

[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
— 一般論文 —
18(6) 620—628 (1992)

制癌剤感受性試験, XTT を用いた SDI (Succinic Dehydrogenase Inhibition) Test の基礎的研究†¹

佐藤嘉孝^{*a)}, 佐藤晴源^{a)}, 石川 幸^{b)}, 立松 輝^{c)}, 近藤達平^{c)}

公立学校共済組合東海中央病院薬剤部†^{a)}, 同検査科†^{b)}, 同外科†^{c)}

A Fundamental Study of Tumor Sensitivity Test, SDI (Succinic Dehydrogenase Inhibition) Test Using XTT

YOSHITAKA SATO^{*a)}, HARUTOMO SATO^{a)}, MIYUKI ISHIKAWA^{b)},

AKIRA TATEMATSU^{c)}, TATSUHEI KONDO^{c)}

Department of Pharmacy†^{a)}, Department of Laboratory†^{b)}, Department of Surgery†^{c)},
Tokai Central Hospital

(Received July 4, 1992)
(Accepted July 21, 1992)

Tumor sensitivity assays have been widely reported, and we have been performed SDI (succinic dehydrogenase inhibition) test using MTT. In this paper we have studied this test fundamentally by the use of a new synthesized tetrazolium salt, XTT. The assay is performed with 96-well microplates. In the assay using XTT, addition of appropriate concentration of PMS (phenazine methosulfate) to XTT results in a marked increase in optical density and continues to increase with reaction time, which means XTT is less toxic to cells than MTT. Therefore, we have studied from time to time the possibility of evaluation with a little number of cells comparing with MTT assay. Tumor cells used in this experiment are Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma, NUGC4 and SW13 as human cell lines.

In result, when we incubate tumor cell over 20-h with XTT, we are able to evaluate sufficiently with a little number of cells, and we studied I.I. (Inhibition Index) of each drug (MMC, ADM, CDDP). XTT assay is easy to be influenced by pH and requires the use of medium contained buffer. Formazan formed from XTT is soluble in water, so that XTT assay does not require DMSO (dimethyl sulfoxide), but the problem is the measure of colored drugs for example ADM etc. It is thought that XTT is a useful tetrazolium salt and the assay is simple and able to evaluate with a little number of cells.

Keywords—SDI test; MTT; XTT; PMS; DMSO

緒 言

†¹ 本報は, 日本癌学会第50回総会(東京, 1991年9月)で発表.

†^{a~c)} 岐阜県各務原市蘇原東島町4-6-2; 4-6-2, Higashijima, Sohara, Kagamihara-shi, Gifu, 504 Japan

近年, 悪性腫瘍に対する化学療法の進歩は著しいが, その成績は一部の例外を除いては極めて不十分である. また, 制癌剤を投与するに当たって腫瘍の制癌剤感受性は, 腫瘍の発生した臓器によ

りある程度の傾向を示すが腫瘍の組織像とは関係なく、同じ臓器の同じ組織像に分類される腫瘍でも、薬剤効果がまちまちである。したがって、癌化学療法を行う際に重要なことは、有効な薬剤を選択して使用し、より臨床効果を高めるとともに、いたずらに無効な薬剤を使用しないことである。この目的のために、現在種々の制癌剤感受性試験法が検討されている。このうち、近藤ら^{1,2)}が発表した *in vitro* の制癌剤感受性試験 SDI (succinic Dehydrogenase Inhibition) test は、tetrazolium 塩が生きた癌細胞内コハク酸脱水素酵素により formazan に還元される反応を利用して、制癌剤の効果を調べる方法であり、近藤らはこの tetrazolium 塩として TTC^{注1)}を用いた。その後感度が高い MTT^{注2)} が合成されると共に、斉藤ら³⁾ や Mosmann⁴⁾ が MTT を用いた SDI 法を発表し、現在欧米でも盛んに検討されている⁵⁻⁸⁾。最近、新しく XTT^{注3)} が合成され、Scudiero ら⁹⁾ が XTT を用いた方法を発表した。

今回、我々は XTT を用いた SDI test を施行し、MTT を用いたそれと実験腫瘍にて基礎的に比較検討し、さらに XTT の特性を生かした少細胞数での評価が可能かどうか実験的検討を加えたので報告する。

注1) TTC : 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

注2) MTT : 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide

注3) XTT : 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide

実験材料及び方法

実験に用いた腫瘍細胞は、ddYマウス腹腔内に継代移植した Sarcoma-180 細胞と Ehrlich 癌細胞、そして名大第二外科より譲り受けたヒト胃癌株 NUGC4 と大腸癌株 SW13 である。NUGC4 と SW13 の cell line は RPMI 1640+20% FCS で培養し週に1回培養液を交換している。MTTはシグマ製薬より、XTTはPolysciencesより入手した。制癌剤は mitomycin C(MMC), adriamycin (ADM), cisplatin (CDDP)を用いた。MMC, ADMは協和発酵^株より CDDPは

日本化薬^株より購入し、RPMI 1640+20% FCS で各々の濃度に希釈した。

MTT, XTT assay 両法とも、腫瘍細胞を RPMI 1640+20%FCS (50×10⁴cells/ml) に浮遊させ 96well cell culture plate に100μl ずつ分注した後、制癌剤 (100μl) を加え、5%CO₂ incubator 内で 37°C で48時間培養した。以上の操作はクリーンベンチ内で無菌的に行う。

MTT assayでは、48時間培養後制癌剤をPBS (phosphate buffered saline) で wash out し沈渣に MTT 試薬 (MTT 4mg/ml+0.1M コハク酸 Na) を 20μl 加え 37°C で3時間 incubate した。その後 DMSO (dimethyl sulfoxide) 150 μl を加え生成した MTT formazan を抽出した。次いで ELISA reader を用いて波長 540nm で測定後、Inhibition Index (以下I.I.) を算出した。

XTT assay は Scudiero の方法に準じた。すなわち、培養後 XTT 試薬 [XTT 1mg/ml+PMS (phenazine methosulfate) 0.025mM] を加え、37°C で3～4時間 incubate し生成した XTT formazan を波長 450nm で測定し I.I. を算出した。XTTに加える PMSの濃度を、Table 1 に示すように S-180 細胞と Ehrlich 癌細胞を用いて検討した。すなわち、腫瘍細胞浮遊液と制癌剤を 5% CO₂ 条件下で 37°C で48時間培養後、XTT 試薬 (XTT+PMS) を加え 37°C で4時間 incubate し吸光度を測定した。XTTはそれ自体では感度が低い、促進剤である PMS を加えてやると XTT の感度が増す。PMS の濃度を 0.0 mM～0.05mM へと変化させると、各腫瘍細胞とも PMS の濃度と共に吸光度も増加した。評価しうる数値、backgroundの上昇も考慮に入れPMSの最良の濃度は、0.01mM～0.025mM と考えられ、本実験では 0.025mM の濃度を使用した。XTT formazan は2個の陰イオンを持ち水溶性であるため MTT assay と異なり、遠心分離、上清除去および DMSO (dimethyl sulfoxide) による抽出操作が不要でありそのまま測定が可能である。

なお、両 assay とも細胞数と incubation time

Table 1. 各 PMS 濃度における XTT の吸光度

Cell line	Cell density ×10 ³ cells/well	XTT			
		0.0mM	0.01mM	0.025mM	0.050mM (PMS濃度)
S-180	50	0.036	0.116	0.145	0.218
	100	0.058	0.245	0.736	1.559
Ehrlich carcinoma	50	0.036	0.093	0.108	0.167
	100	0.062	0.204	0.654	1.211
Background		0.244	0.260	0.263	0.316

• incubation : 4hr. 37℃

• 各データの数値はbackgroundを引いたものである。

の関係を検討するため、Optical Density(O.D.)
を incubation time 24時間まで比較測定した。

制癌剤感受性の判定には、control (a-m) に
対する制癌剤添加細胞の酵素活性抑制率 Inhibi-
tion Index (I.I.) を次式で求めた。

$$I.I. = a - p / a - m \times 100(\%)$$

a : 制癌剤非添加細胞 + MTT or XTT

p : 制癌剤添加細胞 + MTT or XTT (制
癌剤作用)

m : background

実験結果

1. 吸光度と生細胞数との関係

S-180 細胞と Ehrlich 癌細胞を用い、MTT
assay と XTT assay を各種細胞数 (5~100×
10³ cells/well) で比較すると Fig. 1 のように
吸光度と生細胞数の間には正の相関があった。ま
た、XTT assay は MTT assay よりも感度が
高く、細胞数が少ない場合でも評価できると思わ
れる。

2. 少数細胞で長時間 incubate した時の吸光

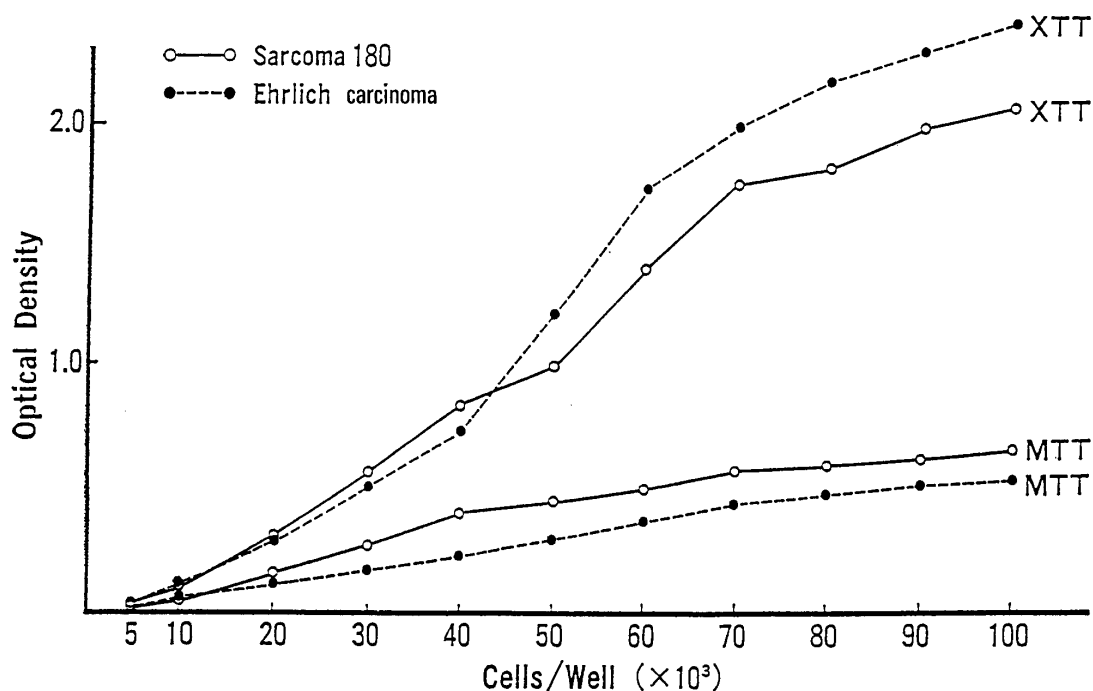


Fig. 1. 細胞数と吸光度の関係 (Sarcoma-180 細胞, Ehrlich 癌細胞)

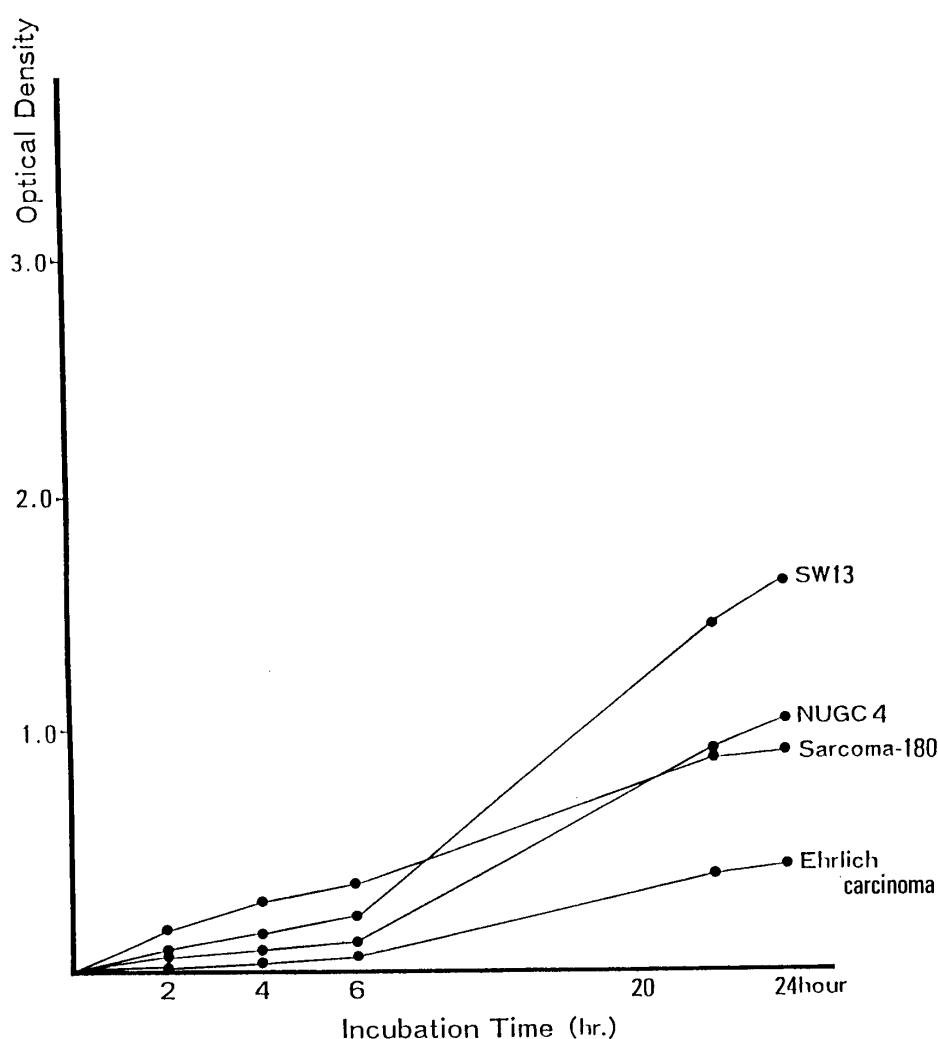


Fig. 2. 各種瘍 (S-180, Ehrlich carcinoma, NUGC4, SW13) における少細胞数 (5×10^4 cells/ml) の XTT 反応時間と O.D. 値の関係

度 (a-m)

XTT assay は MTT assay より感度が高く、その特性をいかした少数細胞での評価が可能かどうか検討した。XTT を用いた場合 6 時間までは値が低い、細胞数 5×10^4 cells/ml でも 20 時間以上 incubate することにより更に高度な判定が可能となる。Ehrlich 癌細胞、および NUGC 4, SW 13 等の cell line についても同様の結果を得た (Fig. 2)。

3. 反応時間と吸光度の関係

S-180細胞の各細胞数における XTT assay と MTT assay の反応時間と吸光度の関係を Fig.3 に示す。反応時間を 0~24 時間と変化させると XTT assay は MTT assay より感度が高く、細胞数が少なくても反応時間が長くなるとともに吸光

度が増し、24 時間も増加を示したが、MTT assay では 3~4 時間後にはプラットに達した。すなわち、 50×10^4 cells/ml を用いた MTT assay と同じ値は XTT assay ではその 1/10 の 5×10^4 cells/ml で長時間 incubate することにより得られる。細胞に対する毒性は、MTT に比して XTT および XTT formazan は少ないと考えられる。

4. XTT 反応時間と I.I. の関係

S-180細胞を用いて XTT 反応時間(2~24 時間)と I.I. の関係について検討した。細胞数 10×10^4 cells/ml で薬剤 3 種 3 濃度において実験を行った。Fig. 4 に示すように MMC, CDDP については各濃度とも反応時間に関係なく一定であったのに対して、ADM については 6 時間までは不安定であったが 20~24 時間ではやや安定していた。

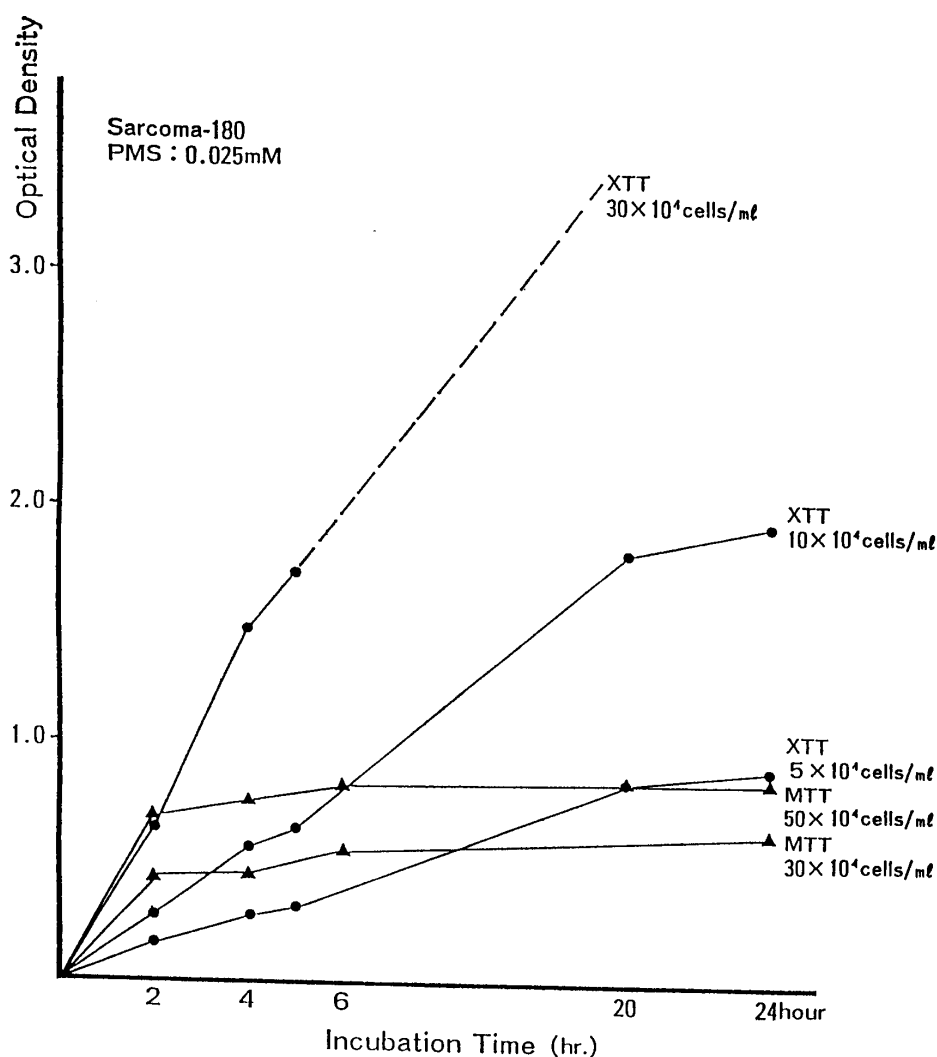


Fig. 3. 各細胞数における MTT assay と XTT assay の反応時間と O.D. 値の関係

これは XTT assay の操作上薬剤を wash out しないため ADM の色が影響していると思われる。したがって Fig. 2 で示されるように、吸光度が低い 2～6 時間までは ADM の色の影響を受けやすく、薬剤濃度の低い 1 μ g/ml の方が薬剤濃度の高い 30 μ g/ml よりも I.I. が高くでる傾向があり、吸光度が十分得られる 20～24 時間では安定した値が得られた。

5. 細胞数と I.I. の関係

S-180 細胞を用いて細胞数 10 $\times$ 10⁴～50 $\times$ 10⁴ cells/ml で各薬剤における I.I. を算出した。Fig. 5 に示すように MMC, CDDP についてはそれぞれの濃度において細胞数に関係なくほぼ一定の値を示したが、ADM については 10 $\times$ 10⁴ cells/ml で I.I. が低かった。これは細胞数が少

ないため 4 時間では十分な吸光度を得ることができず ADM の色が影響してくると思われる。

6. 薬剤濃度と I.I. の関係

Fig. 6 は XTT assay において少数細胞で長時間反応させた場合と多細胞で短時間反応させた場合の各薬剤濃度における I.I. (%) の比較を示す。

S-180 細胞で XTT を用いて 5 $\times$ 10⁴ cells/ml で 22 時間反応させた場合と 30 $\times$ 10⁴ cells/ml で 4 時間反応させた場合と比較すると各薬剤濃度の I.I. はほぼ同じである。これは Fig. 4, 5 で示すように I.I. は XTT 反応時間や細胞濃度に影響されないことによる。Ehrlich 癌細胞、および NU GC4, SW13 等の cell line についても実験を行ったがほぼ同様の結果を得た。しかし ADM については若干問題が残った。

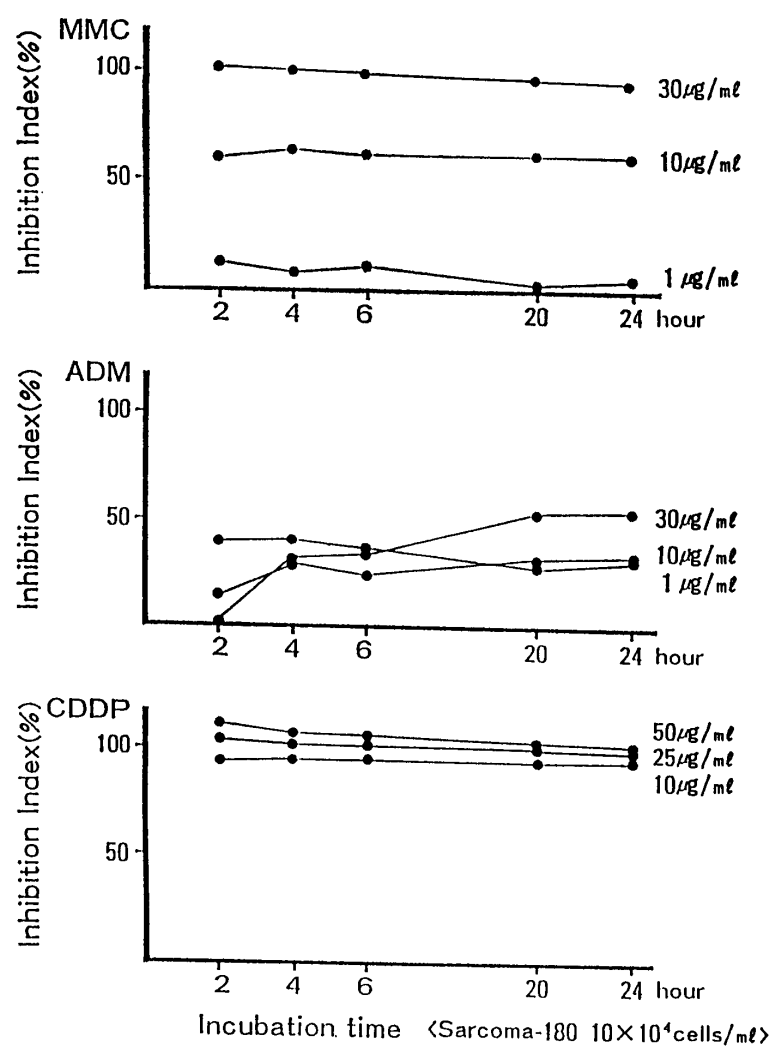


Fig. 4. XTT 反応時間と I.I. (%) の関係

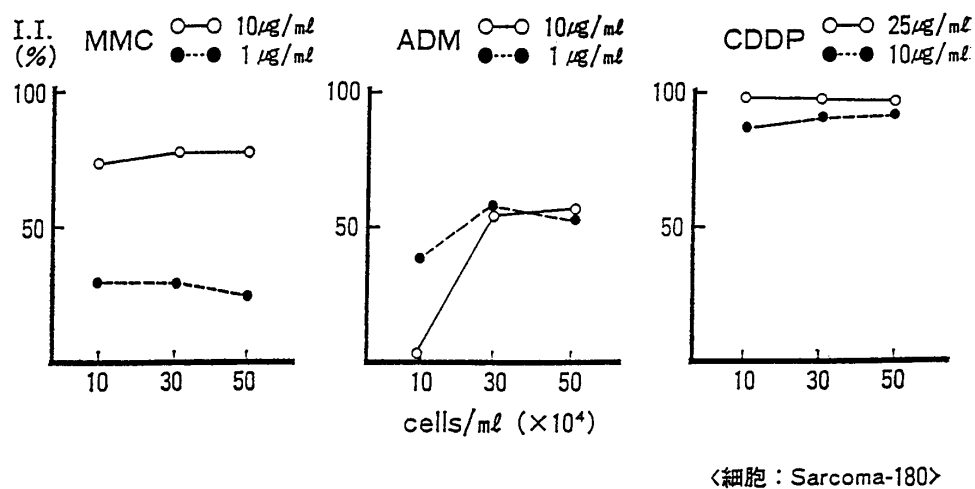


Fig. 5. XTT assay における細胞濃度と I.I. (%) の関係

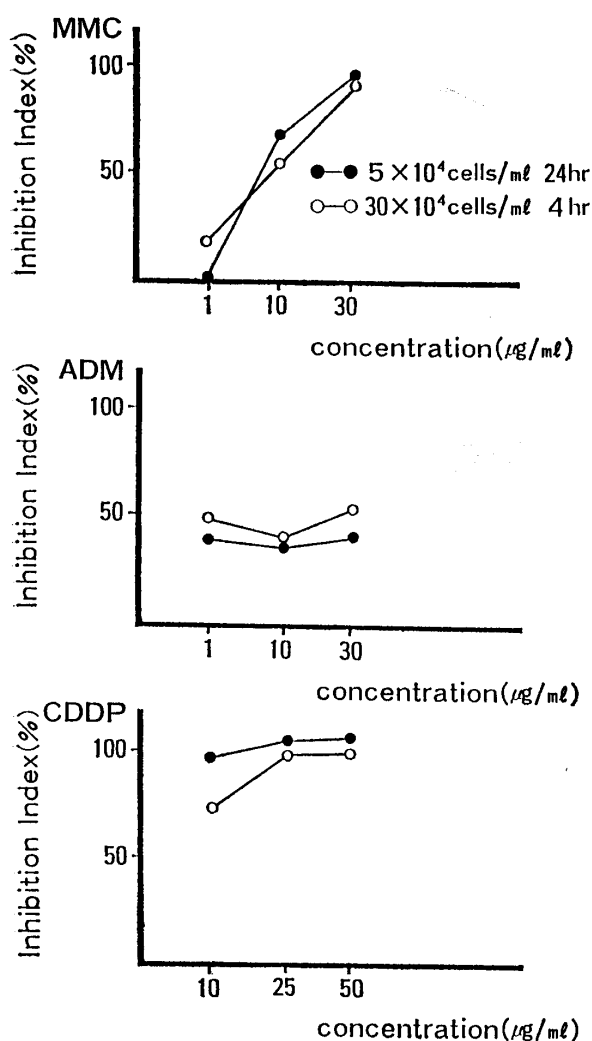


Fig. 6. 薬剤濃度と I.I. (%) の関係
(Sarcoma-180)

7. **XTT assay** に影響を及ぼす因子について
血清の影響をみるために培養液として Gibco
RPMI 1640 with HEPES buffer と日水製薬

RPMI 1640 with HEPES buffer を用い、それ
それに対し Gibco の FCS と片山化学の FCS を
加えて検討したが、その影響はほとんど認められ
なかった。培養液による変化は日水 RPMI 1640,
日水 RPMI 1640 with HEPES buffer および
Gibco RPMI 1640 with HEPES buffer を用い
て比較したが、Gibco RPMI 1640 with HEPES
buffer を使用したものが最も高く感度が高かった
(Table 2)。これは、pHの変動がほかの medium
よりも少ないためと思われる。すなわち medium
の pH の変動を 6.4~9.0 に変化させて O.D. 値を
測定すると pH 7.4 付近では最も酸性側、アルカ
リ性側では低くなっている。また各 medium で
S-180 細胞の培養前後の pH の変動を見ると bu-
ffer を入れない場合の培養後の pH は培養前に比
べ、1.00 以上変動するのに対して buffer を入れ
た場合は変動が少ない。MTT についても同様の
実験を行ったが、血清、pH の影響はほとんどな
かった。

考 察

近藤ら^{1,2)} により開発された SDI test は、腫
瘍細胞と制癌剤を一定時間接触させた後にその細
胞活性を酵素的に測定するものであり、制癌剤感
受性試験短期培養法の中では感度が高く比較的よ
く用いられ、臨床的にもその有用性が報告されて
いる¹⁰⁾。SDI test の特徴をあげると、1)簡便で
再現性があること、2)数量的に判定され判定が客
観的であること、3)評価率が高いこと、4)迅速に
結果が得られること、5)多数の検体を処理できる

Table 2. 培養液の違いの XTT assay への影響

細胞: S-180		数値: O.D. 値		
cells/ml		MTT (4hr.)	XTT (4hr.)	XTT (24hr.)
		30 × 10 ⁴	30 × 10 ⁴	5 × 10 ⁴
	日水 RPMI 1640	0.634	0.760	0.855
	日水 RPMI 1640 with HEPES buffer	0.610	0.952	0.706
	Gibco RPMI 1640 with HEPES buffer	0.682	1.423	1.390

こと、6)多くの制癌剤を比較検討できること、7)経済的に負担が少ないことなどをあげることができる。問題点としては、1)固形腫瘍の場合、腫瘍細胞と正常線維芽細胞との分離が困難であること、2)時間依存性の薬剤の判定法が確立されていないこと、3)masked compound の薬剤の判定ができないことなどがある。この方法は、酵素活性測定に用いる tetrazolium 塩として MTT が広く用いられているが、その後新しく合成された XTT が PMS (0.01~0.025mM)を加えることにより非常に高い感度を有することが報告され、これを用いて MTT assay との比較検討を実験腫瘍で行った。

XTT・MTT ともに水溶液であるが、その formazan は MTT がイオン化されていないのに対し、XTT は2価の陰イオンをもつため、水溶性である。すなわち、XTT を用いて SDI test を行うに当たり、MTT の時に行う遠心分離操作や DMSO を用いた formazan 抽出などの操作は不要になる。また XTT を用いる SDI test では24時間後も吸光度の増加を示すが、一方 MTT では3~4時間後にプラトーに達することから、XTT および XTT formazan は MTT に比し細胞毒性が弱いと考えられる。すなわち、MTT assay は約 50×10^4 cells/ml の細胞数で測定されるが、XTT assay では 5×10^4 cells/ml で20時間以上 incubate することにより測定可能となり、XTT assay は約10倍の感度を有することになる。臨床例では採取出来る組織量が限られていることが多く、出来るだけ少ない組織量で判定できる感受性試験が望ましい。この点 XTT を用いた SDI test は有用な感受性試験と考えられる¹¹⁾。しかし、XTT では促進剤である PMS を加えないと感度が上がらず、このため background が高くなるという欠点がある。tetrazolium 塩を用いた感受性試験法には、細胞の採取法、正常細胞の混入および制癌剤(特に ADM)の色による影響等解決すべき点があり、これらは他の感受性試験にも共通の問題であるが、今後検討していく必要がある。

臨床効果との相関については、SDI test の成績

との間にはある程度の相関があるとする報告¹²⁻¹⁶⁾が多い。各種の感受性試験についてその成績と臨床効果とを対比した今までの文献をまとめた報告^{17,18)}によると、感受性試験法で有効、臨床で有効であったもの61~69%、試験法で無効、臨床で無効なもの91~97%である。これは現在の感受性試験法にはまだまだ多くの問題点があり、制癌剤の有効性を十分正確には予測ができないが、無効なものはほとんどすべて予測し排除できることを示している。したがって、感受性試験は癌化学療法を行う際の前提条件として広く臨床時に用いられるべき方法と考えられる。

謝辞 稿を終えるにあたり、ご協力いただきました Roche 研究所 八木康夫所長、協和発酵工業株式会社 我妻 諒、今井良二両氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 近藤達平, 最新医学, 19, 2304-2311 (1964).
- 2) Kondo, T., Imamura, T. and Ichihashi, H., *Gann*, 57, 113-121 (1966).
- 3) Saito, K., Sasada, H., Natsuno, T., et al., *J. Jpn. Cancer Chemother.*, 7, 1952-1985(1980).
- 4) Mosmann, T., *J. Immun. Methods*, 65, 55-63 (1983).
- 5) Twentyman, P.R., and Luscombe, M., *Br. J. Cancer*, 56, 279-285 (1987).
- 6) Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D. L., Abott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R. H., and Boyd, M.R., *Cancer Res.*, 48, 589-601 (1988).
- 7) Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A. F., Minna, J.D., and Mitchell, J.B., *Cancer Res.*, 47, 936-942 (1987).
- 8) Cole, S.P.C., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 17, 259-263 (1986).
- 9) Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M.J., Seniff, D., and Boyd, M.R., *Cancer Res.*, 48, 4827-4833 (1988).
- 10) 近藤達平, 市橋秀仁, "SDI 法による感受性試験", 近藤達平編, 金原出版, 東京, 1985, p.74-89.
- 11) 近藤達平, 立松 輝, 佐藤嘉孝, 石川 幸, 癌と化学療法, 18, 123-126 (1991).
- 12) Knock, F.E., 最新医学, 33, 2180-2187(1978).

-
- 13) 梶山 稔, 最新医学, **33**, 2248-2253 (1978).
 - 14) 正田明德, 酒井克治, 宮口正美, 藤本幹夫, 最新医学, **24**, 1796-1798 (1969).
 - 15) 市橋秀仁, 近藤達平, 最新医学, **33**, 1485-1487 (1978).
 - 16) Hongo, T., Fujii, Y. and Igarashi, Y. *Cancer*, **65**, 1263-1272 (1990).
 - 17) Weisenthal L.M., Lipman M.E., *Cancer Treatment Reports*, **69**, 615-632 (1985).
 - 18) Phillips R.U., Bibby M.C., Double J.A., *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1457-1468 (1990).