーを形成しない腫瘍細胞には実施できない。判定に2週間と長時間を要するなどである。そこで今回我々は Takasugi and Klein¹¹⁾により報告された細胞性障害性試験の方法を応用した短期間で判定でき、実際の臨床に役立つ簡便な制癌剤感受性試験を開発した。そして本方法が臨床的に利用可能かどうか他の方法との比較をまじえ、検討した。

研究方法

1. 材料

本方法の基礎実験には当科で樹立した絨毛癌の培養細胞である SMT-CC1 を使用した。また本方法により実際に行つた感受性試験の材料としては、手術で摘出された卵巣癌19例、絨毛癌3例の腫瘍組織及び卵巣癌患者から採取された腹水細胞2例を用いた。

腫瘍組織を collagenase (ベーリンガー・マンハイム社) 2mg/ml, hyaluronidase (ベーリンガー・マンハイム社) 5 μ /ml, deoxyribonuclease (シグマ社) 0.2mg/ml を含んだ RPMI 1640 (日本製薬) 培養液中で細切。その後0.25%トリプシン (ディフコ社)+EDTA 溶液中で37 $^{\circ}$ C, 10分間処理、得られた細胞浮遊液を更に Ficoll-Paque[®] (フォルマシア社) に重層し、900 \times G, 20分間遠沈して死細胞と赤血球を除去した。得られた癌細胞浮遊液を RPMI 1640 で洗浄後、10% Fetal Calf Serum (FCS) (ギブコ社)+RPMI 1640+ペニシリン G カリウム100U/ml (明治製薬)+硫酸ストレプトマイシン 100 μ g/ml 中に生細胞数が $2.5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ /ml になるように調整した。腹水細胞及び培養細胞も数を調整し使用した。

2. 制癌剤

感受性を検討した制癌剤は Cyclophosphamide の活性型である 4-hydroperoxy cyclophosphamide (CPA), Etoposide (VP 16-213), Adriamycin (ADM), Cis-platinum (CDDP) の4剤を使用した。4剤はいずれも Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (250 μ l)+PBS (1,750 μ l) で溶解し1mg/ml の濃度の原液を作製し、制癌剤常用量の人体血中ピークレベル濃度を参考にして、PBS にて更に希釈して各 well あたりの濃度が0.1, 1, 10, 50 μ g/ml になるように調整した。

3. 方法

96well のマイクロプレート (コーニング社) 各 well あたりの卵巣癌及び絨毛癌の癌細胞浮遊液 100 μ l (細胞数 $2.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$) と各濃度に調整された制癌剤10 μ l, 更に10%FCS+RPMI 1640 培養液90 μ l を加え、合計200 μ l の容量として5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C の条件下で一定時間混合培養。培養終了後、各 well を PBS にて2回洗浄し、更に100%メタノールにて30分間固定して死細胞を除去した。固定された付着生細胞を0.2%クリスタルヴィオレット (メルク社) で15分間染色後、流水にて余分な色素を除去した。更に各 well に200 μ l の1% ラウリル硫酸を加え、細胞を破壊し、付着細胞に取り込まれていた色素を上清中に溶出させ、上清中の吸光度を OD 540nm にて測定した。吸光度の測定には Titertek Multiskan[®] MC (フロー社) を使用した (図1)。

なお実験はすべて triplicate で実施した。

4. ³H-thymidine uptake を指標とした方法

市橋ら³⁾の方法に準じて実施した。各 well あたり 1×10^4 の絨毛癌培養細胞 SMT-CC1 と制癌剤 (CPA, VP 16-213, ADM, CDDP) を上記の方法にて混合培養し、培養開始24時間後に ³H-thymidine (³H-TdR) を各 well あたり1 μ Ci ずつ添加し、その後更に24時間混合培養し、培養開始48時間後の腫瘍細胞への³H-TdR uptake を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

研究成績

(I) 絨毛癌培養細胞株 SMT-CC1 を使用して行つた基礎的実験

1. 細胞数と吸光度の関係

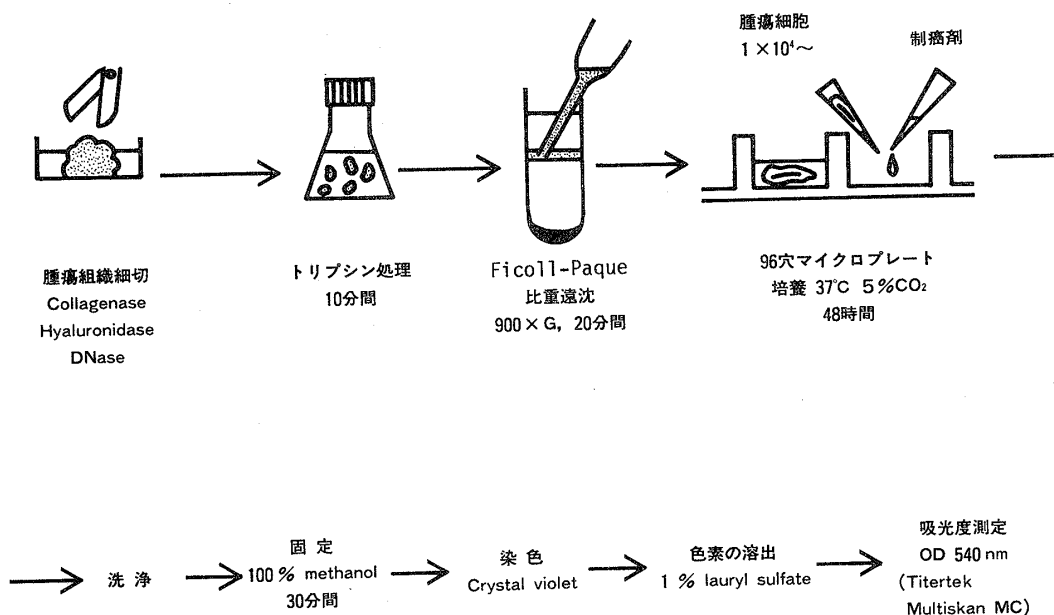


図1 方法

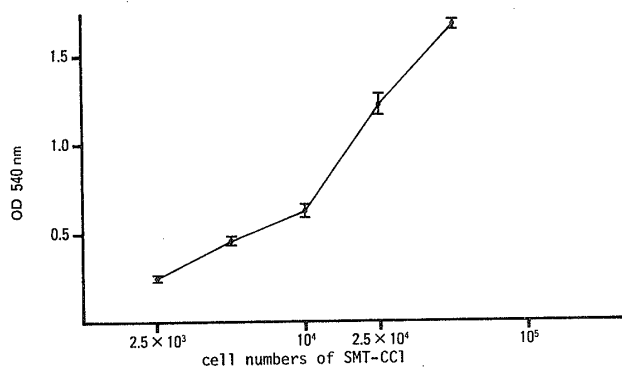


図2 生細胞数と吸光度の関係

マイクロプレート各wellに生細胞数を $2.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ に調整したSMT-CC1を上述の方法で単独に培養し、24時間後各wellの吸光度を測定した。吸光度と細胞数はほぼ正の相関を示した(図2)。このことより吸光度の値が付着している生細胞数を間接的に示し得ることが判明した。従つて測定された吸光度を以下の式に当てはめ、求められた値を%survivalとして薬剤の効果判定に使用した。

$$\%survival = \frac{\text{薬剤添加群の吸光度} - \text{培養液単独の吸光度}}{\text{薬剤非添加群の吸光度} - \text{培養液単独の吸光度}} \times 100$$

また吸光度の値より各wellの細胞数が $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ で十分であると判断し、以下の実験はそ

の細胞数で実施した。

2. 培養日数による感受性の変化

各wellあたり 1×10^4 のSMT-CC1と0.1, 1, 10 μ g/mlの濃度に調整したCPA, VP 16-213, ADM, CDDPの制癌剤と混合培養し、培養時間を12, 24時間, 2, 5, 7, 10日間と設定し、各時間での感受性を判定した(図3)。

各薬剤とも0.1, 1, 10 μ g/mlと濃度が上昇することにより%survivalは減少した。特に10 μ g/mlの濃度では著明な減少を認めた。0.1 μ g/mlの濃度では12及び24時間の短時間では各々の薬剤の効果に差が認められなかつた。しかし48時間の培養によつて各々の薬剤の効果に差が認められた。0.1 μ g/mlの濃度では、SMT-CC1はADM, VP 16-213, CPA, CDDPの順に感受性を示し、また1 μ g/mlの濃度ではADM, VP 16-213, CDDP, CPAの順に感受性を示した。そして培養開始48時間後にみられたこの傾向は培養時間を5, 7, 10日間と延長しても同様に認められた。10 μ g/mlの高濃度ではすべての薬剤に対して感受性を認めた。

以上のことより短期間で制癌剤に対する感受性を判定するためには48時間の培養で十分であることが判明した。よつて以下の本方法による感受性試験はすべて48時間混合培養にて行つた。

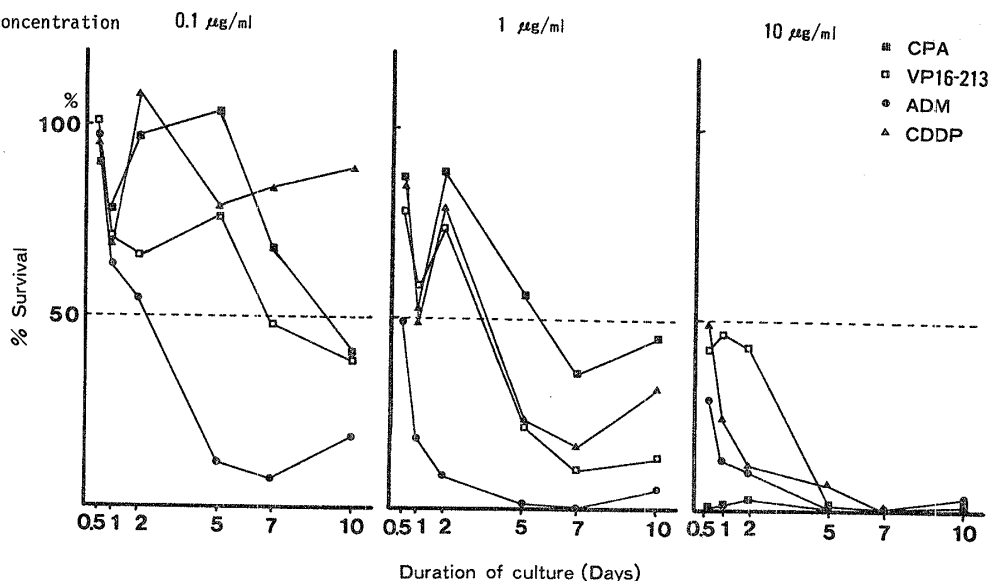


図3 培養日数による SMT-CC1 の制癌剤感受性の変化

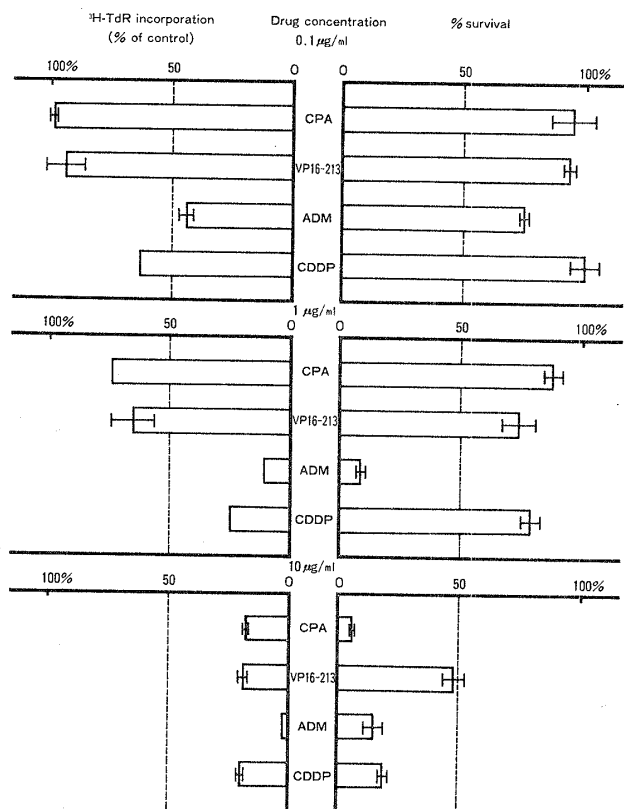


図4 本方法と³H-TdR uptake法との比較

3. ³H-thymidine(³H-TdR)uptake法との比較
SMT-CC1を使用して³H-TdR uptakeを指標とする感受性試験と本方法を同時に施行し、その結果を比較した(図4)。

%survivalにて表示してあるのが本方法による

結果である。0.1 μ g/mlの濃度では³H-TdR uptake法ではADM, CDDPに著明なDNA合成阻害を認めたが、VP 16-213, CPAにはあまり認めなかつた。本方法でもADMに最も細胞障害能を認めたが、その効果は他の薬剤同様低いものであつた。1 μ g/mlの濃度ではADM, CDDPに著明なDNA合成阻害を認めたが、本法ではADMにのみ強い細胞障害能を認めた。10 μ g/mlの濃度ではすべての薬剤に著明なDNA合成阻害を認めた。本法でも同様にすべての薬剤に細胞障害能を認めた。全体として³H-TdR uptake法では本方法に比べて薬剤の効果が強く表現されていたが、両者の結果は図の如く類似性を示した。このことより本方法が制癌剤の感受性を調べるのに、³H-TdR uptake法とほぼ同等の成績を得る方法であることが証明された。

(II) 本法による各種制癌剤の卵巣癌及び絨毛癌に対する感受性試験の結果

実際に上記の制癌剤との48時間混合培養法によつて感受性試験を実施したのは、卵巣癌19例、絨毛癌3例、計22例であつた。そのうち感受性を判定できたものは17例でsuccess rateは77%であり、他のassay法と比べても高率であつた。絨毛癌のsuccess rateは33%と低い値を示しているが、これは細胞浮遊液を作製する段階での失敗であり、卵巣癌も含めて、癌細胞浮遊液が作製でき

表1 対象症例別の成功率

	case	success rate
Ovarian carcinoma	19	16 (84%)
Source		
Solid	17	14 (82%)
Ascites	2	2 (100%)
Site		
Primary	15	13 (87%)
Metastasis	4	3 (75%)
Choriocarcinoma	3	1 (33%)
Total	22	17 (77%)

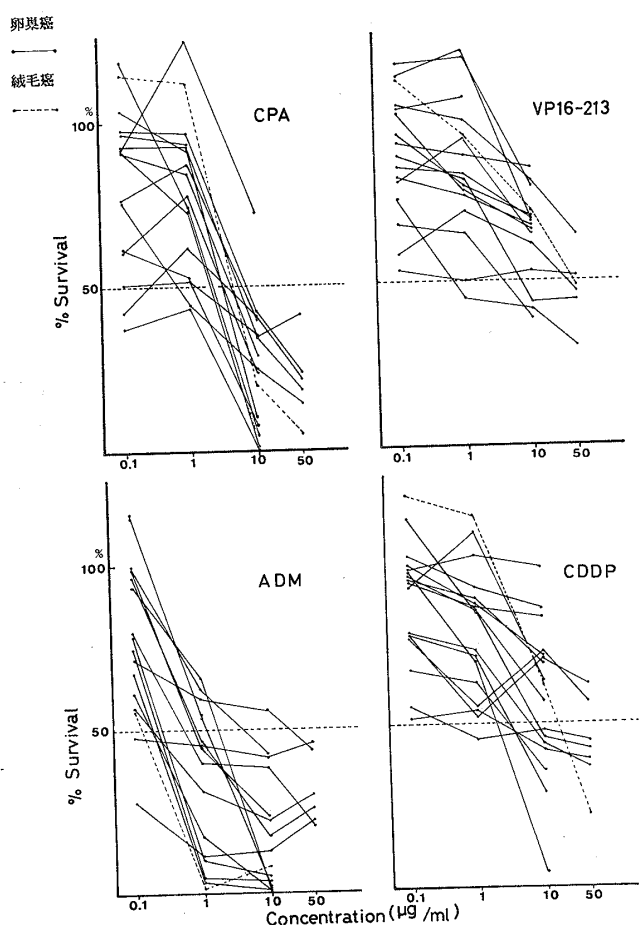


図5 本方法による薬剤別感受性の結果

れば本方法の success rate は17例中17例, 100%であった。なお卵巣癌の組織型は adenocarcinoma 8例と最も多く, 次いで embryonal carcinoma 3例, Krukenberg 3例その他各1例ずつであった(表1)。

次に本方法を実施し, 制癌剤に対する感受性判定可能であった17症例の結果を薬剤別に示す(図

5)。CPA に関しては0.1, 1 μ g/ml の低濃度では症例によつて異なつた感受性を示したが, 臨床での常用量から考えて感受性を判定するのに妥当だと考えられる10 μ g/ml の濃度では, ほとんどすべての症例が感受性を示した。VP 16-213 に対しては薬剤の濃度が高くなつても, どの症例もあまり感受性を示さなかつた。ADM に対しては常用量から考えると0.1 μ g/ml の濃度で感受性を判定するのが妥当だと考えられるが, この濃度では感受性を示す症例は少なかつた。しかし投与方法が工夫され, より高濃度の投与が可能となれば ADM の制癌作用はより期待できるものと判明した。CDDP に対しては予想に反して高濃度でも感受性を示す症例は少なかつた。

以上のことより同じ種類の癌でも各薬剤に対する感受性には違いのあることが明らかとなり, 治療を行ううえで感受性試験の必要性が再確認された。なお実際に臨床で使用する薬剤は, 常用投与量でのヒトの血中濃度を参考にして, この感受性試験の結果より選択した。

考 案

制癌剤の感受性試験は以前より種々の方法が行われてきたが, *in vivo* による方法と *in vitro* による方法との二つの方法に大別できる。*In vivo* のものとしてはヌードマウスにヒト癌も移植して行う方法などが行われているがヒト癌のヌードマウスへの生着率の低さや判定までに長時間を要するなどの欠点のため実際の臨床に役立つことは少ない。*In vitro* のものとしては, 1954年 Black et al.⁵⁾ によつて発表され, その後 SDI 法 (Succinic Dehydrogenase Inhibition Test) に発展した代謝, 酵素活性の障害を指標とする方法。Wright et al.¹²⁾ の形態の変化を直接見る方法。また Bickis et al.⁴⁾ および東ら¹⁾ によつて始められた放射性同位元素を用いて行う方法などがあつた。特に1977年 Salmon et al.¹⁰⁾ および Hamburger et al.⁶⁾ によつて human tumor clonogenic assay 法が開発されるや世界的に注目を浴び, 臨床の成績と相関を認めるため今や各施設で行われるようになってきた。しかしこの方法にもいくつかの欠点がある。たとえば培養方法など手技が簡単ではない。判定

にまで2週間と長時間を要するなどである。そこで今回我々は本郷ら²⁾との共同開発で、それらの点を改善したより簡単で、応用範囲の広い方法を開発した。この方法は Takasugi and Klein¹⁾によつて報告された免疫担当細胞による細胞障害能を検定する方法に基づいている。つまりプレートに付着する性質を持った癌細胞が付着能を持たないリンパ球らによつて攻撃を受けると、障害を受けた癌細胞のみがプレートより剝離するという原理に基づいた方法である。Ruff et al.⁹⁾はその Takasugi and Klein の方法を改善し、細胞障害能を従来の直視下で、細胞の viability を調べて判定するのではなく、色素取り込み量の違いによつて判定する方法を導入した。付着している癌細胞に取り込まれた色素をラウリル硫酸による細胞の破壊によつて上清中に遊離せしめ、その量を吸光度によつて測定するという方法である。つまり吸光度が高いほど遊離する色素量が多いわけで、このことは制癌剤による障害を受けずにプレートに付着している癌細胞が多いことを示しているのである。もちろんこの方法では各細胞間及び viability の違いによる染色率の差は存在するが、1回毎に未処置癌細胞群の吸光度をコントロールとしてとることによつて%survival におよぼす影響は除外できる。Ruff et al.⁹⁾はこの方法を TNF (tumor necrosis factor) の測定に利用した。今回我々は免疫担当細胞や TNF のかわりに制癌剤を使用し、この方法を制癌剤感受性試験として応用し、実施した。

本方法の特徴を以下に述べる。

- ① 少量の癌細胞で実施できる。マイクロプレートを使用した方法で、一つの薬剤に対する感受性を調べるのに $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個の細胞でよい。
- ② 48時間という短時間で判定できる。
- ③ 手技が簡単である。吸光度の測定も ELISA auto reader の使用により簡単、迅速にできる。
- ④ 放射性同位元素を使用しなくてもよい。
- ⑤ コロニーを形成しない細胞でも実施でき、また応用範囲も広く、免疫的、物理的な刺激に対する癌細胞の感受性を調べる検査などにも利用できる。

しかし本方法は³H-TdR uptake を指標とする方法に比べると感度が低いという性質も持つている。この感度の違いは³H-TdR uptake 法は DNA 合成能のある細胞をみており、本法は生細胞をみているので、前者において障害度が強く表現されているためと考えられる。

今後の検討課題としては以下のものがある。まず、いかにしてより純粋な癌細胞浮遊液を得るかということである。我々は Mazumder et al.⁸⁾の報告した、Percoll 濃度勾配による比重遠沈法も試みたが、よい結果を得ることはできなかつた。Ficoll-Paque を使つた比重遠沈は死細胞や赤血球を除去するにはよい方法であるが、リンパ球などのcontaminationは避け難い。またpurificationに重点を置き、多くの操作を繰り返せば cell viability はそれだけ悪化するという事実が存在し、この点を解決するのは今後の課題であり、in vitro の感受性試験を成功させるうえでも重要な点であると考えられる。我々は毎回得られた細胞浮遊液を染色固定し、癌細胞の含有率が50%以上であることを確認している。次に制癌剤との接触方法に関してである。Clonogenic assay などは1時間の接触だけで判定しているが、本方法は48時間の連続接触で行つている。いずれの方法がよいのかは制癌剤の作用機序による違いや生体内での動態の違いなど調べ、検討していかなければならない。最後に本方法による感受性試験の結果と臨床成績との相関についてである。Clonogenic assay がその複雑な手技にもかかわらず、広く行われているのは臨床成績との高い相関をもつためであり、制癌剤感受性試験においては最も必要なことである。現在我々は本方法を実施して、その結果より制癌剤を選択、使用した症例を増やしており、検討中であるが、その成績は期待できるものであると考えている。

稿を終えるに臨み、本研究について御教示をいただいた本学微生物学教室吉田孝人教授、原口惣一助手、また本学小児科学教室本郷輝明講師に謝意を表します。

本論文の要旨は第44回日本癌学会総会および第37回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

1. 東 弘, 天方大弼, 梶 正博, 高井新一郎, 神前五郎: 核酸合成の阻害効果を指標とした制癌剤感受性試験, INAS 法について, 最新医学, 33: 2263, 1978.
2. 本郷輝明, 水野義仁, 原口惣一, 吉田孝人: 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, 癌と化療, 13: 247, 1986.
3. 市橋秀仁, 近藤達平: Isotope Uptake を指標とした感受性試験, 癌の臨床, 30: 1130, 1984.
4. Bickis, I.J., Henderson, I.W.D. and Quastel, J. H.: Biochemical studies of human tumors. II. In vitro estimation of individual tumor sensitivity to anticancer agents. *Cancer*, 19: 103, 1966.
5. Black, M.M. and Speer, F.D.: Further observations on the effects of cancer chemotherapeutic agents on the in vitro dehydrogenase activity of cancer tissue. *J. Natl. Cancer Inst.*, 14: 1147, 1954.
6. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197: 461, 1977.
7. Hamburger, A.W., Salmon, S.E., Kim, M.B., Trent, J.M., Soehnlen, B.J., Alberts, D.S. and Schmidt, H.J.: Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar. *Cancer Res.*, 38: 3438, 1978.
8. Mazumder, A., Grimm, E.A., Zhang, H.Z. and Rosenberg, S.A.: Lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocyte activated in vitro with lectins. *Cancer Res.*, 42: 913, 1982.
9. Ruff, M.R. and Gifford, G.E.: Purification and physico-chemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, 125: 1671, 1980.
10. Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnlen, B., Durie, B.G.M., Alberts, D.S. and Moon, T.E.: Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. *New Eng. J. Med.*, 298: 1321, 1978.
11. Takasugi, M. and Klein, E.: The methodology of microassay for cell-mediated immunity. In *In Vitro Methods in Cell-Mediated Immunity* (eds. B.R. Bloom and P.R. Glade), 415. Academic Press, New York, 1971.
12. Wright, J.C., Cobb, J.P., Gumpert, S.L., Colomb, F.M. and Safadi, D.: Investigation of the relation between clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. *New Eng. J. Med.*, 257: 1207, 1957.

(No. 6019 昭61・8・5 受付)