

コロニー形成試験および³Hサイミジン取り込み試験を用いた膀胱癌細胞株の放射線感受性に関する検討

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 吉田 修教授)

李 南奎*・金丸 洋史・吉田 修

ASSESSMENT OF THE RESPONSE OF HUMAN BLADDER CANCER CELL LINES TO RADIATION USING COLONY FORMATION ASSAY AND [³H] THYMIDINE INCORPORATION ASSAY

Lee NAM KYU, Hiroshi KANAMARU and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. O. Yoshida)

The effect of radiation on the human bladder cancer cell lines, KK47 and J82, was studied using colony formation assay and [³H] thymidine incorporation assay. The response to radiation was dose-related for both assays, but the curve for the colony formation assay was steeper than that for [³H] thymidine incorporation assay. However, the steepness of the curve for [³H] thymidine incorporation assay increased to be approximately the same as that for the colony formation assay as the incubation period increased. [³H] Thymidine incorporation assay can provide a rapid assessment of radiation sensitivity comparable to that obtained by the colony formation assay to select a radiosensitive bladder cancer patient for definitive or adjunctive radiotherapy.

Key words: Bladder cancer, Radiosensitivity, Colony formation assay, [³H] thymidine incorporation assay

緒 言

Salmon および Hamburger¹⁾ により開発されたコロニー形成試験は、現在制癌剤感受性試験として広く用いられているが、培養成功率、培養期間、コロニー計測などにおける問題点が指摘されてきた²⁾。これらの問題点を克服し、コロニー形成試験の利点を生かした感受性試験として谷川ら³⁾や Friedman ら⁴⁾は、³Hサイミジン取り込み試験を開発し、その薬剤感受性結果は、コロニー形成試験とよく相関することが示されたため、簡便かつ優れた制癌剤感受性試験として普及しつつある。

一方、膀胱癌細胞の放射線感受性についての基礎的な検討の報告は少なく、また臨床における浸潤性膀胱癌に対する術前放射線治療の是非についても議論の分

かれるところである。今回われわれは、膀胱癌細胞株の放射線感受性について上記のコロニー形成試験および³Hサイミジン取り込み試験を用いて検討を行ったので報告する。

材料および方法

1)細胞株: ヒト由来膀胱癌細胞株 KK47⁵⁾ (金沢大学泌尿器科学教室より譲与) および J82⁶⁾ を用いた。KK47 は RPMI 1640 (日水製薬), J82 は Eagle's MEM (Flow Laboratories Inc.) にそれぞれ 10% ウシ胎児血清 (FCS, Flow) を添加した培養液にて継代培養を行った。

2)コロニー形成試験: Salmon らの方法に準じて以下のごとく行った。15% FCS 添加培養液 (KK47 は RPMI 1640, J82 は MEM) に Bact-agar (Difco Laboratories) を混合して 0.5% agar 液を作成し、35×10 mm プラスチック皿 (Linbro 76-247-05) に

* 現: 順天郷大学医学部泌尿器科

1 ml 注入し下層とした。次に、腫瘍細胞を浮遊させた15% FCS 添加培養液に Bact-agar を混合して0.3% agar 液とし、1 ml を0.5% agar の上層に播種した。37°C 5% CO₂ の条件下で約2週間の培養後、2-(p-iodophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) (半井化学薬品) にて生体染色を行い、60 μm 以上のコロニーを Automatic particle counter CP-2000 (白井松器械) にて計測した。

3) [³H] サイミジン取り込み試験：Friedman らに準じて以下のごとく行った。コロニー形成試験と同様の0.5% agar 下層の上層に、腫瘍細胞を浮遊させた15% FCS 添加培養液 1 ml を播種し、3日間(実験3では4, 7, 11日間) 培養後 2.5 μ Ci の [³H] サイミジン (New England Nuclear, NEN) を加え、さらに24時間培養した。培養終了後、上層を磷酸緩衝食塩液 (PBS) 10 ml の入った 15 cc 遠沈管 (Corning 25310) に回収し15分間 1,600 rpm で遠沈後、上清を除去し再び PBS 10 ml で洗浄、10分間遠沈後上清を除去し5%トリクロル酢酸 (TCA) 5 ml および0.1 ml の1%ヒトアルブミンを加え、4°C で1時間静置した。10分間の遠沈後上清を除去し、5% TCA 5 ml を加え15分間再度 4°C で静置した。10分間の遠沈後上清を除去し、メタノール 5 ml を加え10分間遠沈した。上清を除去した後、水酸化メチルベンゼトニウム 0.5 ml を加え 60°C の恒温槽に1時間静置した。遠沈管内容液をアクアゾール-2(NEN) 4 ml と混合し、シンチレーションカウンター (Aloka) にて [³H] サイミジン取り込み量の計測を行った。

4) 実験1・放射線感受性試験における KK47 および J82 の至適細胞濃度を決定するための予備実験として、種々の細胞濃度 (5×10³, 1×10⁴, 5×10⁴, 1×10⁵/ml) にてコロニー形成試験および [³H] サイミジン取り込み試験を行った。

5) 実験2および3：腫瘍細胞浮遊液を 6×10⁴/ml の濃度に調整した後、25 cm² 培養用フラスコ (Corning 25100) に分注し、ライナック ML-15 MIII, 10 MV X-ray (三菱) にて、それぞれ 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16 Gy の放射線照射を行った。対照群 (非照射群) を含め、各群の腫瘍細胞濃度が最終的に 2×10⁴/ml となるよう調整し、実験2では KK47 と J82 に対して、コロニー形成試験および [³H] サイミジン取り込み試験を行った。実験3では J82 に同様の放射線照射を行った後、異なった培養期間 (4, 7, 11日間) にて [³H] サイミジン取り込み試験を行った。

結 果

実験1：腫瘍細胞濃度とコロニー数および [³H] サイミジン取り込み量との関係 (Fig. 1, 2)

Fig. 1 は KK47 と J82 の細胞濃度と [³H] サイミジンの取り込み量との関係を示すが、細胞濃度 5×10³~1×10⁵/ml の範囲で [³H] サイミジン取り込み量の直線的な増加が得られた。

Fig. 2 は KK47 と J82 の細胞濃度とコロニー数との関係を示すが、細胞濃度 5×10³~5×10⁴/ml の範囲でコロニー数のほぼ直線的な増加を示したのに対

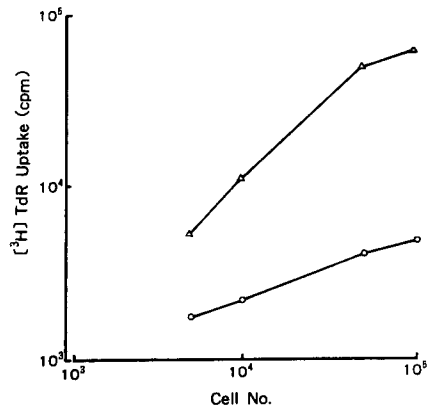


Fig. 1. Relationship between [³H] thymidine uptake and number of cells plated per well. (○) KK47, (△) J82

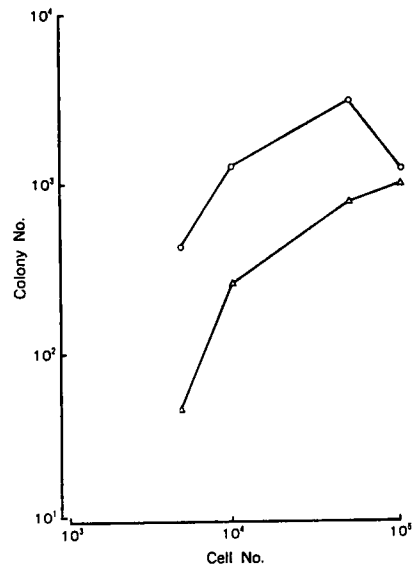


Fig. 2. Relationship between colony number and number of cells plated per well. (○) KK47, (△) J82

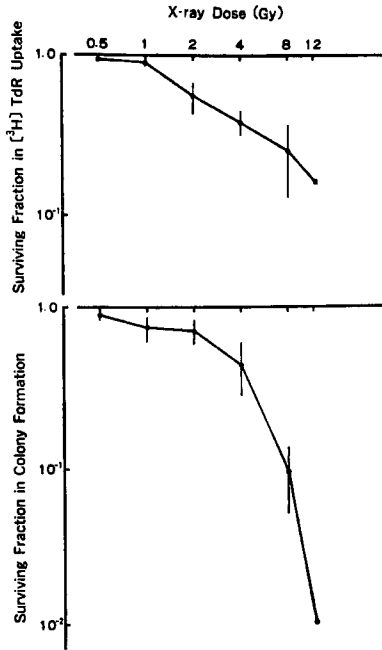


Fig. 3. Comparison of X-ray survival curves for KK47 cells using $[^3\text{H}]$ thymidine uptake and colony formation assay. Data shown are the mean \pm SD of 3 experiments.

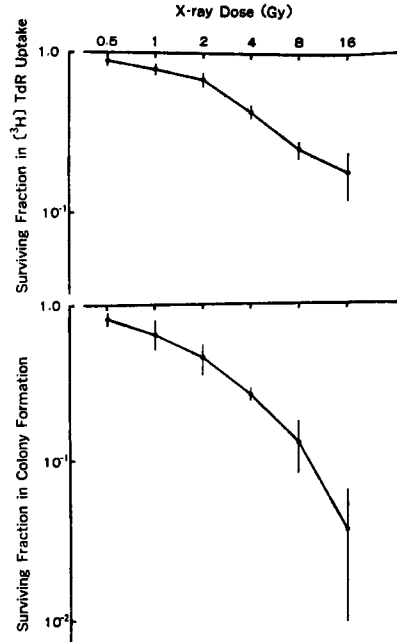


Fig. 4. Comparison of X-ray survival curves for J82 cells using $[^3\text{H}]$ thymidine uptake and colony formation assay. Data shown are the mean \pm SD of 3 experiments.

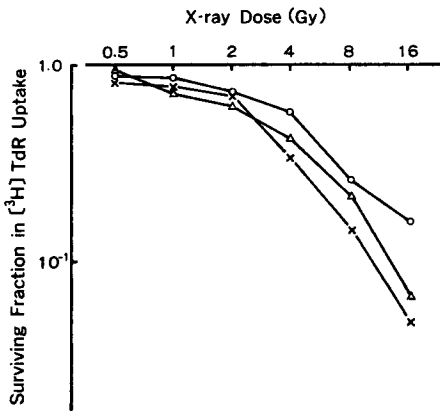


Fig. 5. Change of X-ray survival curves for J82 cells by different incubation periods in $[^3\text{H}]$ thymidine uptake assay. (○) 4 days, (△) 7 days, (×) 11 days.

し、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ では KK47 においてコロニー数の減少がみられた。以上の結果に基づき、実験2および3では $2 \times 10^4/\text{ml}$ の細胞濃度で実験を行った。

実験2：KK47 および J82 の放射線感受性 (Fig. 3, 4)

Fig. 3 は KK47 の, Fig. 4 は J82 の放射線照

射後の $[^3\text{H}]$ サイミジン取り込みおよびコロニー形成を対照群 (非照射群) との比で示した。KK47, J82 のいずれも、二つの試験法間で類似した線量-効果曲線が得られたが、高線量域においてはコロニー形成の減少が $[^3\text{H}]$ サイミジン取り込みの減少より顕著であった。

実験3：放射線照射後の培養期間による J82 の $[^3\text{H}]$ サイミジン取り込み量の変化 (Fig. 5)

培養期間の増加とともに、高線量域での J82 の $[^3\text{H}]$ サイミジン取り込みは減少し、11日間の培養では、実験2のコロニー形成試験で得られた J82 の線量-効果曲線とほぼ一致した。

考 察

浸潤性膀胱癌の治療における放射線療法の位置付けは、いまだ確定的なものではないが、術前放射線照射後の根治的膀胱全摘標本において、一部の症例にTの低下が認められ、 P_0 となった症例の予後は良好であるという報告もある^{7,8)}。したがって、放射線療法に対する反応群と非反応群を治療前に分別可能であれば、治療効果の期待できる反応群に対してのみ放射線療法を選択することにより、浸潤性膀胱癌患者全体の治療成績の向上が可能となるであろう。しかし、現

在そのような *in vivo* での効果を正しく予見可能な *in vitro* 放射線感受性試験として確立されたものはない⁹⁾。

一方, Salmon および Hamburger により開発されたコロニー形成試験は, 正常細胞の増殖を抑制し, anchorage independent growth の可能な腫瘍細胞のみ選択的に増殖させる利点を有し, 優れた *in vitro* 制癌剤感受性試験として広く用いられてきたが, 培養期間の長さ (2~3週間), 培養成功率の低さ (30~60%), 細胞播種時の凝集塊によるコロニー計測の困難などの問題点が指摘されてきた。

これに対して, 近年コロニー形成試験を応用して, [³H] サイミジンの取り込みを用いた制癌剤感受性試験が, 谷川らや Friedman らによって開発された。その薬剤感受性結果はコロニー形成試験とよく相関し, より短い期間 (5日間) で高い評価可能率 (50~90%)^{10,11)} が得られる簡便な制癌剤感受性試験として普及しつつある。

今回われわれは, これら二種類の試験法を用いて, 膀胱癌細胞株の放射線感受性について検討した。その結果二つの膀胱癌細胞株において, 二種類の試験法間ではほぼ類似した線量効果曲線が得られた。ただし高線量域においてはコロニー形成の低下は [³H] サイミジン取り込みの低下より著明であった。これはヒト肺癌細胞株を用いて同様の検討を行った Twentyman ら¹²⁾ の報告と一致する。コロニー形成試験では, 2~3週間の長期間の培養でコロニーを形成する clonogenic cell を標的とするのに対し, [³H] サイミジン取り込み試験では, 増殖能を有するより広い腫瘍細胞集団を標的とすると考えられる。したがって, 放射線照射後の致死的傷害細胞の中で, 1回以上の分裂のうちに細胞死に至るような細胞群の存在は, コロニー形成には関与しないが, 短期間培養での [³H] サイミジンの取り込みには反映される可能性がある。実験3で培養期間を延長した [³H] サイミジン取り込み試験にて得られた線量-効果曲線が, コロニー形成試験にて得られたそれと高線量域においてもほぼ一致したのは, このような細胞群の要素が除去されたためと考えられる。

Hopwood ら¹³⁾ は, 膀胱癌を含めた42症例の生検より得た腫瘍細胞に *in vitro* で放射線照射を行い, コロニー形成試験を施行した。その結果28例が評価可能であったが, 20 Gy の1回照射に対して50%以上のコロニー形成抑制を示したのは全体の75%にすぎず, 今回のわれわれの結果や他の細胞株で得られた結果¹⁴⁾ と比較して低い放射線感受性を示した。

コロニー形成試験あるいは [³H] サイミジン取り込み試験が臨床での放射線感受性試験として有用であるかどうかは, 細胞固有の放射線感受性以外に, 酸素濃度による感受性変化の問題 (低酸素性細胞分画の *in vitro* での評価)¹⁵⁾ を含め, 今後の検討が必要だが, 治療を前提とした放射線感受性試験としては, その迅速さ, 評価可能率の高さから [³H] サイミジン取り込み試験がより適していると考えられる。

文 献

- Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197** 461~463, 1977
- Shoemaker RH, Wolpert-Defilippes MK and Venditti JM: Potentials and drawbacks of the human tumor stem cell assay. *Behring Inst Mitt* **74**: 262~272, 1984
- Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y and Morton DL: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar cultures. *Cancer Res* **42**: 2159~2164, 1982
- Friedman HM and Glaubiger DL: Assessment of *in vitro* drug sensitivity of human tumor cells using [³H]-thymidine incorporation in a modified human tumor stem cell assay. *Cancer Res* **42**: 4683~4689, 1982
- 田谷 正・小林徹治・塚原健治・打林忠雄・内藤克輔・久住治男・黒田恭一: ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養. *日泌尿会誌* **68**: 1003~1010, 1977
- O'toole C, Price ZH, Ohnuki Y and Unsgaard B: Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional cell carcinoma. *Br J Cancer* **38**: 64~76, 1978
- Prout GR Jr: The surgical management of bladder carcinoma. *Urol Clin North Am* **3**: 149, 1975
- Bloom HJG, Hendry WF, Wallace DM and Skeet RG: Treatment of T3 bladder cancer: Controlled trial of pre-operative radiotherapy and radical cystectomy versus radical radiotherapy. *Br J Urol* **54**: 136~151, 1982
- Peters LJ, Hoopwood LE, Withers HR and Suit HD: Predictive assays of tumor radio-curability. *Cancer Treat Symp* **1**: 67~74, 1984
- Sondak VK, Bertelsen CA, Kern DH and Morton DL: Evolution and clinical application of a rapid chemosensitivity assay. *Cancer* **55**: 1367~1371, 1985
- Hosaka Y, Tukamoto T and Lieber M: Soft agarose colony formation assay for human renal cell carcinoma: comparison of optical colony counting versus tritiated thy-

- midine incorporation. *J Urol* **136**: 1102~1109, 1986
- 12) Twentyman PR, Walls GA and Wright KA: The response of tumor cells to radiation and cytotoxic drugs —A comparison of clongenic and isotope uptake assays. *Br J Cancer* **50**: 625~631, 1984
- 13) Hopwood LE: Response of human tumor cells from biopsy specimens to radiation and hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **8** (suppl): 72, 1982
- 14) Weichselbaum R, Dahiberg W, Little JB, Ervin TJ, Miller D, Hellman S and Rheinwald JG: Cellular x-ray repair parameters of early passage squamous cell carcinoma lines derived from patients with known responses to radiotherapy. *Br J Cancer* **49**: 595~601, 1984
- 15) Siemann DW and Keng PC: Characterization of radiation resistant hypoxic cell subpopulations in KHT sarcomas (I) Centrifugal elutriation. *Br J Cancer* **55**: 33~36, 1987

(1987年9月1日迅速掲載受付)