— 原 著 —

薬剂量からみた AUC 依存性薬剤に対する各種 抗癌剤感受性試験の比較検討

武本 俊彦

日本医科大学内科学第4教室

A comparative study of chemosensitivity tests in vitro for AUC-dependent drugs focusing on the usefulness of MTT assay with drug washout and additional incubation (M-MTT)

Toshihiko Takemoto

Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Although many in vitro chemosensitivity tests for anticancer agents have been reported, no scientific assessment of the optimum exposure time and dose of anticancer drugs for such tests has been established.

We assessed the cytotoxicity of 4 anticancer agents (CDDP, CBDCA, ADM, MMC) by analyzing the relationships between the IC50 values and the drug exposure time in a study using PC-14 cells. The clinical AUC (Area Under the Curve) of each drug was compared with the dose giving 50% inhibition of the control level for cell growth (IC50) in a conventional MTT assay (C-MTT). A modified MTT assay, which involved washing out of the drugs and additional incubation (M-MTT) and a HTCA (Human Tumor Clonogenic Assay) was also carried out with PC-9 and PC-14 cells.

The results suggested that all of 4 anticancer drugs were AUC-dependent agents. The HTCA was considered to be the assay giving results closest to the doses effective in clinical practice among the 3 assays tested, while the C-MTT gave a much higher AUC than the clinical AUC. It is suggested the reason is that in the C-MTT all the cells are viable at the end of drug exposure. Thus, not only viable cells with the potential of proliferate but also those without this potential are included in the results.

On the other hand, viable cells with a proliferative potential are better assessed by the M-MTT, which has an additional incubation time.

This study indicated that the C-MTT was unsuitable in vitro chemosensitivity tests for new AUC-dependent drugs. In contrast, the HTCA and M-MTT showed the doses of AUC to be effectively closer to those in clinical practice and proved useful for analyzing the cytotoxicity of AUC-dependent drugs.

Key words: chemosensitivity test, MTT assay, AUC-dependent drug, additional incubation

緒 言

HTCA (Human Tumor Clonogenic Assay)¹⁾ や MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Assay²⁾ など、これまでに様々な in vitro 抗癌剤感受性試験が臨床

効果の予測、新しい抗癌剤のスクリーニングなどの癌化学療法の基礎的研究手段を目的に考案されてきている^{3,4)}。しかし、細菌学の薬剤感受性試験のように確立された抗癌剤感受性試験は存在していない。この理由の一つとして、臨床で用いられる薬用量における薬剤の血中動態から算出される薬剂量と in vitro における抗癌剤感受性試験での薬剂量との関係について検討されていなかったことがあげられる。一方、人癌細胞培養株を用いた細胞障害性に関する近年の解析により、抗癌剤は

Correspondence to Toshihiko Takemoto, Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

その細胞障害性により AUC (Area Under the Curve) 依存性薬剤および時間依存性薬剤に大別されることが判明している。前者ではその細胞障害性は AUC (Area Under the Curve), すなわち活性型薬剤濃度×暴露時間のみで想定されることが明らかとなった^{5,6)}。現在, AUC 依存性薬剤においてはアニマルスケールアップ⁷⁾を応用して in vitro のデータを直接に臨床使用の参考とすることさえ可能となってきた⁸⁾。

今回, 我々はいくつかの AUC 依存性薬剤を用いて Mosmann らにより開発された従来からの MTT assay (以下 Conventional MTT assay; C-MTT)²⁾, 暴露薬剤の洗浄後に追加培養を行う MTT assay (以下 Modified MTT assay; M-MTT) および HTCA¹⁾におけるそれぞれの追加培養に対する 50%増殖抑制率を得るために必要とされる AUC 量と通常臨床で投与される薬用量における AUC 量の比較を行った。そして薬剤量 (AUC) の点からどの抗癌剤感受性試験が臨床に近いものであるかを検討し, 同時に in vitro 抗癌剤感受性試験における薬剤接触条件および薬剤洗浄後の追加培養について検討したので報告する。

実験材料ならびに方法

(1) 実験材料

1) 細胞

実験に使用した細胞は培養人肺腺癌細胞株である PC-9, PC-14 の 2 株である。これらの細胞は抗生物質添加 RPMI 1640+10%FCS (牛胎児血清) を含む組織培養フラスコ内で 37℃, 5%CO₂ の環境下で培養した。

2) 薬剤

Cis-dichlorodiammine platinum (以下 CDDP; 日本火薬株式会社より供与) は, その生理食塩水溶解液を直前に生食水を用いて目的とする濃度に希釈して実験に使用した。Cis-diammine-1, 1-cyclobutane dicarboxylate platinum II (以下 CBDCA; ブリストルマイヤーズ研究所より供与), Doxorubicin hydrochloride (以下 ADM; 協和発酵工業株式会社より供与), Mitomycin C (以下 MMC; 協和発酵工業株式会社より供与) はそ

れぞれの原末を使用直前に生食により溶解, 希釈して使用した。

(2) 測定方法

1) In vitro 抗癌剤感受性試験の方法

C-MTT では, RPMI 1640+10%FCS により 1×10^5 個/ml に調節された癌細胞浮遊液 135 μ l を 96 穴 Tissue Culture Plate (FALCON 3072) に分注し, 生食により種々の濃度に希釈された薬剤 15 μ l を加えて 37℃ 5%CO₂ 下にて 72 時間の培養を行った。その後, MTT 溶液 (5 μ g/ml in PBS) 15 μ l を加えて 4 時間 37℃ 5%CO₂ 下に置き, 10%SDS (n-Dodecylsulphate sodium salt) in 0.01 N HCL 溶液 100 μ l を加えた。24 時間後, マイクロプレートリーダー (日本バイオ・ラッドラボラトリース株式会社, モデル 3550 EIA リーダー) により 560 nm の波長で吸光度を測定した。

M-MTT では, 癌細胞浮遊液 (1×10^5 個/ml in RPMI 1640+10%FCS) 0.9 ml に種々の濃度の薬剤 0.1 ml を加えて 37℃ 5%CO₂ 下にて 2 時間の薬剤暴露 (薬剤の AUC 依存性を検討する実験では 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 時間) を行った。薬剤洗浄後 RPMI 1640+10%FCS にて再浮遊させ 1 ml とし, その 150 μ l を 96 穴 Tissue Culture Plate に分注, 37℃ 5%CO₂ 下にて 72 時間追加培養を行った。その後 MTT 溶液 (5 μ g/ml in PBS) 15 μ l を加え, 以下 C-MTT と同様の方法にて測定を行った。

HTCA¹⁾では種々の濃度の薬剤 0.3 ml に, 癌細胞浮遊液 (PC-9, PC-14 とともに 5×10^4 個/ml in RPMI 1640+10%FCS) 2.7 ml を加え, 37℃ 以下にて 2 時間の薬剤暴露を行った。薬剤洗浄後, RPMI 1640+10%FCS 2.7 ml に再浮遊させ, さらに 3% noble agar 0.3 ml を加え, その 1 ml を 35 mm 培養皿を用いた二重軟寒天培地の土層とした。

下層として最終濃度 0.6% noble agar を含む 10%FCS+5%HSA (Horse Serum Albumin) 加 McCoy's 5A の 1 ml を用いた。37℃ 5%CO₂ 環境下にて 14 日間培養後コロニーカウンター (東洋測器 Colony-Analyzer CA-7) でコロニー数を算定した。

2) 薬剤の AUC 依存性の検討

薬剤の暴露時間を 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 時間とした M-MTT により PC-14 (人肺腺癌細胞株) に対する各薬剤 (CDDP, CBDCA, ADM, MMC) の細胞障害効果を薬剤の暴露時間と IC 50 値 (薬剤暴露群の IC 50 値: 薬剤非暴露のコントロール値の 50% 値を示すときの薬剤濃度) との相関から検討した。

すなわち, $\log [IC 50] - \log [暴露時間]$ グラフを描き AUC 依存性が否かの検討を行った。このとき -1 の傾きを持つ直線になるものは AUC 依存性薬剤と判断される⁹⁾。

3) 各抗癌剤感受性試験における IC 50 およびその AUC (AUC_{IC50})

各感受性試験 (C-MTT, M-MTT および HTCA) では培養人腺癌細胞株の PC-9 と PC-14 細胞を対象とした。それぞれの感受性試験における 50% 抑制を示す薬剤暴露培地 (RPMI 1640 + 10% FCS) 中のその薬剤の AUC 量 (AUC_{IC50}) を算出するために, CDDP と CBDCA では薬剤暴露培地中の CDDP, CBDCA からの非蛋白結合プラチナ (free Pt.) 濃度を経時的に測定した。CDDP, CBDCA を薬剤暴露培地に加え 37°C 5% CO₂ 下にて 0 (薬剤 RPMI 1640 + 10% FCS に加えた直後のもの), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 時間静置後, アミコンセントフリー (code number 4104) で 1970 G, 20 分間遠心分離して限外濾過液を得た。この限外濾過液中の free Pt. 濃度をフレイムレス原子吸光度法¹⁰⁾により測定した。

さらに台形法により薬剤暴露培地中における free Pt. の AUC_{IC50} を計算した。

ADM と MMC では, 薬剤暴露培地中の ADM, MMC 濃度を経時的に HPLC 法 (High Performance Liquid Chromatography)¹¹⁾で測定し, CDDP や CBDCA と同様に台形法により薬剤暴露培地中の ADM, MMC の AUC_{IC50} を求めた¹²⁾。

4) 追加培養過程における IC 80 と細胞数の変化

PC-14 細胞浮遊液 (1×10^5 個/ml in RPMI 1640 + 10% FCS) 0.9 ml に種々の濃度の薬剤 0.1 ml を加えて 37°C 5% CO₂ 下にて 72 時間

の薬剤暴露を行った。

次いで薬剤非洗浄群では, PC-14 細胞浮遊液 150 μ l を 96 穴 Tissue Culture Plate に分注した後に MTT 溶液 (5 μ g/ml in PBS) 15 μ l を加えて 4 時間 37°C 5% CO₂ 下に置き, 10% SDS in 0.01 N HCL 溶液 100 μ l に加えた。24 時間後, マイクロプレートリーダーにより 560 nm の波長で吸光度を測定した。

薬剤洗浄群では 2 回の薬剤洗浄後, 24, 48, 72, 96 時間の追加培養を行った後に MTT 溶液 (5 μ g/ml in PBS) 15 μ l を加え, 以下 C-MTT と同様の方法により吸光度を測定して IC 80 値の変化を検討した。

また, 追加培養過程における生細胞数の変化を調べる目的で CDDP 2 μ g/ml, CBDCA 30 μ g/ml, および ADM と MMC はそれぞれ 1 μ g/ml による 72 時間の薬剤暴露を行った。そして薬剤洗浄後, それぞれの追加培養時間 (0, 24, 48, 72 時間) ごとに Dye exclusion 法¹³⁾により生細胞数を測定した。Dye exclusion 法は, PC-14 細胞浮遊液 5.0 μ l にトリパンブルー溶液 50 μ l を混和した後, 生細胞数を血球計算板を用いて算定した。

結 果

1. 薬剤の AUC 依存性の検討

CDDP, CBDCA, ADM および MMC の 4 薬剤の M-MTT を用いた $\log [IC 50] - \log [暴露時間]$ グラフはいずれも傾き -1 の直線として示された (Fig. 1)。この実験結果から 4 薬剤ともすべて AUC 依存性薬剤であることが判明した⁸⁾。

2. 各薬剤感受性試験における IC 50 およびその AUC (AUC_{IC50})

Table 1 は, それぞれの抗癌剤感受性試験で 50% 抑制を得るための, 各薬剤の $AUC (AUC_{IC50})$ と臨床使用時の $AUC (AUC_{CLIN})$ との比較を示したものである¹⁴⁻¹⁸⁾。4 薬剤すべてにおいて C-MTT, M-MTT, 次いで HTCA の順に高い AUC_{IC50} 値が得られた。特に C-MTT の場合, AUC_{CLIN} と比べて掛け離れて高値の AUC 量が必要とした。C-MTT では, PC-9 で得られた 4 薬剤

Fig. 1 log-log relationships between IC₅₀ and exposure time for (a) CDDP (b) CBDCA (c) ADM (d) MMC by modified MTT assay using PC-14 cells
cisplatin: CDDP carboplatin: CBDCA doxorubicin: ADM mitomycin: MMC IC₅₀: concentrations necessary for 50% cell kill. (μg/ml)

の AUC_{IC50}/AUC_{CLIN} 比は 101.2 ± 155.0 倍と著しく高く、さらに PC-14 においても 68.9 ± 89.9 倍と高かった。

M-MTT では、PC-9 の AUC_{IC50}/AUC_{CLIN} 比は 15.9 ± 21.3 倍と低下し、また PC-14 でも 9.3 ± 8.4 倍となっていた。さらに HTCA の場合、 AUC_{IC50}/AUC_{CLIN} 比は PC-9 で 0.69 ± 0.42 倍、同様に PC-14 でも 1.14 ± 1.13 倍という結果が得られた。

この実験結果から M-MTT、HTCA の順に AUC_{CLIN} に近い AUC 量で 50% 抑制率を得ることが可能であることが示された。

特に HTCA から得られた AUC 量は、臨床使用時に最も近い結果となっていた。

3. 追加培養過程における IC₈₀ および生細胞数の変化

薬剤非洗浄時の IC₈₀ 値と薬剤洗浄後に追加培養を行った群の経時的な IC₈₀ 値の変化を Table 2 に示した。薬剤洗浄群において洗浄直後(追加培養時間: 0 時間)と薬剤非洗浄群の IC₈₀ 値にはほとんど相違はみられなかった。さらに 4 薬剤すべてにおいて IC₈₀ 値は洗浄後の追加培養時間が延長するにしたがって低下し、72 時間の追加培養後における IC₈₀ 値は 0 時間の IC₈₀ 値の 14% から 24% にまで低下していた。

Table 1 Comparison of required AUC of four drugs (CDDP, CBDCA, ADM, MMC) to get 50% inhibition in three assays (C-MTT, M-MTT and HTCA) using PC-9, PC-14 cells and AUC in clinical practice

	AUC _{freePt} of CDDP (μg/ml × hr)	AUC _{freePt} of CBDCA	AUC of ADM	AUC of MMC
C-MMT				
PC-9	72.3 ± 31.8	672 ± 148	39.5 ± 31.3	160 ± 101
PC-14	79.5 ± 6.3	540 ± 180	40.7 ± 15.9	97.3 ± 8.8
M-MTT				
PC-9	19.7 ± 7.3	265 ± 35	4.9 ± 1.6	23.0 ± 15.0
PC-14	13.5 ± 2.7	315 ± 5	5.7 ± 0.3	10.5 ± 3.5
HTCA				
PC-9	1.4 ± 0.5	36 ± 22	0.38 ± 0.24	0.64 ± 0.36
PC-14	1.5 ± 0.9	52 ± 21	0.35 ± 0.14	1.34 ± 1.17
Clinical practice (AUC _{CLIN})	2.7~3.5 ⁽¹⁴⁾⁽¹⁸⁾ (CDDP 80~120 mg/m ²) d.i.v.	57.4~70.5 ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾ (CBDCA 375~450 mg/m ²) d.i.v.	1.2~2.2 ⁽¹⁷⁾ (ADM 50~70 mg/m ²) i.v.	0.48~1.05 ⁽¹⁸⁾ (MMC 15 mg/m ²) i.v.

The values calculated express means ± SD. (n=3)

cisplatin: CDDP carboplatin: CBDCA doxorubicin: ADM mitomycin C; MMC AUC: Area Under the Curve (μg/ml × hr)
c-MTT: Conventional MTT Assay (Mosmann) M-MTT: Modified MTT Assay HTCA: Human Tumor Clonogenic Assay

Table 2 IC 80 of four drugs (CDDP, CBDCA, ADM, MMC) in Conventional MTT assay and changes of IC 80 by time of additional incubation using PC-14 cells

	CDDP	CBDCA	ADM	MMC
IC 80 in Conventional MTT assay	$(\mu\text{g/ml})$ 14.078.0		0.92	0.34
Changes of IC 80 by additional incubation				
	(hr)	$(\mu\text{g/ml})$		
	0	13.270.0	0.86	0.30
	24	4.840.0	0.42	0.08
Additional incubation time	48	1.823.0	0.25	0.07
	72	1.917.0	0.16	0.06
	96	2.018.6	0.21	0.04

cisplatin; CDDP carboplatin; CBDCA doxorubicin; ADM mitomycinC; MMC
IC 80: concentrations necessary for 80% cell kill. $(\mu\text{g/ml})$

Fig. 2 Changes of viable PC-14 cells by time of additional incubation. Open circles (—○—) represent the numbers of viable cells which have no drug exposure. Open squares (—□—) represent the numbers of viable cells during drug exposure at each of (a) 2 $\mu\text{g/ml}$ CDDP, (b) 30 $\mu\text{g/ml}$ CBDCA, (c) 1 $\mu\text{g/ml}$ ADM, (d) 1 $\mu\text{g/ml}$ MMC. Each point indicates the means of three experiments ($n=3$).
cisplatin: CDDP carboplatin; CBDCA doxorubicin; ADM mitomycin C; MMC

72 時間の追加培養における生細胞数の変化を Fig. 2 に示した。4 薬剤ともコントロール群 (薬剤無処理のもの) において追加培養時に生細胞数の対数増殖過程が認められたものの、薬剤処理群では 4 薬剤とも生細胞数の対数増殖過程は見られなかった。

考 察

これまでに多くの抗癌剤感受性試験が報告されてきたが、いまだ確立されたものはない。この主な理由として、1) 正常細胞 (繊維芽細胞など) の混入など技術的な問題のために感受性試験の成功率や再現性に乏しいこと、2) 新しい抗癌剤のスクリーニングや臨床効果の予測を目的としたこれまでの感受性試験では、薬剤濃度や暴露時間の設定はそれぞれの抗癌剤感受性試験によって異なり、さらにその明確な設定根拠が明らかでなかった^{4,19,20}。3) さらに今までの感受性試験では、臨床で用いられる薬用量における薬剤の血中動態から算出される薬剤量と in vitro における薬剤量との関係について全く検討されていなかったこと、などがあげられる。

今回の PC-14 を用いた実験で、小沢ら⁹⁾の log [IC 50]·log [暴露時間] カーブにしたがって解析した結果、CDDP, CBDCA, ADM および MMC はすべて AUC 依存性であることが明らかにされた (Fig. 1)。この 4 薬剤が AUC 依存性である限

り、その細胞障害性は AUC 量によって規定される^{6,21)}。このため AUC 依存性薬剤では、今までのような薬剤濃度による細胞障害性の検討ではなく、それぞれの AUC 量によって抗癌剤の細胞障害性を検討することが理論的と考えられる。

また、M-MTT を用いた今回の AUC 依存性薬剤の実験結果からも、その暴露時間は任意の時間でよいことが示された (Fig. 1)。

RPMI 1640+10%FCS 中の各薬剤の AUC 量は、暴露倍地中の薬剤濃度×暴露時間 (台形法) で求めることが可能である¹²⁾。今回の実験で 4 薬剤の暴露倍地中における濃度変化についてみると、臨床投与時のような急激な薬剤の消失傾向はみられず²²⁻²⁴⁾、暴露後 72 時間経過した時点においても 4 薬剤すべてが検出された。とくに CDDP の薬剤暴露倍地中の薬物動態は投与後 3 時間で free Pt. が消失する臨床薬物動態²⁵⁾とまったく異なっていた。この理由として薬剤暴露倍地中の蛋白濃度が 0.9 g/dl と低値であるため CDDP の free Pt. が倍地中に長時間残存したものと考えられた。このことからみても、暴露倍地中では生体内と比べて抗癌剤の薬物動態に著しい相違が存在していることが明らかとなった。

一方、in vitro 抗癌剤感受性試験の再現性や成功率を高めるために使用する培養株の選択も重要な点である。今回の実験では PC-9 と PC-14 を使用したが、この培養株は技術的に single-cell suspension とすることが容易であり、コロニー形成能や感受性試験の再現性も高く、有用な培養株と考えられた²⁶⁾。

各抗癌剤感受性試験で 50%抑制率を示す各薬剤の AUC (AUC_{IC50}) と臨床使用時の AUC (AUC_{CLIN}) の比較では、C-MTT から算出された各薬剤の AUC_{IC50} は AUC_{CLIN} と比べて CDDP は 26.8 倍から 29.4 倍、CBDCA は 9.4 倍から 11.7 倍、ADM は 33.0 から 33.4 倍となり、とくに MMC は 202.7 倍から 333.3 倍と非常に高値となった。また、今回用いた培養株別の AUC_{IC50} も AUC_{CLIN} と比べて PC-9 は 101.1 倍、PC-14 は 68.7 倍となっていた。一方、暴露薬剤の洗浄と追加培養を加えた M-MTT における各薬剤の

AUC_{IC50} は AUC_{CLIN} の 4.1 倍から 47.9 倍にまで低下した。さらに HTCA より得られた AUC_{IC50} は、4 薬剤ともほぼ AUC_{CLIN} の約 0.04 倍から 0.68 倍で 50%抑制が得られていた。

この各抗癌剤感受性試験における AUC_{IC50} の相違の原因をみるために、薬剤洗浄後の追加培養の影響について検討した。暴露時間を洗浄した後の追加培養により、IC 80 値の低下が追加培養時間の延長に伴って認められた (Table 2)。また、IC 80 の変化を解明するために薬剤暴露後の追加培養中の細胞数変化を Dye exclusion 法¹³⁾でみると、追加培養時間が 72 時間までの間は薬剤処理後の癌細胞にはコントロール群に見られたような対数増殖過程は見られず、非増殖期に入っていることが判明した。さらに 4 薬剤とも死細胞数の経時的変化は薬剤処理群とコントロール群間ではほとんど相違はみられず、今回の実験で用いた薬剤量ではこの IC 80 値低下の原因として dividing cell death は関与していないものと考えられた (Fig. 2)。したがって、これらの実験結果より、C-MTT では感受性試験におけるすべての生細胞 (増殖能を有する細胞ならびに生き残っていても増殖能を持っていない細胞) をまとめて測定していると思われる。このために臨床使用時と比べて極端に高い AUC 量が必要になったと考えられた。つまり、暴露薬剤を洗浄した後に行う M-MTT では増殖能を有する生細胞をより選択的に検討していると推察された。

これらのことから臨床効果の予測を目的とした抗癌剤感受性試験で C-MTT を用いる場合には、そのカットオフ値 (抗癌剤の殺細胞性を決定する境界濃度) の薬剤量が非常に高値になるものと判断される。このカットオフ値は、多く症例の C-MTT の結果と臨床効果の相関によって決められた値であり、臨床効果を予測することについては科学的根拠があると言える。しかしながら、このカットオフ値は薬剤量から設定された値ではなく、例えば便宜的に最大血中濃度の 10 倍を指標とする設定根拠は不適切なものであると考えられる。しかも C-MTT は、1) 薬剤暴露時間が長く、薬剤暴露倍地中の薬剤量を測定することが容易で

ないため抗癌剤の AUC 量と細胞障害の相関関係を把握しにくく、2) 臨床使用時の薬剤量より非常に高い薬剤量で判定しているなどの問題点が存在している。

新しい抗癌剤のスクリーニングなど癌化学療法の基礎的研究手段としての抗癌剤感受性試験において、薬剤量は $\mu\text{g/ml}$, $\mu\text{M/ml}$ などの単位で表わされている^{26,27)}。しかしながら、今回検討した AUC 依存性薬剤においてこのような薬剤濃度を基準とした従来からの検討法では AUC 依存性薬剤を扱う場合には正当性がないと思われる。

今後の *in vitro* 抗癌剤感受性試験に求められることは、1) 抗癌剤の AUC 量と細胞障害性が定量的かつ、2) 臨床使用時の薬剤量に近い値で、その抗癌剤の細胞障害性が判定可能なことが重要な点と考えられる。これらの結果から HTCA と M-MTT は完全ではないが両条件を備えており、より臨床に近い AUC 量と細胞障害性の相関を定量的に判定することが可能であり、有用な抗癌剤感受性試験と思われた。

結 論

これまでの *in vitro* 抗癌剤感受性試験では、臨床で用いられる薬用量における薬剤の血中動態から算出される薬剤量と、*in vitro* 抗癌剤感受性試験における薬剤量との相関について検討した報告はなかった。

今回、CDDP, CBDCA, ADM, MMC の 4 薬剤が AUC (Area Under the Curve) 依存性か否かを検討した。次ぎに Mosmann らの MTT assay (C-MTT), 暴露薬剤を洗浄した後に追加培養を行う MTT assay (M-MTT) および HTCA (Human Tumor Clonogenic Assay) で、50% 抑制率を得るための AUC 量と臨床使用時の AUC 量とを比較することによって、どの抗癌剤感受性試験が臨床に近いものかを検討した。

1) $\log [\text{IC } 50] - \log [\text{暴露時間}]$ カーブの解析より CDDP, CBDCA, ADM および MMC はすべて AUC 依存性薬剤であることが判明した。AUC 依存性薬剤である限り、その細胞障害性はこれまでのような薬剤濃度によらず、AUC によって規定

されるべきものと判断された。

2) それぞれの抗癌剤感受性試験で 50% 抑制を得るための各薬剤の AUC 量と臨床使用時の AUC 量を比較したところ、HTCA と M-MTT が臨床に近い結果が得られたものの、C-MTT では臨床時と比べて著しく高値の AUC 量を必要とした。

3) Dye exclusion 法による検討から、C-MTT では薬剤処理後に増殖能が失われている細胞も含めて測定しているため、M-MTT と比べて AUC 量が高くなると推測され、暴露薬剤の洗浄と追加培養の導入により増殖能を有する生細胞のみについてより選択的な検討が可能になったと考えられた。

AUC 依存性薬剤では、新しい抗癌剤のスクリーニングなど癌化学療法の研究手段として *in vitro* 抗癌剤感受性試験を行う場合、C-MTT で得られた結果は生体内の薬物動態と比べて大きな相違がみられ、より臨床に近い AUC 量と細胞障害性を定量的に検討し得る HTCA や C-MTT が適していると考えられた。

本稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました本学内科学第 4 教室仁井谷久暢主任教授に深謝いたしますとともに、小林国彦博士、青山昭徳講師、林原賢治先生、和才さつき女史および教室の諸兄に深甚の謝意を表す。

なお、本論文の要旨は、第 28 回、第 29 回日本癌治療学会 (平成 2 年 10 月、平成 3 年 10 月)、第 24 回制癌剤適応研究会 (平成 3 年 3 月) および第 50 回日本癌学会 (平成 3 年 9 月) にて発表した。

また、薬剤を提供していただいた日本化薬株式会社、協和発酵工業株式会社およびブリistol・マイヤーズ株式会社と実験の協力をしていただいた諏訪正人博士、菊地 孚博士、日吉千浪博士および武本宣教博士に深謝します。

文 献

- 1) Hamburger, A.M., and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, 461~463, 1977.
- 2) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55~63, 1983.
- 3) 下山正徳, 田中和彦, 木村禮代二: 人がん細胞培養株

- の薬剤感受性度—再増殖試験 (regrowth assay) による薬剤感受性度測定とその意義—。癌の臨床, 25, 75~83, 1979.
- 4) 中川和彦, 西条長宏: In vitro 抗癌剤感受性テスト—その現況と今後の展望。医学のあゆみ, 141, 533~537, 1987.
 - 5) Jusko, W.J.: Pharmacodynamics of chemotherapeutic effects; Dose-time-response relationships for phase-nonspecific agents. *J. Pharm. Sci.*, 60, 892~895, 1971.
 - 6) 杉山雄一, 小林知雄, 稲葉 實: 抗癌剤の殺細胞作用の定量的解析; In vitro, in vivo の両実験系での考察—。癌と化学療法, 14, 3183~3198, 1987.
 - 7) Dedrick, R.L.: Animal scale up. *J. Pharmacol. Biopharm.*, 1, 435~461, 1973.
 - 8) 小林国彦, 日野光紀, 林原賢治, 仁井谷久暢: シスプラチンとカルボプラチンの併用効果について: 肺腺癌細胞株を用いた HTCA (Human Tumor Clonogenic Assay) での検討。日癌治, 25, 2684~2692, 1990.
 - 9) Ozawa, S., Sugiyama, Y., Matsushashi, Y., Kobayashi, T., and Inaba, M.: Cell killing action of cell phase-nonspecific antitumor agents is dependent on concentration-time product. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 21, 185~190, 1988.
 - 10) Leroy, A.F., Wehling, M.L., Sponseller, H.L., Friauf, W.S., Solomon, R.E., and Dedrick, R.L.: Analysis of platinum in biological materials by flameless atomic absorption spectrophotometry. *Biochemical Medicine*, 18, 184~191, 1977.
 - 11) Cummings, J.: A method for the determination of 4'-Deoxydoxorubicinol and their 7-deoxyaglycones in human serum by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 341, 401~409, 1985.
 - 12) Patk, J.-G., Kramer, B.S., Steinberg, S.M., Carmichael, J., Collins, J.M., Minna, J.D., and Gazdar, A. F.: Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium-based colorimetric assay. *Cancer Research*, 47, 5875~5879, 1987.
 - 13) 下山正徳, 木村禮代二: 抗癌剤の殺細胞作用の定量法: Mitomycin C の殺細胞作用について。Chemotherapy, 20, 787~794, 1972.
 - 14) 北島恵子, 福岡正博, 小林 貞, 楠 洋子, 高田 実, 根来俊一, 松井 薫, 酒井直道, 劉 震永, 滝藤伸英: Cisplatin 静注時の血中動態と副作用からみた至適投与法の検討。癌と化学療法, 14, 2517~2523, 1987.
 - 15) Sasaki, Y., Tamura, T., Eguchi, K., Shinkai, T., Fujiwara, Y., Fukuda, M., Ohe, Y., Bungo, M., Horichi, N., Niimi, S., Minato, K., Nakagawa, K., and Saijo, N.: Pharmacokinetics of (glycolato-O, O')-diammine platinum(II), a new platinum derivative, in comparison with cisplatin and carboplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 23, 243~246, 1989.
 - 16) 藤原恵一, 宮本康成, 早瀬良二, 吉野内光夫, 小橋勇二, 河野一郎, 関場 香: カルボプラチンの薬理動態および婦人科臓器内濃度分布。癌と化学療法, 15, 1943~1948, 1988.
 - 17) Rodvold, K.A., Rushing, D.A., and Tewksbury, D. A.: Doxorubicin clearance in the obese. *J. Clin. Oncol.*, 6, 1321~1327, 1988.
 - 18) den Hartigh, J., McVie, J.G., van Oort, W.J., and Pinedo, H.M.: Pharmacokinetics of mitomycin C in humans. *Cancer Research*, 43, 5017~5021, 1983.
 - 19) Rupniak, H.T., Whelan, R.D.H., and Hill, B.T.: Concentration and time-dependent interrelationships for antitumor drug cytotoxicities against tumor cells in vitro. *Int. J. Cancer*, 32, 7~12, 1983.
 - 20) Weinkam, R.J., and Deen, D.S.: Quantitative dose-response relations for the cytotoxic activity of chloroethylnitrosoureas in cell culture. *Cancer Research*, 42, 1008~1014, 1982.
 - 21) Levin, V.A.: Clinical anticancer pharmacology; Some pharmacokinetic considerations. *Cancer Treatment Review*, 13, 61~76, 1986.
 - 22) Van Echo, D.A., Egorin, M.J., Whitacre, M.Y., Olman, E.A., and Aisner, J.: Phase I clinical and pharmacologic trial of carboplatin daily for 5 days. *Cancer Treat. Rep.*, 68, 1103~1114, 1984.
 - 23) Benjamin, R.S., Riggs, C.E., Jr., and Bachur, N.R.: Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function. *Cancer Research*, 37, 1416~1420, 1977.
 - 24) Schilcher, R.B., Young, J.D., Ratanatharathorn, V., Karanes, C., and Baker, L.H.: Clinical pharmacokinetics of high-dose mitomycin C. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 13, 186~190, 1984.
 - 25) Belt, R.J., Himmelstein, K.J., Patton, T.F., Bannister, S.J., Sternson, L.A., and Repta, A.J.: Pharmacokinetics of non-protein-bound platinum species following administration of cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Cancer Treat. Rep.*, 63, 1515~1521, 1979.
 - 26) Sasaki, Y., Shinkai, T., Eguchi, K., Tamura, T., Ohe, Y., Ohmori, T., and Saijo, N.: Prediction of the antitumor activity of new platinum analog based on their ex vivo pharmacodynamics as determined by bioassay. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 27, 263~270, 1991.
 - 27) Shoemaker, R.H., Wolpert-DeFilippes, M.K., Kern, D.H., Lieber, M.M., Makuch, R.W., Melnick, N.R., Miller, W.T., Salmon, S.E., Simon, R.M., Venditti,

- J.M., and VonHoff, D.D.: Application of a human tumor colony-forming assay to new drug screening. *Cancer Research*, **45**, 2145~2153, 1985.
- 28) Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paull, K.D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T.H., Currens, M. J., Seniff, D., and Boyd, M.R.: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, **48**, 4827~4833, 1988.

(受付: 1993年 2 月25日)