MTT アッセイを用いた口腔癌の制癌剤感受性試験 ——新鮮腫瘍細胞を用いての検討——

久保田英朗・田中絹子・香月 武
黒河博之・今村英夫

Chemosensitivity tests of oral cancer by MTT assay : Studies on fresh tumor cells

EIRO KUBOTA・KINUKO TANAKA・TAKESHI KATSUKI
HIROYUKI KUROKAWA・HIDEO IMAMURA

Abstract : Fresh surgical specimens from 14 oral cancer patients were used for chemosensitivity tests by MTT assay.

The chemosensitivity of 11 out of 19 samples taken from the patients was able to be assessed. The mean optical density (OD) of the control culture containing no drugs was 0.163, which was suitable for measuring the fine sensitivity of cells against various anti-cancer drugs. Squamous cell carcinomas (SCC) were highly sensitive to cisplatin (CDDP), followed by peplomycin (PEP) and 5-fluorouracil (5-FU).

Synergistic growth inhibitory effect was detected against 2 SCC when PEP was used in combination with small amounts of CDDP. Thus, MTT assay was considered to be a useful chemosensitivity screening test for oral cancers.

Key words : MTT assay (MTT アッセイ), chemosensitivity test (制癌剤感受性試験), oral cancer (口腔癌)

緒 言

制癌剤感受性試験については古くから数多くの方法¹⁻⁵⁾が検討されてきたが、いまだに広く臨床応用されるには至っていない。この原因としては、対象とする癌細胞の初代培養が困難であるという技術的問題に加え、*in vitro* や *in vivo* で行う感受性試験が煩雑で測定結果を得るまでに長時間を有する点にあった。

この点を改良し、色素還元法の中でも感度が高く比較的少量の腫瘍塊でアッセイを行うことができる MTT 法⁶⁾は、短時間で評価判定でき、臨床応用を行うに適した方法であると考えられている。われわれは、

株化扁平上皮癌細胞を用いた基礎的実験から、本法が口腔癌の制癌剤感受性試験に有用であることを報告してきた⁷⁾。

今回、実際に癌患者から得られた新鮮腫瘍細胞を用いた検討を行い、薬剤選択における MTT アッセイの有用性ならびに問題点をあきらかにした。

材料および方法

1. 新鮮腫瘍細胞の採取

口腔癌患者から生検によって得られた腫瘍塊 (約 5 mm³ 大) を、ペニシリン G (100 U/ml)、ストレプトマイシン (100 µg/ml)、ファンギゾン (1 µg/ml) を加えた Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS 液) で 3 回洗浄後、ピンセットとハサミを用いて無菌的に細片とし、0.2% コラゲナーゼと 0.1% デオキシリボヌクレアーゼ (Sigma 社) を含む HBSS 液に浮遊させ、37°C で 2 時間処理した。処理後、ピペッティングにより単細胞浮遊液を得、3 回洗浄して実験に供した。

佐賀医科大学歯科口腔外科学教室

(主任: 香月 武)

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

受付日: 平成 5 年 8 月 23 日

表 1 癌患者から採取された対象検体

検体番号	原発部位	病理組織型	細胞数	対照群の O. D. 値	コメント
No. 1	左側上顎歯肉 ～口蓋	高分化扁平上皮癌	—	0.056	判定可
No. 2	左側耳下腺	腺房細胞癌	3.6×10^5	0.206	汚染
No. 3	左側下顎歯肉 ～中咽頭	未分化扁平上皮癌	—	0.012	細胞数少
No. 4	右側下顎歯肉	高分化扁平上皮癌	5.2×10^3	0.025	細胞数少
No. 5	右側下顎歯肉	高分化扁平上皮癌	1.7×10^5	0.028	判定可
No. 6	右側下顎歯肉	高分化扁平上皮癌	—	0.518	判定可
No. 7	下顎歯肉	高分化扁平上皮癌	1.6×10^4	0.108	判定可
No. 8	左側顎下部	中分化扁平上皮癌	—	0.260	判定可
No. 9	左側上顎歯肉	高分化扁平上皮癌	—	0.040	判定可
No. 10	左側上顎歯肉	高分化扁平上皮癌	—	0.182	判定可
No. 11	左側下顎歯肉	中分化扁平上皮癌	—	0.013	細胞数少
No. 12	左側上顎洞	中分化扁平上皮癌	—	0.013	判定可
No. 13	口底	高分化扁平上皮癌	1.5×10^4	0.192	判定可
No. 14	口底	高分化扁平上皮癌	—	0.030	細胞数少
No. 15	下顎歯肉	高分化扁平上皮癌	2.3×10^4	0.004	細胞数少
No. 16	左側下顎歯肉	高分化扁平上皮癌	—	0.014	汚染
No. 17	右側下顎歯肉 ～頬部	明細胞癌	—	0.075	判定可
No. 18	右側下顎歯肉 ～頬部	明細胞癌	—	0.054	判定可
No. 19	舌	高分化扁平上皮癌	1.0×10^4	—	汚染

2. 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazoyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) の調整

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

口腔癌の治療に用いる peplomycin (PEP), cis-platin (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU) の3種の制癌剤を 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. MTT アッセイ

培養には 96 ウェル平底マイクロプレート (Corning 社) を用いた. 一定数 ($0.06 \sim 2 \times 10^4$ cells/well) の細胞を 10% FCS 添加 RPMI 1640 培地に浮遊させ, あらかじめ段階希釈した制癌剤を加えたプレートの各ウェルに播いた (100 μ l/well). このプレートを 37°C, 5% CO₂ インキュベーター中で3日間培養した.

培養後, マイクロプレートの各ウェルに MTT を添加し2時間培養して生細胞のミトコンドリア内の酵素による, MTT の還元を促した. ついで, 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. 次に, 形成された紫色の MTT-formazan

の結晶を溶解させるため 100%dimethylsulfoxide (DMSO) を各ウェルに 100 μ l 加え攪拌した. 溶解した MTT-formazan の発色 (紫色) 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.

増殖抑制率の判定は次式により行った. 増殖抑制率 (%) = (1 - 制癌剤入り実験群の吸光度の平均/対照群の吸光度の平均) $\times$ 100. 制癌剤無添加で培養した腫瘍細胞を対照群とした. いくつかの実験では, 対照群の O. D. 値を 100%とし, 実験群の増殖抑制効果を対照群との O. D. 比 (% O. D.) で表した.

結 果

1. 各種腫瘍患者からの新鮮腫瘍細胞の回収率と対照群の O. D. 値との関係

14名の口腔癌患者から, 19検体の採取が可能であった. 回収した細胞数は検体ごとに異なり, $0.52 \times 10^4 \sim 36 \times 10^4$ 個の生存新鮮腫瘍細胞が得られた. 19検体それぞれの対照群の O. D. 値の範囲は, 0.04~0.518の値を示した (表1). 対照群の MTT-formazan 発色による O. D. 値が十分高く, 実際に判定が可能であったのは 19検体中 11検体であり, これらの O. D. 値の平均は 0.163であった (表2). 細胞回収率が高くても必ずしも O. D. 値が高いとは限らず, 各細胞の viabil-

表 2 新鮮腫瘍細胞の感受性判定可能率と対照群の O. D. 値

対象検体数	判定可能	O. D. 値 (対照群)
19	11/19 (58%)	0.163

写真 MTT を還元し formazan の針状結晶を形成した新鮮扁平上皮癌細胞、核細胞質比の大きな腫瘍細胞のみが MTT-formazan を形成し(矢印)、正常線維芽細胞や血球には formazan の形成をみない。

ity や cell cycle に MTT-formazan 形成量が依存していることが示された。顕微鏡下で観察すると、増殖している腫瘍細胞は MTT を取り込み、MTT-formazan の針状結晶が形成されていた(写真)。一方、正常線維芽細胞や血球は、腫瘍細胞と比較し著しく代謝活性が低いため、2時間の培養では MTT-formazan の形成ができていないことがわかった。

2. 種々の新鮮腫瘍細胞における制癌剤感受性の相違について

0.04~25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の PEP, CDDP, 5-FU などの各制癌剤に対する感受性試験を行った(図1)。その結果、50%以上の増殖抑制を示す薬剤を感受性ありとすると、PEP と CDDP に対しては 70% (7/10)、5-FU には 29% (2/7) の腫瘍細胞が感受性を示した(表3)。また、50%の増殖抑制を示す薬剤濃度を個々の腫瘍細胞で比較すると、1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で PEP, CDDP が 1 例ずつ、5 $\mu\text{g/ml}$ で CDDP 3 例、5-FU 1 例、25 $\mu\text{g/ml}$ で PEP 6 例、CDDP 3 例、5-FU 1 例であり、CDDP>PEP>5-FU の順に感受性が高かった。

3. 制癌剤の併用効果の判定

制癌剤併用による相加、相乗ならびに拮抗作用を検出するために、検体 8 と検体 10 で PEP と CDDP の併用による腫瘍細胞増殖抑制効果を検討した(図2, 3)。その結果、検体 10 の扁平上皮癌(SCC)細胞は PEP, CDDP に対し比較的抵抗性であるが、PEP を段階希釈したウェル中に CDDP (1 $\mu\text{g/ml}$) を添加する

図 1 新鮮腫瘍細胞の PEP, CDDP, 5-FU に対する感受性の相違

表 3 新鮮腫瘍細胞に対する制癌剤の感受性率と 50%抑制濃度 (IC_{50})

制癌剤	PEP	CDDP	5FU
感受性例/施行例	7/10	7/10	2/7
感受性率	70%	70%	29%
IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)			
25<	3	3	5
25	6	3	1
5	0	3	1
1	1	1	0

と、腫瘍細胞はほとんど増殖できず、この SCC 細胞に対しては PEP と CDDP の併用で相乗効果のあることが示された。検体 8 の SCC 細胞は、CDDP よりも PEP に対して感受性があるが、さらに CDDP 1 $\mu\text{g/ml}$ を添加すると、PEP 単独の場合 (0.2 $\mu\text{g/ml}$) よりも 1/5 倍低い濃度 (0.04 $\mu\text{g/ml}$) の PEP でほぼ 50%の増殖抑制効果が得られ、相乗効果のあることが示された。

図 2 検体 10 の扁平上皮癌細胞の PEP, CDDP 併用による相乗的増殖抑制効果

図 3 検体 8 の扁平上皮癌細胞の PEP, CDDP 併用による相乗的増殖抑制効果

考 察

新鮮腫瘍細胞を対象とした制癌剤感受性試験には、癌細胞の *in vitro* ないし *in vivo* での培養と制癌剤接触後の癌細胞の *viability* の判定という 2 つのプロセスからなっている。われわれの行っている MTT アッセイ⁷⁾は *in vitro* で腫瘍細胞の単層培養を行い、その *viability* を細胞がもつ酵素による MTT 還元能で判定するもので^{8,9)}、従来の方法よりも手技が簡単で高い再現性と精度を有している。

しかし、手術材料より単離した細胞を単層培養した場合、対照群の細胞の維持が可能である期間は 2～3 日であることが多く、時間に依存して効果を発揮するフッ化ピリミジン系薬剤の効果を十分に評価することは困難であると考えられる。消化器癌（特に大腸癌）を対象として行った実験でも、本来第一選択薬剤とされているフッ化ピリミジン (5-FU) の効果が、単層培養法による MTT アッセイでは過小評価されたという報告がある¹⁰⁾。本研究でも、扁平上皮癌細胞に効果があると考えられ、濃度依存性である CDDP, PEP に高い増殖抑制効果が認められたが、5-FU に対する感受性は低かった (図 1)。このように単層培養を用いた MTT アッセイでは培養期間内に癌細胞の *viability* が低下する場合がほとんどであり、これを改善するには古川らが報告しているコラーゲンマトリックスを用いた 3 次元培養による長期培養法¹¹⁾を応用する必要があると思われる。

感受性試験の効果判定を左右する条件として、十分な量の単離腫瘍細胞を得ることができるか、また培養中の細菌汚染による偽陽性反応を除外することができるかなどがある。細胞の回収率が良くても休止期にある細胞が多いと、酵素による MTT 還元の度合も低下し実際には判定が困難な検体も存在した (表 1)。さらに、口腔内から採取した腫瘍塊は種々の細菌で汚染さ

れているのが普通であり、これを除去するため通常の抗生物質の他にファンギゾンを含む培地を使用した。しかし、これでも細菌汚染を完全に防ぐことができず、3 日間の培養期間中に細菌（特に真菌）汚染で判定困難となった検体も存在した。

MTT アッセイでは、検体中に混入した正常間質細胞が判定に影響することも考えられる。腫瘍細胞と正常間質細胞との分離は実際には困難である。しかし、MTT の反応時間が短ければ、これら正常細胞による干渉は低いものと推察される (写真)。これは、腫瘍細胞と正常間質細胞の代謝活性や分裂速度に著しい相違があるためと考えられる。すべてのウェルに一定量の正常細胞が含まれているので、これらの細胞により MTT が還元され発色しても、制癌剤の高濃度域での O. D. 値のバックグラウンドが高くなるだけで、臨床上の効果判定には特に問題ないと思われた (図 2)。

制癌剤感受性試験法には、ヌードマウスを用いた試験³⁾、正常マウス腎被膜下移植法⁴⁾、顕微鏡下での腫瘍細胞コロニー試験¹⁾、生化学的方法^{6,7)}などの種々の試験法が報告されている。これらいくつかの *in vivo*, *in vitro* での感受性試験の結果と臨床効果との相関を調べた Weisenthal と Lippman の報告¹²⁾によると、感受性試験で無効の薬剤が臨床上の効果も無効であった真陰性率が 92%、逆に感受性試験でも有効と判定され臨床効果も有効であった真陽性率が 63%であった。コロニー法による感受性試験の結果と臨床効果との相関を集積した Von Hoff の報告¹³⁾でも、真陰性率 91%、真陽性率 69%と前者とほぼ同様の結果であった。これらの事実は、増殖可能な新鮮腫瘍細胞が十分得られれば試験の方法を問わずその判定効果は臨床効果を予測できることを示唆している。

したがって、培養の汚染に注意し、細胞回収の方法を工夫すれば、われわれが行っている単層培養による MTT アッセイは、制癌剤感受性試験の臨床でのスクリーニング法として応用できる簡便さと正確さを有し

ており、有効薬剤とくに相乗効果を期待できる多剤併用薬剤の選択に有用であると考えられる。

結 語

ヒト口腔癌から得られた新鮮腫瘍細胞を用いて MTT アッセイによる制癌剤感受性試験を行った。その結果、

1. 14 名の患者から 19 検体の腫瘍細胞が回収され、そのうち 11 検体 (58%) において制癌剤に対する感受性判定が可能であった。

2. 判定が困難であった 8 検体のうちわけは、細胞回収率の低値 (5 例)、培養の細菌による汚染 (3 例) であった。

3. 扁平上皮癌細胞は CDDP に低濃度で感受性があり、ついで PEP, 5-FU の順に有効であった。

4. 多剤併用による相乗効果の検出にも本法は有効であることが示された。

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) 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 Res* 28 : 2516-2521 1968.
- 3) 近藤達平, 今泉宗久, 他 : ノ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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 : 55-63 1983.
- 7) 田中絹子, 久保田英朗, 他 : 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. *日口外誌* 38 : 1809-1814 1992.
- 8) 葛西正孝, 足田一郎, 他 : MTT アッセイを用いた T 細胞増殖の測定. *Medical Immunology* 12 : 411-415 1986.
- 9) 菅原 勇, 石坂重昭, 他 : MTT アッセイ細胞増殖能および細胞傷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.
- 10) Furukawa, T., Kubota, T., et al. : Chemosensitivity testing of clinical gastrointestinal cancers using histoculture and the MTT endpoint. *Anticancer Res* 12 : 1377-1382 1992.
- 11) Furukawa, T., Kubota, T., et al. : High *in vitro-in vivo* correlation of drug response using spongel-supported three-dimensional histoculture and the MTT endpoint. *Int Cancer* 51 : 489-498 1992.
- 12) Weisenthal, L. M. and Lippman, M. : Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays. *Cancer Treat Rep* 69 : 615-632 1985.
- 13) Von Hoff, D. D. : Human tumor cloning assays : applications in clinical oncology and new antineoplastic agent development. *Cancer Metast Rev* 7 : 357-371 1988.