

ヒト卵巣癌培養細胞株の薬剤感受性に関する定量的解析

新潟大学医学部第一病理学教室

本 山 悌 一

Quantitative Analysis on in Vitro Drug Sensitivity of Cultured Human Ovarian Cancer Cell Lines

Teiichi MOTOYAMA

First Department of Pathology, Niigata University School of Medicine, Niigata

概要 ヒト卵巣癌由来の培養細胞, Kuramochi 株と CKS 株の, in vitro における Mitomycin C と Carboquone に対する感受性を測定し, 種々の組織型に由来するヒト胃癌培養細胞株のそれと比較した。卵巣の漿液性嚢胞腺癌由来の CKS 株は Mitomycin C と Carboquone に対する感受性が胃癌群に比べて極めて低く, また, 2 剤の治療係数も低かった。他方, 卵巣の未分化癌由来の Kuramochi 株は, Mitomycin C に対する感受性は低いが, Carboquone に対する感受性は高く, また Carboquone の治療係数も高かった。したがって, 治療薬として, 卵巣の未分化癌に Carboquone を用いることは合理的であるが, 漿液性嚢胞腺癌には 2 剤とも不適当と推察された。2 剤ともその殺細胞効果は, 濃度および作用時間に依存するが, Carboquone の方が時間依存性はやや少なかった。

Synopsis Two cell lines, Kuramochi and CKS, established from human ovarian cancer, were analyzed in vitro drug sensitivity to Mitomycin C and Carboquone. These values were compared to those of eight human gastric cancer cell lines composed of various histological types.

The CKS cell line, derived from serous cystadenocarcinoma, was less sensitive to both test-drugs than the groups of gastric cancer cell lines. Therapeutic indices of the two drugs were very low. So it was considered that the two drugs were unsuitable to chemotherapy to serous cystadenocarcinoma.

The Kuramochi cell line, derived from undifferentiated carcinoma, was less sensitive to Mitomycin C than the groups of gastric cancer cell line. However, it was as sensitive to Carboquone as high-sensitive gastric cancer cell lines. Therapeutic index of the Carboquone in the undifferentiated carcinoma was high. So it was considered that Carboquone was suitable to chemotherapy to undifferentiated adenocarcinoma.

The cytocydal actions of the two drugs were dependent upon dose and time. Time-dependency was, however, smaller in Carboquone than in Mitomycin C.

Key words: Ovarian cancer • Cell culture • Drug sensitivity • Therapeutic index

結 言

既報⁵⁾のごとく, 2 種のヒト卵巣癌由来の培養細胞は, ヒト胃印環細胞癌由来の培養細胞 KATO-III 株に比して, Mitomycin C に対する感受性が著しく低い。しかし, このような現象が Mitomycin C 以外の薬剤についてもあるのか, さらに KATO-III 株以外のヒト癌培養株と比較した場合にどのようなになるのか, などは興味ある問題である。今回は, 以上の 2 点について明らかにすべく, 2 種の薬剤, 2 種のヒト卵巣癌培養細胞株および 8 種のヒト胃癌培養細胞株を用いて, それぞれの in vitro 薬剤感受性を比較検討した。本

論文では, それらの実験結果を詳述するとともに, 化学療法剤の選択法について若干の考察を加えてみた。

研究材料および方法

培養細胞株: 今回の研究に用いた培養細胞は, 卵巣癌由来の Kuramochi⁵⁾と CKS⁵⁾²²⁾の 2 株, 胃癌由来の MKN 7²⁾, MKN 28²⁾, MKN 74, MKN 45²⁾, MK 2, OKAJIMA, KATO-III²¹⁾, MKN 1²⁾の 8 株である。各株の主な性格は, 表 1 に示した。

対照としてヒト 2 倍体細胞 IMR-90¹⁹⁾株を用いた。

培養方法: 培養液は, 20 μ g/ml の硫酸カナマイ

表 1 Ovarian and gastric cancer cell lines used in the present study

Cell line	Histological type of origin	Growth pattern	Karyotype	PDT* ¹ (hr)	Culture medium
Kuramochi	Undifferentiated carcinoma, ovary	monolayer	hyperdiploid	24—27	90%RPMI 1640 + 10%FBS* ²
CKS	Serous cystadenocarcinoma, ovary	monolayer	hypodiploid	32—36	80%RPMI 1640 + 20%FBS
MKN 7	Well differentiated tubular adenocarcinoma, stomach	monolayer	hypotetraploid	64—66	90%RPMI 1640 + 10%FBS
MKN 28	Well differentiated tubular adenocarcinoma, stomach	monolayer	hypotriploid	30—34	90%RPMI 1640 + 10%FBS
MKN 74	Well differentiated tubular adenocarcinoma, stomach	monolayer	hypodiploid	44—48	90%RPMI 1640 + 10%FBS
MK 2	Poorly differentiated adenocarcinoma, stomach	suspension	hypertriploid	52—53	90%RPMI 1640 + 10%FBS
MKN 45	Poorly differentiated adenocarcinoma, stomach	monolayer	hypotriploid	30—38	90%RPMI 1640 + 10%FBS
OKAJIMA	Poorly differentiated adenocarcinoma, stomach	suspension	hypotriploid	36—38	90%RPMI 1640 + 10%FBS
KATO-III	Signet-ring cell carcinoma, stomach	suspension	hypotetraploid	37—41	90%RPMI 1640 + 10%FBS
MKN 1	Adenosquamous carcinoma, stomach	monolayer	hypodiploid	43—45	90%RPMI 1640 + 10%FBS

*1. PDT: Population doubling time

*2. FBS: Fetal bovine serum

シン（明治製菓）を含む RPMI-1640 培地に、CKS 株と IMR-90 株とでは 20% の割合に、他の株では 10% の割合に牛胎仔血清を加えたものを用いた。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。各細胞は、60×15mm のプラスチックシャーレ（LUX）でふやし、指数増殖後期の細胞を 30×10mm のプラスチックシャーレ（LUX）にまきなおし、制癌剤の実験に供した。細胞は全て 5% 炭酸ガス加湿恒温器内で 37℃ で静置培養した。

薬剤処置：Mitomycin C（以下 MMC）（協和発酵）は蒸留水に、Carboquone（以下 CQ）（三共）は 0.4% リン酸ナトリウム液にそれぞれ使用直前に溶解し、培養液で目的の濃度に希釈した後、直ちに実験に使用した。なお CQ を用いた実験で、その培養液中にわずかに含まれることになるリン酸ナトリウムは、細胞増殖に全く影響を及ぼさないことを予め確認した。細胞は、前述の恒温器内で一定時間（30 分、2 時間、8 時間、24 時間、48 時間）処理し、その後直ちに薬剤を含まない培養液で 1 回洗浄し、再び静置培養に戻した。

生残率測定：薬剤処理後の細胞生残率の測定は、Alexander and Mikulski¹⁵⁾ の逆外挿法（Backward extrapolation method）を改良した

再増殖測定法（Regrowth assay method）⁶⁾¹²⁾¹⁸⁾ を用いた。

成 績

1. MMC と CQ の濃度依存性作用

両薬剤の殺細胞効果の濃度依存性を、Kuramochi 株と MKN 45 株とを例にとつて検討してみた。細胞生残率を薬剤量に対して semi-log plot した場合、図 1～4 のような濃度反応曲線が得られる。生残率曲線は、作用時間が短かすぎると上に凹になる傾向が見られるが、作用時間が長いと直線状になり、かつ急勾配になる。どちらの薬剤の場合も生残率は薬剤濃度に比例して対数的に減少する。

図 1 Dose-response curves of Kuramochi cells to MMC (semi-log plot)

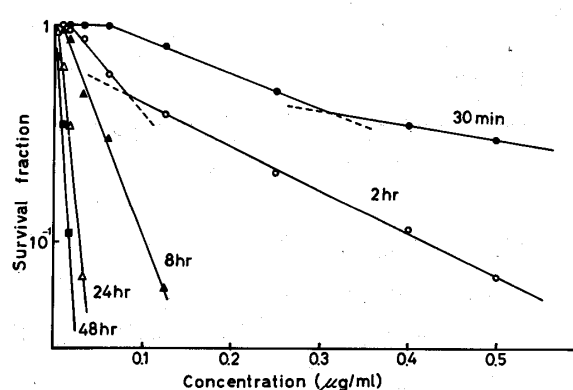


図2 Dose-response curves of Kuramochi cells to CQ (semi-log plot)

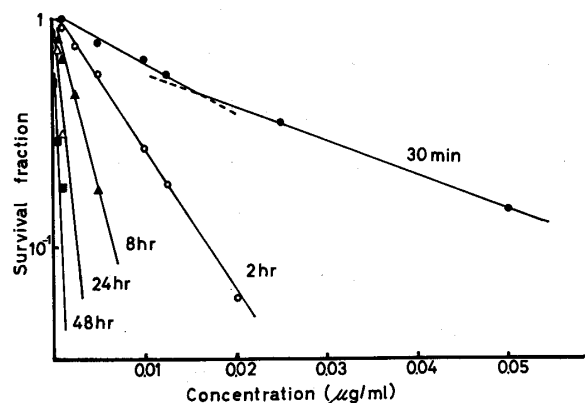


図3 Dose-response curves of MKN 45 cells to MMC (semi-log plot)

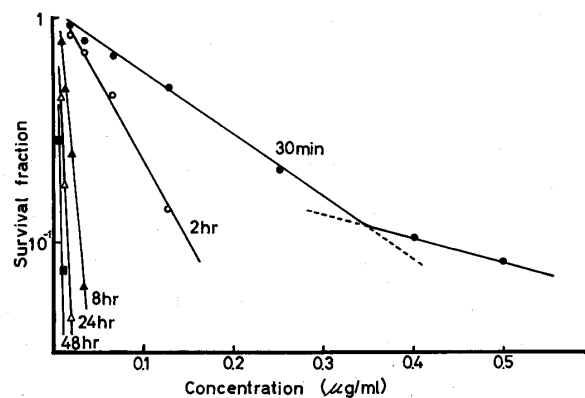
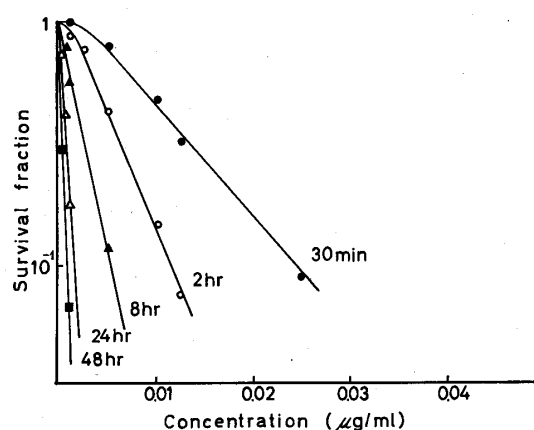


図4 Dose-response curves of MKN 45 cells to CQ (semi-log plot)



2. MMC と CQ の時間依存性作用

図5～8は、前述の2株を用いて一定の薬剤濃度下における細胞生残率の変化を時間反応曲線 (semi-log plot) として示したものである。両薬剤

とも高濃度で作用させると生残率は作用時間に比例して対数的に減少するが、低濃度域では生残率曲線は上に凹の弯曲を示す。したがって、低濃度

図5 Time-response curves of Kuramochi cells to MMC after treatment with a certain dose of MMC (semi-log plot)

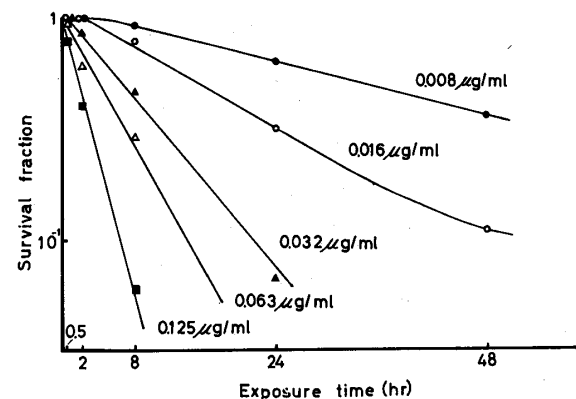


図6 Time-response curves of Kuramochi cells to CQ after treatment with a certain dose of CQ (semi-log plot)

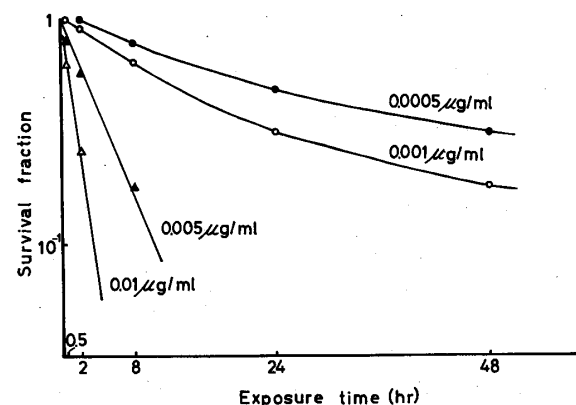


図7 Time-response curves of MKN 45 cells to MMC after treatment with a certain dose of MMC (semi-log plot)

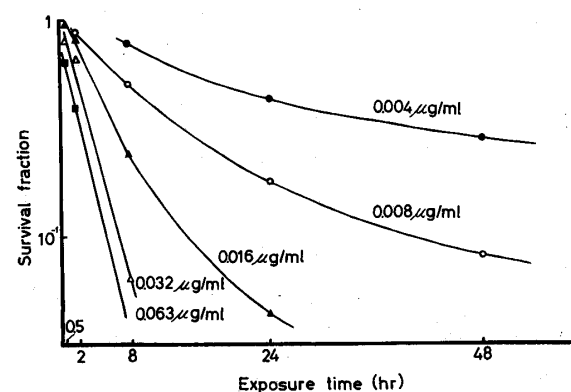


図8 Time-response curves of MKN 45 cells to CQ after treatment with a certain dose of MMC (semi-log plot)

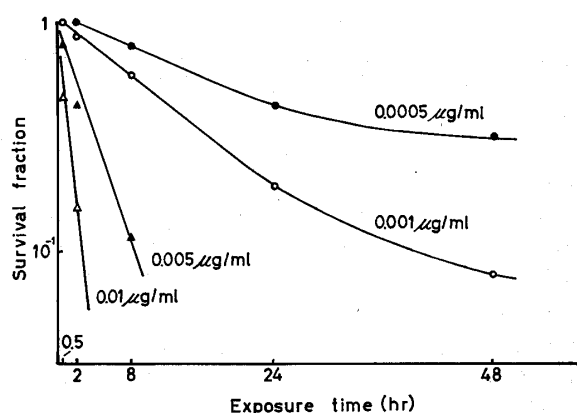


図9 Dose-response curves of Kuramochi cells to MMC (log-log plot)

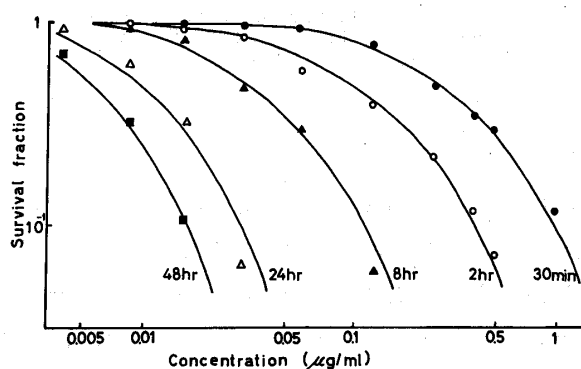


図10 Dose-response curves of Kuramochi cells to CQ (log-log plot)

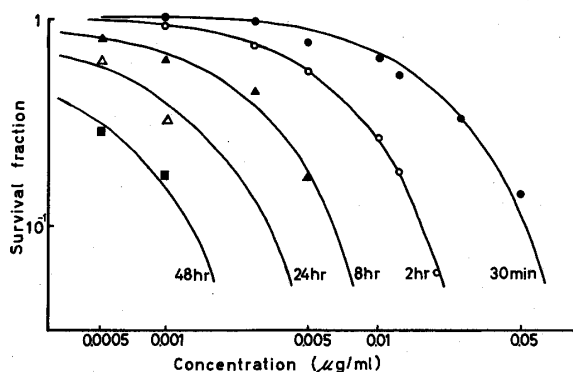


図11 Dose-response curves of MKN 45 cells to MMC (log-log plot)

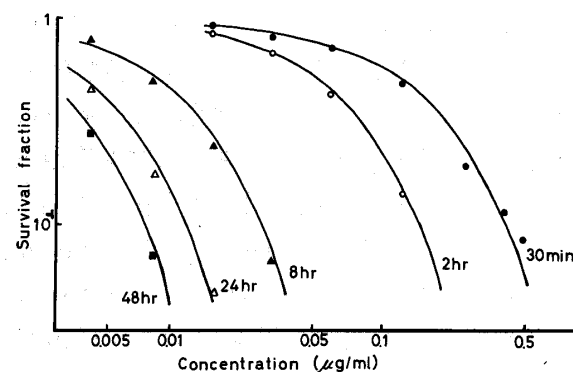
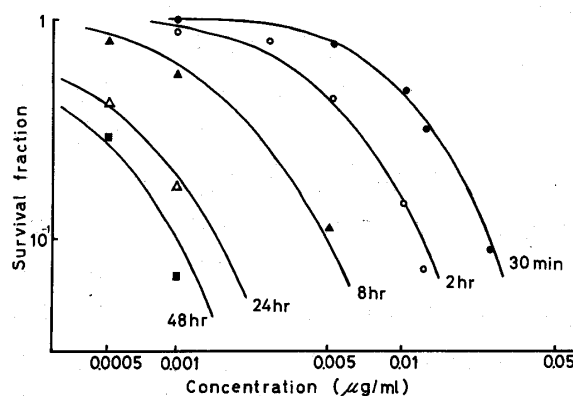


図12 Dose-response curves of MKN 45 cells to CQ (log-log plot)



では、作用時間を長くしても殺細胞効果の上昇はあまり期待できない。

両薬剤の時間依存性作用の程度を比較してみるため、作用時間別に濃度反応曲線を log-log plot で求めると図9～12のようになる。生残率を1 log₁₀値減少させる薬剤濃度を30分作用と48時間作用とで比較すると、Kuramochi株の場合、MMCでは60倍、CQでは約40倍となる(図9, 10)。一方、MKN 45株では、MMCで約50倍、CQで約25倍となる(図11, 12)。いずれの場合にもCQのほうが作用時間差による有効濃度差が小さい。このことは、CQのほうが時間依存性がより少ないことを意味している。

3. 培養ヒト卵巣癌細胞と胃癌細胞のMMCおよびCQに対する感受性：生残率を1 log₁₀値減少させる濃度、すなわち90%の細胞を死滅させ、

生残率を10%に減少させる薬剤濃度を90%致死量値(90% Lethal dose)(以下LD₉₀)と表現し、これを薬剤感受性の一つの指標とすることができる。表2にMMCおよびCQによる2時間処理時のLD₉₀値を一括して示す。LD₉₀の値が小さいほど高感受性、値が大きいほど低感受性と判断される。

表2 Sensitivity of cultured human ovarian and gastric cancers to Mitomycin C and Carboquone

Cell line	Mitomycin C LD ₉₀ (μg/ml)	Carboquone LD ₉₀ (μg/ml)
Kuramochi	0.42	0.017
CKS	1.13	0.144
MKN 7	0.31	0.049
MKN 28	0.31	0.052
MKN 74	0.27	0.038
MK 2	0.32	0.025
MKN 45	0.14	0.012
OKAJIMA	0.16	0.018
KATO-III	0.16	0.018
MKN 1	0.58	0.016

胃癌においては、一般に高分化型管状腺癌由来の細胞株は、MMC、CQのいずれに対しても低感受性であり、MK2株を除いた低分化型腺癌由来の細胞株、印環細胞癌由来の細胞株は、両剤に対して比較的感受性が高い。漿液性嚢胞腺癌由来のCKS株は、いずれの薬剤に対しても極めて感受性が低い。しかし、未分化癌由来のKuramochi株は、MMCに対しては低感受性であるが、CQに対しては高感受性となり、胃腺扁平上皮癌由来のMKN1株と同様の傾向を示した。

4. 治療係数による薬剤効果の比較

LD₉₀値の大小によつて薬剤間の効力を単純に比較することはできない。臨床的には、副作用が最小で、治療効果が最大である薬剤が望まれるわけであるが、それを判断する一つの基準として治療係数が用いられる。これは、一般に生体の最大耐量と治療薬用量との比で求められ、これをもつて薬剤間の有効性あるいは安全性の一端を比較することができる。この考えに準じ、MMCおよびCQヒト最大耐量¹¹⁾を今回求めたLD₉₀値で除し、in vivo-in vitro 治療係数¹¹⁾とした。また、いわゆる正常細胞として、ヒト胎児肺由来の線維芽細胞IMR-90株を用い、その両薬剤によるLD₁₀値(10%の細胞を死滅させる薬剤量)を再増殖測定法で求め、これを上記のようにLD₉₀値で除すことにより、in vitro-in vitro 治療係数を新たに設定した。

以上の2種の治療係数は、いずれもその値が大きいほうが治療上、より安全かつより有効である

表3 Therapeutic index of each cell line

Therapeutic index Cell line	In vivo-in vitro*1		In vitro-in vitro*3	
	human MTD*2 (mg/kg)		IMR-90 LD ₁₀ (μg/ml)	
	MMC 1.0	CQ 0.3	MMC 0.11	CQ 0.009
Kuramochi	2.9	17.6	0.262	0.529
CKS	0.9	2.1	0.097	0.063
MKN 7	3.2	6.1	0.355	0.184
MKN 28	3.2	5.8	0.355	0.173
MKN 74	3.7	7.9	0.407	0.237
MK 2	3.1	12.0	0.344	0.360
MKN 45	7.1	25.0	0.786	0.750
OKAJIMA	6.3	16.7	0.688	0.500
KATO-III	5.9	16.7	0.647	0.500
MKN 1	1.7	18.8	0.190	0.563

*1. In vivo-in vitro therapeutic index was estimated by dividing the value of human MTD by the value of LD₉₀ of each cell line

*2. MTD: maximum tolerance dose

*3. In vitro-in vitro therapeutic index was estimated by dividing the value of IMR-90 LD₁₀ by the value of LD₉₀ of each cell line

と推測される。

各細胞株の両剤に対する治療係数を表3に示す。いずれの方法においても、CKS株ではMMCおよびCQの治療係数はともに胃癌由来の細胞株のそれに比し著しく低い。一方、Kuramochi株では、MMCの治療係数は低いが、CQの治療係数は高く、胃癌群のCQ治療係数が高いものと、ほぼ等値を示している。

考 察

卵巣癌の化学療法剤として、欧米では古くから、Melfalan, Cyclophosphamide, Chlorambucil, Triethylene thiophosphoramide (Thio-TEPA)等のアルキル化剤が主として用いられてきた¹⁶⁾²⁴⁾。その後、Hexamethylmelamine, Adriamycin, 5-fluorouracil (5-FU), Platinum compounds等も単剤あるいは併用で用いられるようになってきている²⁰⁾²⁴⁾²⁵⁾。しかし、古典的アルキル化剤をはるかに上まわる臨床効果は必ずしも得られていない。

一方、日本においては、本邦で創製、工業化されたMMCが各種の癌に対して優れた効果を示したため、卵巣癌にも初期から応用が試みられた。その後、MMCは木村⁴⁾によつて開発された

FAMT 療法 (5-FU, Cyclophosphamide, MMC, Toyomycin の併用), あるいは太田らによつて開発された MFC 療法 (MMC, 5-FC, Cytosine arabinoside の併用)⁸⁾, METVFC 療法 (MMC, Cyclophosphamide, Toyomycin, Vincristin, 5-FU, Cytosine arabinoside の併用)⁹⁾における主力制癌剤としての位置を占めており, また, これらの合併療法は卵巣癌にも現在広く用いられている。

CQ は, 卵巣癌に対して単剤で用いられた報告もあるが¹³⁾, 武正¹³⁾によつて FCQ 療法 (5-FU, Cytosine arabinoside, CQ の併用) が各種の癌で有効であることが認められ, 卵巣癌においてもこの方法がしばしば試みられている²⁶⁾。

このように, 卵巣癌に対しても, 多くの薬剤が種々の投与方法によつて内外で使用されてきた。しかし, 薬剤相互間の効力の比較, 組織型による感受性の比較などの点で評価に耐えうる資料は極めて少ない。

また, MMC と CQ とは, アルキル化をその主作用とする点, 構造上の類似性, さらに共に本邦において開発された制癌剤であることなどから, その効力上の比較が問題視されることが少なくはないが, この点においても資料は乏しい。

培養細胞を用いた in vitro の薬剤感受性試験の結果から, 卵巣癌は, 印環細胞型のみならず, 低分化型および高分化型の胃癌に比べ, MMC に対する感受性は低く治療係数も低い。一方, CQ に対しては, CKS 株は MMC に対すると同様の傾向を示すが, Kuramochi 株は高感受性を示し, 治療係数も高い。

胃癌では MMC と CQ とに対して, 高分化型管状腺癌が低感受性, 印環細胞癌および低分化腺癌が高感受性という傾向が認められる。卵巣癌においても, わずか 2 株の in vitro 薬剤感受性試験の結果からではあるが, 同様の傾向があると推測される。すなわち, 分化型腺癌である漿液性嚢胞腺癌は MMC と CQ の効果は全く期待できず, 未分化癌では, MMC は無効であるが, CQ は少なからぬ効果を発揮すると推測される。

卵巣癌のうち, 一般にムチン性嚢胞腺癌と高分

化型漿液性嚢胞腺癌とは生存率が良い²³⁾。これは増殖速度が比較的緩徐なためと思われるが, さらに生残率を高めるためには, より有効な制癌剤の開発が当面の問題となる。一方, 感受性は高いが, 予後は必ずしもよくない未分化癌に対しては, より有効な制癌剤の投与方法が検討されねばならない。

腫瘍の組織型と薬剤感受性の関連および至適薬剤の選択については, 究極的には多数の臨床資料の集積を待たねばならない。しかし, 各種臓器癌別により有効な制癌剤を積極的に見つける方法として, 株化培養細胞の薬剤感受性を定量的に解析することが極めて有効であると考えられる。

今回用いた株細胞の他に, 現在日本では HOC-21¹⁴⁾, HAC-2⁷⁾, AS-II¹⁷⁾などのヒト卵巣癌培養細胞株がある。これら細胞株の薬剤感受性測定とその解析がなされれば, 卵巣癌化学療法の基礎資料がさらに豊富となり, ひいては臨床治療に示唆するところ大であらう。しかし, この方面の研究は, わずかに関谷ら¹⁰⁾によつて少数の細胞と少数の薬剤についてなされているにすぎない。今後, 多種の細胞, 多種の薬剤についての早急な検定実験が望まれる。

文 献

1. 秋谷 清, 根岸能之, 大田明生, 宮崎通泰, 原 捷平, 奴田原裕一, 中尾愼仁, 紅露 純, 吳盛 豊: 卵巣癌に対する新制癌剤エスキノンの臨床成績。癌と化学療法, 3: 265, 1976.
2. 北條晴人: 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, 1977.
3. 利部輝雄, 七山邦彦, 佐野利之, 中村和芳, 金田修: 手術不能卵巣癌に対するエスキノンの使用経験。産婦人科の世界, 28: 703, 1976.
4. 木村禧代二: 多剤併用療法。癌の臨床, 14: 184, 1968.
5. 本山梯一: ヒト卵巣癌培養細胞の生物学的特性と Mitomycin C 感受性に関する基礎的研究, 日産婦誌, 33: 1197, 1981.
6. 本山梯一, 鈴木利光: 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, Chemotherapy, 28: 142, 1980.
7. 西田正人, 蔵本博行, 上方敏子, 田口 明, 長内国臣, 林 博厚: 株細胞にみるヒト卵巣 clear cell carcinoma の諸性格。日産婦誌, 29: 1346, 1977.
8. 太田和雄, 栗田宗次, 西村 穰, 小川一誠, 今井邦之, 有吉 寛, 片桐邦之, 村上 稔, 尾山 淳,

- 星野 章, 天羽弘行, 加藤武俊: 悪性腫瘍の化学療法における多剤併用療法. 日癌治誌, 6: 267, 1971.
9. 太田和雄, 栗田宗次, 西村 穰, 杉山雄一, 小川一誠, 亀井良孝, 今井邦之, 片岡邦孝, 村上 稔, 尾山 淳, 早野 章, 天羽弘行, 加藤武俊, 石川三枝子: 悪性腫瘍の化学療法における多剤併用療法 (METVFC療法) に関する研究 (第1報). 第29回日本癌学会総会記事, 231, 1970.
 10. 関谷宗英, 高見沢裕吉: In vitro におけるヒト婦人性器癌培養株細胞に対する抗癌剤の殺細胞効果. 日産婦誌, 33: 373, 1981.
 11. 下山正徳, 木村禎代二: 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), 477, 朝倉書店, 東京, 1975.
 12. 下山正徳, 田中和彦, 木村禎代二: 人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, 1979.
 13. 武正勇造: 多剤併用による化学療法の効果と適応. 日本臨床, 33: 1873, 1975.
 14. 田村昭蔵, 山田拓郎: ヒト卵巣癌由来細胞株の確立. 医学のあゆみ, 90: 209, 1974.
 15. Alexander, P. and Mikulski, Z.B.: Differences in the response of leukemia cells in tissue culture to nitrogen mustard and to dimethyl myleran. Biochem. Pharmacology, 5: 275, 1961.
 16. Bagley, C.M.Jr., Young, R.C., Canellos, G.P. and Devita, V.T.: Treatment of ovarian carcinoma: Possibilities for progress. New Eng. J. Med., 287: 856, 1972.
 17. Kimoto, T., Ueki, A. and Nishitani, K.: A human malignant cell line established from ascites of patient with embryonal carcinoma of ovary. Acta Path. Jap., 25: 89, 1975.
 18. Motoyama, T., Hojo, H., Suzuki, T. and the late Oboshi, S.: 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: 49, 1979.
 19. Nichols, W.W., Murphy, D.G., Cristofalo, V.J., Toji, L.H., Greene, A.E. and Dwight, S.A.: Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90. Science, 196: 60, 1977.
 20. Park, R.C., Blom, J., Disaia, P.J., Lagasse, L.D. and Blessing, J.A.: Treatment of woman with disseminated or recurrent advanced ovarian cancer with melphalan alone in combination with 5-fluorouracil and dactinomycin or with the combination of cytoxan, 5-fluorouracil and dactinomycin. Cancer, 45: 2529, 1980.
 21. Sekiguchi, M., Sakakibara, K. and Fujii, G.: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. Japan. J. Exp. Med., 48: 61, 1978.
 22. Sekiguchi, M., Sakakibara, K., Suzuki, T., Motoyama, T. and Fujii, G.: A newly established cell line derived from human ovarian adenocarcinoma. Japan. J. Exp. Med., 50: 283, 1980.
 23. Smith, J.P., Rutledge, F. and Wharton, J.T.: Chemotherapy of ovarian cancer: New approaches to treatment. Cancer, 30: 1565, 1972.
 24. Tobias, T.S. and Griffiths, C.T.: Management of ovarian carcinoma: Current concepts and future prospects. New Eng. J. Med., 294: 877, 1976.
 25. Wallach, R.C., Cohen, C., Brucker, H., Kaba-kow, B., Deppe, G. and Patner, L.: Chemotherapy of recurrent ovarian carcinoma with cis-dichlorodiammine platinum II and adriamycin. Obstet. & Gynec., 55: 371, 1980.
 26. Yajima, A., Higashiiwai, H., Sato, A., Watanabe, M., Mori, T., Nasu, I., Furuhashi, N., Hoshi, K., Muraguchi, K., Okamura, K., Kuramoto, M., Hamazaki, Y., Yamaya, Y., Suzuki, M., Hanyu, T., Suzuki, K., Kunii, H., Moritsuka, T., Igarashi, N., Nakano, M., Nagasawa, K. and Sato, S.: Results of FQC chemotherapy for primary ovarian cancer in relation to the clinical stage, completeness of surgical resection and histological type. Acta Obst. Gynaec. Jpn., 31: 1947, 1979.

(No. 4969 昭56・9・7受付)