

肺癌の in vitro 制癌剤感受性試験における線維芽細胞の影響について

(1990年11月8日受付)

\*名古屋大学医学部胸部外科, \*\*県立愛知病院外科

榊原 正典\* 今泉 宗久\* 内田 達男\*\* 阿部 稔雄\*

日本外科学会雑誌 第92回 第12号 別刷

名古屋大学図書	
和	11210'73

## 肺癌の in vitro 制癌剤感受性試験における線維芽細胞の影響について

(1990年11月8日受付)

\*名古屋大学医学部胸部外科, \*\*県立愛知病院外科

榎原 正典\* 今泉 宗久\* 内田 達男\*\* 阿部 稔雄\*

## 内容要旨

肺癌切除標本を用いた in vitro 制癌剤感受性試験には線維芽細胞が混在するため、その影響と除外方法を検討した。用いた細胞は肺癌継代培養細胞14種類と肺癌切除標本より得られた線維芽細胞14種類である。これらの細胞を1対1の割合で混合し、適宜培養後制癌剤を投与し肺癌細胞単独と線維芽細胞混在時の感受性を比較した。制癌剤感受性はMTT colorimetric assay法でSD活性を測定することにより求めた。結果として線維芽細胞のSD活性は肺癌細胞の1/2から1/4であった。線維芽細胞の制癌剤感受性はCDDP, MMC, 5-FUに対しては肺癌細胞とほぼ同等であったが、ADMとVP-16に対しては肺癌細胞より高かった。肺癌細胞と同様に線維芽細胞の感受性にも heterogeneity が認められた。

肺癌細胞に線維芽細胞を混合し3日間培養後CDDPを加えた場合、61%に感受性に影響がみられた。また線維芽細胞培養液(C.M)を加えた場合には10%に感受性の亢進がみられた。このC.M中の感受性亢進因子は100GYの照射では影響を受けないが、10分間の煮沸で失活した。この因子は一部の肺癌細胞のG<sub>0</sub>・G<sub>1</sub>期を刺激し増殖を促進させ、EGFの可能性が高いと思われたが同定はできなかった。しかしこれらの影響は線維芽細胞あるいはC.M混合時に制癌剤を同時に投与することにより除外することが可能であった。

以上より切除標本を用いた in vitro 制癌剤感受性試験においては、線維芽細胞の直接的および間接的影響を最少限にするために、腫瘍細胞を採取後培養期間を置かず制癌剤を加え、感受性試験を行う必要があった。

索引用語：制癌剤感受性試験，線維芽細胞，肺癌，培養細胞

## はじめに

制癌剤をより有効に使用するために、in vitro<sup>1)2)</sup>および in vivo<sup>3)</sup>で制癌剤感受性試験が行われてきたが、切除標本を用いた in vitro 制癌剤感受性試験では混在する線維芽細胞の影響があるため、最近では測定方法に種々の工夫がなされている。しかしながら線維芽細胞の具体的な影響についての検討はあまりなされていない。そこで、肺癌培養細胞に対するMTTを用いた in vitro 制癌剤感受性試験における培養線維芽細胞の影響とその解決策につき検討を加えた。

## 材料および方法

## ① 培養細胞

用いた肺癌培養細胞は14種類(QG56, QG90, QG91, Luci7, Luci10, Luci13, NULC2, NULC3, NUTLC1, NUTLC2, NUTLC4, Ferrians, Darby, Calny)で

あった。なおNUTLC1, 2, 4は当教室で樹立できた腺癌と大細胞癌である。線維芽細胞は肺癌切除標本を無菌的にハサミで細切し、10%FCS (Fetal Calf Serum: Gibuco) 加RPMI1640 (ニッスイ: ペニシリン, ストレプトマイシン, メイロン, グルタミン含有) 内で培養。適宜パスを繰返し、3カ月以上経過し光顕的に線維芽細胞のみになったと思われる14種類を用いた。

## ② MTT assay法

10<sup>5</sup>個/mlに調整した培養細胞0.1mlを96穴プレート(Greiner)に撒き、一定の培養期間を置いた後、5mg/mlに調整したMTT (Sigma)を各ウェル当たり0.01mlずつ加え4時間反応させた。形成されたformazanを0.04N塩酸加イソプロピルアルコール0.1mlで溶解し、ELISA ANALYSER (SLT: EAR 400)で570~630nmの波長でoptical densityを測定しSD

(succinate dehydrogenase) 活性を求めた。各データは5ウェルの平均値である。

③ 制癌剤感受性試験

プレート作製後3日間細胞を培養した。その後、最終濃度が0.1, 1.0, 10, 100ug/mlとなるように希釈した制癌剤(CDDP, ADM, MMC, VP-16, 5-FU)0.1mlを加え4日間反応させた。効果判定はMTT colorimetric assayにより行ったが、その評価は残存するSD活性とコントロールのSD活性の比で表し50%以下を有効濃度とした。対照として3日間の培養期間を置かず、プレート作製と同時に制癌剤を投与した。

④ 線維芽細胞および線維芽細胞培養液の影響

線維芽細胞の制癌剤感受性試験におよぼす影響を検討するために、 $5 \times 10^4$ 個/mlに調整した肺癌細胞と同数の線維芽細胞を0.1mlずつ同一プレートに撒き、また線維芽細胞培養液の影響に関する検討は、肺癌細胞を $10^5$ 個/mlに調整したプレートに、線維芽細胞を3日間培養した培養液(conditioned medium : C.M)を0.1mlずつ加え同様に制癌剤に対する感受性を測定した。

結果

① MTT colorimetric assay 法の誤差の検討

SD活性比に影響を与える因子としてFormazan溶解から測定までの時間とplate efficiencyの違いにより生ずる細胞数の違いにつき検討した。図1に示すようにformazan溶解後測定までの時間を10分と1時間で比較すると、SD活性比が50%以下の場合1時間の方がSD活性比が高くなり、SD活性比が50%以上の場合では逆の傾向であった。しかしSD活性比はFormazan溶解後1時間以内であれば、誤差範囲は10%以内であった。また3種類の細胞であるが、細胞数を1/

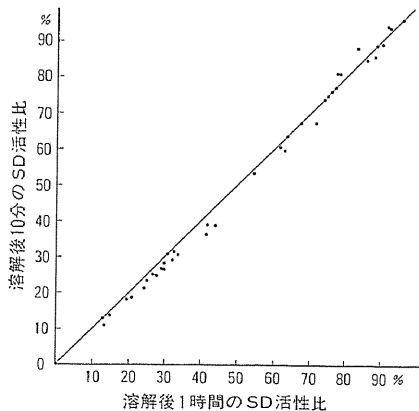


図1 Formazan 溶解後の測定時間とSD活性比

2~1/4倍にした場合、細胞数が減るにつれSD活性比は低下し、15%以内の誤差を生じた(図2)。以上より±19%以内を誤差範囲と決めた。

② 肺癌細胞と線維芽細胞のSD活性

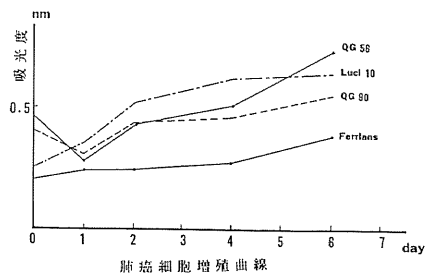
$10^5$ 個/mlの肺癌細胞と線維芽細胞のSD活性を6日間経時的に測定したところ、両種細胞とも24時間後ではSD活性が低下するが、72時間後にはプレート作製時に戻り、線維芽細胞も以後増殖が認められた。線維芽細胞のSD活性は肺癌細胞の1/4~1/2であった(図3)。

③ 肺癌細胞と線維芽細胞の検量曲線

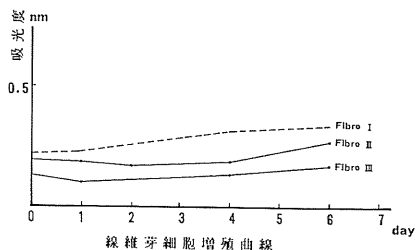
肺癌細胞QG56と線維芽細胞(Fibro VII)各単独と1対1の混合時のSD活性を知るために $2.3 \sim 70 \times 10^4$ 個/mlの範囲でプレートを作製。48時間後にSD活性を測定したところ、 $4.5 \times 10^4 \sim 1.75 \times 10^5$ 個/mlの範囲で両種細胞とも細胞数と吸光度との間で比例関係が認められた。線維芽細胞のSD活性はQG56のSD活性のおよそ50%であったが、混合時では肺癌細胞単独のSD活性の10%(2~17%)の増加しかみられなかった(図4)。

	$10^5$ /ml	$5 \times 10^4$ /ml	$2.5 \times 10^4$ /ml	
NULC2	39	37	31	CDDP 3.80ug/ml
NULC3	27	25	25	CDDP 1.25ug/ml
Luci 10	82	82	68	CDDP 2.50ug/ml

図2 細胞数と感受性(SD活性比)



肺癌細胞増殖曲線



線維芽細胞増殖曲線

図3 肺癌細胞と線維芽細胞の増殖曲線

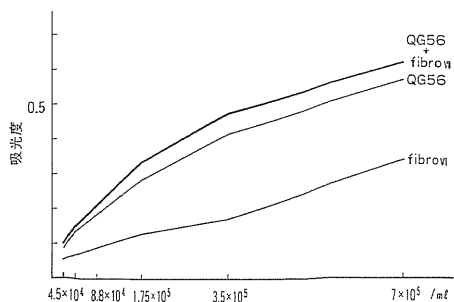


図4 癌細胞と線維芽細胞のSD活性

	CDDP			ADM			MMC			VP 16			5 FU		
	10	1	0.1	10	1	0.1	10	1	0.1	10	1	0.1	100	10	1
QG 56	+			+			+						+		
QG 90							+								
QG 91															
Luci 7				+			+								
Luci 10				+			+								
Luci 13				+			+								
Ferrians							+								
Calny				+						+					
Darby							+								
常用量血中ピーク値	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$			0.4			1.0			1.0			10.0		

図5 肺癌培養細胞の制癌剤感受性

	CDDP			ADM			MMC			VP 16			5 FU		
	10	1	0.1	10	1	0.1	10	1	0.1	10	1	0.1	100	10	1
Fibro I	+			+			+			+			+		
Fibro II	+			+			+								
Fibro III	+			+			+			+					
Fibro IV	+			+			+								
Fibro V	+			+			+			+					
Fibro VI	+			+			+						+		
Fibro VII	+			+			+								
常用量血中ピーク値	2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$			0.4			1.0			1.0			10.0		

図6 培養線維芽細胞の制癌剤感受性

④ 肺癌細胞および線維芽細胞の制癌剤に対する感受性

図5に9種類の肺癌細胞に対する5種類の制癌剤の感受性を示した。点線は国立がんセンターのデータでヒト常用量における最高血中濃度である。図6は線維芽細胞の感受性であるが、肺癌細胞に比しADMとVP-16に対しては線維芽細胞の感受性がやや高かったが、CDDP、MMCと5-FUに対しては同程度であった。個々の線維芽細胞に関しては、肺癌細胞と同様に感受性において heterogeneity が認められた。

感受性の低い肺癌細胞に感受性の高い線維芽細胞が混在すれば全体の感受性が高まる事は容易に想像できるため、感受性がほぼ同等なCDDPに対し以下の検討を行った。

⑤ 線維芽細胞混在に伴う肺癌細胞の感受性の変化

4種類の肺癌細胞に5種類の線維芽細胞を混合し感受性試験を行ったが、同数の線維芽細胞が混在することにより20%以上の感受性に变化を生じた組み合わせは61%であったが、そのうち82%は感受性が亢進された(表1)。

⑥ autologous における線維芽細胞の影響

表1 肺癌細胞単独と線維芽細胞混合時の感受性の変化

	Fibro 8	Fibro 9	Fibro 10	Fibro 11	Fibro 12
NULC2	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Luci10	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
QG56	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
NUTLC4	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)

(+) : 20%以上の感受性の差

表2 Autologous の線維芽細胞の感受性への影響

NUTLC1	Mixed	Fibro 13
66	49	57

CDDP3.8ug/ml時のSD活性比(%)

当教室で樹立できた1種類の autologous の肺癌細胞と線維芽細胞および両細胞が混在するフラスコを用いCDDP 3.8ug/mlで同様に感受性試験を行ったが、肺癌細胞単独のSD活性比は66%、線維芽細胞は57%であるのに対し混在フラスコの細胞を用いた場合49%であり癌細胞単独より17%の感受性亢進であった(表2)。

表3 線維芽細胞培養液の肺癌細胞感受性への影響

	Luci10	Luci13	QG56	NUTLC2	NUTLC1	Luci7	QG90	NULC2
Fibro 8	(◎)	(○)	(○)	(○)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fibro 9	(○)	(○)	(○)	(○)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fibro12	(-)		(-)	(○)	(-)	(-)	(-)	(-)
Fibro14	(◎)	(○)	(-)	(◎)	(-)	(-)	(-)	(-)

線維芽細胞培養液による感受性亢進 (◎), 増殖促進 (○)

制癌剤感受性において大きな違いのみられない肺癌細胞と線維芽細胞の組み合わせでも、混合時の感受性では20%以上の差がみられることより、この作用が線維芽細胞自身によるものか線維芽細胞培養液(C.M)中の soluble factor によるものかを知るために、肺癌細胞にC.Mを加え同様に感受性試験を行ったところ、20%以上の感受性の変化がみられた組み合わせは31組中3組であった(表3)。

⑦ 制癌剤同時投与による線維芽細胞の影響の除去の試み

3日間の培養期間を置かずにプレート作製時に制癌剤を同時投与し感受性試験を行った。感受性は3日間の培養期間を置いた場合よりやや高まったが、最高14%の誤差を生じたのみで、20%を越える組み合わせは認められなかった。

### 考 察

In vitro 制癌剤感受性試験は、継代培養細胞を用い制癌剤のスクリーニングとして行う場合にはその有用性は高いとされているが、切除標本を用いて行う場合は線維芽細胞等の影響があるため、腫瘍組織の感受性がどの程度反映されているか信頼に欠ける一面を有する。今回1種類ではあるが autologous の細胞を用いた感受性試験でも肺癌細胞単独と線維芽細胞の混在時とでは17%のSD活性比の差があり、線維芽細胞の影響の可能性が示唆された。

clonogenic assay は線維芽細胞の発育がみられないことから、最も利用価値があるとされているが<sup>9)</sup>、操作の複雑性や colony 形成率が低く判定までに時間を要することが難点<sup>6)7)</sup>であり、MTT hybrid assay<sup>4)</sup>等が考案されている。しかしながら Mosmann の MTT colorimetric assay 法<sup>9)</sup>はより簡便・迅速であることより、この方法を用いながら線維芽細胞の影響をできるだけ除外する方法を見出すために、培養線維芽細胞を肺癌細胞に混合しその影響につき検討した。

in vitro 制癌剤感受性試験には一定の方法は定めら

れていないが、幾つかの解決されるべき問題点があり、制癌剤の投与時期もその一つである。秋山ら<sup>9)</sup>は、切除標本から得られた細胞を用いる場合、第1日目の細胞は放置しておいても自然に死滅する細胞が含まれるため3日間の培養期間を置き、再増殖する細胞のみの感受性を求めようとした。今回の検討でもプレート作製後24時間ではSD活性は一旦減少しその後増加することより妥当な考えと思われた。しかしこの方法に基づきわれわれが行った線維芽細胞を混合し3日間の培養期間を置いた実験では、組み合わせの61%に癌細胞単独と20%以上の感受性の変化が認められた。一方培養期間を置かずに制癌剤を同時投与すれば最高14%の感受性亢進がみられたのみであり、3日間の検討で培養期間が増すにつれ経時的に線維芽細胞の影響が強まった。つまり制癌剤を同時投与した場合の感受性は、3日間培養後に得られる感受性よりやや高目となるが、少なくとも癌細胞と線維芽細胞が1対1の割合であれば線維芽細胞の影響は有意に押さえられた。

しかし切除標本を用いた場合、プレート作製24時間以内では附着した細胞が少なく、浮遊細胞と附着細胞との感受性に差を生じる可能性が考えられるため、プレートに fibronectin を前処置して比較した。fibronectin 前処置のプレートでは明らかに細胞の附着が良好であったが、コーティングしなかったプレートとSD活性および感受性に差を認めず、標本の保存が良好で生きた腫瘍細胞が十分に含まれておれば、制癌剤を同時投与する方法で信頼の置けるデータが得られると思われた。

制癌剤感受性試験における線維芽細胞の影響因子をさらに検討するために、線維芽細胞培養液(C.M)を用い制癌剤感受性に及ぼす影響を調べたところ、31組中3組に癌細胞単独より20%以上の感受性亢進がみられた。この亢進作用のみられる組み合わせのひとつはLuci10と線維芽細胞VIIIの組み合わせであるが、Luci10はヌードマウス可移植性で低分化扁平上皮癌であっ

た。感受性を亢進させる線維芽細胞は43歳の女性で原発腫瘍の大きさの割には広範なリンパ節転移を認める腺癌組織より得られたものである。このC.MをLuci10に加え3日間培養することによりCDDPに対するLuci10の感受性はSD活性比で30%、CDDPの濃度では2~3倍の感受性の亢進がみられた。この感受性亢進作用は経時的に増強され、また線維芽細胞VIIIに100GYの照射を行い増殖能を消失させても認められるが、このC.Mを10分間煮沸すると消失することより線維芽細胞培養液中のpolipeptideからなるsoluble factorによるものと考えられた。そこでまずこのC.M中の生理活性物質の有無を探るために線維芽細胞が合成することがよく知られているprostaglandin(PG)<sup>10)</sup>の濃度を測定したところE<sub>2</sub>, E<sub>1</sub>, A+B, Fやtoromboxan B<sub>2</sub>などが高濃度に含まれていた。

つぎに感受性に影響を与えるfactorを同定する目的で線維芽細胞よりやや合成分泌されることが知られているもの<sup>11)12)</sup>のうち入手可能なfibronectin, PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF, EGF (Epidermal Growth Factor)<sup>13)</sup>, 小細胞癌より分泌されるbombesinとEGF (Fibroblast Growth Factor)を加え感受性試験を行ったところ、EGFで類似した作用が認められたが、EGFとprostaglandinを組み合わせた場合には感受性亢進作用が強まった。しかしLuci10にはEGF receptor<sup>14)</sup>は免疫染色法でみる限りでは認められず、またこのC.MでLuci10のG<sub>0</sub>・G<sub>1</sub>期が刺激され増殖が促進されるにもかかわらず、uci10内のCDDP濃度には有意の上昇は認められなかった。またこのC.Mは8種類の肺癌細胞のうち4種類の増殖を促進させる(表3)が、感受性が亢進されたのはLuci10のみであったことから、感受性亢進の作用起点を明らかにすることはできなかった。しかしながらこれらの因子による感受性亢進作用も制癌剤の同時投与により除外可能であった。

以上より制癌剤感受性試験では混在する線維芽細胞の直接的な作用あるいはsoluble factorを介した間接的作用による影響が及ぶため、今までは明確な根拠なくして行われていたが、今後切除標本を用いた制癌剤感受性試験では、線維芽細胞の影響を最少限に押さえるために制癌剤を同時投与すべきであると思われる。

#### まとめ

肺癌細胞と線維芽細胞を用いて制癌剤感受性試験を行うことにより以下の結論を得た。

1. 線維芽細胞の感受性はADM, VP-16に対しては肺癌細胞よりやや高く、CDDP, MMCおよび5-FUに

対しては同等であった。

2. 線維芽細胞においても制癌剤感受性にheterogeneityが認められた。

3. 肺癌細胞に線維芽細胞を1対1で混合し、制癌剤感受性試験を行う場合、制癌剤を投与する前に3日間の培養期間を置けば、61%に感受性の変化が認められたが、制癌剤を同時投与すれば、線維芽細胞の影響が除外できた。

4. 線維芽細胞より合成・分泌されるfactorの中に一部の肺癌細胞に対し制癌剤感受性を亢進させる物質が存在した。

稿を終えるに当たり、肺癌細胞の供与を賜りました名古屋大学第2外科渡辺 正先生および愛知県がんセンター上田龍三先生に深謝いたします。なお本研究は平成2年度文部省科学研究費補助金の助成により行ったものである。

#### 文 献

- 1) Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197: 461, 1977.
- 2) Salmon, S.W., Soehnlen, B.J., Durie, B.J.M., et al.: Clinical correlations of drug sensitivity in tumor stem cell assay. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res. ASCO.*, 20: 340, 1979.
- 3) Bogden, A.E., Cobb, W.R., Lepage, D.J., et al.: Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse: Six-day subrenal capsule assay. *Cancer*, 48: 10, 1981.
- 4) Hida, T., Ueda, R., Takahashi, T., et al.: Chemosensitivity and radiosensitivity of small cell lung cancer cell lines studied by a newly developed 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) hybrid assay. *Cancer Res.*, 49: 4785, 1989.
- 5) Hoff, D.D., Casper, J., Bradley, E., et al.: Association between human tumor colony-forming assay. Results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, 70: 1027, 1981.
- 6) Selby, P., Buick, R.N. and Tannock, I.: A critical appraisal of the human tumor stem cell assay. *N. Engl. J. Med.*, 308: 129, 1983.
- 7) Weisenthal, L.M. and Lipmann, M.E.: Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treat. Rep.*, 69: 615, 1985.
- 8) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65: 55, 1983.

- 9) 秋山清次, 市橋秀仁, 今泉宗久, 他: In vitro 抗癌剤感受性試験とその臨床応用に関する研究. 日癌治, 20: 1285, 1985.
- 10) Korn, J.H.: Substrain heterogeneity in prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis of human dermal fibroblasts. Arthritis Rheum, 28: 315, 1985.
- 11) Shirasna, K., Morioka, S., Watani, K., et al.: Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells by medium conditioned with normal human fibroblasts. Cancer Res., 48: 2819, 1988.
- 12) Ehrismann, R.C., Kalla, P. and Pearson, C.A.: Participation of tenascin and transforming growth factor in reciprocal epithelial-mesenchymal interactions of MCF7 cells and fibroblasts. Cancer Res., 49: 4322, 1989.
- 13) Kurobe, M., Furukawa, S. and Hayashi, K.: Synthesis and secretion of an epidermal growth factor (EGF) by human fibroblast cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun., 131: 1080, 1985.
- 14) Cerny, T., Barnes, D.M., Hasleton, P., et al.: Expression of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human lung tumors. Br. J. Cancer, 54: 265, 1986.

### A STUDY OF FIBROBLASTS IN THE CHEMOSENSITIVITY TESTING ON HUMAN LUNG CANCER CELL LINES

Masanori Sakakibara<sup>1</sup>, Tatsuo Uchida<sup>2</sup>, Munehisa Imaizumi<sup>1</sup> and Toshio Abe<sup>1</sup>  
 Department of Thoracic Surgery, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan<sup>1</sup>  
 Department of Surgery, Aichi Hospital, Aichi, Japan<sup>2</sup>

The purpose of this study is to assess effects of fibroblasts in the vitro chemosensitivity testing on human lung cancer cells and to remove them. Fourteen lung cancer cell lines and 14 fibroblasts derived from resected specimens of lung cancers were used, whose S.D (succinate dehydrogenase) activities were measured with MTT colorimetric assay. The chemosensitivity of a lung cancer cell alone was compared with that of mixed cancer cell and fibroblast. As results, S.D activities of fibroblasts were less 2~4 fold than those of lung cancer cells. Fibroblasts were as sensitive to CDDP, MMC and 5-FU as lung cancer cells, but more sensitive to ADM and VP-16 than them. When sensitivity testings were performed on mixed cancer cells and fibroblasts, or mixed cancer cells and conditioned media of fibroblasts to CDDP with 3 day's incubation times, the sensitivity was affected in 61%, or 10% of all the pairs, respectively. However, when these tests were done without any incubation times, the sensitivity was not affected.

Therefore, it was suggested that anticancer drugs had to be simultaneously added when single cell suspensions were plated if resected specimens were used in a anticancer drug sensitivity test.