

# イヌ可移植性性器肉腫細胞のグルコース消費を指標とした制 ガン剤感受性試験の開発

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	渡辺, 幸彦 中西, 章男 江島, 博康
巻/号	35号
掲載ページ	p. 82-86
発行年月	1986年12月

## イヌ可移植性性器肉腫細胞のグルコース消費を 指標とした制ガン剤感受性試験の開発

渡辺幸彦・中西章男・江島博康・黒川和雄

日本獣医畜産大学 第一外科

**要約** イヌ可移植性性器肉腫 (Canine Transmissible Venereal Tumor, CTVT) 細胞のグルコース消費の抑制率によって、制ガン剤の感受性を評価する目的で、その基礎的条件 (培地・細胞濃度・培養日数) について検討し、また、その最適条件下で、CTVT に対する各種制ガン剤の感受性の有無を検討した。その結果、(1) 培地は DM-160 が適当であった。(2) 細胞濃度は  $0.5-1 \times 10^6/ml$  が適当であった。(3) 培養日数は 3 日以降が適当であった。

サイクロフォスファミド、カルボコン、シトシンアラビノシド、アドリアマイシン、マイトマイシン C の CTVT に対する感受性試験の結果では、サイクロフォスファミドとカルボコンが高い感受性を示した。

キーワード：制ガン剤感受性試験、グルコース消費、CTVT。 日獣畜大研報, 35, 82~86, 1986.

悪性腫瘍に対する化学療法は今日単剤投与から多剤投与へ切りかわり、主作用を高め、副作用を軽減させる方向へ進展している。よりよい臨床成績を得るために新しい制ガン剤のコンビネーションや投与スケジュールが開発されている。このような進展の背景には、より高い感受性の選択法の開発が不可欠である。近年、人医領域においては制ガン剤の感受性試験が報告され、実際の臨床に応用されている。獣医学領域においては、制ガン剤の選択についての客観的方法は確立されておらず、ヒトのそれに順じているのが現状である。

今回、我々は悪性度の高い腫瘍が高い解糖能を有していることを利用して、腫瘍細胞のグルコース代謝の抑制率によって制ガン剤の感受性を決定する方法を考案し、その基礎的検討として、イヌ可移植性性器肉腫 (Canine transmissible venereal tumor, CTVT) を用いて、培地、細胞濃度、培養日数の各条件について、また、CTVT に対する数種の制ガン剤の感受性を評価し、興味ある知見を得たので報告する。

### 実験材料および方法

#### 1. 腫瘍細胞

使用した細胞は 6 例の雑種犬の皮下に移植継代している CTVT の増殖期細胞である<sup>9)</sup>。腫瘍は手術により切除し、周囲の結合織や、壊死部は取り除き、Hank's

balanced salt solution (HBSS 日水製薬) 中で、ハサミを用いて 1~2 mm 大に細切し、これを #100 stainless steel mesh でろ過し、2 回 HBSS で洗浄した。混入した赤血球は、Tris buffer solution (hydroxy methyl amino methan,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) を 37°C で 5 分間作用させて溶血し、その後、HBSS で 3 回洗浄し、比重勾配法<sup>4,9)</sup>によって腫瘍細胞を遊離した。すなわち、Ficoll-Isopaque (比重 1.077, 武藤化学) を HBSS で 75%, 50% の各濃度に希釈し、これを、プラスチック試験管の底部より、100%, 75%, 50% の順に、各々 1 ml, 2 ml, 2 ml 宛重層した。その上に細胞浮遊液 5 ml を重層し、室温で 600 G, 20 分間遠心した。遠心後、各層に分離された細胞を、それぞれ採取し、HBSS で 3 回洗浄したのち、トリパンブルー染色を行ない、生存率と混入率を算定した。実験には、細胞の生存率が高く、また、他の細胞の混入率の低い層を用いた。

#### 2. 培地

培地は、RPMI-1640 (日水製薬) および、DM-160 (極東) を用い、使用に際しては、それぞれ、10% イヌ非働化血清、Hepes (同仁化学); 5.9575 g/l, レグルタミン (和光純薬); 0.2923 g/l, ゲンタマイシン (エッセクス日本); 80 mg/l, ファンギソン (三共); 2.5 g/l を添加した。

### 3. 細胞濃度の調整

細胞濃度は細胞浮遊液を培地で1回洗浄したのち調整した。すなわち、 $2 \times 10^6/ml$ 、 $1 \times 10^6/ml$ 、 $5 \times 10^5/ml$ の3種類である。その後、96穴 microtiter-plate (NUNC) に  $0.2 ml$  ずつ分注した。Negative control は細胞浮遊液の代わりに培養液の同量を  $0.2 ml$  注入した。

### 4. 培養

培養は中西<sup>7)</sup>らの方法を参考にして行ない、全て4重培養とした。プレートは密閉し、 $38^\circ C$  インキュベーターで、培養日数の検討は、1日、2日、3日、および4日について行なった。

### 5. グルコース濃度の測定法

培養後のグルコース濃度はグルコース-B-テスト (和光純薬) を用いて測定した。腫瘍細胞によるグルコースの消費は下記の式より求めた。

$$\begin{aligned} & \text{CTVT 細胞のグルコース消費量} \\ & = \text{Negative control のグルコース量} \\ & \quad - \text{CTVT 細胞培養後のグルコース量} \end{aligned}$$

### 6. 制ガン剤の種類と濃度

感受性試験に用いた制ガン剤は Mitomycin C (MMC; 協和発酵), Adriamycin (ADM; 協和発酵), Cyclophosphamid (CPM, 活性型の 40847; シオノギ), Cytosin arabinosid (Ara-C; 日本製薬), Carboquin (CQ; 三共) の5種類である。

薬剤の濃度は、ヒトの制ガン剤感受性試験に用いられている *in vitro* の量を規定量と設定し、その10倍量とその1/10量の3種類の濃度について検討した。すなわち、それぞれの濃度は、MMC:  $20 \mu g/ml$ ,  $2 \mu g/ml$ ,  $0.2 \mu g/ml$ , ADM:  $200 \mu g/ml$ ,  $20 \mu g/ml$ ,  $2 \mu g/ml$ , CPM:  $200 \mu g/ml$ ,  $20 \mu g/ml$ ,  $2 \mu g/ml$ , Ara-C:  $200 \mu g/ml$ ,  $20 \mu g/ml$ ,  $2 \mu g/ml$ , および CQ:  $20 \mu g/ml$ ,  $2 \mu g/ml$ ,  $0.2 \mu g/ml$  である。

制ガン剤の各濃度を  $0.1 ml$  ずつ 96 穴マイクロプレートの各ウェルに分注し、そこへ  $2 \times 10^6/ml$  に調整した腫瘍細胞浮遊液を  $0.1 ml$  加え、密閉し、よく攪拌して  $38^\circ C$  インキュベーターで培養した。培養は全て4重培養とした。

### 7. グルコース消費の抑制率の算定法

グルコース消費の抑制率は、消費したグルコース量を求め、下記の式にあてはめて算出した。

$$\text{抑制率} = (C - A) \div (B - A) \times 100$$

A: 制ガン剤非添加のグルコース量

B: 培地のグルコース量

C: 制ガン剤添加のグルコース量

## 結 果

### 1. 培養の至適条件

比重勾配法を用いた腫瘍細胞の回収率: 比重勾配による分離を行なう前の腫瘍細胞の生存率は平均 18.9% であった。しかし、それを Ficoll-Isopaque の 50%, 75%, 100% の3層に分離したのちの腫瘍細胞の生存率は 50% 層が 88.7%, 75% 層が 81.6% を示し、100% 層は細胞が極めて少なく算定はできなかった (Table 1)。

75%, 50% の各層はいずれも腫瘍細胞が主体で、結合繊細胞、上皮細胞などの混入は、極めて少なかった。また、50% 層の腫瘍細胞の方が 70% の層のそれよりも大型であった。

培地: グルコースの消費に関して培地を比較検討したところ、Fig. 1 に示したように、 $2 \times 10^6/ml$  の細胞数では DM-160 において、グルコースは2日目まで消費されてしまっている。一方、グルコース含量が DM-160 の2倍である RPMI-1640 では4日目においても消費されてしまうことはなく、消費カーブは上昇している。 $2 \times 10^6/ml$  以下の細胞濃度では、DM-160 と RPMI-1640 の間には差はみられなかった。

細胞濃度と培養日数: DM-160 を用いた細胞濃度の比較では、Fig. 2 に示すように、 $2 \times 10^6/ml$  では、培地中のグルコース含量は、ほとんど2日目まで消費されてしまった。 $1 \times 10^6/ml$  では、培地のグルコース含量のほぼ半分を3日間で消費し、4日目に変化はみられなかつ

Table 1. Viabilities of CTVT cells before and after separations by discontinuous Ficoll gradient method.

CTVT No.	Before	After interface		
		50%	75%	100%
1	26.0*	72.0	89.5	—
2	17.5	88.0	92.0	—
3	25.0	95.5	55.0	—
4	28.0	95.0	83.0	—
5	28.0	92.0	85.0	—
6	20.0	92.5	64.0	—
7	22.0	96.0	75.5	—
8	9.0	86.0	96.0	—
9	7.0	78.0	84.0	—
10	6.0	92.0	92.0	—
Average ± S. D.	18.9 ± 8.2	88.7 ± 7.6	81.6 ± 12.5	—

\*: Viability was judged by Trypan blue stain (%)

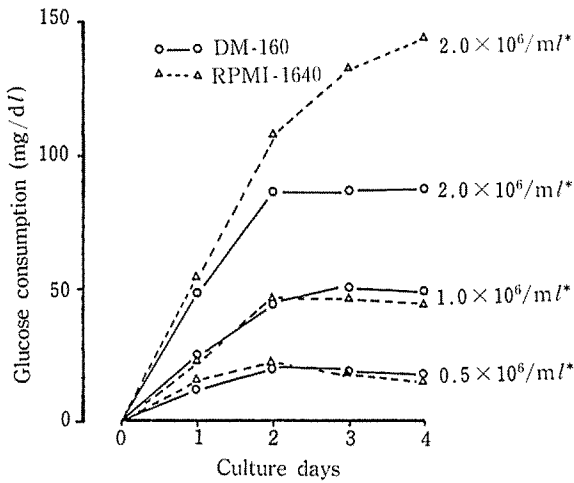


Fig. 1. Comparison of glucose consumption between two culture media and various concentration of cells.

\*: The number of CTVT cells

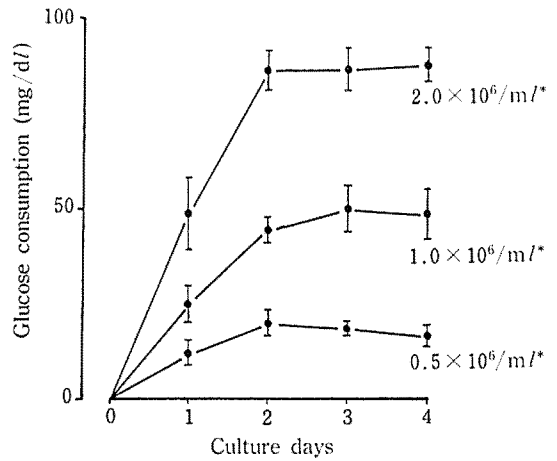


Fig. 2. Correlation between culture days and various cell concentrations in culture medium, DM-160.

\*: The number of CTVT cells

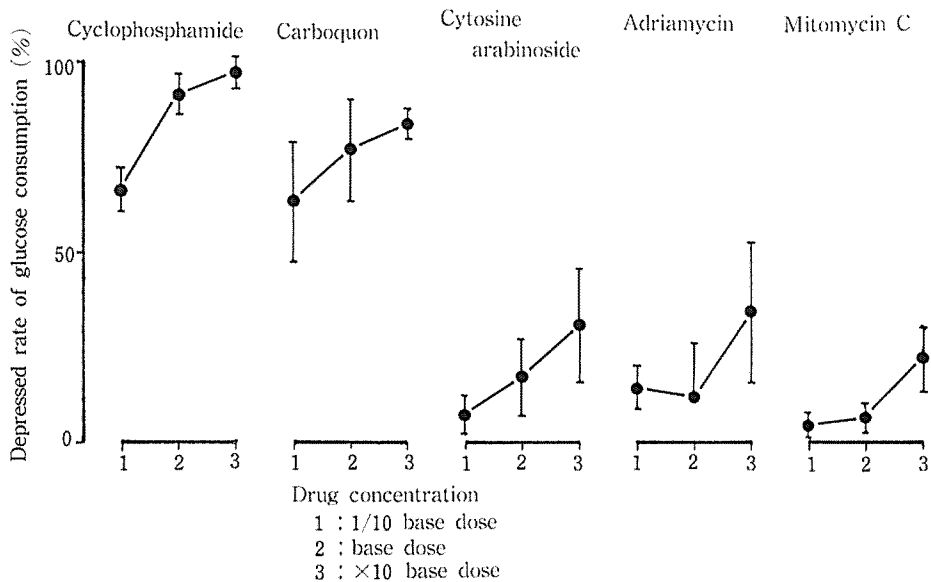


Fig. 3. Depressed rate of glucose consumption of CTVT cells against various anti-cancer agents.

Table 2. Optimal culture condition for glucose consumption of CTVT cells.

Medium	: DM-160 (containing with 2 mM L-glutamine and 25 mM HEPES)
Serum	: Normal dog serum (inactivated at 56°C for 30 minutes)
Cell concentration	: 0.5—1.0 x 10 <sup>6</sup> /ml
Incubation period	: Sealed tightly and incubated at 38°C for 3 days.

た。5×10<sup>6</sup>/ml では、2日間で40 mg/ml を消費し、その後変化は見られなかった。

以上のことから、CTVT を用いた場合の培養至適条件は Table 2 のようにまとめることができた。

## 2. CTVT 細胞に対する各種制ガン剤感受性の評価

前記の至適条件下において、CTVT 細胞に対する制ガン剤の感受性を測定評価したところ、CPM と CQ では、1/10 量、通常量、10 倍量のいずれにおいても、グルコース消費の抑制率は60%以上の高い値を示した (Fig. 3)。また、他の薬剤における、グルコース消費の抑制率はいずれも平均で50%以下であった。

## 考 察

現在、ヒトにおいて用いられている制ガン剤感受性試験には、*in vitro* の方法として、INK 法<sup>9)</sup>、SDI 法<sup>9)</sup> などの酵素活性の変化を指標とする方法、核酸、タンパク合成阻害をアイソトープの取り込みでみる方法<sup>8)</sup>、細胞の増殖や形態の変動を指標とする方法、Organ culture による方法<sup>10)</sup>、孵化鶏卵を用いる方法<sup>9)</sup>、Stem cell assay によるコロニー法<sup>1)</sup>、などがあり、*in vivo* の方法には、スードマウスを用いる方法<sup>11)</sup>などがあるが、いずれも操作がむずかしかったり、客観的に判定できなかったりなど、獣医臨床領域への内挿は困難と思われた。そこで、獣医臨床領域への応用を目的として、腫瘍細胞のグルコース消費を利用した感受性試験の開発を試みた。

腫瘍細胞の回収においては、Ficoll-Isopaque 50% 層に集積する部分が生存率や細胞の形態においても最もよい結果を示した。これは、Sykes<sup>1)</sup> や仁尾<sup>8)</sup>らの比重勾配法を用いた最上層、すなわち50%層は線維芽細胞や上皮細胞の混入が多く、腫瘍細胞は少ないという報告とは異っていた。これは、CTVT が遊離性の細胞で特に増殖期には線維芽細胞などの浸潤が少なく<sup>6)</sup>、また、大型の細胞のため、50%層の細胞より、75%層の細胞が小型で、また、100%の層には、ほとんど細胞が集まらないという性質のためと思われた。

培地は通常、RPMI-1640 や MEM などが用いられている。しかし、本試験では、グルコースの消費の抑制によって感受性を判定するため、培地に含まれているグルコース量は少ない方が感度はよいと考えられた。さらに、細胞濃度を1×10<sup>6</sup>/ml以上に設定することは通常の大サイズの腫瘍においてはほとんど不可能である。そこで、グルコース含有量がRPMI-1640の約半分であるDM-160を選択した。事実、DM-160を用いた場合、Fig. 1のように培養2日目以降は、グルコースは消費されてしまい、消費率の算定は極めて容易であった。

細胞濃度は5×10<sup>6</sup>/mlと1×10<sup>6</sup>/mlで測定可能であった。この細胞濃度は腫瘍の種類によっても異なると思われるが、本試験では、5×10<sup>6</sup>~1×10<sup>6</sup>/mlの範囲で実施可能と思われた。

培養日数は2日でも充分であるが、本試験の場合、培養期間全部のグルコース消費量を求めた方が感度は良くなることと、培養日数をのばしてもその影響は受けにくいことなどから、その期間は3日間とした。临床上、検査の迅速性は重要なファクターであり、Fig. 1の結果からすると2日培養でも可能かもしれない。

今回、用いた制ガン剤は、アルキル化剤の CPM と CQ、抗生物質性抗ガン剤の MMC と ADM、代謝拮抗剤の Ara-C の5種類を用いた。CPM は masked compound で *in vivo* では主に肝臓で代謝されて活性型となって抗腫瘍作用を示すため、*in vitro* の実験には不適当である。そこで、活性型の CPM (40487-S)<sup>2)</sup> を本試験に使用した。

今回の感受性試験は、グルコースの消費の抑制率で適否を判定するため、濃度依存性の制ガン剤を用いる必要がある。そこで、今回は、アルキル化剤と抗生物質性抗ガン剤を用いた。また、Ara-C は代謝拮抗剤であるが、作用時間を延長すると指数的に抗ガン作用を示し、小動物での併用療法に用いられることが多いのでこれも検索対象とした。

各制ガン剤の濃度は、ヒトの制ガン剤感受性試験においても、一定の規準がないため、市橋ら<sup>2)</sup>のヒトガン由来培養株に及ぼす形態的变化や、仁尾ら<sup>8)</sup>の臨床的な治療学の予測血中濃度から設定する方法などを参考に規定量を求め、今回は、その量を基準とした10倍量と1/10量の3種類で検索した。

CTVT を用いた感受性試験では、いずれも、CPM、CQ が高い抑制率を示した。このことは、CTVT の治療として CPM や CQ の投与が、最も適していることを示唆している。今後、*in vivo* においてその効果を臨床的に確認していく必要があると思われる。

## 謝 辞

この研究にあたり、活性型 CPM (40487-S) を提供して下さいました塩野製薬株式会社、また、本研究の推進にあたり、ご協力を頂いた第一外科学教室の室員各位に深謝する。

## 文 献

- 1) HAMBURGER, A. W., SALMON, S. E. (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells.

- Science, 197, 461~463.
- 2) 市橋秀仁・村岸英彦・近藤成彦他 (1974). Endo-xan 活性型による適応判定の試み. 最新医学, 29 (9), 1853~1857.
  - 3) 市橋秀仁・伊藤勝基・林敬一郎・近藤達平 (1978). 孵化鶏卵を用いる制癌剤感受性試験. 最新医学, 33(11), 2289~2292.
  - 4) J. A. SYKES, J. WHITESCARAVER, L. BRIGGS, J. H. ANSON (1970). Separation of tumor cell from fibroblasts with use of discontinuous density gradients. Journal of the national cancer institute, 44(4), 855~864.
  - 5) 近藤達平・市橋秀仁 (1978). SDI 法による感受性試験. 最新医学, 33(11), 2239~2247.
  - 6) 中村隆志・相見和宏・中西章男・他 (1983). 犬の可移植性生殖器腫瘍に関する研究. 日本獣医畜産大学研究報告, 32, 115~119.
  - 7) 中西章男・相見和宏・江島博康 (1974). グルコース消費試験を応用したインスリンバ幼若化反応の測定. 日本獣医畜産大学研究報告, 33, 100~105.
  - 8) 仁尾義則・稲本 俊・大垣和久・菅 典道 他 (1985). 制ガン剤感受性試験-DNA 合成 ( $^3\text{H}$ -Thymidineuptake) 阻害率よりみた臨床例の検討. 日外会誌, 86(1), 8~21.
  - 9) 西川正夫・宮沢政栄 (1978). INK 法について. 最新医学, 33(11), 2227~2238.
  - 10) 田口鐵男・薄金眞雄・藤田昌英 (1978). Organ culture を用いた制癌剤感受性試験について. 最新医学, 33(11), 2221~2226.
  - 11) 谷 忠憲・西廻和春・新本 稔・服部考雄 (1978). スードマウスを応用した制ガン剤感受性試験. 最新医学, 33(11), 2293~2299.

## Sensitivity Test of Anti-Cancer Agents based on Depressed Rate of Glucose Consumption for Canine Transmissible Venereal Tumor Cells

Yukihiko WATANABE, Akio NAKANISHI, Hiroyasu EJIMA  
and Kazuo KUROKAWA

First Department of Surgery,  
Nippon Veterinary and Zootechnical College, Tokyo

### ABSTRACT

Sensitivity test of anti-cancer agents based on depressed rate of tumor cells' glucose consumption was developed. Some fundamental culture conditions (culture medium, cell concentration and day of culture) analyzed. Sensitivity test of anti-cancer agents for Canine Transmissible Venereal Tumor (CTVT) cells was examined for optimum culture conditions. As a result, it was indicated that (1) DM-160 was suitable for culture medium, that (2) the cell concentration was  $0.5-1.0 \times 10^6/\text{ml}$  and that (3) the day of culture was on and after 3 days. When sensitivity tests for CTVT cells was performed with five anti-cancer agents in these optimum conditions, there was a statistically significant difference in depressed rate of glucose consumption among Cyclophosphamide and Carboquon, and Cytosine arabinoside, Adriamycin and Mitomycin C. From the results mentioned above, Cyclophosphamide and Carboquon were seemed to show a high sensitivity against CTVT cells.

**Key words:** cancer sensitivity test, glucose consumption, Canine Transmissible Venereal Tumor.  
Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 35, 82~85, 1986.