

## 細胞レベルにおける制癌剤効果判定に関する研究

京都大学結核胸部疾患研究所，胸部外科学部

(指導：教授 寺松 孝)

張 炎 森

### 緒 言

実験腫瘍細胞の薬剤感受性に関する“tumor spectrum”なる概念<sup>1)</sup>は人癌にもあてはまるものかも知れない。すなわち，癌には，程度の差はあっても，それぞれ個性があり，制癌剤に対する薬剤感受性もまた，それぞれ異るとしてよいのかも知れないということである。

このように考えるならば，ある個体の癌に対して化学療法を始めるに際して，その癌に最も適した制癌剤が何であるかをあらかじめ知っておくことは，実地臨床上極めて重要である。

このことは，癌の進展が速く，制癌剤の副作用も強大であるために，癌化学療法では，やり直しがきかない現状からもその重要性を首肯しうる処である。

さて，制癌剤の効果を知るには種々の方法があるが，臨床的応用を目的にした場合，細胞レベルでの方法が最も有用である。

細胞レベルで制癌剤の効果を判定しようとする場合，2つの方法が考えられる。

1つは，患者に制癌剤を投与しつつ，経時的に細胞診を行ない，細胞学的変化を基準にしつつ，使用された薬剤が細胞に変化を与え得たか否かをしらべる方法で，いわば *in vivo* での効果判定法といえるものである，これに関しては，若干の報告<sup>2),3)</sup>があり，われわれも若干例に於てその細胞学的所見を観察している。しかし，この方法は必ずしも全例には行いえず，とくに

治療前の薬剤選択という意味での効果判定はできないという致命的な欠点を有する。

一方，*in vitro* で制癌剤を作用させたのちに，細胞に対する障害をみて，どの薬剤が癌細胞に対して最もつよい障害を与えたかをみる方法については，従来 *in vitro-in vivo* 法<sup>4)</sup> I.N.K. 法<sup>5)</sup>，<sup>14</sup>C-formate の核酸へのとりこみ障害でみる方法<sup>6)</sup>，S.D.I. 法<sup>7)</sup>，など，いろいろの方法が試みられているが，いずれも，臨床的に応用するには，今一步というところがあった。

これらのうち，臨床的に最も普及したのは近藤氏の S.D.I. 法<sup>7)</sup> である。この方法は，定量的に取扱えること，操作が簡便なことなどからかなり普及し，これに関しての追試も若干なされている<sup>8),9)</sup>，しかしこの方法も，一つの薬剤について  $10^6$  ケ以上という多数の癌細胞数を必要とするため，手術によって採取される程度のまとまった大きさの組織が必要であるという欠点があった。

本研究では，培養液中に保存した腫瘍細胞に制癌剤を作用させた場合，何らかの細胞学的変化を来すか否か，その変化と腫瘍細胞の *viability* との関連性の有無，さらにはこれらの方法が制癌剤の感受性試験としての可能性を有するか否かなどが検討された。

すなわち，本研究の目的は，細胞レベルで制癌剤による癌細胞の変性所見をとらえ，その変性所見を基準として，制癌剤の効果判定に利用

しうるか否かを検討すること、換言すれば、細胞診レベルで得られる程度の少数細胞によって制癌剤の効果判定を試みることにある。

## I. 実験腫瘍細胞による研究

### (1) Papanicolaou 染色による効果判定

#### a. 材料および方法

実験腫瘍細胞としては、DDD マウスに継代移植された Ehrlich 腹水癌細胞を用いた、この腫瘍細胞を生理食塩水で洗滌、遠沈したのち、表 1 の如く調整した培養液中に再浮遊させた。その最終的な腫瘍細胞濃度は  $10^6/c.c$  である。

一方、これらの腫瘍細胞浮游液に最終的な制癌剤濃度としては Mitomycin-C  $10^r/c.c.$ 、Bleomycin  $15^r/c.c.$ 、Endoxan  $500^r/c.c.$ 、COPP  $25^r/c.c.$ 、5-FU  $500^r/c.c.$  になるように制癌剤を加えて、CO<sub>2</sub> incubator で培養したのち、それぞれの制癌剤による細胞の変性所見を塗沫標本の Papanicolaou 染色によって検討した。

さらに、その変性細胞数の経時的变化についても検討を加えた。

#### b. 結果

腫瘍細胞に制癌剤を作用させた場合の変性所見としては、写真(1), (2), (3), (4) のように細胞膜に近接した細胞質内の空胞の出現、細胞、核の膨大傾向、染色性の低下、核縁の不整、核質の粗大顆粒、核融解、核凝縮、多型性核、核膜の崩壊像などがみられるが、このうち、細胞質内空胞は、かなり早期から多数の細胞にあらわれ、(V) に於て後述するように in vitro-in vivo の移植実験の成績とよく一致するようになる。

この細胞質内空胞形成を変性細胞の基準にして、変性細胞数の経時的变化をみると、表 2 のように制癌剤との接触時間は、1 時間后が最も差が著明で、その後、時間がたつにつれて差がなくなる、したがって、制癌剤による細胞

表 1

培養液 TC 199	70%
コウシ血清	30%

表 2 制癌剤による Ehrlich 腹水癌細胞空胞形成率

	1 時間	3 時間	6 時間
対 照	17%	26%	75%
MMC	39%	54%	91%
BLM	33%	45%	94%
5-FU	27%	38%	94%
Ex	25%	38%	98%

の障害を細胞質内空胞でみる場合には、1 時間后の標本でみるのが最も適当である。

### (ii) 超生体染色による効果判定

形態学的な細胞の生死判定法としては、超生体染色がよく用いられており Schrek によるエオジンおよびサフラニン超生体染色法<sup>10)</sup>、Baker による Methylene blue および Janus green 超生体染色法<sup>11)</sup>、などがもちいられている、これによると、生きた細胞は染色されないが、細胞が死んで細胞膜に傷害が加わると容易に染色されるとされている。この結果を利用して、制癌剤による腫瘍細胞の生死判定を Eosin および Neutral red 等を用いた超生体染色<sup>12)</sup> によって行なった。

#### a. 材料および方法

前項の実験と同様の腫瘍細胞と制癌剤を用い、それぞれの制癌剤による細胞の生死判定を Eosin 染色、Neutral red 染色などの超生体染色を行なった。

さらに、生死細胞数の経時的变化についても検討を加えた、染色にはそれぞれアルコールで溶かした 0.1% Eosin および 0.25% Neutral red を用いた。

#### b. 結果

Eosin, Neutral red を使って超生体染色による生死判定を試みると、表 3 および表 4 の如く、各制癌剤の間の細胞学的障害の程度にあまり差がみとめられず、(V) における in vitro-in vivo 法の成績とも一致しない、したがって、制癌剤による腫瘍細胞の細胞学的障害を Eosin, Neutral red 等の超生体染色でみる方法は感受性試験には不適當である。

超生体染色では、完全に死滅した細胞のみ

**表3** Eosin 超生体染色による Ehrlich 腹水癌細胞の死亡率

	1 時間	3 時間	6 時間
対 照	8%	10%	8%
MMC	9%	11%	19%
BLM	12%	15%	17%
5-FU	13%	13%	17%
Ex	6%	8%	14%

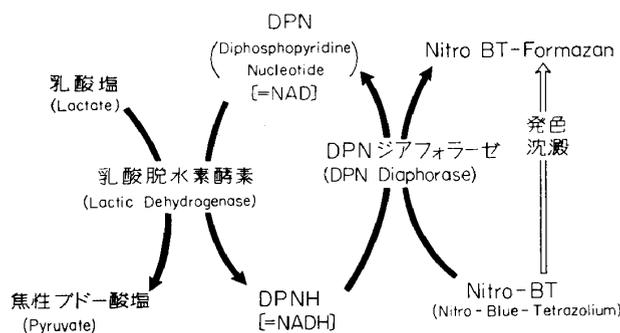
**表4** Neutral red 超生体染色による Ehrlich 腹水癌細胞の死亡率

	1 時間	3 時間
対 照	6%	13%
MMC	10%	16%
BLM	10%	21%
5-FU	11%	18%
Ex	8%	15%

を、障害をうけた細胞として算定しているので、再移植不可能なほどの障害をうけていても、完全な障害でないような細胞は、生きた細胞として算定しているものと考えられる。

**(iii) LDH・DPN-diaphorase 染色による効果判定**

Farber ら ('54-'56)<sup>13),14),15)</sup> および水谷ら<sup>16)</sup> は、**図1**のような反応系を用いて、Formazan の発色により LDH・DPN-diaphorase 系の酵素活性を組織学的に証明する方法を開発した、特に水谷ら<sup>16)</sup> は、腹水癌細胞における本酵素系の染色を行ない、変性細胞に於ては、染色性が極度に低下することを報告した。この結果を利用して、制癌剤による腫瘍細胞の変性を、LDH・DPN-diaphorase 系酵素染色法により判定しよ



**図1** 乳酸脱水素酵素 (LDH)-ジアフォラーゼ系の組織化学的証明法

うと試みた。

a. 材料および方法

使用した腫瘍細胞および制癌剤は前項の実験と同様である。それぞれの制癌剤による腫瘍細胞内の酵素活性の変化を塗沫標本の LDH・DPN-diaphorase 染色 (**表5**) によって検討した。

さらに、酵素活性の有無を基準とした場合の変性細胞数の経時的変化についても検討を加えた。

b. 結果

この LDH・DPN-diaphorase 染色による染色性の変化は細胞変性と比例する、ということについては水谷<sup>16)</sup> 以来若干の報告がある、この変化は、かなり早期から多数の細胞にあらわれ、(i)に於てのべたように空胞形成を来した細胞の出現率や、(v)に於て後述するように in vitro-in vivo の移植法の成績とよく相関するようと思われる。

**写真 (5), (6), (7)** のように染色性のある細胞を Enzyme activity のある細胞、染色性のない細胞を Enzyme activity のない細胞とし、Enzyme activity のある細胞を生活細胞、Enzyme activity のない細胞を死滅した細胞とした、この基準の下に、制癌剤で処理した

**表5** LDH・DPN-diaphorase 染色法(水谷)

1. 癌細胞浮游液作製
2. 癌細胞浮游液 0.2 c.c. 宛を小試験管に分注、これに 0.2 c.c. 宛の各制癌剤溶液を添加。
3. この混合液を CO<sub>2</sub> incubator に1時間 incubate したのち塗沫標本とする。
4. 空気乾燥塗沫標本の冷 acetone 30分間固定。
5. 染色液作成
 

0.1% Nitro-BT (orNT)	1 c.c.
0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)	1 c.c.
0.1M Sod. lactate (adjusted to pH 7.0 by NaOH)	1 c.c.
DPN	10 mg
6. DPN 染色液を固定した塗沫標本に載せ、15分間染色。
7. 染色液を捨て、軽く水洗。
8. 乾燥, Xylol 封入。
9. 検鏡 (酵素活性の低下した細胞の割合を算定する)。

**表6** LDH・DPN-diaphorase 染色法による Ehrlich 腹水癌細胞の死亡率

	1 時間	2 時間	3 時間
対 照	10%	12%	24%
MMC	26%	31.2%	62%
BLM	18%	28.5%	50%
5-FU	13.9%	16%	38%
Ex	13.6%	15.9%	38%

Ehrlich 腹水癌細胞の LDH・DPN-diaphorase 染色法によって、腫瘍細胞の生死判定を行なった。

成績は表6の通りである、この表を見ると、1時間後に於てすでに差があらわれてくる、しかしながら細胞が受けた障害度と細胞内酵素の染色性の変化は連続的であるので、生活細胞と死滅細胞の間にはっきりした境界をつくることは容易でなく、判定基準にはかなり主観的な面がある。著者は全く染色されない細胞や、染色性の低下した細胞を死滅細胞の中に含めて考えた。

(iv) S.D.I. 法と LDH・DPN-diaphorase 染色の比較

1964年に近藤<sup>7)</sup>は表7のようにコハク醇脱水素酵素の活性の多少を、triphenyl tetrazolium chloride に対する還元能の低下により定量的に判定する方法 (S.D.I. 法) を開発し、1969年伊藤<sup>8)</sup>は肺癌細胞を用いて臨床的に追試し、かなり信じる方法であることを述べている、著者は Ehrlich 腹水癌細胞を用いて S.D.I. 法による Inhibition Index を求め、また LDH・DPN-diaphorase 系の染色性の低下との間の関連性を検討した、表8は、S.D.I. 法による Inhibition Index と LDH・DPN-diaphorase 染色による変性細胞出現率との比較である。

表8の通り、両者の成績はほぼ平行している。

(v) in vitro-in vivo 法による腫瘍細胞の viability と細胞変性所見との関連性

a. 材料および方法

実験腫瘍細胞としては DDD マウスに継代移植された Ehrlich 腹水癌細胞を用いた、この

**表7** S. D. I. 法

1. 癌細胞浮游液作製
2. 癌細胞浮游液を細胞数 600万個/0.3c.c. に調整、その 0.3c.c. 宛を小試験管に分注、0.2c.c. 宛の各制癌剤溶液を添加。
3. この混合液を 37°C, 1時間 incubate したのち、Buffered Saline で洗滌し、Saline によって元の量にする。
4. 0.03% T.T.C. 液 ( $\frac{1}{5}$  M Phosphate Buffered Saline pH 7.4 100c.c. 中に Sodium Succinate 2.70g. Triphenyl Tetrazolium Chloride 30mg) 0.3c.c. 宛を加え、37°C 15時間以上保温。
5. 0.5% Trichloroacetic acid 加 Ethyl acetate 3c.c. を加注し振盪する。
6. Ethyl acetate 層に移行した赤色 Formazan を、480m $\mu$  で比色定量する。
7. Inhibition Index =  $\frac{a-p}{a-m} \times 100$ 
  - a. 制癌剤を入れないもの
  - p. 制癌剤を入れたもの
  - m. 制癌剤も T.T.C. も入れないもの

**表 8**

	LDH・DPN-diaphorase 染色による変性細胞出現率	S.D.I. 法による Inhibition Index
対 照	10%	0
MMC	26%	65
BLM	18%	60
5-FU	13.9%	28
Ex	13.6%	28

腫瘍細胞を3回洗滌遠沈して、表1の如く調製した培養液を作成し、その最終的な腫瘍細胞濃度は 10<sup>6</sup>/c.c. とした。

一方、これらの腫瘍細胞浮游液に最終的には Mitomycin-C 10<sup>r</sup>/c.c., Bleomycin 15<sup>r</sup>/c.c., 5-FU 500<sup>r</sup>/c.c. Endoxan 500<sup>r</sup>/c.c. になるように制癌剤を加えて、1時間、3時間、6時間 CO<sub>2</sub> incubator にて incubate のち、生理的食塩水でこれらを3回繰返して洗滌し、10<sup>6</sup>/c.c. の濃度になるように、制癌剤で処理された腫瘍細胞の生理的食塩水浮游液を再調製した。マウスは5匹宛 Control, Mitomycin-C, Bleomycin,

Endoxan, 5-FU の5組に分けた。

このようにして調製した腫瘍細胞浮游液の0.2c.c.をマウスの背部皮下に注入し、注入後28日目まで観察した、28日目まで生存したものはすべて頸椎脱臼(Cervical dislocation)により屠殺して、移植腫瘍を摘出し、腫瘍の大きさを重量(Gram)で計算した。

b. 結果

表9の通り、1時間の制癌剤処理が最も適当であると思われる。制癌剤との接触時間を3時間、6時間と延長させると、各制癌剤の間の差がほとんど出て来ない。

実験腫瘍の制癌剤に対する感受性については、個々の腫瘍によってかなり差があることが知られている。杉浦ら<sup>1)</sup>は、このような各種腫瘍の制癌剤に対する感受性の傾向を“Tumor-spectrum”として体系化している、著者はEhrlich 腹水癌細胞に対する Mitomycin-C, Bleomycin, 5-FU, Endoxan などの制癌剤効果を in vitro-in vivo の移植により検討した結果、最も効果がみられたのは Mitomycin-C その次は Bleomycin であった。

この結果は(i)の空胞形成を基準にした変性細胞率、(iii)の LDH・DPN-diaphorase 染色を基準にした変性細胞率などの結果とほぼ平行しているようである。

(vi) 小括

著者は、Ehrlich Acites Tumor に各種の制癌剤を加え、組織学的、酵素形態学および in vitro-in vivo 再移植法により、制癌剤による腫瘍細胞の変性に関する研究を行ない、以下の結果をえた。

表9 in vitro-in vivo 法による、Ehrlich 皮下腫瘍の大きさ(Gram)に及ぼす MMC BLM. 5-FU. Ex. の影響 (各群とも5匹宛の平均値)

	1時間	3時間	6時間
対 照	3.3g	0.9g	0.6g
MMC	0.4g	0	0
BLM	0.5g	0.32g	0
5-FU	1.4g	0.23g	0.2g
Ex	1.6g	0.16g	0

1) Ehrlich Acites Tumor に於ては、再移植法による制癌剤効果と細胞学的なダメージとは比例する。

2) Cytological Damage は、Papanicolaou 染色, LDH・DPN-diaphorase 染色などでみるのがよく、Eosin, Neutral red 等の超生体染色による方法では、不可である。

3) Cytoplasmic Vacuolization は細胞変性のかかなりよい指標になりうる。

4. 腫瘍細胞を制癌剤に接触させる時間は、1時間で十分で、それ以上の実験は不必要である。

5) LDH・DPN-diaphorase 染色による方法は、Succinic Dehydrogenase Inhibition とも、再移植法の成績ともほぼ平行するので、この酵素形態学的方法も制癌剤による変性をみる方法として有望である。

II. 人肺癌細胞による研究

(i) Papanicolaou 染色による効果判定

a. 材料および方法

Papanicolaou 法に供する腫瘍細胞の浮游液は、京大胸部研胸部外科及び京都桂病院胸部外科で切除された12例の患者の肺組織から調製した。

すなわち、まず新鮮な癌組織 0.5~1.0 gm を予め鋏で小さく切り、これをクラッシャーを用いておし砕く、この砕いた組織片は約 2c.c. の無菌培養液内に受けて軽く振盪すると容易に細胞浮游液を得ることが出来る、この浮游液を 0.2c.c. ずつ小試験管内に分注し、これに各制癌剤溶液を 0.2c.c. ずつ加える。

本実験における制癌剤の最終的濃度は Mitomycin-C 10<sup>r</sup>/c.c., Bleomycin 15<sup>r</sup>/c.c., Endoxan 500<sup>r</sup>/c.c. COPP 25<sup>r</sup>/c.c., 5-FU 500<sup>r</sup>/c.c. Toyomycin 1<sup>r</sup>/c.c. となるように調整した、この制癌剤を加えた癌細胞浮游液を CO<sub>2</sub> incubator に培養したのち、制癌剤による細胞の変性所見を塗沫標本の Papanicolaou 染色で検討した。

b. 結果

原発性肺癌細胞に制癌剤を作用させた場合の変性所見は、写真(8),(9),(10)のように、

表10 制癌剤による人肺癌細胞の空胞形成率

氏名	型	MMC	BLM	Ex	5-FU	COPP
H.S.	腺	30%	23%	6.6%	6.6%	
T.K.	腺	46%		21%	18%	19%
H.O.	腺	66%	64%	44%	54%	40%
K.O.	腺	60%	50%	47%		54%
H.I.	腺	62%	43%	38%	40%	30%
G.T.	腺	60%	60%	46%	44%	44%
S.Y.	扁	20%	33%	12%	20%	
S.M.	扁	17%	20%	4%		5%
T.H.	扁	49%	47%	20%	25%	25%
S.S.	扁	48%	52%	40%	38%	45%
K.N.	大末	46%	65%	70%	84%	55%
M.Y.	小末	50%	40%	31%	35%	37%

Ehrlich 腹水癌細胞におけると同様に、細胞質内の空胞の出現、核内の空胞出現、細胞又は核の膨大、核の融解、核の濃縮、核縁の肥厚、多核細胞、染色性の低下などがあらわれるが、このうち、細胞質内空胞はかなり早期から多数の細胞にあらわれるので、この細胞質内空胞形成を変性細胞の基準にした。

表10は、制癌剤との1時間接触させた後に、Papanicolaou 染色を行なった場合の変性細胞の百分率を示している。これによれば、Mitomycin-C は腺癌に対して有効なことが多く、Bleomycin は扁平上皮癌に対し有効なことが多い。この成績は、先に伊藤<sup>9)</sup>が S.D.I. 法によって報告している成績と近似している。

#### (ii) LDH・DPN-diaphorase染色による効果判定

##### a. 材料および方法

LDH・DPN-diaphorase 染色法に供する腫瘍細胞の浮游液は京大胸部研胸部外科及び京都桂病院胸部外科で切除された16例の患者肺癌組織から調製した。

癌細胞浮游液のつくり方と制癌剤の濃度は前項と同様である。

著者が用いた LDH・DPN-diaphorase 染色法の実施方法の詳細は表11の通りで、水谷の原法とほとんど同様である。

##### b. 結果

LDH・DPN-diaphorase 染色による酵素活性の変化は、細胞内酵素顆粒の染色性の変化によ

り表わされる。すなわち、細胞採取直後のこまかく、均一であった酵素顆粒は、時間とともに次第に細胞外に逸脱を起し、細胞内顆粒の減少とともに酵素活性を有する細胞が著しく減少して来る傾向にある。写真(11)、(12)は人肺癌細胞の LDH・DPN-diaphorase 染色の所見である。

LDH・DPN-diaphorase 染色によって、染色性の低下した肺癌細胞の出現率をみると表12の通りである。これによれば、Mitomycin-C は

表 11

1. 肺癌組織 0.3~1.0 gm を破碎、癌細胞浮游液作製。
2. 癌細胞浮游液を 0.2 c.c. 宛を小試験管に分注、0.2 c.c. 宛の各制癌剤溶液添加。
3. この混合液を 37°C 1時間 incubate したのち、塗沫標本とする。
4. 空気乾燥塗沫標本を冷 acetone 30分間固定。
5. 染色液作成
 

0.1% Nitro-BT (or NT)	1 c.c.
0.1M Phosphate buffer (pH 7.0)	1 c.c.
0.1M Sod. lactate (adjusted to pH 7.0 by NaOH)	1 c.c.
DPN	10 mg
6. DPN 染色液を固定した塗沫標本に載せ、15分間染色。
7. 染色液を捨て、軽く水洗。
8. 乾燥, Xylol 封入。
9. 検鏡 (酵素活性の低下した細胞の割合を算定する)。

表12 LDH・DPN-diaphorase 染色による  
人肺癌細胞の変性細胞率

氏名	型	MMC	BLM	Ex	5-FU	COPP	TM
T.K.	腺	60%		25%	21%	29%	26%
C.M.	腺	60%	47%			62%	60%
H.S.	腺	65%	48%	23%	23%		
H.O.	腺	48%	48%	34%	32%	32%	
K.O.	腺	66%	59%	55%		62%	
H.I.	腺	52%	40%	30%	43%	37%	
G.T.	腺	60%	48%	44%	43%	50%	
C.S.	扁	49%	51%	40%		41%	28%
S.Y.	扁	32%	60%	24%	36%		
S.M.	扁	30%	48%	34%	20%	20%	
T.H.	扁	47%	47%	20%	25%	25%	
S.S.	扁	43%	46%	38%	30%	40%	
B.T.	大未	61%	23%	58%		40%	60%
K.N.	大未	48%	51%	75%	77%	50%	
K.T.	小未	80%		70%		48%	52%
M.Y.	小未	61%	50%	50%	44%	40%	

腺癌に対して有効なことが多く、Bleomycin は扁平上皮癌に対して有効なことが多い。

(iii) S.D.I. 法と LDH・DPN-diaphorase 染色の比較

近藤ら<sup>7)</sup>の S.D.I. 法と、われわれの LDH・DPN-diaphorase 染色とを同時に行なった症例について比較してみると表13の通りとなる。

すなわち、近藤ら<sup>7)</sup>の S.D.I. 法による Inhibition Index は、われわれの LDH・DPN-diaphorase 染色による変性細胞出現率とよく比例しており、実地臨床上にこの酵素形態学的方法が用いうるという可能性を示唆していると思われる。

(iv) 小括

著者は、前節の Ehrlich 腹水癌細胞による

実験の結果に基づき、人の肺癌細胞を用いて、制癌剤の肺癌細胞に対する効果を、細胞学的ないし、細胞化学的に検討して、以下のような結果を得た。すなわち、

1. 人肺癌細胞に於ても Papanicolaou 染色による Cytoplasmic vacuolization, あるいは LDH・DPN-diaphorase 系の染色性の低下の両者とも、制癌剤による癌細胞の障害の指標となりうるが、LDH・DPN-diaphorase 系の染色性を指標にする場合の方が、より適確に判定しうる。

2. S.D.I. 法の成績と LDH・DPN-diaphorase 系の染色性とは、よく比例する。

3. この酵素形態学的、細胞化学的方法は、肺穿刺吸引生検などえられる少数細胞にも応用

表13 S.D.I. と LDH・DPN-diaphorase 染色の比較

氏名	型	S.D.I. による Inhibition Index					LDH・DPN-diaphorase 染色による変性細胞出現率				
		MMC	Ex	TM	COPP	BLM	MMC	Ex	TM	COPP	BLM
C.M.	腺	75					60%		60%	62%	47%
T.K.	腺	94	88	48	36		60%		26%	29%	
C.S.	扁		100	100	85	100	49%	40%	28%	41%	51%
B.T.	大未	42	59	60		9	61%	58%	60%	40%	23%
K.T.	小未	85	25	40	52		80%	70%	52%	48%	

できるので、手術前の制癌剤の感受性判定、ないし手術を行なわない症例での感受性判定に期待しうる。

### III. 総括ならびに考按

実験腫瘍細胞、および人肺癌細胞を用いて、細胞レベルに於て制癌剤の効果を予知しうるか否かについて検討し、Papanicolaou 染色による細胞変性所見および LDH・DPN-diaphorase 系染色による酵素形態学的に、それが可能であることを明らかにした。

細胞学的レベルの細胞の生死鑑別法については、Strugger<sup>17)</sup> が Acridine Orange 染色を用いて蛍光顕微鏡で観察すると、生細胞は緑色に、死細胞は赤色に染まることを報告したのにはじまる。その後 Methylene blue, Janus green 超生体染色による方法、Giemsa 位相差法などが行なわれて来た。しかし、臨床細胞学の立場から癌細胞の生死を論ずる場合には、最近では Papanicolaou 染色によるものが殆んどである。

放射線療法による治療効果を子宮癌剥離細胞の変性所見から判定しようとする研究は、従来からかなり行なわれて来た。

たとえば、Frankle ら<sup>18)</sup> および、Glücksman ら<sup>19)</sup> は、癌組織の放射線治療による細胞の変化を、

1. 胞体内空胞形成
2. 細胞の腫大
3. 核の皺襞形成 (wrinkling)
4. 多核細胞の出現
5. 奇態細胞 (Bizarre cell) の出現

などと記載し、細胞の変化の著明なものほど予後が良好で、細胞の変化の軽微なものでは予後が不良であると述べた。また Graham ら<sup>20), 21)</sup> Silverman ら<sup>22)</sup> も同様に、細胞の変化と遠隔成績との間には、密接な関係があることを報告している。肺癌剥離細胞に対する放射線の影響に関しては、柴田らの詳細な研究があり<sup>2)</sup>、子宮癌の場合にみられたのと同様の所見が変性所見として報告され、放射線感受性は、小細胞癌が最も高く腺癌が最も低いと報告している。

一方、制癌剤の効果を、同様に剥離細胞のレ

ベルで検討している研究も、かなりみられるようになった。

たとえば、柴田ら<sup>2)</sup>、竹中ら<sup>23)</sup>、谷田ら<sup>24)</sup>、Beumer ら<sup>3)</sup>によると、Mitomycin-C, Endoxan, Bleomycin などの制癌剤による剥離細胞の変性所見は、放射線治療のそれと全く同様であり、また、制癌剤の種類によって変性像に差を見出し難いことが明らかにされている。細胞の変性所見としてあげられる所見は次の如くである。すなわち、細胞腫大、細胞質内空胞形成、細胞質染色性の淡染傾向、細胞質均質粗散化、細胞境界の不明瞭化、細胞内封入物の増加、細胞質の消失、核形の不整、核縁の肥厚鮮明化、核染色質の融解あるいは凝集によって粗網状となったり、粗大凝塊状となったりする。核仁の腫大鮮明化、核内空胞、核濃縮、核破碎、核融解、多核細胞、巨核細胞、奇妙な (bizarre) 形態を示す細胞および細胞分裂の異常などである。

一方培養細胞の変性像については細胞質に関しては、

1. Cytoplasm の小顆粒増加
2. Cytoplasm 顆粒周囲の空胞出現
3. 空胞増加, Cytoplasm をみたす (Endoplasmic Reticulum 拡張による)
4. ミトコンドリア減少, 消失

核に関しては、

1. 核の不規則な凹凸
2. 核質の一部, 核小体の膜外遊出
3. 核質くもったようになり, ついで顆粒状となる
4. 核膜徐々厚みをまして来る
5. 有糸—無糸分裂移行型というべき分裂の形を示す

などがあげられており、細胞質の変化は徐々に起り、核に変化が起ると急激に死に至るとされている。

培養液中に保存した癌細胞の変性所見について Papanicolaou 染色から検討した、著者の成績によると、これらの所見の中でも、特に細胞質内空胞化は、かなり早期からはっきりとした形であらわれはじめ、実験腫瘍の再移植法によ

っても、細胞質内空胞化を細胞変性の判定基準としてよいことが判明した。

次に、癌細胞内の酵素活性に対する制癌剤の影響を制癌剤の効果判定に利用しようとする試みは、近藤の S.D.I. 法<sup>7)</sup>で臨床的に応用されるようになった。

本研究に於ては、この S.D.I. 法の欠点、すなわち、かなり多数の細胞を必要とするという欠点を補う目的で、癌細胞内酵素活性を形態学的に染色する方法、すなわち、水谷ら<sup>16)</sup>による LDH・DPN-diaphorase 系の染色を行なった。この酵素は、細胞の変性度に比例しており、変性細胞では、明らかに酵素の染色性が低下する。このことを利用して、LDH・DPN-diaphorase 系染色を制癌剤使用下の Ehrlich 腹水癌細胞で試みたが、その染色性の変化と腫瘍の再移植法による腫瘍の大きさとは比例しており、この方法が制癌剤の感受性検査に利用しうることが明らかとなった。

さらに、人肺癌細胞に本染色を試みたが、その成績は、同じ症例における S.D.I. 法の結果と全く一致しており、臨床的応用も期待しうと思われた。

しかしながら、前述したような、若干の主観的判断の入る余地のある部分に関しては、顕微測光の導入も必要であろうと考えられる。

#### IV. 結 語

in vitro における制癌剤による Ehrlich 腹水癌細胞の変性所見について、Papanicolaou 染色、超生体染色、LDH・DPN-diaphorase 染色などを行なって検討して、制癌剤の感受性試験が可能か否かについて若干の検討を加えた。また同時に人肺癌細胞を用い、制癌剤による Papanicolaou 染色による細胞変性所見ならびに LDH・DPN-diaphorase 系の染色性低下などについても検討した。それらをまとめてみると次のようになる。

(1) Papanicolaou 染色においては、Cyttoplasmic Vacuolization が細胞変性の判定基準として最も適当である。

(2) 制癌剤によって招来される Cytoplasmic Vacuolization の程度と、制癌剤による Ehrlich 腹水癌細胞の移植性の低下とは比例する。

(3) Neutral red, Eosin などを用い、いわゆる超生体染色を試みたか、これは制癌剤の感受性試験には適当ではないと思われる。

(4) 制癌剤による細胞内酵素活性の阻害について、LDH・DPN-diaphorase 系の染色を用いて検討し、これが制癌剤の感受性検査として用いることを明らかにした。とくに、この標本では細胞の変性が酵素活性の低下、すなわち染色性の低下ということで表現出来ること、結果が近藤<sup>7)</sup>の S.D.I. 法の成績とほぼ一致することなどから、少数の細胞での検査が可能であり、臨床的応用にかなり期待ができるように思われた。

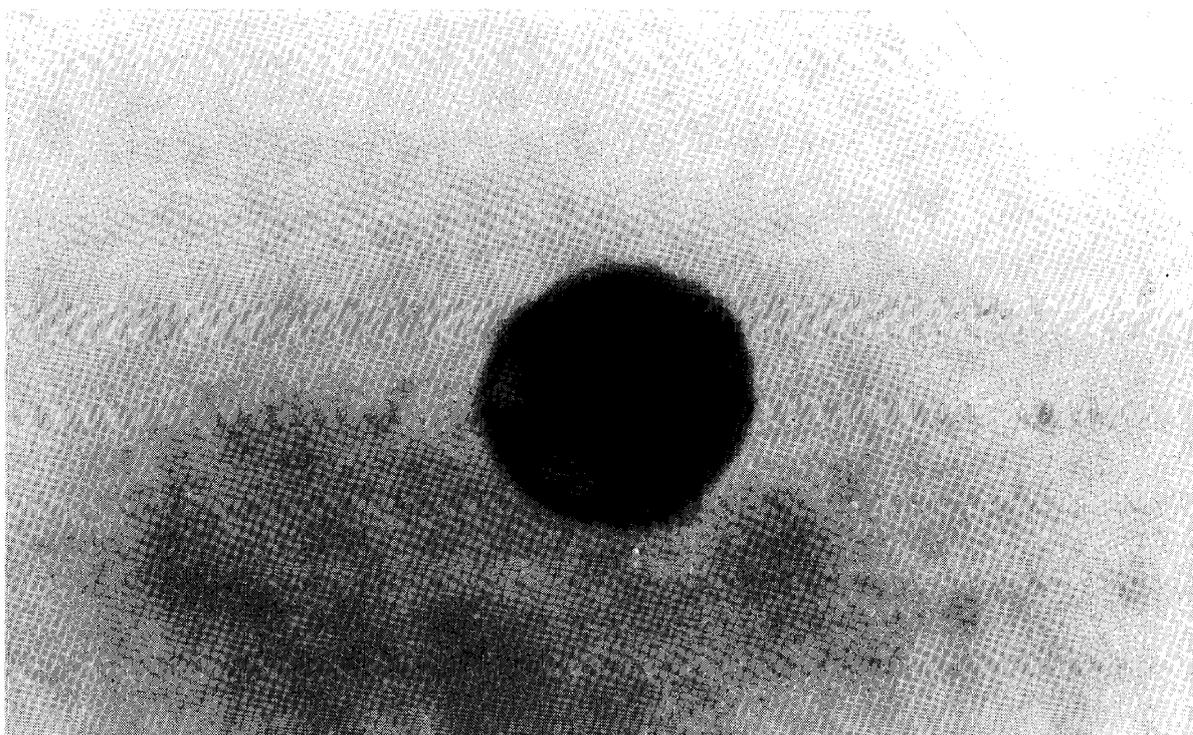
(5) そこで、人肺癌細胞を用いて検討した結果、LDH・DPN-diaphorase 系の染色性低下を基準とした制癌剤の感受性判定法の成績は、S.D.I. 法のそれと近似していることが明らかとなった。

(6) それであるから、本法は、S.D.I. 法における大量の癌組織を要するという欠点を補い得て、より一層臨床的に応用し易い方法であると思われる。

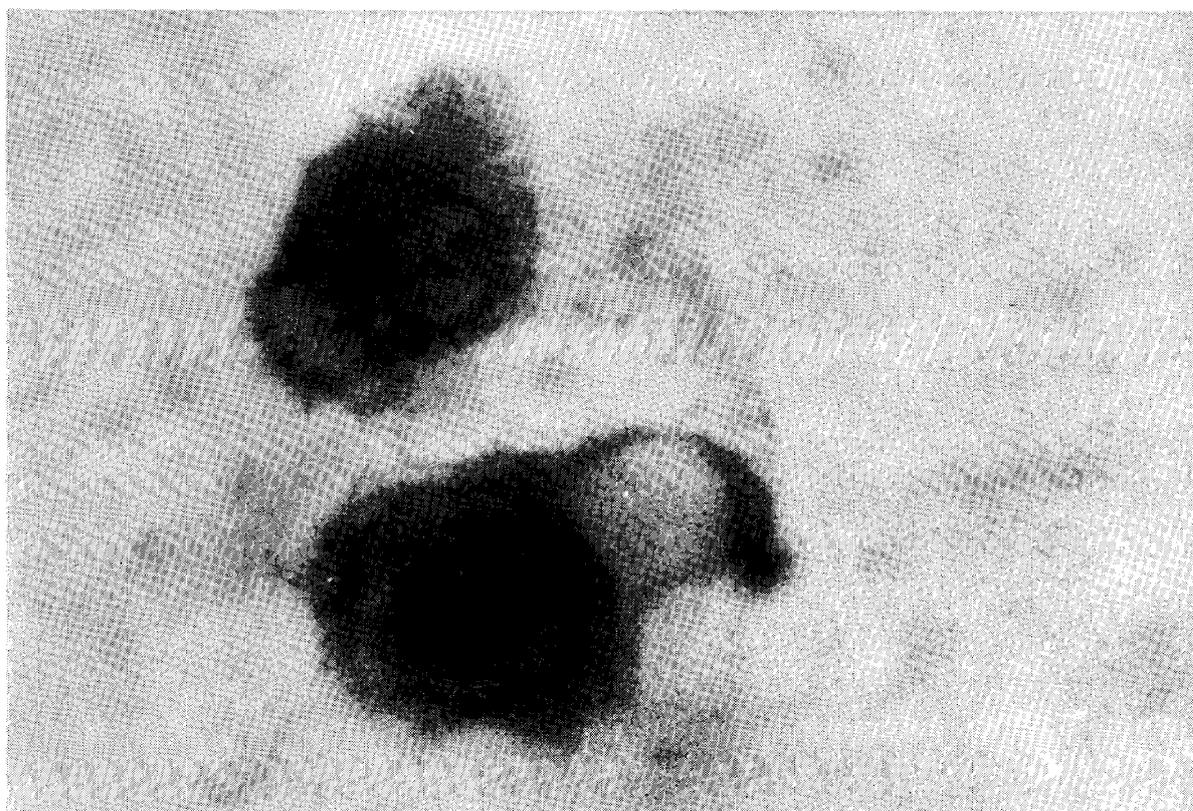
#### 文 献

- 1) Sugiura, K. et al. Studies in tumor spectrum I. Cancer 5, 382, 1952. II. Cancer 5, 579, 1952.
- 2) 柴田偉雄ら：経時的細胞診による肺癌の放射線療法および化学療法の効果判定について、癌の臨床、第14巻、第4号、1968年4月。
- 3) Beumer H. M. et al. Morphological Effect of Cytotoxic Drugs on Tumor cells. Dis. Chest. 53, 254, 1968.
- 4) Mc Donald, G. O. et al. In vivo and in vitro assay for drug effect on Cancer cells. Ann. Surg. 157, 785, 1963.
- 5) 西岡久寿弥：人の悪性腫瘍の制癌性ウィルスおよび化学療法剤に対する感受性試験のこころみ、日本臨床15, 1937, 1948, 1957.

- 6) 東弘：薬剤感受性と合併療法，癌治療学会，vol. 4 特別号22，1969.
- 7) 近藤達平：制癌剤の適応—感受性試験，最新医学 19，2304，1964.
- 8) 伊藤元彦：肺癌手術に対する補助化学療法に関する実験的ならびに臨床的研究，京都大学結核胸部疾患研究所紀要，第3巻 第1号，1969.
- 9) 小林巖ら：Succinic Dehydrogenase inhibition 法による抗癌剤の選択について，第6回癌治療学会総会抄録集，1968.
- 10) Schrek, R. : A method for Counting the viable cells in normal and malignant cell suspensions. *Am. J. cancer* 28, 389-392, 1936.
- 11) Baker, J.R. : *Cytological technique* Methuen and Co., London, 1960.
- 12) 日本血液学全書，第6巻-1，術式，1964，丸善.
- 13) E. Farber, W. H. Sternberg & C.E. Dunlap : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 86 ; 534-537, 1954.
- 14) E. Farber, W. H. Sternberg & C. E. Dunlap : *Am. J. Path.*, 30 ; 616-619, 1954.
- 15) E. Farber et al : *J. Histochem. & Cytochem.*, 4 ; 254-265, 266~283, 283-294, 347-356, & 357-362. 1956.
- 16) 水谷 昭 : *Histochemical Studies on DPN-Diaphorase System in Spraed and Smear Preparations. Proceeding of the First Annual General Meeting of Japanese Histochemical Association. Oct, 3, 1960.*
- 17) Strugger. S. : *Naturwissenschaften* 34, 267-272, 1947.
- 18) Frankle, D. and Amreich, I. : *Surg. Gynec. Obst.* 33, 62, 1921.
- 19) Glücksmann, A. and Cherry, C. P. : *Acta Cytol.* 3, 381-387, 1959.
- 20) Graham, R. M. and Graham, J. B. : *Cancer* 8, 59-70, 1955.
- 21) Graham, R. M. : *Acta Cytol.* 3, 347-351, 1959.
- 22) Silverman, S. and Sheline, G. E. : *Cancer* 14, 587-596, 1961.
- 23) 竹中正治：遊離胃癌細胞の螢光顕微鏡学的研究とくに制癌剤の胃癌細胞への影響に関する実験，米子医誌17(3)：316—343，1966.
- 24) 谷田 秀：癌性腹水中に出現する各種細胞の変性に関する研究，米子医誌20(6)：486—504 1969.



**写真1** エーリッヒ腹水腫瘍細胞の変性所見，胞体内に空胞形成，核クロマチンの粗大凝集，不整な核縁などがみられる（Papanicolaou 染色）。



**写真2** 変性のすすんだエーリッヒ腫瘍細胞，上の細胞では細胞の崩壊像がみられ，下の細胞に於ては細胞質内巨大空胞がみられ，核クロマチンは粗大となり中心部に凝集している。又，核縁は不整で核内に空胞もみとめられる。（Papanicolaou 染色）

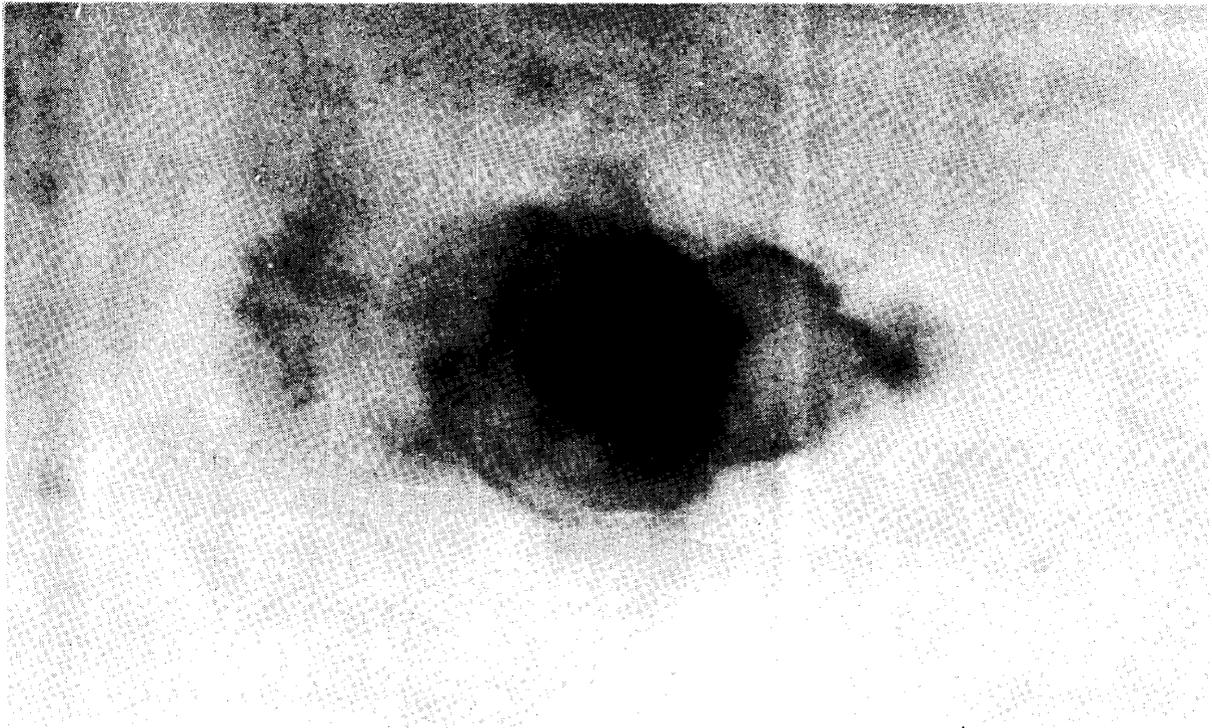


写真3 変性のさらにすすんだエーリッヒ腫瘍細胞細胞腫大，胞体内巨大空胞形成，細胞膜の破壊，核崩壊像などがみとめられる。(Papanicolaou 染色)

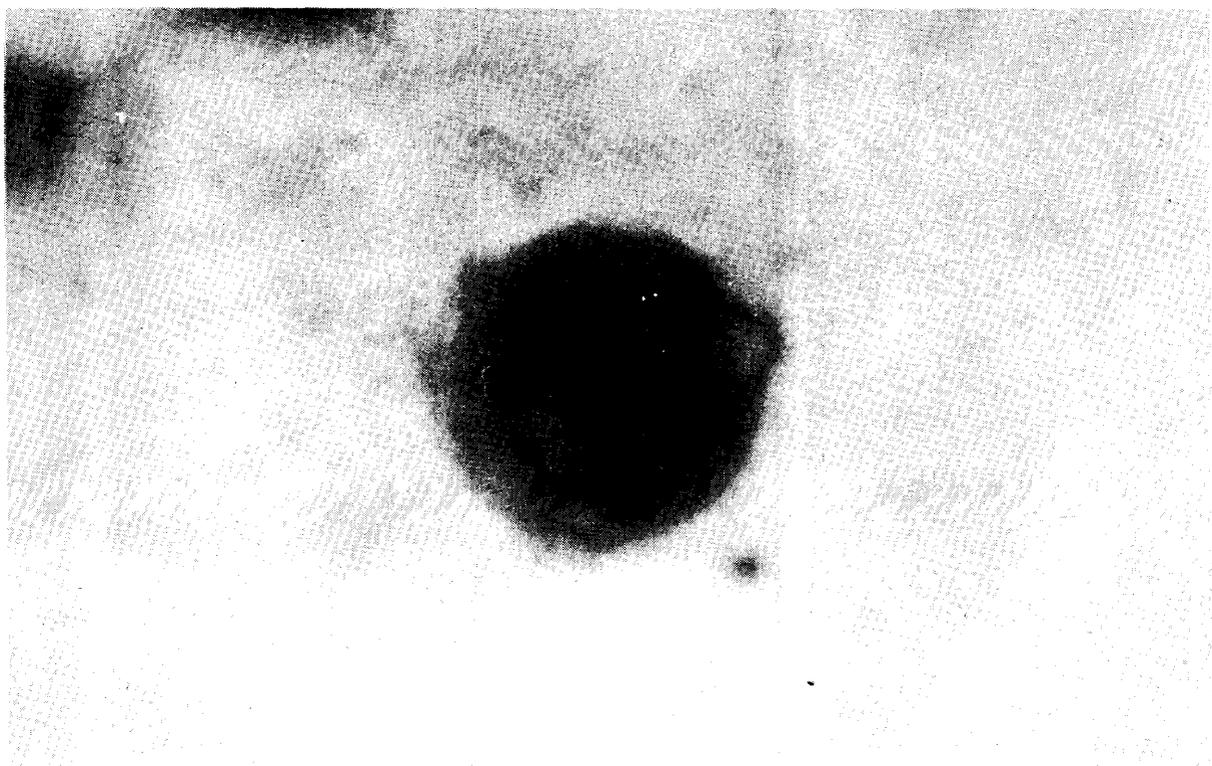
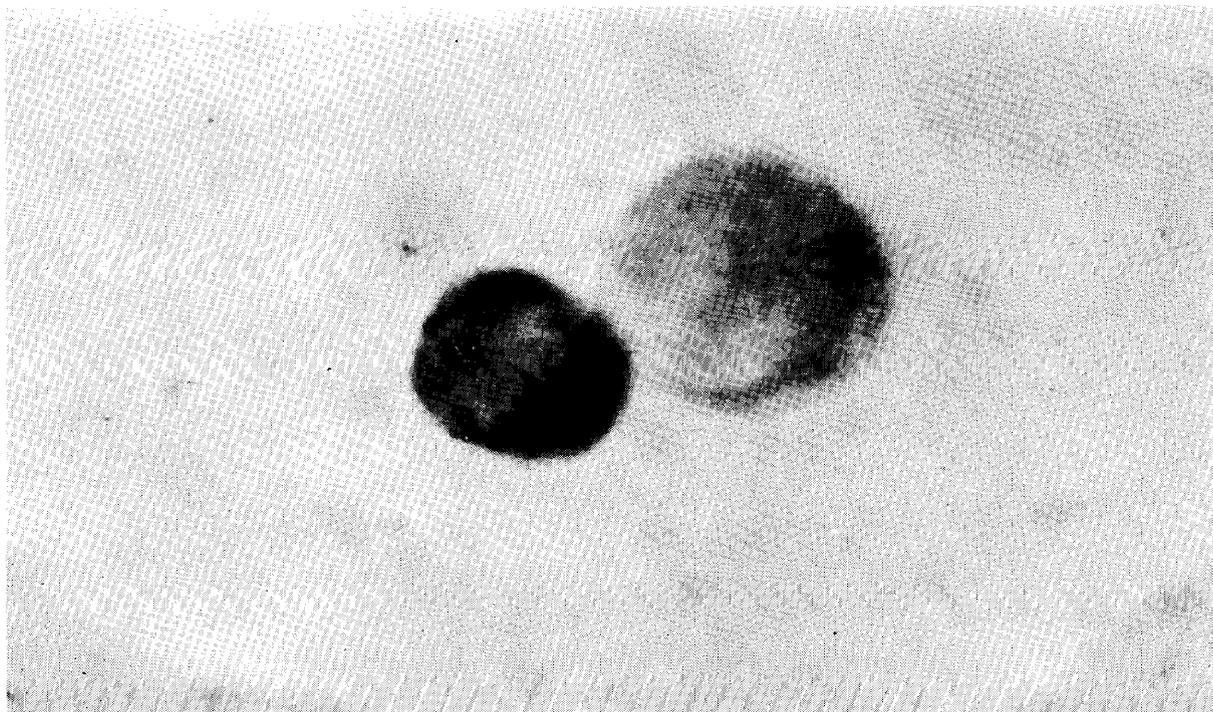
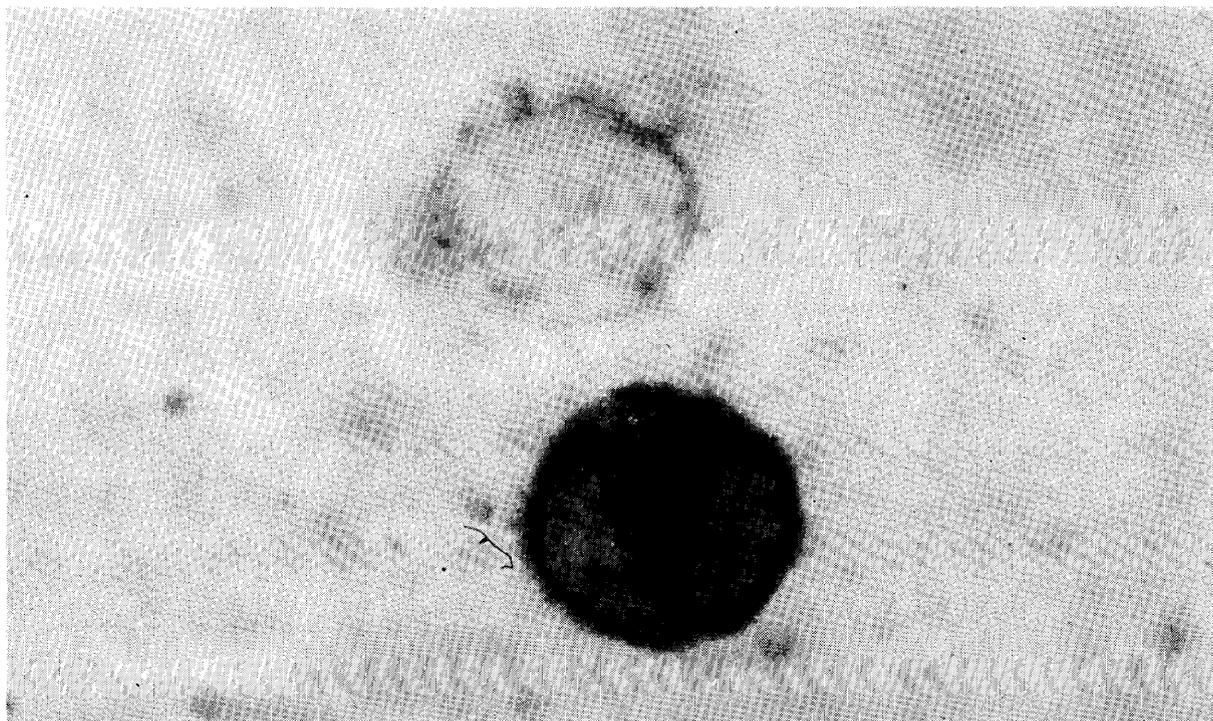


写真4 変性した腫瘍細胞，細胞腫大，細胞質および核内に空胞形成がみられる。(Papanicolaou 染色)



**写真5** エーリッヒ腫瘍細胞の LDH-DPN diaphorase 染色右の細胞では、左に比し、染色性がかなり低下している。



**写真6** エーリッヒ腫瘍細胞の LDH-DPN diaphorase 染色所見，上の染色性の低下した細胞は生活力のよわい細胞，下の濃染した細胞は生活力のつよい細胞と判定した。この染色では，細胞質が染色され，核内は染色されない。

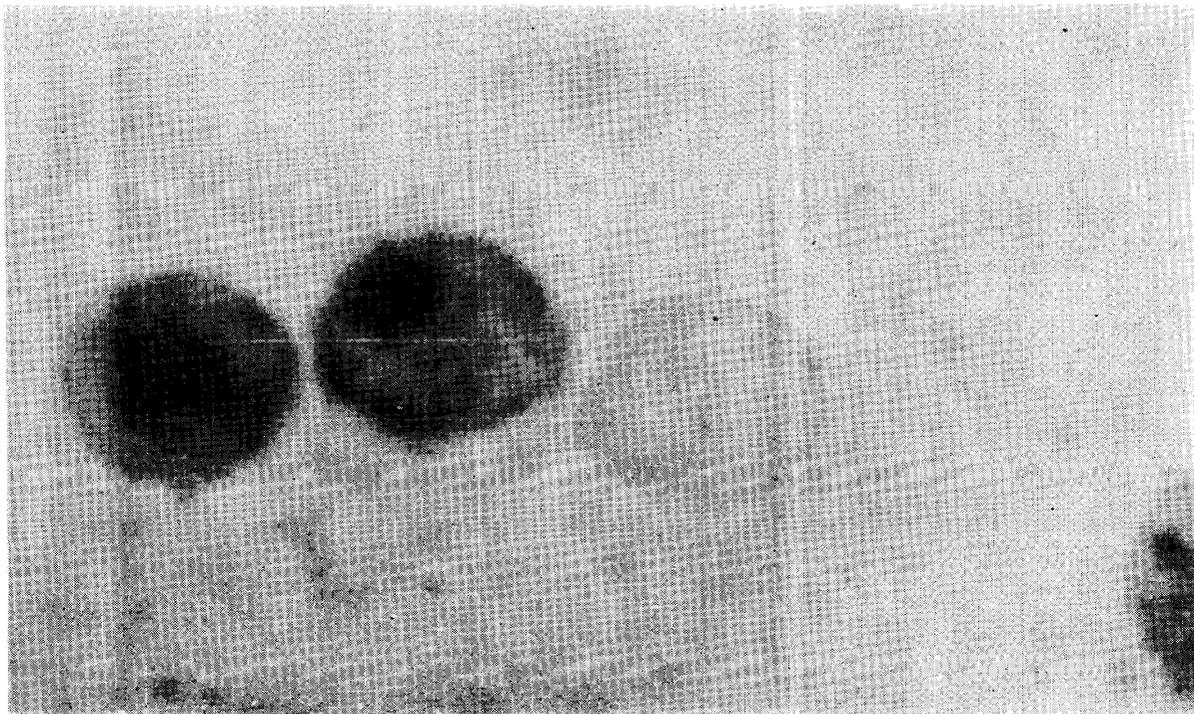
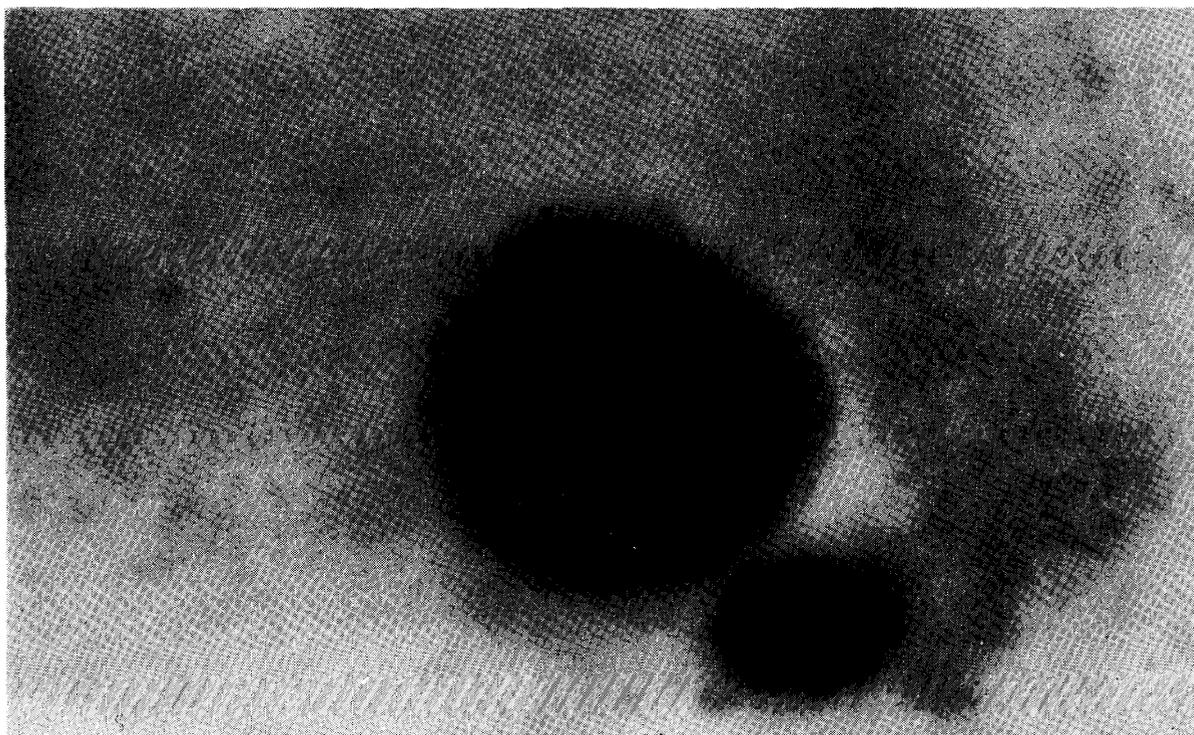


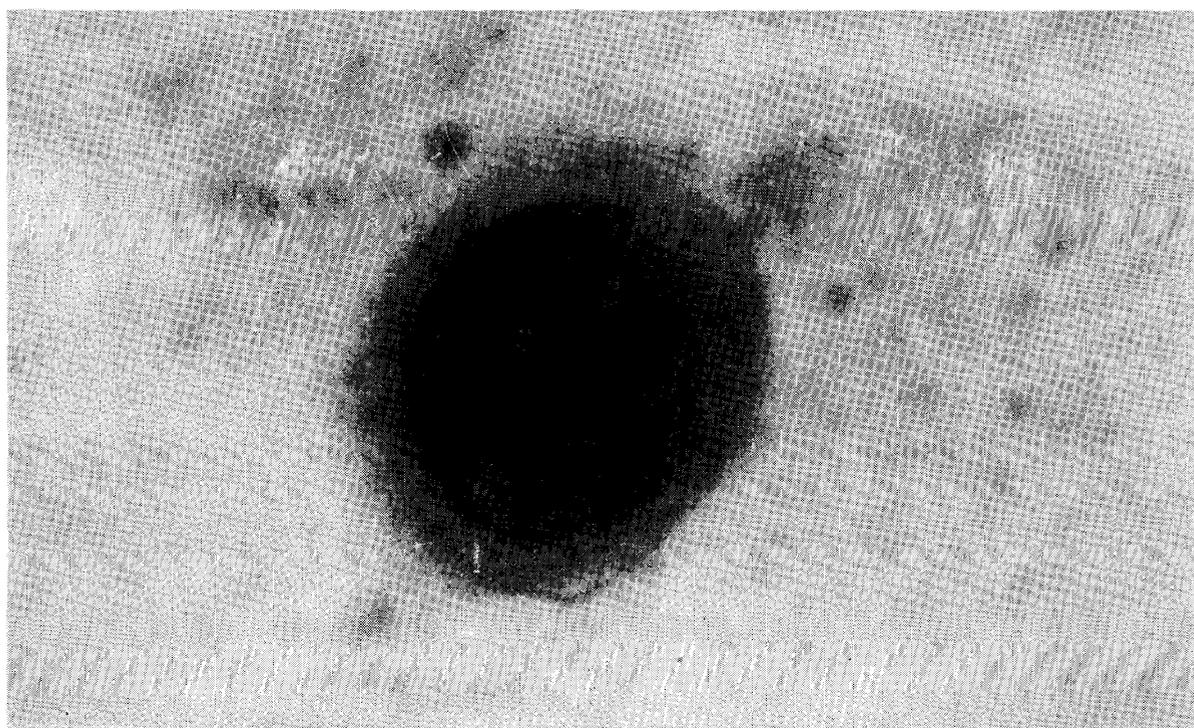
写真7 エーリッヒ腫瘍細胞の LDH-DPN diaphorase 染色，右の2ヶの細胞は染色性がよく保たれているが右の細胞は染色性が低下し，生活力の弱い細胞と判定した。



写真8 変性した人肺癌細胞，胞体は膨化し核周囲に Hof がみとめられる。又核クロマチンは凝集し，核縁不整，核内空胞形成などがみられる。(Papanicolaou 染色)



**写真9** 変性した人肺癌細胞の Papanicolaou 染色，核膜に近接した細胞内に空胞の出現があり，核クロマチン粗大凝集，空胞形成がみられる。



**写真10** 人肺癌細胞の Papanicolaou 染色による変性細胞所見，細胞質内および核内に空胞形成がみられ，全体として染色性が低下している。



写真11 人肺癌の LDH-DPN diaphorase 染色，上の細胞は染色性がよく保たれているが下の細胞では染色性が低下している。

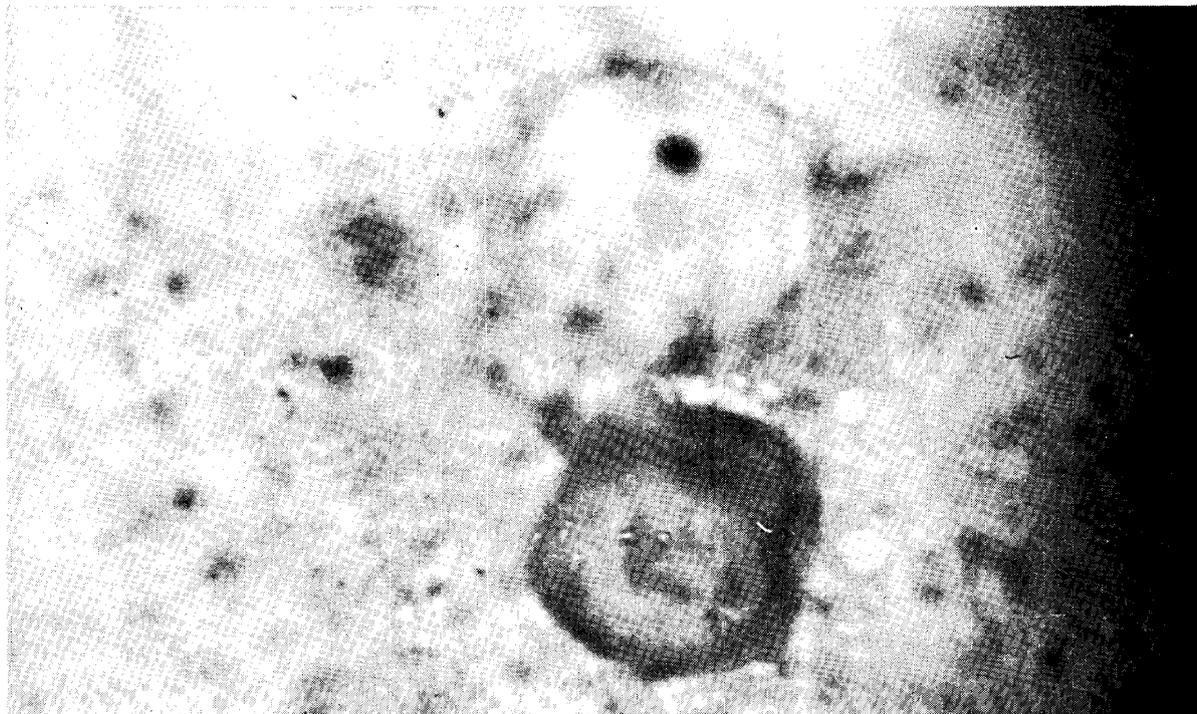


写真12 変性した人肺癌細胞の LDH-DPN diaphorase 染色，上の細胞に於ては染色性の低下が著明である。