

Title	細胞集団のsemisynchronizationを利用した制癌効果増強に関する研究 : methotrexateとadriamycinの順次併用について
Author(s)	植松, 昌雄
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32474">https://hdl.handle.net/11094/32474</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名・(本籍)	植 松 昌 雄
学 位 の 種 類	医 学 博 士
学 位 記 番 号	第 4 6 9 2 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 8 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学 位 論 文 題 目	細胞集団のsemisynchronizationを利用した制癌効果増強に関する研究 ——methotrexateとadriamycinの順次併用について——
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 神 前 五 郎 (副査) 教 授 坂 本 幸 哉 教 授 川 俣 順 一

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

代謝拮抗剤の低濃度長時間処理により癌細胞集団を cell cycle 上の特定の phase に集積させた上で、phase specific に作用する制癌剤で短時間処理すれば、制癌効果の増強が期待できる。

そこで、methotrexate と adriamycin の組合せにつき、順次併用によって制癌効果の増強が本当に得られるか否かを明らかにし、さらにその効果増強の機構を解明することを目的として以下の実験を行なった。

### 〔方法ならびに成績〕

ヒト Hodgkin 病胸水由来の培養細胞株 RPMI3236 (cell cycle time 24 時間,  $G_1$ : 12 時間, S: 8 時間,  $G_2 + M$ : 4 時間) を用い, in vitro で methotrexate (MTX) 24 時間処理, adriamycin (ADM) 1 時間処理,あるいはこれらの処理の順次併用による増殖抑制効果および、殺細胞効果を検討した。さらに、これらの薬剤処理後の細胞集団の relative DNA content histogram の変化を flow cytometry によって検討した。

#### 1) 各種濃度の MTX 24 時間処理の細胞増殖抑制効果。

薬剤処理後 4 日目における細胞核数を無処理対照群のそれと比較した。 $2^{-5} \mu M$  では無処理群と大差ない増殖を示し,  $2^{-3} \mu M$  では無処理群の約 20% 程度にまで強く増殖が抑制された。その中間の  $2^{-4} \mu M$  では、薬剤処理中はほとんど細胞数が増加せず、そののちはほぼ無処理群と平行した増殖を示し、4 日目の細胞核数は無処理群の約半数であった。そこで以後の実験は、 $2^{-4} \mu M$  の MTX を用いた。

2) MTXおよびADM処理の順次併用による増殖抑制効果。

MTX( $2^{-4}\mu\text{M}$ , 24時間) 処理にひきつづいて ADM( $0.1\mu\text{g/ml}$ , 1時間) 処理を行なった場合(以下 MTX→ADMと略す)の方が, 処理順序を逆にした場合(ADM→MTX)に比べて増殖抑制効果が著明であった。ADMの溶解後の失活による影響を避けるために, 上記2群のADM溶解は使用直前に別個に調整するので, それぞれのADM各単独処理群の細胞核数を対照としてその効果を比較すると, MTX→ADM群が $27\pm 6\%$ であるのに対し, ADM→MTX群では $46\pm 16\%$ であり, MTX→ADM処理の方が有意に増殖抑制の増強を示した( $p<0.05$ )。

3) MTXおよびADM処理の順次併用による殺細胞効果。

各薬剤処理あるいは両薬剤により順次処理したのち, 一定数の細胞をシャーレに接種し, 11日目に生じたコロニー数(30個以上の細胞集団をコロニーとした)を算定することによってその効果を比較すると, ADM→MTX群は $70\pm 34\%$ に対し, MTX→ADM群は $12\pm 5\%$ と, MTX→ADM群の方が有意に高い殺細胞効果を示した( $p<0.01$ )。

4) flow cytometryによる薬剤処理後の細胞動態の検討。

各々の薬剤処理を受けた細胞群をDNA蛍光色素の propidium iodide 液( $0.05\text{mg/ml}$  in  $0.1\%$  sodium citrate)に移したのち, Bio/Physics社製 Cytofluorograf model 4800Aを用いて relative DNA content の histogramの経時的変化を追求した。

a). MTX処理直後にはS期の初期に細胞の集積が見られ, 処理後終了後の6時間目には集積の peakはS期後半に移り, 12時間目には $G_1$ 期に移っており, その細胞回転は無処理群のS期 $G_2 + \text{M}$ 期の通過時間とよく合致している。

b). ADM処理直後は無処理群と同じ histogramを示し, 時間の経過とともに $G_2$ 期への集積がみられ, 23時間には一部の細胞が $G_1$ 期に移って細胞回転が再開する。

c). 両薬剤の順次併用後の変化

ADM→MTX処理直後には, ADMによる $G_2$ 期の peakと, MTXによるS期初期の peakの二峰性を示す。時間の経過につれて $G_2$ 期にほとんどの細胞が集積し, 18時間後には一部の細胞が $G_1$ 期に移行し, 細胞回転の再開がみられた。

MTX→ADM処理直後には, S期初期に細胞が集積している。12時間目には peakは $G_2$ 期に移動し, 18~36時間目にかけて $G_2$ 期に相当するDNA量より多いDNAを持った細胞群が多く見られるようになる。そののち, この peakの低下とともに異常に少ないDNA量をもつ細胞群がみられ, 細胞崩壊を来しているものと推定される。48~72時間後には,  $G_1$ 期相当部分に小さな peakが出現し, 細胞回転のわずかな回復がみられた。

[総括]

MTXの低濃度24時間処理にひきつづいてADM1時間処理を加えると, その逆の順序に処理した場合に比べて, 明らかに強い細胞増殖抑制効果および殺細胞効果を認めた。

この現象はMTXによりS期初期に集積した細胞に対して, この時期の細胞にとくに強い傷害作用を有するADMが作用する結果, ADM単独処理や, ADMを先に, つづいてMTX処理を行なった

場合に比べて、より強いG<sub>2</sub> blockがおこり、多数の細胞に致死効果を与えるためであることをflow cytometry法により証明し得た。

### 論文の審査結果の要旨

本論文は、人癌由来培養細胞を用いて methotrexate の低濃度長時間処理後 adriamycin 短時間処理を加えると、逆の順序に処理した場合に比べて、強い制癌効果が起ること、ならびに、この現象は前者によって細胞集団がS期初期に集積され、このphaseに強い傷害作用を有する adriamycin が作用する結果、より強いG<sub>2</sub> blockが起り、多数の細胞に致死効果を与えるためであることをflow cytometryを用いて明らかにしたものである。

これらのことは癌化学療法上重要な知見であって価値あるものと認める。