

VP-16 のヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47, KW-103, RT 4 およびヒト腎癌由来培養細胞 KN-41 に対する *in vitro* の殺細胞効果

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 黒田恭一教授)

久 住 治 男
中 嶋 和 喜
黒 田 恭 一

THE DRUG SENSITIVITY OF VP-16 *IN VITRO* IN BLADDER CANCER CELL LINES, KK-47, KW-103, AND RT 4 AND IN RENAL CANCER CELL LINE, KN-41

Haruo HISAZUMI, Kazuyoshi NAKAJIMA and Kyoichi KURODA

From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa
(Director: Prof. K. Kuroda)

Using a colony formation technique and KK-47, KW-103 and RT4 cell lines established from human bladder transitional cell carcinomas and KN-41 cell line from a human renal cell carcinoma, the drug sensitivity of VP-16 was determined. The survival curves of the cell lines showed that this agent has a concentration dependent cell killing effect. From the drug sensitivity at 50 per cent and 90 per cent inhibitions (ID_{50} and ID_{90}) determined from the survival curves in these cell lines at 2- and 24-hour exposure series of the drug, it was indicated that VP-16 has almost the same cell killing effects as those of bleomycin and cis-platinum. Compared with those of mitomycin C, adriamycin and carboquone, the ID_{50} and ID_{90} values of VP-16 were 1 to 3 digits higher in order.

緒 言

マンダラゲ (*podophyllum peltatum*) の薬用成分については19世紀頃から下剤, 胆汁分泌促進剤としてその生物学的作用が知られていたが, その強い毒性のため一般的でなかった。1942年, その抽出成分のポドフィリン (*podophyllin*) の外用剤が尖圭コンジロームの治療に有効と報告され¹⁾, さらにこれより毒性が少なく, かつ抗腫瘍性の高い誘導体の研究がおこなわれた。その結果 *podophyllotoxin* の誘導体のうち VP-16, および VM-26 が抗癌剤として臨床的に応用しようことが見出された²⁾。VP-16 (4'-demethyl-epipodophyllotoxin- β -D-ethylidene glucoside) は Sarcoma -37 と180細胞に抗腫瘍活性が認められ, 実験的に細胞周期の分裂前期に増殖阻止作用を有し, G_2 , S 期が高感

度を示し G_2 期における阻害が考えられている³⁾。臨床的には肺の oat-cell carcinoma に有効な薬剤とされ, その他 *histiocytic lymphoma*, *acute non-lymphocytic leukemia* に有用視されている。固型癌では VP-16 の単剤あるいは他剤との併用により乳癌, 卵巣癌, 膀胱癌にも応用価値が認められている⁴⁾。

筆者は VP-16 のヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47⁵⁾, KW-103⁶⁾, RT4⁷⁾, さらにヒト腎細胞癌由来培養細胞株 KN-41⁶⁾ における殺細胞効果を *in vitro* のコロニー形成法を用いて検討した。

実験材料および方法

抗癌剤の殺細胞効果は *in vitro* のコロニー形成率により, 抗癌剤の濃度勾配に対しそれぞれの細胞生残率を求め, 片対数表上に plot し, dose-response curve

を作製し、細胞の50%致死量 ID_{50} 、90%致死量 ID_{90} を算出して比較検討した。なお薬剤接触時間は2時間、24時間の2シリーズとし、それぞれ実験系をデザインした。実験法はすでに報告したごとくであるが²⁰⁾、以下の方法を用いた。

細胞培養には Ham F 12 培地 (日水製薬株, 東京) に 20% calf serum (株式会社医学部生物学研究所, 名古屋) と aminobenzyl penicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むものを使用した。

KK-47, KW-103, KN-41 はいずれもすでに報告したごとく金沢大学医学部泌尿器科学教室にて樹立された細胞株で, RT4 は Rigby and Franks により樹立されたもので, Dr. P. Collins, Krolinsua Institute の厚意により送られてきて, 当教室にて維持されているものである。

各細胞は培養瓶中に semi-confluent monolayer に発育しているものを用い, 0.02% EDTA と 0.1% pronase にて disperse し, 生細胞数を 40~60/ml の濃度に single cell suspension を作製した。これをペトリ皿, 3002 tissue culture dish, 60×15 mm (Falcon, Cal., USA) に 5 ml あて分注し, それぞれの plating efficiency をあらかじめ測定した。なお KK-47, KW-103, RT4, KN-41 の doubling time はそれぞれ 23.5, 16.0, 54.7 および 20.9 時間であった。ペトリ皿に細胞植え込み後, 5% CO_2 , 37°C の incubation を 24 時間おこない, その後 medium をすて, 5~7 段階の濃度に倍々希釈した VP-16 を含む medium を, それぞれ 5 ml あて triplicate にペトリ皿に注入し, 2 時間, あるいは 24 時間薬剤接触をおこなった。薬剤接触後直ちに新しい medium にて 3 回洗浄し, さらに 12~13 日間培養をつづけた。培養終了とともに medium をすて, 10%ホルマリン溶液にてコロニーを固定し, ギムザ染色を施し, 乾燥後コロニー数を肉眼的に計算した。対照には薬剤無添加の medium による結果を用いた。対照コロニー数から各濃度における細胞生残率を算出した。この実験は各シリーズ当り 3 回くり返し, 生残率の平均値とその標準偏差を求めた。生残率は濃度別に片対数表上に plot し, survival curve (dose-response curve) を作製した。 ID_{50} , ID_{90} はそれぞれ survival curve より求めた。

実験成績

1. KK-47 細胞の VP-16 に対する survival curve は Fig. 1 および Fig. 2 に示す。薬剤 2 時間接触時の ID_{50} は 1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ID_{90} は 3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で, 24 時間接触時の ID_{50} は 0.17 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ID_{90} は 0.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で

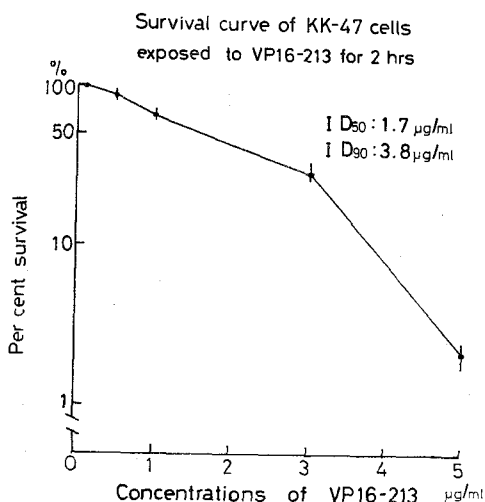


Fig. 1

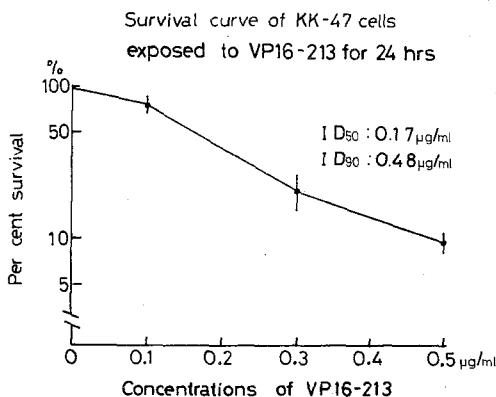


Fig. 2

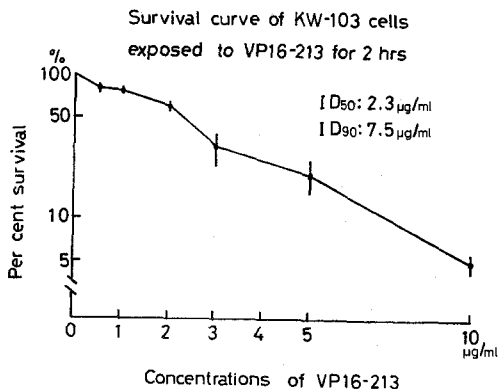


Fig. 3

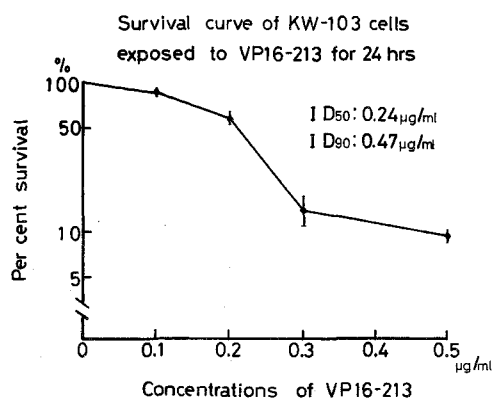


Fig. 4

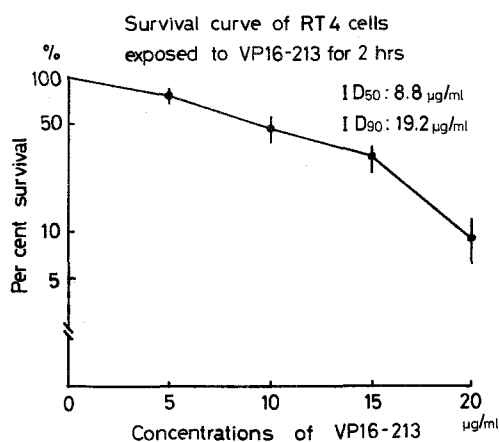


Fig. 5

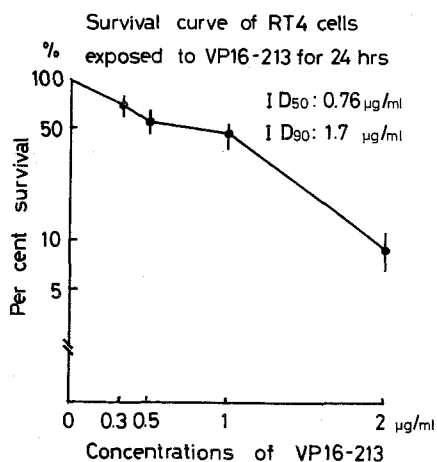


Fig. 6

あった。

2. KW-103 細胞における survival curve は Fig. 3, および Fig. 4 に示す。薬剤 2 時間接触時の ID₅₀ は 2.3 µg/ml, ID₉₀ は 7.5 µg/ml で、24 時間接触時の ID₅₀ は 0.24 µg/ml, ID₉₀ は 0.47 µg/ml であった。

3. RT4 細胞では 2 時間接触時の ID₅₀ は 8.8 µg/ml, ID₉₀ は 19.2 µg/ml で、24 時間接触時の ID₅₀ は 0.76 µg/ml, ID₉₀ は 1.7 µg/ml であった (Fig. 5, 6)。

4. KN-41 細胞では 2 時間接触時 ID₅₀ は 2.1 µg/ml, ID₉₀ は 4.9 µg/ml で、24 時間接触時の ID₅₀ は 0.25 µg/ml, ID₉₀ は 0.57 µg/ml であった (Fig. 7, 8)。

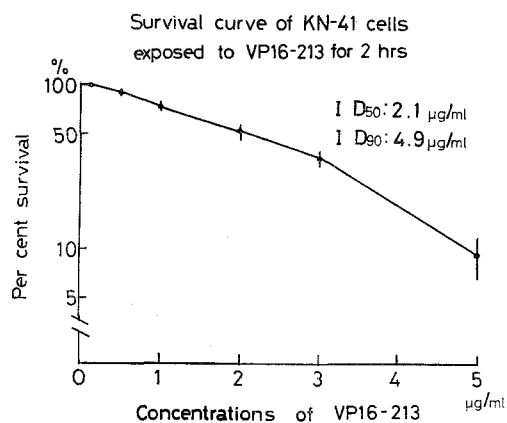


Fig. 7

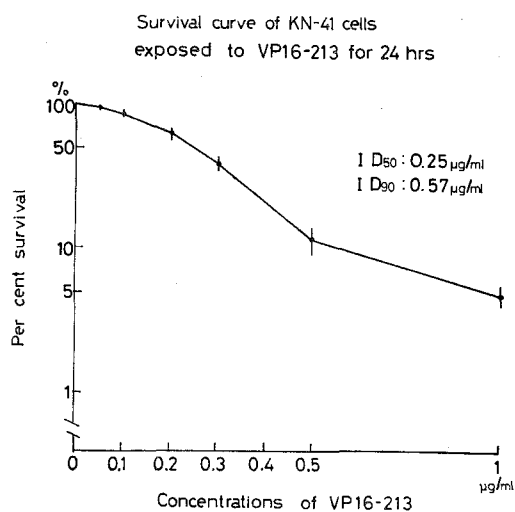


Fig. 8

考 察

いずれの株細胞においても2時間薬剤接触時の survival curve の勾配は大きい、細胞の生残率は薬剤濃度とともにほぼ直線的に低下する。24時間薬剤接触時の survival curve を前者の片対数表上に plot すると、survival curve はさらに急峻となり、直線的で本剤の concentration dependent な殺細胞効果が一層明確に認められる。ID₅₀ と ID₉₀ における薬剤濃度差は2時間、および24時間薬剤接触のいずれの場合も10倍前後であった。このことは両 survival curve がかなり直線的に平行関係を保っていることを示すもので、VP-16 は濃度依存性の性格を有するものといえる。RT4 の ID₅₀, ID₉₀ は他の3株に比してかなり大であったが、この低感受性は RT4 の doubling time が他の3株に比して2倍以上長いためかもしれない。

ID₅₀, ID₉₀ の観点からみると VP-16 は、これまで筆者の実験した bleomycin, cis-platinum のそれらに匹敵し、mitomycin C, carboquone のそれらと比較して10~1000倍大であった。すなわちこれまでに検討した薬剤の中では比較的殺細胞効果の低いものであった。

ま と め

VP-16 の KK-47, KW-103, RT4, および KN-41 に対する殺細胞効果を survival curve より検討すると、本剤は concentration dependent の性格を有する抗癌剤であるが、ID₅₀, ID₉₀ の比較では bleomycin, cis-platinum のそれとほぼ匹敵する殺細胞効果が認められた。しかし mitomycin C, adriamycin, carboquone と比較すると 1/10~1/1000 程度であった。

VP-16 の提供を頂いたブリストル・マイヤーズ株式会社に感謝します。

なお本論文の要旨は第30回泌尿器科中部総会の特別講演において久住が報告した。

文 献

- 1) Kaplan, I.: Condylomata acuminata. New Orleans Med. Surg. J., 94: 388~390, 1942.
- 2) Keller-Juslen, C., Kuhn, M. and von Wartburg, A.: Synthesis and antimitotic activity of glycosidic lignan derivatives related to podophyllo-toxin. J. Med. Chem., 14: 936~940, 1971.
- 3) Hou, Y. and Huang, C.C.: Effects on growth and chromosomes in human hematopoietic cell lines by a new antitumor agent epipodophyllo-toxin (VP-16). Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 14: 49, 1973.
- 4) 古江 尚・ほか: 癌化学療法の基礎と臨床, p.160 癌と化学療法社, 東京, 1977.
- 5) 久住治男・ほか: ヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47 の生物学的特性について. 日泌尿会誌, 70: 485~494, 1979.
- 6) 内藤克輔・ほか: ヒト腎癌および膀胱癌由来培養細胞株 (KH-39, KN-41 および KW-103) の樹立とその性状. 日泌尿会誌, 投稿中.
- 7) Rigby, C.C. and Franks, L.M.: A human tissue culture cell-line from a transitional cell tumor of the urinary bladder: growth, chromosome pattern and ultrastructure. Brit. J. Cancer, 24: 746~754, 1970. 1979.
- 8) 久住治男・ほか: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47 を用いた抗癌剤感受性試験について. 癌と化学療法, 6: 1057~1062, 1979.

(1981年3月6日迅速掲載受付)