MTT アッセイを用いた口腔癌の制癌剤感受性試験に関する基礎的検討

田中 絹子・久保田英朗・香月 武
黒河博之・今村英夫・胡 兆良

Basic studies of chemosensitivity tests in oral cancer by MTT assay

Kinuko TANAKA・Eiro KUBOTA・Takeshi KATSUKI
Hiroyuki KUOKAWA・Hideo IMAMURA・Hu Zhao-LIANG

Abstract: We applied the *in vitro* colorimetric dye reduction technique described by Mosmann to carry out chemosensitivity tests of human squamous cell carcinomas.

The assay is based on the selective reduction of the tetrazolium salt, MTT, by cells which remain viable after exposure to drugs. Mitochondrial dehydrogenases at the sites of coenzyme Q as well as cytochromes b and c in viable cells convert the yellow form of the salt to an insoluble intracellular purple formazan. Solubilized formazan can then be quantitated spectrophotometrically.

Squamous cell carcinoma cell lines which we established from oral cancer patients were used throughout the experiments. A linear relationship between the number of viable tumor cells, $0.625 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ cells/well, and absorbance at 590 nm was established. With cell numbers over 2×10^4 cells/well, this relationship no longer existed, and this necessitated adjusting the number of target tumor cells to 1×10^4 in the assay. The formazan formation reached plateau by 2 h of culture period. The assay was so sensitive that it could distinguish the fine sensitivities of various SCC sublines to an anti-cancer drug. By using a multititer plate, the assay can be used to readily test a large number of samples with much easier and less expensive technique. It also exhibits high sensitivity and reproducibility.

All of these results indicate that chemosensitivity tests by MTT assay are useful for screening oral cancers.

Key words: MTT assay (MTT アッセイ), chemosensitivity test (制癌剤感受性試験), anti-cancer drugs (制癌剤)

緒 言

癌細胞の制癌剤感受性試験には、human tumor clonogenic assay (HTCA)^{1,2)}, cytotoxicity assay^{3,4)}, radioactive precursor を用いた incorporation method⁵⁾, 脱水素酵素活性を利用した succinic dehydrogenase inhibition test (SDI 法)⁶⁾ などがあるが、いまだ広く臨床

応用されるにいたっていない。本郷ら⁷⁾, Hamburger ら⁸⁾, 西條ら⁹⁾ はスクリーニングとしての制癌剤感受性試験には、手技が簡単であること、感度と特異性が高く安価なこと、測定が迅速であり、手技が画一的で容易に標準化できること、時間依存性のある制癌剤にも濃度依存性のある制癌剤のどちらにも使用できること、制癌剤の *in vivo* の臨床効果と相関が高いことなどが要求されるとしている。

3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazoyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) は、生細胞中のミトコンドリア内に存在する脱水素酵素 coenzyme Q や cytochrome b, c などにより還元されると黄色の tetrazolium 塩から紫色の MTT-formazan 結晶を形成する色素¹⁰⁾である (図1, 写真1)。ある一定範囲の細胞数において、

佐賀医科大学歯科口腔外科学教室

(主任: 香月 武教授)

Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Saga Medical School (Chief: Prof. Takeshi Katsuki)

受付日: 平成4年8月20日

写真 1

a. MTT 反応前の SCC 細胞

b. formazan の針状結晶が形成された MTT 反応後の SCC 細胞

図 1 MTT アッセイの基本原理

生細胞数と MTT-formazan 形成量は比例関係にあることが報告されており¹¹⁾, MTT-formazan 量を比色定量することにより間接的に生細胞数を推測することができる。

Mosmann らの報告したこの MTT アッセイを用いた制癌剤感受性試験¹²⁾は, 前述の条件を満たす方法として最近注目されている。われわれは, MTT アッセイを用いて口腔癌の制癌剤感受性試験を行うために基礎的研究を行った。

材料および方法

1. 腫瘍細胞

感受性試験には, われわれが舌癌患者の癌転移リンパ節から樹立した扁平上皮癌細胞株 SCC およびその亜株

(subline) のほかに, 子宮頸癌から樹立された扁平上皮癌細胞株である A431, 赤芽系白血病細胞株である K562 を用いた。これらの細胞は 10% FCS 添加 RPMI 1640 培地中で 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養維持した。

2. MTT

MTT (Sigma 社製) は phosphate buffered saline (PBS) で 5 mg/ml の濃度に溶解調整し, 細胞と MTT を反応させる際, 各ウェルに 10 μ l (最終濃度 0.25 mg/ml) ずつ分注した。

3. 制癌剤

口腔癌治療に用いる peplomycin (PEP), cis-diamminedichlor platinum (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU) の 3 種の制癌剤を Hanks' balanced salt solution (HBSS 液) にて 25, 5, 1, 0.2, 0.04 μ g/ml の 5 段階希釈を行い使用した。また, 測定は triplicate で行った。

4. 細胞の培養と MTT-formazan 定量法

培養には 96 ウェル平底マイクロプレート (Corning 社製) を用いた。一定数 ($0.0625 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ cells/well) の細胞を前述の 10% FCS 添加 RPMI 1640 培養液に浮遊させ 100 μ l/well で各ウェルに播き, 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で数日間 (3~7 日) 培養を行った。培養期間は制癌剤を加えていないコントロールウェルの細胞が, ウェルの底面にほぼ均一に増殖するまでとし, 培養中の制癌剤の洗浄は行わなかった。

培養後, マイクロプレートの各ウェルに MTT を分注し, さらに 2~3 時間培養した。MTT を添加培養後, プレートを 1,200 rpm で 6 分間遠心して細胞を沈澱

させ、上清を吸引した。つぎに MTT-formazan を溶解させるために、酸性イソプロパノールより短時間で溶解可能であり約1.4倍の吸光度を示す100% DMSO¹³⁾を、各ウェルに 100 μ l 加え攪拌した。溶解した MTT-formazan の発色の度合を分光光度計を用いて 590 nm の波長で比色定量した。

5. 実験方法

1) 各ウェルあたりの培養細胞数が MTT アッセイに及ぼす影響の検討

細胞数が少ない場合 MTT-formazan の生成量が少なく吸光度計の感度以下となるため、また細胞数が多すぎると発色の度合が強すぎて結果に差が出ないことが予想されるため、1ウェル当たりの適切な細胞数を決定する目的で以下の実験を行った。1ウェルあたりの細胞数を 0.0625×10^4 , 0.125×10^4 , 0.25×10^4 , 0.5×10^4 , 1×10^4 , 2×10^4 cells/well の6段階として PEP に対する感受性試験を行い、細胞数と MTT-formazan 形成量との比例関係を検討した。

2) MTT の反応時間が MTT-formazan 形成量に及ぼす影響の検討

MTT を生細胞に反応させると MTT-formazan が形成され、その量は経時的に増加し、ある時間でプラトーに達する。制癌剤に対する感受性の相違を比較する場合、MTT-formazan 形成量がプラトーに達した時点で測定すべきである⁹⁾。そこで MTT の至適反応時間を決定するために、MTT の反応時間を30分、1、2、3、6、9時間の6段階において PEP に対する感受性試験を行った。

3) Cytotoxicity Index (C.I.) による効果判定

MTT アッセイを用いた制癌剤感受性試験は非常に感度が高く、個々の細胞の制癌剤に対する微妙な感受性を検出できることが示唆されている⁷⁾。そこで株化 SCC 細胞およびその亜株 (SCC-1, SCC-2, SCC3-D, SCC 4-B)、子宮頸癌より樹立された SCC 細胞 A431、赤芽系白血病細胞 K562 について制癌剤感受性試験を行い、本郷らの考案した C.I. table¹⁴⁾を用いて有効薬剤の増殖抑制効果の判定を行った。

$$C.I. (\%) = (1 - \text{制癌剤入り実験群の吸光度の平均} / \text{対照群の吸光度の平均}) \times 100$$

C.I. ≥ 60 を有効域とした。

4) 制癌剤の相加、相乗ならびに拮抗効果の判定

制癌剤の組合せによる相加、相乗、拮抗効果の有無をみるために、PEP, CDDP, 5FU単独とこれらのうちの2種の薬剤を併用したもので感受性試験を行った。

2種類の制癌剤を単独で用いたときに50%の腫瘍細胞増殖抑制率を示す濃度をそれぞれA, Bとし、これらを混合して用いたときに同じく50%の増殖抑制を示す濃度をそれぞれa, bとした。相加、相乗効果の判定は、Sacchi ら^{15, 16)}の用いた Combination Index により、以

図2 1ウェルあたりの SCC 細胞数と MTT-formazan 形成量との関係

図3 SCC 細胞の各細胞数における PEP に対する感受性試験

下に示す計算で行った。

$a/A + b/B = 1$, 相加作用

< 1 , 相乗作用

> 1 , 拮抗作用

結 果

1. 各ウェルあたりの培養細胞数が MTT アッセイに及ぼす影響

段階希釈した細胞数と発色度を、制癌剤を加えていないコントロールウェルにおいて検討した結果、 $0.0625 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ cells/well までは発色と生細胞数が比例関係を示した(図2)。また、それぞれの細胞数での PEP に対する感受性試験の結果、 0.0625×10^4 cells/well の細胞濃度では、制癌剤濃度が $0.04 \mu\text{g/ml}$ のときコントロールの 113.7% の生細胞率を示した。これらの結果から、細胞数が少ないと必ずしも発色の度合と生細胞数が比例しないことがわかった。また、 2×10^4 個の細胞濃度では高濃度($25 \mu\text{g/ml}$)の PEP でも生存細胞数が 71.1% と高値を示し、発色の度合が強すぎて必ずしもこれが生細胞数の割合を反映していないことがわかった(図3)。

図 4 制癌剤無添加時の MTT-formazan 形成量の経時的変化

表 1 各種細胞の PEP に対する感受性

培養細胞	各制癌剤濃度での死細胞率(CI)				
	25	5	1	0.2	0.04 ($\mu\text{g/ml}$)
SCC-1	82.4	72.3	52.1	11.1	-42.6
SCC-2	84.0	52.8	23.5	7.7	7.7
SCC-3	78.6	58.3	18.4	1.2	36.9
SCC-4	47.6	26.8	21.1	28.2	-43.6
SCC 3-D	61.1	51.9	22.2	-1.9	-1.9
SCC 4-B	58.3	55.0	20.0	-136.7	-123.3
A-431	84.9	77.1	73.2	53.1	65.9
K-562	57.4	38.5	34.1	15.9	7.8

2. MTT の反応時間が MTT-formazan 形成量に及ぼす影響

SCC 細胞の感受性試験を、MTT の反応時間を種々変えて検討した結果、吸光度は経時的に増加し、2 時間でプラトーに達した (図 4)。このことはこの SCC 細胞では MTT-formazan 形成が終了するのに 2 時間を要することを示している。したがって、MTT の反応時間は 2 時間以上が適当と考えられた。

3. 種々の株化腫瘍細胞における 制癌剤感受性の相違について

種々の株化腫瘍細胞において制癌剤感受性試験を行った結果、以下のように亜株ごとに同一薬剤に対する感受性が異なることを認めた。すなわち PEP への感受性試験 (表 1) では、SCC-1 が $5 \mu\text{g/ml}$ で C.I. 72.3 % と強い殺細胞効果を示しているのに対して、SCC-4 および SCC4-B は $25 \mu\text{g/ml}$ の PEP でも有効域と設定した C.I. 60%に達しなかった。また子宮頸癌から樹立された扁平上皮癌細胞株 A431 は $1 \mu\text{g/ml}$ で C.I. 73.2% と SCC 細胞株と比較して非常に高い感受性を示したが、赤芽系

表 2 各種細胞株の CDDP に対する感受性

培養細胞	各制癌剤濃度での死細胞率(CI)				
	25	5	1	0.2	0.04 ($\mu\text{g/ml}$)
SCC-1	96.3	83.8	29.9	-2.5	-28.3
SCC-2	96.2	76.5	5.5	-35.0	-1.8
SCC-3	91.2	82.5	46.0	-56.2	5.8
SCC-4	82.9	78.6	26.4	25.7	8.6
SCC 3-D	81.1	68.9	44.6	18.9	28.4
SCC 4-B	94.5	45.2	-32.9	-79.5	-58.9
A-431	98.8	94.7	34.6	14.5	13.9
K-562	87.7	70.3	31.2	21.9	-4.4

図 5 SCC 細胞の PEP と CDDP に対する増殖抑制曲線

図 6 SCC 細胞の PEP と 5FU に対する増殖抑制曲線

白血病細胞株 K562 は $25 \mu\text{g/ml}$ で C.I. 57.4 % と PEP に対し比較的抵抗性であった。CDDP への感受性試験 (表 2) では SCC4-B を除いては、SCC 細胞の亜株間ではほぼ同様の感受性を示した。

図7 SCC細胞のCDDPと5FUに対する増殖抑制曲線

4. 制癌剤の相加、相乗ならびに拮抗作用の判定

50%の腫瘍細胞増殖抑制率を示したときの薬剤濃度は、PEP単独のとき0.6 μg/ml, CDDP単独のとき1.2 μg/ml, PEPとCDDPを併用したとき0.5 μg/mlであった。これによりCombination Index (CI)=0.5/0.6+0.5/1.2=1.25>1となり、両者は拮抗的に作用したことが示された(図5)。同様に、PEPと5FUの組合せではCI=0.3/0.6+0.3/8.5=0.535<1(図6), CDDPと5FUの組合せではCI=0.6/1.4+0.6/9.5=0.491<1となり(図7), それぞれ相乗効果を示した。

考 察

癌化学療法の進歩に伴って多種類の制癌剤が開発され、癌の治療率は向上している。しかしながら再発例、転移例や難治性癌症例に対してはいまだ制癌剤の効果が十分に発揮されず、根治する例は多くはない。頻回再発した症例の場合、制癌剤の選択は臨床医の経験に任せられているのが現状である⁷⁾。また、癌に無効な制癌剤の投与は逆に患者の免疫力を減退させ、腫瘍の増大や転移をまねく危険があるといわれており⁶⁾、すべての制癌剤がさまざまな副作用を引き起こすことを考えると、不用意な制癌剤の選択は避けなければならない。

このような理由から、これまでいくつかの制癌剤感受性試験の方法が報告され検討されてきた⁹⁾。従来から行われているHTCA法^{17,18)}は制癌剤を含んだ寒天培地上で腫瘍細胞を培養し、そのコロニー数を計算するもので頻用されている。しかしこの方法は培地の調整が煩雑であること、培養期間が長いこと(2~3週間)、さらに、出現したコロニー数を1ウェルずつ顕微鏡下で算定しなければならないことなどの欠点を有し、スクリーニング法としては実用的ではない。一方、近藤らの2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC)を用いるSDI法は、短期培養法による制癌剤感受性試験の中では感度が高く比較的よく用いられており、臨床的にもその有用性が

報告されている¹⁴⁾。MTTを用いる本法は、TTCを用いるSDI法と同様、細胞質内ミトコンドリアの脱水素酵素活性を指標として細胞の生死を判定するものであるが、SDI法よりも約10倍感度が高いといわれている¹³⁾。しかも、本法は洗浄などの操作が不要で、腫瘍細胞を96ウェルプレートで3~7日間培養後、そのプレートに直接MTTを作用させるだけでよく、操作が非常に簡単で一度に多数の検体を処理することが可能である。さらにMTTアッセイではプレートを直接分光光度計にかけ、瞬時のうち吸光度が検出でき、かつ客観性が保たれる利点がある。MTTアッセイと³H-チミジンの取り込み試験との比較では、いくつかの制癌剤において感受性に相違がみられたとの報告がある¹⁴⁾。これはDNA合成の有無で感受性を検出する³H-チミジン試験ではDNA合成終了後の核分裂時に作用するvincristine sulfate (VCR), vinblastine (VBC), vindesine (VDS)などの薬剤を感受性ありととらえることができないためと考えられている。

ただし、本法を用いて、新鮮腫瘍細胞の制癌剤感受性試験を行う場合、以下に示すいくつかの問題点がある。

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厳密には困難であること、
2. 本法で調べている感受性は、自己増殖可能なtumor stem cellsの感受性をみているのか、それとも放置しても死ぬ運命にある腫瘍細胞の感受性をみているのか不明であること、
3. 培養期間以降に効果が出現する制癌剤に対する感受性を見逃す恐れがあること、
4. *in vivo*と*in vitro*の感受性の相関性に疑問が残ること、
5. 生検時に得た細胞でただちに感受性試験を行った場合、生検時混入した細菌の持つ脱水素酵素がMTTを還元し偽陽性を呈する危険性があるなどである。

腫瘍細胞と正常線維芽細胞の分離は実際には困難であるが、腫瘍細胞と正常線維芽細胞の代謝活性および分裂速度には著しい相違があること、すべてのウェルには一定数の正常線維芽細胞が含まれていることを考えれば、MTT-formazanの形成量に影響を与えるのは大部分が腫瘍細胞のviabilityとなる。したがって、本法の精度に、同時に混在する正常線維芽細胞が影響を及ぼすことはほとんどないと考ええる。また、前記2,3,4に示したような問題点については、ヌードマウスを用いた制癌剤感受性試験¹⁹⁾、正常免疫マウス腎皮膜下移植法(subrenal capsule assay, SRC法)²⁰⁾、孵化鶏卵を用いる制癌剤感受性試験²¹⁾など、*in vivo*での実験を行い、*in vitro*との相関関係を検討する必要があると思われる。特に、SRC法においては、マウスとヒトで薬剤の体内代謝が異なること、腫瘍細胞の移植部位が腎皮膜下という特殊な条件下であることなど問題点はあるものの、臨床効果との高い相関率が示されており、有効な方法であると思われる。さらに、生検時に混入した細菌の汚染について

は、腫瘍細胞の培養時、培養液にペニシリン、ストレプトマイシンの他に $1 \mu\text{g/ml}$ のファンギゾンを追加することにより、腫瘍細胞増殖への影響を最小限に抑え、細菌の増殖を抑制することが可能であった。

腫瘍の中にはさまざまな腫瘍細胞クローンが存在するので、クローンが異なれば制癌剤に対する感受性が変わることが当然考えられる。同一薬剤を使った化学療法を頻回にくり返すと、それに感受性のある腫瘍細胞クローンは消失し、より抵抗性のクローンのみが残存し増殖することが予想される。より効果的な制癌剤を選択するためにも、迅速で、簡単な、しかも正確な制癌剤スクリーニング法の臨床応用が望まれる。われわれが行っている MTT アッセイによるスクリーニング法は上記を満たす有効な方法であると考ええる。

結 語

MTT アッセイを用いた口腔癌の制癌剤感受性試験のための基礎的実験を行った。その結果、

1. 培養細胞数を、 $0.125 \times 10^4 \sim 1 \times 10^4$ cells/well の間に設定すれば、生細胞数と MTT-formazan 形成量が比例関係にあることが示された。

2. MTT-formazan の形成には、2 時間以上要することがわかった。

3. MTT アッセイは、各株化腫瘍細胞間の制癌剤に対する感受性の相違を微妙に検出でき、制癌剤の組合せによる相加、相乗、拮抗効果の判定にも有効であることが示された。

4. MTT アッセイは、簡便で、再現性があり、しかも精度が高く、一度に大量の検体が処理できる方法として、制癌剤感受性試験に有効であることが示された。

稿を終えるにあたり、本研究に多大なるご協力をいただきました佐賀医科大学薬学部松永 尚博士に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197: 461-463 1977.
- 2) Salmon, S.E. and von Hoff, D.D.: In vitro evaluation of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. *Seminars in Oncology* 8: 377-385 1981.
- 3) Bosanquet, A.G. and Bird, M.C., et al.: An assessment of a short-term tumour chemosensitivity assay in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Cancer* 47: 781-789 1983.
- 4) Weisenthal, L.M., Marsden, J.A., et al.: A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* 43: 749-757 1983.
- 5) Cline, M.J. and Rosenbaum, E.: Prediction of in vivo cytotoxicity of chemotherapeutic agents by their in vitro effect on leukocytes from patients with acute leukemia. *Cancer Research* 28: 2516-2521 1968.
- 6) 近藤達平, 市橋秀仁, 他: 制癌剤適応判定法について. *癌の臨* 10: 17-21 1964.
- 7) 本郷輝明, 水野義仁, 他: マイクロプレート培養・生存細胞染色法による簡便な制癌剤感受性試験の開発. *癌と化学療法* 13: 247-254 1986.
- 8) Hamburger, A.W.: Use of in vitro-test in predictive cancer chemotherapy. *JNCI* 66: 981-988 1981.
- 9) 西條長宏, 佐々木康綱, 他: 化学療法剤の感受性試験. *代謝* 23: 261-272 1986.
- 10) 葛西正孝, 疋田一郎, 他: MTT アッセイを用いた T 細胞増殖の測定. *Medical Immunology* 12: 411-415 1986.
- 11) 菅原 勇, 石坂重昭, 他: MTT アッセイ—細胞増殖能および細胞障害試験に応用可能な迅速比色定量法. *医学のあゆみ* 128: 733-735 1984.
- 12) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63 1983.
- 13) 福地かおり, 宮本京子, 他: マイクロプレートを用いた SDI 法の基礎検討. *衛生検査* 38: 1287-1294 1989.
- 14) 本郷輝明, 藤井裕治, 他: マイクロプレート短期培養・MTT dye 還元法による制癌剤感受性試験. *癌と化学療法* 14: 472-477 1987.
- 15) Sacchi, M., Klapan, L., et al.: Antiproliferative effects of cytokines on squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 321-326 1991.
- 16) Chou, T.C. and Talalay, P.: Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enz Reg* 22: 27-55 1984.
- 17) 官澤文彦: 人肺癌における Human tumor clonogenic assay. *癌と化学療法* 12: 1552-1559 1985.
- 18) 大槌泰亮, 平木俊吉: Human Tumor Assay による制癌剤感受性試験. *肺癌症例における検討*. *癌と化学療法* 12: 1582-1587 1984.
- 19) 近藤達平, 今泉宗久, 他: ヌードマウスを用いた制癌剤感受性試験の効果判定基準に関する研究. *癌と化学療法* 14: 680-686 1983.
- 20) 西山正彦: Subrenal capsule assay (SRC assay) による制癌剤感受性試験の基礎的、臨床的研究. *日外会誌* 88: 152-162 1987.
- 21) 市橋秀仁, 伊藤勝基, 他: 孵化鶏卵を用いる制癌剤感受性試験. *最新医学* 33: 116-119 1978.