

肺扁平上皮癌の治療に関する研究

第 1 編

ハムスター移植ヒト肺扁平上皮癌細胞株に対する 各種制癌剤の感受性について

岡山大学医学部第二内科学教室（指導：木村郁郎教授）

瀬 戸 匠

（平成元年 3 月 25 日受稿）

Key words : human lung cancer cell line, xenograft, chemosensitivity test

緒 言

遠隔転移を有するような進展期悪性腫瘍の治療法に対しては、癌化学療法が第 1 選択である。近年、数多くの制癌剤が開発され、現在 30 種以上の薬剤が臨床に用いられているが、これら薬剤の各種悪性腫瘍に対する効果は、臨床第 2 相試験やこれまでの臨床経験より、腫瘍の発生臓器によりある程度の傾向を示すことが知られている。現在の癌化学療法は、これら臨床集計に基づいて選択される 3 ないし 4 剤を組み合わせた多剤併用療法が主流であり、悪性リンパ種や白血病などの一部悪性腫瘍ではその治療成績は著しく向上してきている。しかし、多くの悪性腫瘍に対する標準的癌化学療法は、いまだ確立されたとは言いがたく、種々の試みが行われている。

近年、著増傾向を示している肺癌においても、その約 40% を占める肺扁平上皮癌に対する癌化学療法の治療成績は決して満足すべきものとは言えず、奏功例においてすら患者の延命にどれほど寄与しているかは、いまだ明らかでない^{1,2,3)}。肺扁平上皮癌の治療成績の向上には、この悪性腫瘍に対してより強力、かつ有効な新制癌剤の開発が望まれるとともに既存の制癌剤のこの腫瘍に対する正確な感受性を知ることも重要である。

今回、著者は各種制癌剤の肺扁平上皮癌に對

する有効性をより正確に把握し、そしてその治療成績の向上に寄与することを目的に、ヒト肺扁平上皮癌に類似した理想的疾患モデルとして当教室において開発されたハムスター・ヒト肺扁平上皮癌移植系⁴⁾を用いて種々薬剤の感受性を検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 移植細胞

移植には、ハムスターに継代移植中のヒト肺扁平上皮癌細胞株 (EBC-1)⁵⁾を用いた。

2. 移植腫瘍の作成

移植腫瘍の作成は、継代中の腫瘍を無菌的に摘出し、細切したのちパイペッティングし、金属メッシュにて濾過し、RPMI1640 (Flow 製) にて 1 回洗浄した後、生理食塩水中に細胞数 1×10^7 個/ml を浮遊させ、これを移植に用いた。生細胞数は、トリパンブルーを用いて算定した。移植には、ツベルクリン針を用い、生後 24 時間以内の新生児ハムスターの背部皮下に 1×10^6 個移植した。移植後ハムスター胸腺細胞に対するウサギ抗リンパ球血清 (ALS) 0.1ml を、同じくツベルクリン針にて腹腔内に投与し、その後も週 2 回の投与を続けた。

3. 移植動物

ハムスターは、固形飼料と水道水で自家繁殖させた生後 24 時間以内の新生児シリアンゴールデンハムスターを用いた。

4. 抗リンパ球血清 (ALS)

抗リンパ球血清は, Levery と Medawar の方法⁶⁾に準じて作製した。すなわち, 生後3~4週目のハムスターの胸腺を無菌的に摘出し, 生理食塩水中にてピンセットで細胞を分離し, 細胞数が 1×10^9 個になるように調整し, 約3kgの健康な家兎に2週間隔で2回静注後, 2回目の免疫から1週間目に採血した。分離した血清は, 56°Cで30分間加熱し非働化した後, 0.45 μ mのミリポアフィルターで濾過し, -20°Cに保存して実験に用いた。

5. 製 癌 剤

検討した制癌剤は, 肺癌治療剤としてよく用いられている1-(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)methyl-3-(2-chloethyl)-3-nitroseaurea (ACNU), adriamycin (ADM), bleomycin (BLM), cis-dichlorodiammineplatinum(II) (CDDP), cyclophosphamide (CTX), 5-fluorouracil (5-FU), ifosphamide (IFO), mitomycin C (MMC), methotrexate (MTX), neocaruzinostatin (NCS), procarbazine (PCZ), vincristine (VCR) の12薬剤で, これら薬剤の投与量は, マウスのLD₅₀の1/4量を基準とし, 1/2量, 1/8量についても検討した。なお, 5-FUおよびVCRについては1/16量も追加し, 検討した。希釈には生理食塩水を用い

た。表1に実験に用いた薬剤とその投与量を示した。

6. 制癌剤の投与およびその効果判定

移植後, 腫瘍が発育し, 腫瘍の長径と短径の積が100mm²になった時点で, 前記薬剤を, 単剤で, 1回のみ腹腔内投与した。その後, 腫瘍径を投与後14日目まで隔日に計測した。効果判定は, 制癌剤適応研究会に採用されている Battle Columbus Laboratory の方法⁷⁾に準じた。すなわち, 腫瘍重量の算出には次の式を用いた。

$$\text{腫瘍重量 (mg)} = \frac{(\text{腫瘍の短径})^2 \times (\text{腫瘍の長径})}{2}$$

また, 実験の均一化を図るために relative-tumor weight (RTW: 治療開始時の腫瘍重量に対する計測時点での腫瘍重量の比) を求め, 下記の式にて腫瘍増殖抑制率を算出した。

$$\text{腫瘍増殖抑制率} = \frac{\text{対照群の RTW} - \text{実験群の RTW}}{\text{対照群の RTW}} \times 100$$

腫瘍増殖抑制率が58%以上の場合, その薬剤は感受性有りとした。なお, 腫瘍抑制率58%は, 薬剤投与群の腫瘍各径がコントロール群における各径の75%になった場合の, 推定腫瘍重量から導かれた数値42%⁸⁾を基準とし算出したものである。対照群に対しては, 腫瘍の長径と短径の

表1 実験薬剤および投与量

薬剤	投与量 (mg)	マウスの 1/2LD ₅₀ *	1/4 LD ₅₀	1/8 LD ₅₀	1/16LD ₅₀
ACNU		26.9	13.5		
adriamycin			3.5	1.8	
bleomycin	234		117		
cis-platinum (II)	7.3		3.7	1.9	
cyclophosphamide	216		108	54	
5-fluorouracil			250		63
ifosphamide	327		164	82	
mitomycin C	2.6		1.3		
methotrexate	50		25		
neocarzinostatin	2.0		1.0		
procardazine	400		200		
vincristine			0.8		0.2

* LD₅₀: 50%致死濃度

積が100mm²になった時点で、薬剤の代わりに生理食塩水0.1mlを腹腔内注射した。

また、副作用を検討するため、ハムスターの体重測定を、治療開始時より腫瘤径測定と同時にに行った。

なお、実験はすべて5～7匹を1群として検討した。

結 果

EBC-1細胞を移植したハムスターすべてに腫瘤の形成が認められ、腫瘤は移植部位である背部皮下に移植後7日目頃より触知するようになった。移植後12日目から14日目(平均13日目)には腫瘤の長径と短径の積が100mm²となり、検討薬剤を単剤で投与した。対照群に対しては生理食塩水を投与したが、投与後も腫瘤はほぼ直線的な増殖を示した(図1)。

EBC-1細胞に対するACNU, ADM, BLM, CDDP, CTX, 5-FU, IFO, MMC, MTX, NCS, PCZ, VCRの12剤における抗腫瘍効果を検討するため、薬剤投与後経時的に腫瘍重量を測定したが、それらの結果を図2および図3に示す。マウスのLD₅₀の1/4量の薬剤投与において、最大効果発現時に58%以上の腫瘍増殖抑制率を示したのはADM, IFO, CTX, MMC, MTXおよびCDDPの6薬剤で、図2に各薬剤投与後の

相対的腫瘍重量による腫瘍増殖曲線を示した。これら6薬剤は、EBC-1細胞に対して感受性ありと判定されたが、このうちADM投与群では腫瘍増殖抑制率は86%, IFO投与群では84%と明らかな抗腫瘍効果が認められた。しかし、CTX, MMC, MTXおよびCDDP投与群では、腫瘍増殖抑制率はそれぞれ66%, 64%, 60%, 60%とADM, IFO投与群に比してその抗腫瘍効果は弱く、また薬剤投与後12日目には再び腫瘍の急速な増殖が認められた。ADM, IFOおよびCTXの3薬剤についてはさらにマウスのLD₅₀の1/8量を投与し検討したが、腫瘍増殖抑制率はそれぞれ21%, 57%, 27%と、この投与量では抗腫瘍効果はほとんど認められなかった(表2)。MMC, MTXおよびCDDPについては投与量をマウスのLD₅₀の1/2量と増量し投与したが、抑制率はそれぞれ68%, 64%, 70%であった(表2)。

つぎに、その他の6薬剤、すなわちACNU, NCS, PCZ, BLM, 5-FU, VCRの検討結果について述べる。ACNU, NCS, PCZおよびBLMはマウスのLD₅₀の1/4量投与群では投与後の腫瘍増殖曲線が示すように、抑制効果は全く認められなかった(図3)。これらの薬剤については

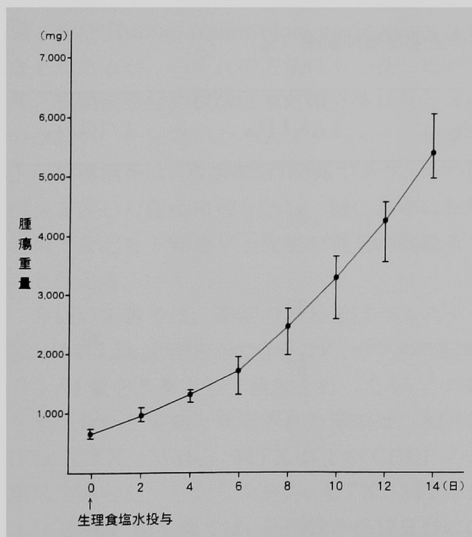


図1 対照群(生理食塩水投与後)の腫瘍増殖曲線

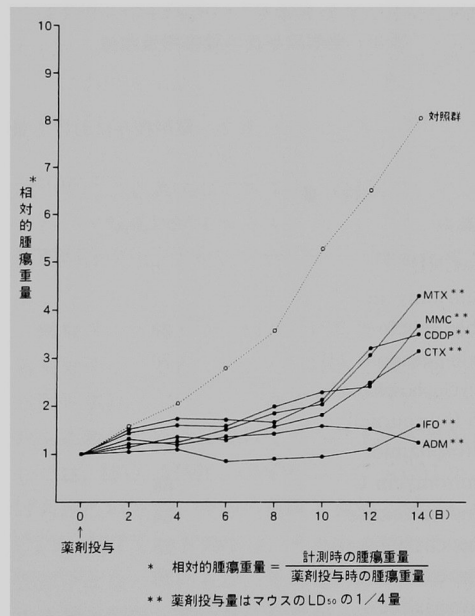


図2 薬剤投与後の腫瘍増殖曲線

さらに投与量をマウスのLD₅₀の1/2量と増量し投与したが、抑制率はそれぞれ0%, 18%, 38%, 23%と効果は認められず、これらの薬剤はEBC-1細胞に対して全く抗腫瘍効果はないと判定した(表2)。5-FUおよびVCRは、マウスのLD₅₀の1/4量を投与したところ、すべてのハ

ムスターが死亡したため投与量をマウスのLD₅₀の1/16量として実験を行ったが、抑制率はそれぞれ39%, 42%と抑制効果はあまり認められなかった。以上の各薬剤投与における最大効果発現時の腫瘍増殖抑制率を表2にまとめて示す。

各薬剤の副作用の検討は、腫瘍径測定時に計った体重を対照群と比較し行った(表3)。対照群に比し20%以上の体重減少を認めたのは、マウスのLD₅₀の1/2量のCDDP, MTX, BLMおよびLD₅₀の1/16量の5-FU, VCR投与群であった。LD₅₀の1/4量の5-FU, VCRおよびLD₅₀の1/2量のCTX, IFO投与群では、薬剤毒性のためすべてのハムスターが死亡した。その他、ADM, CTXおよびIFO投与群ではすべてに脱毛が認められた。

考 案

近年、わが国における肺癌の増加は著しく、集団検診などによる早期発見の努力がなされているにもかかわらず、手術症例は全肺癌の約30%に過ぎない。肺癌の治療法としては、手術療法の外に放射線療法、癌化学療法があるが、遠隔転移を有する肺扁平上皮癌に対する治療法としては、癌化学療法が唯一の治療法である。1980年以降、肺非小細胞癌の治療にCDDPが導入され、奏効率は従来の成績に比しかなり向上して

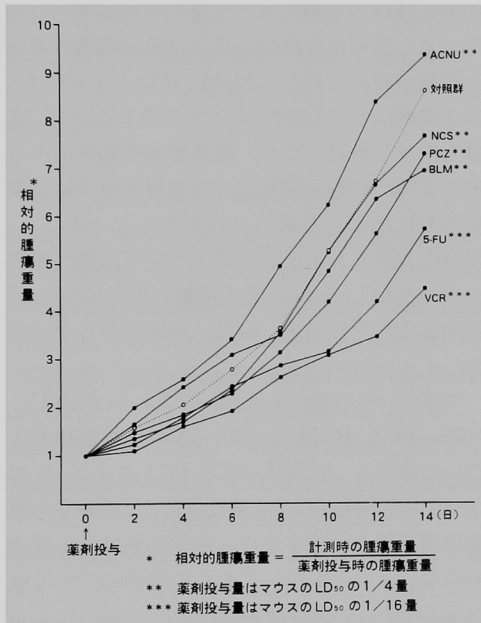


図3 薬剤投与後の腫瘍増殖曲線

表2 薬剤投与における最大効果時の主要増殖抑制率(%)

薬剤	投与量	マウスの 1/2 LD ₅₀ *	1/4 LD ₅₀	1/8 LD ₅₀	1/16LD ₅₀
ACNU		0	0		
adriamycin			86	21	
bleomycin	23		20		
cis-platinum (II)	70		60		
cyclophosphamide			66	27	
5-fluorouracil					39
ifosphamide			84	57	
mitomycin C	68		64		
methotrexate	64		60		
neocarzinostatin	18		7		
procardazine	38		20		
vincristine					42

* LD₅₀: 50%致死濃度

表3 薬剤投与の体重におよぼす影響：対照群（生理食塩水投与群）に対する体重比（%）

薬剤	投与量 マウスの 1/2 LD ₅₀ *	1/4 LD ₅₀	1/8 LD ₅₀	1/16LD ₅₀
ACNU	98	88		
adriamycin		100	96	
bleomycin	78	87		
cis-platinum (II)	68	95		
cyclophosphamide		85	82	
5-fluorouracil				77
ifosfamide		80	100	
mitomycin C	94	103		
methotrexate	78	95		
neocarzinostatin	82	88		
procadazine	104	108		
vincristine				70

* LD₅₀：50%致死濃度

きたが、未だ完全寛解率は数%に過ぎず、奏効例における延命効果も明らかでない。著者は、今回既存の12薬剤について、肺扁平上皮癌に対する *in vivo* における抗腫瘍効果をハムスター・ヒト肺扁平上皮癌移植系を用いて検討した。

従来制癌剤の感受性試験としては、*in vivo* ではヌードマウスを用いた方法^{9)~13)}が、また、*in vitro* においては制癌剤作用後の腫瘍細胞の生死を、色素染色性¹⁴⁾、酵素活性¹⁵⁾あるいは放射性同位元素の取り込み¹⁶⁾で判定する方法、あるいは近年開発された Human tumor clonogenic assay 法¹⁷⁾などがあるが、いずれの方法にも一長一短があり、制癌剤感受性試験は未だ確立されたとはいえない。今回用いたハムスター・ヒト肺扁平上皮癌移植系は、移植率は100%であり、かつ移植後安定した腫瘍増殖を示し、肺に高率に転移を来すなどヒト肺扁平上皮癌の理想の実験モデルと言える。

今回の実験では、薬剤の投与量はハムスターにおける LD₅₀が明らかでないため、マウスの LD₅₀の1/4量を基準として検討を行ったが、この投与量において有効と判定された薬剤は、ADM、IFO、CTX、MMC、MTX および CDDP の6薬剤であった。しかしながら、CTX、MTX および CDDP 投与群では、薬剤投与後12日目には腫瘍の再増殖が認められ、ADM および IFO 投

与群に比し感受性は低いと思われた。その他の薬剤、とくに NCS、BLM、PCZ および ACNU 投与群では、腫瘍増殖抑制率は極めて低く、抗腫瘍効果はほとんど得られなかった。しかも、これら薬剤は LD₅₀の1/2量に増量しても抗腫瘍効果はほとんど認められず、EBC-1細胞に抗腫瘍効果はないと思われた。VCR、5-FU 投与群ではマウスの LD₅₀の1/4量を投与したにもかかわらず、すべてのハムスターが死亡し、ハムスターにおける LD₅₀がマウスのそれと異なるのではないかと思われた。しかし、この2薬剤はマウスの LD₅₀の1/16量投与群においても、薬剤の副作用による著明な体重減少が出現したにもかかわらず腫瘍増殖抑制効果は認められず、この両薬剤は EBC-1細胞に対しては抗腫瘍効果を有しないものと思われた。

肺扁平上皮癌を含む肺非小細胞癌の単剤による有効率は、これまで行われてきた臨床第2相試験を集計し、いくつか報告されているが、これらの報告にれば10%以上の有効率を示す薬剤としては、IFO、MMC、CDDP および ADM があげられている¹⁸⁾。今回の実験で有効と判定した CTX、MTX の有効率は、それらの報告では10%以下となっているが、その他の4薬剤は今回の成績と類似していた。したがって、今後の肺扁平上皮癌に対する薬剤としては、これら薬剤

のうち3～4薬剤を組み合わせた多剤併用療法が、良好な治療成績をあげられうるのではないかと期待される。今後の課題としては、今回用いたハムスター・ヒト肺扁平上皮癌移植系を用いて、前述の4薬剤についてその併用療法の抗腫瘍効果を検討する必要があると思われる。

結 論

各種制癌剤の肺扁平上皮癌に対する感受性を正確に知る目的で、ハムスター・ヒト肺扁平上皮癌移植系を用い、既存の12薬剤の感受性を検討した。その結果、ADM, IFO, CTX, MMC, MTX および CDDP の6薬剤が、ヒト肺扁平上

皮癌細胞株である EBC-1 細胞に対し、抗腫瘍効果を有することが判明した。したがって、これら薬剤のうち、3～4薬剤を組み合わせた多剤併用療法が肺扁平上皮癌の標準的治療法として期待できるのではないと思われる。

本論文を撰筆するにあたり、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を賜りました大熨泰亮助教授、平木俊吉先生に深謝致します。

なお本論文の要旨は第22回日本肺癌学会総会（昭和56年札幌市）において発表した。

文 献

- 1) 太田和雄, 杉浦孝彦, 池田淳夫: 肺癌化学療法の実際, 併用療法について, 肺癌の化学療法. ライフ・サイエンス社, 東京 (1986) pp. 144—171.
- 2) 木村郁郎, 大熨泰亮, 平木俊吉: 肺癌の化学療法, 内科 (1987) **59**, 439—159.
- 3) 藤原康弘, 西條長宏: 肺癌の治療, 非小細胞癌の化学療法. 臨床 (1988) **14**, 54—58.
- 4) 渡辺洋一: ヒト肺癌実験モデルの作製に関する研究, 第2編ヒト肺扁平上皮癌細胞株 (EBC-1) およびヒト肺腺癌細胞株 (ABC-1) の異種移植. 岡山医誌 (1985) **97**, 701—712.
- 5) 渡辺洋一: ヒト肺癌実験モデルの作製に関する研究, 第1編ヒト肺扁平上皮癌細胞株 (EBC-1) およびヒト肺腺癌細胞株 (ABC-1) の樹立とその性状. 岡山医誌 (1985) **97**, 691—700.
- 6) Levey RH and Medawar PB: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. Proc Natl Acad Sci USA (1966) **56**, 1130—1137.
- 7) Houchens DP, Ovejera AA and Barker AO: The therapy of human tumors in athymic (nude) mice in proceeding of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research. Houchens DP and Ovejera AA, Custav Fisher. New York, Stuttgart (1978) pp. 267—280.
- 8) Ovejera AA et al: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. Ann Clin Lab Sci (1978) **8**, p. 50.
- 9) Ovejera AA, Houchens DP and Barker AD: Sensitivity of a human tumor xenograft in nude (athymic) mice to various clinically-active drugs. Proc. 2nd Int. Workshop on Nude Mice. University of Tokyo (1977) pp. 451—460.
- 10) Kubota T, Shimosato Y and Nagai K: Experimental chemotherapy of the human stomach and colon serially transplanted in nude mice. Gunn (1978) **69**, 249—309.
- 11) 大沢伸昭, 上山義人: ヌードマウスに移植したヒト悪性腫瘍を用いる制癌剤感受性試験について. 医のあゆみ (1978) **96**, 278—287.
- 12) 下里幸雄, 他: ヌードマウスに移植したヒト癌を用いた治療実験 (予報). 医のあゆみ (1976) **96**, 296—299.
- 13) 藤田昌英, 田口鐵男: ヌードマウスを用いる制癌剤感受性テスト. 癌と化療 (1982) **9**, (4)605—615.
- 14) Phillips HJ and Terryberry JE: Counting actively metabolizing tissue cultured cells. Exp Cell Res (1957) **13**, 341—347.
- 15) Black MM and Speer FD: Effect of cancer chemotherapeutic agents on dehydrogenase activity of

- human cancer tissue in vitro. *Am J Clin Pathol* (1953) **23**, 218—227.
- 16) Bickis IJ et al : Biochemical studies of human tumors II, in vitro estimation of individual tumors sensitivity to anticancer agents. *Cancer* (1966) **19**, 103—113.
 - 17) Salmon SE, Humburger AW, Soehlen B, Durie GM, Alberts DS and Moon TE : Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* (1978) **298**, 1321—1327.
 - 18) 池上晴通：化学療法 — 新しい抗癌剤の効果を含めて。図説臨床「癌」シリーズ，6，肺癌メジカルビュー社，東京（1986）pp. 118—135.

Studies of the treatment of pulmonary epidermoid carcinoma
Part 1. Sensitivity to various anticancer drugs against human pulmonary
epidermoid carcinoma xenograft in the hamster

Takumi SETO

Second Department of Internal Medicine,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. I. Kimura)

Chemotherapy is the only therapeutic modality applicable to patients with advanced pulmonary epidermoid carcinoma (PEC). However, the results of chemotherapy to PEC remain unsatisfactory. It is very important to have an accurate knowledge of the sensitivity of anticancer drugs against PEC in order to establish a successful chemotherapy. The *in vivo* sensitivity of 12 anticancer drugs was investigated using PEC cell line (EBC-1) xenografts in hamsters.

In the present study, adriamycin, ifosphamide, mitomycin C, methotrexate and cis-dichlorodiammineplatinum (II) showed antitumor activity against EBC-1 cells, but the other 6 drugs (ACNU, bleomycin, 5-fluorouracil, neocarzinostatin, procarbazine and vincristine) have no antitumor activity against EBC-1 cells. These results suggest that combination chemotherapy with 3 or 4 drugs with antitumor activity in the present study may be effective to PEC.