

氏 名 (本籍) 蒲 生 真 紀 夫

学 位 の 種 類 医 学 博 士

学 位 記 番 号 医 博 第 1 0 3 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 元 年 9 月 27 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当

研 究 科 專 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
(博 士 課 程) 内 科 学 系 專 攻

学 位 論 文 題 目 in vitro 抗 癌 剂 感 受 性 試 験, 姉 妹 染 色 分 体 交 換 法
の 基 礎 的 檢 討

(主 査)
論 文 審 査 委 員 教 授 涌 井 昭 教 授 今 野 多 助
教 授 及 川 淳

論文内容要旨

I 目 的

癌化学療法の効果増強には、標的とする癌細胞に対し有効な抗癌剤を選択することが必要である。この目的のため、現在までに様々な抗癌剤感受性試験法が検討されてきている。しかし、それぞれに問題点があり、何れも確立された方法とはなっていない。

今回著者は、新しい有用な抗癌剤感受性試験を開発する目的で、以前より変異原性物質の検出などの目的で用いられてきた姉妹染色分体交換法 (sister chromatid exchange assay ; SCE assay) に注目し、その有用性および臨床応用への可能性について基礎的検討を行った。

II 実験材料および方法

1) 実験材料 : 継代培養ヒト癌細胞株として、HeLaS₃, ACHN, TE2を、固形癌としてヌードマウス可移植性ヒト胃癌株SC-6-JCKを用いた。抗癌剤はmitomycin C (MMC), cisplatin (CDDP), nimustine hydrochloride (ACNU), adriamycin (ADR), methotrexate (MTX) の5薬剤を用いた。

2) コロニー形成法 : 抗癌剤1時間処理後、適当数の細胞を60mmディッシュに播種し、約2週間後に形成されたコロニー数より薬剤感受性を検討した。

3) SCE assay : 細胞は薬剤1時間処理後、bromodeoxyuridine (BrdU) 含有培地内で2細胞周期培養した。染色体標本はヘキスト・ギザム法で染色分体を分染し、誘発SCE数から検討した。

4) in vivoの薬剤感受性試験 : ヌードマウスに皮下移植したSC-6-JCK腫瘍を用い、抗癌剤投与後3週間のgrowth curveより検討した。

5) 初代単層培養法 : ヌードマウス皮下より採取したSC-6-JCKから無菌的にsingle cell suspensionを作成し、これの初代単層培養細胞を用いてSCE assayを行った。

III 結 果

1) コロニー形成法とSCE assayとの相関 : コロニー形成法では本研究で用いた全ての薬剤において感受性の順序は、TE2 > HeLaS₃ > ACHNであった。一方SCEはMTXを除く4剤において、殺細胞効果を示す濃度の約1/10の濃度から有意の発現を示し、用量依存性に増強した。MTXでは有意のSCEの発現を認めなかった。またSCE発現の程度はおよそTE2 > HeLaS₃ > ACHNの順であり、コロニー形成法による薬剤感受性の順位との一致がみられ

た。薬剤の殺細胞効果とSCE発現との間には相関係数0.82の高い相関が得られた。

次に、同一の標的細胞の複数抗癌剤に対する感受性について検討した。細胞はTE2を、薬剤はMTXを除く4剤を用い、薬剤濃度は臨床常用量静注時の最高血中濃度の1/10(C₀)を基準とした倍数系列濃度を用いて、コロニー形成法とSCE assayの結果を比較した。コロニー形成法では感受性はADR, MMC>ACNU>CDDPの順であり、SCE assayでは他の3剤に比べCDDPによる発現が低率であった。以上の結果より、DNAを直接の標的とする抗癌剤ではSCE assayによって細胞の感受性を、複数の薬剤間の感受性の差を含めて予測し得ることが示された。

2) *in vivo*の薬剤感受性とSCE assayとの相関：固形癌のモデルとしてSC-6-JCKを用い、ヌードマウス皮下移植でのgrowth curveとSCE assayの結果とを比較した。薬剤はMTXを除く4剤を用いた。

ヌードマウス皮下移植でのgrowth curveでは、抗癌剤投与3週後のI. R. (inhibition ratio)はADR16.3%, CDDP26.4%, MMC74.8%, ACNU75.4%であり、SC-6-JCKはMMC, ACNUに高感受性、ADRに低感受性を示した。

SC-6-JCKの初代培養系で、C₀, 2C₀の2濃度を用いてSCE assayを行った。SCE発現は2C₀の濃度において、ADR処理では0.2/chromosome以下と低値であるのに対し、他の3剤処理ではいずれも1.0/chromosome以上の高値を示した。このことからSCE assayによって癌細胞の*in vivo*の抗癌剤感受性を予測し得ると考えられた。

IV 結 論

本研究ではアルキル化剤やintercalating agent等、DNAを直接の標的とする抗癌剤ではSCE発現頻度は細胞の抗癌剤感受性と高い相関を示した。また、初代単層培養系を用いてSCE assayを行うことによって、固形癌の*in vivo*抗癌剤感受性をも予測し得る事が示された。

本法は初代培養を行う必要があり、適応薬剤に制約があるなどの問題はあるが、比較的短時間で感受性判定が可能な事、癌の増殖相に対する感受性を検討できる事、臨床において得られる濃度に近いと考えられる濃度で鋭敏に感受性を判定できる可能性がある事などの利点があり、新しい抗癌剤感受性試験としての有用性が期待される方法と考えられた。

審査結果の要旨

癌化学療法の効果を増強するには、予め、標的とする癌細胞が感受性を示す抗癌剤を選択することが必要である。このため、現在までに様々な抗癌剤感受性試験法が検討されてきているが、それぞれに問題点があり、いずれも確立された方法とはなっていない。本研究は、このような現状において、より有用な抗癌剤感受性試験を開発する目的で、以前より変異原性物質の検出などに用いられてきた姉妹染色体交換法 (sister chromatid exchange assay : SCEA) に着目し、その抗癌剤感受性試験としての有用性および臨床応用への可能性について基礎的検討を行ったものである。

著者は、まず、SCEAとin vitro感受性試験法として既にある程度の評価を得ているコロニー形成法との相関を、継代培養ヒト細胞株HeLaS₃、ACHN (腎癌由来) およびTE 2 (食道癌由来) とMMC, CDDP, ACNU, ADRおよびMTXとの系で検討した。その結果、コロニー形成法における前記の5抗癌剤感受性の順序は、TE 2 > HeLaS₃ > ACHNで、SCEはMTXを除く4剤において、殺細胞効果を示す濃度の約1/10から有意の発現がみられ、その程度はおよそTE 2 > HeLaS₃ > ACHNの順で前者の順位との一致がみられ、薬剤の殺細胞効果とSCE発現との間に高い相関 ($r=0.82$) を得た。次にTE 2に対するMMC, CDDP, ACNUおよびADRの感受性とSCE発現の程度を検討したが、コロニー形成法による感受性はADR, MMC > ACNU > CDDPの順で、SCE AではCDDPによるSCE発現が他の3剤に比べて低率であることを認めた。

さらに、固形癌のモデルとして、ヒト胃癌株SC-6-JCKのヌードマウス皮下移植における増殖およびSCE発現におよぼすMMC, CDDP, ACNU, ADRの影響を検討し、抗癌剤投与3週後の腫瘍増殖抑制率はACNU75.4%, MMC74.8%, CDDP26.4%, ADR16.3%で、SCEの発現はADR処理を除き、いずれも1.0/chromosome以上の高値を示し、ACNU, MMCでは増殖抑制率と相関することを指摘し得た。

これらの結果から、著者は、アルキル化剤やintercalating drugなどのようなDNAを直接の標的とする抗癌剤によるSCE発現頻度は、コロニー形成法やヌードマウスの皮下移植によるin vivoの抗癌剤感受性と相関を示すので、初代培養を行う必要があり、適応薬剤に制約があるなどの問題点はあるが、SCEAを新しい抗癌剤感受性試験として有用性が期待される方法と結論している。

以上本論文は、SCEAが新しい有用な抗癌剤感受性試験法になり得る可能性を示したものであり、癌化学療法の発展に寄与するところが大きいと考えられるので、学位論文に値するものである。