

# 組織培養を用いた制癌剤の Screening に関する研究

## 第 2 編

### 人癌初代培養細胞にたいする各種制癌剤の作用 (Adverse effect について)

岡山大学医学部第一外科教室 (指導: 田中早苗教授)

須原 銀兵衛

[昭和46年10月18日受稿]

#### 緒 言

癌治療の外科的限界が痛感されるとともに、制癌剤に大きな期待が向けられ、新しい制癌剤の開発とあいまって、種々の投与法が考案されてきたが、現在はむしろ制癌剤投与法の反省期といえよう。

近年、近藤ら<sup>1-3)</sup>は、腫瘍に感受性が低く宿主に毒性作用の強い制癌剤を投与すると、宿主の抵抗力が減弱して、いわゆる host-tumor relationship に悪影響をおよぼし、腫瘍の増殖が促進されたり、転移が増加する現象を捉えて、adverse effect of cancer chemotherapy なる名称を付して発表している。第一編<sup>4)</sup>においては、培養株癌細胞を用いて、癌の特性である細胞の増殖分裂を指標とした in vitro の screening test の有用性についてのべたが、その中で、制癌剤はある一定濃度ではもちろん制癌性に作用するが、一定濃度以下に希釈された場合には腫瘍細胞の増殖を促進する危険性のあることを指摘した。そこで同じようなことが人癌の初代培養細胞にも認められるかどうか検討する必要がある。本論文では、技術的に初代培養の容易な癌性胸水あるいは癌性腹水を主材料とし、剔出乳癌に求め、人癌由来の細胞を初代培養して、これに種々の濃度の制癌剤を付加して培養した。宿主の抵抗力を全く考慮に入れる必要のない in vitro において、制癌剤自体が増殖促進性に作用する場合であることを明らかにしたので報告する。

#### II 実験材料および実験方法

##### 1. 人癌由来初代培養細胞

a. 浮遊腫瘍細胞よりの初代培養細胞: 62才女性の乳癌末期患者の癌性胸水よりえた初代培養細胞と

71才男性の末期胃癌患者の癌性腹水よりえた初代培養細胞を用いる。それぞれ以下、胸水初代培養細胞、腹水初代培養細胞と仮称する。

b. 固型腫瘍細胞よりの初代培養細胞: 50才女性の乳癌患者の根治手術時にえた剔出腫瘍 (duct adenocarcinom) よりの初代培養細胞を用いる。

2. 培養液: Keflin 100 r / ml 含有の 20% 牛血清加 LE medium で培養する。

3. 制癌剤: Chromomycin-A3 (武田製薬), Mitomycin C (協和醗酵), Cobalt protoporphyrin (日本ブラッドバンク) を用いる。以下、それぞれを Chr. A3, MMC, Copp と略記する。牛血清加 LE medium で希釈し、Chr. A3 単独使用では、 $10^{-1}\gamma$ ,  $10^{-2}\gamma$ ,  $10^{-3}\gamma$ ,  $10^{-4}\gamma$ ,  $10^{-5}\gamma$ ,  $10^{-6}\gamma$  / ml であり、MMC 単独では  $1\gamma$ ,  $10^{-1}\gamma$ ,  $10^{-2}\gamma$ ,  $10^{-3}\gamma$  / ml の範囲を用い、Copp では  $10\gamma$ ,  $10^{-1}\gamma$ ,  $10^{-2}\gamma$  / ml を用いる。2者併用では、MMC+Copp の場合は、それぞれ  $10^{-1}\gamma$  / ml と  $1\gamma$  / ml であり、MMC+Chr. A3 では  $10^{-1}\gamma$  / ml と  $10^{-1}\gamma$  / ml である。

4. 培養方法: 浮遊腫瘍細胞では、採取胸、腹水細胞を Hanks 氏液で洗滌後、その 1 部に 0.5% trypan blue を加えて超生体染色し 90~98% 生存細胞であることを確認し、牛血清加 LE medium で  $10 \times 10^4$  / ml に調整し、短試験管に 1.5 ml づつ分注して、37°C で静置培養する。制癌剤付加当日に at random に数本を取り出し、上澄を捨てて、1.5 ml づつの Crystal violet 液を加え、37°C, 30分間加温、管壁より細胞を静かに剝離し、Bürker-Türk 血球計算盤で、各短試験管ごとに 6 回以上細胞数を算定して、平均をとり、3 本以上の短試験管の平均値をとって、腫瘍細胞数とする。核の大きいものを腫瘍細胞とみ

なす。別出固型乳癌腫瘍の場合には、経約3cmの腫瘍を無菌的に取り出し、penicillin 加 Hanks 液で充分洗滌する。腫瘍に割を入れて中心部の壊死部分を取り除き、できるだけ小さく細切する。ついで第1編<sup>1)</sup>にてのべた Mandden-Burk 法に準じて、牛血清加 LE Medium にて $100 \times 10^4$ /mlの腫瘍生細胞浮遊液をつくる。1.5 ml づつを短試験管に分注し、48時間静置培養を行い、上述のごとく crystal violet を加えて生着腫瘍細胞数を算定し、分注が均等であったことを確認しておく。

5. 制癌剤投与時の効果判定：初代培養細胞が均一に分注されていることを確認後、上澄と制癌剤含有培養液を置換し、37℃で静置培養する。制癌剤の持続付加培養群では、48、96、144時間目に、その都度3-4本づつの試験管を採り出して上澄を捨て、前述のごとくCrystal violet 液を加えて腫瘍細胞の核数計算を行い、制癌剤非付加群を対照として、効果判定をする。

制癌剤の一定時間付加培養液では、初めの48時間は制癌剤を加えて培養し、再び上清を捨てて、制癌剤を含有しない培養液に置き換えてさらに培養を続け、96時間、144時間で効果を判定する。

### III 実験成績

1. 各種濃度の制癌剤単独持続付加培養群：
  - a. MMC  $1 \gamma, 10^{-1} \gamma, 10^{-2} \gamma$ /ml 持続付加培養群：図1のごとく、対照に比し、MMC 付加群では、

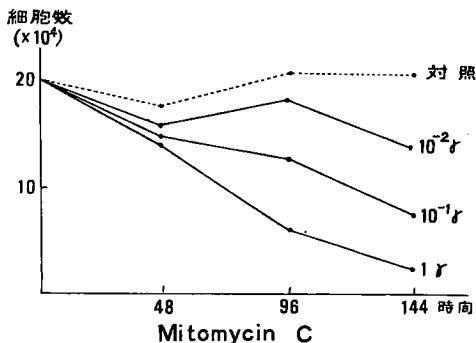


図1. 癌性胸水初代培養細胞 (ヒト乳癌)

培養96時間目頃より著明になる胸水初代培養細胞の増殖抑制がみられ、しかも dose response がみられた。1  $\gamma, 10^{-1} \gamma$  の高濃度では、形態学的にも細胞質の膨化、核崩壊、核濃縮がみられ、対照群では、上皮性由来の癌細胞様の細胞がきれいな monolayer をなして管壁に付着している。

- b. Chr. A,  $10^{-1} \gamma, 10^{-2} \gamma, 10^{-3} \gamma$ /ml 持続付加培

養群：図2のごとく、 $10^{-1} \gamma, 10^{-2} \gamma$ /ml では48時間頃

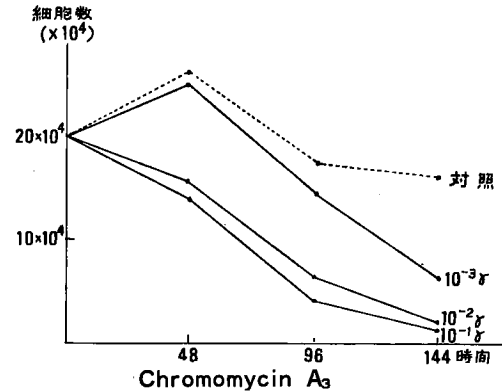


図2. 癌性胸水初代培養細胞 (ヒト乳癌) より著明になる増殖抑制効果がみられ、144時間目では殆んど生着細胞をみない。 $10^{-3} \gamma$ /ml 付加では96時間ではじめて増殖抑制効果がみられている。

- c. Copp  $10 \gamma, 10^{-1} \gamma, 10^{-2} \gamma$ /ml 持続付加培養群：図3のごとく、いずれの濃度付加でも制癌効果は

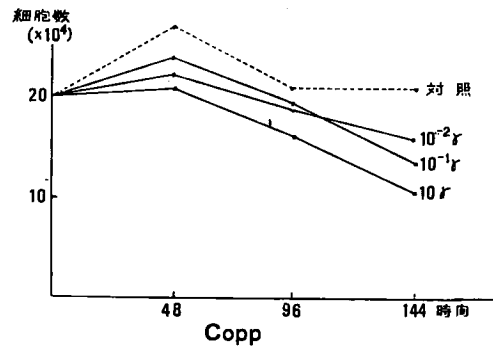


図3. 癌性胸水初代培養細胞 (ヒト乳癌)

殆んどえられていない。

2. 制癌剤2者併用持続付加培養群：

a. MMC  $10^{-1} \gamma$  + Copp  $1 \gamma$  併用群：MMC  $10^{-1} \gamma$ /ml 単独付加群に比して、Copp  $1 \gamma$  を併用しても胸水初代培養細胞の増殖抑制効果には増強がみられず、MMC と Copp の間には相乗効果はえられていない

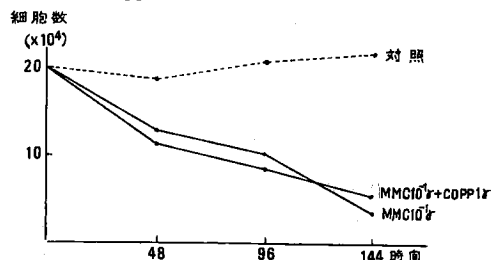


図4. MMC + COPP (相乗効果テスト)

b. MMC  $10^{-1} \gamma$  + Chr. A<sub>3</sub>  $10^{-1} \gamma$  併用群: MMC と Chr. A<sub>3</sub> の併用の場合には相乗効果がみられ, 48 時間目より著明なる増殖抑制が認められる (図 5).

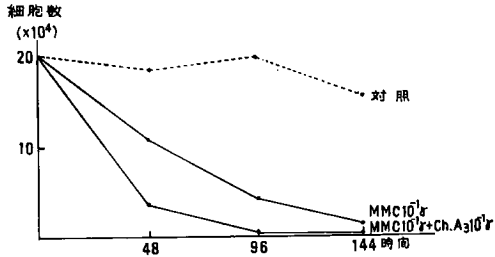


図 5. MMC + Chromomycin A<sub>3</sub> (相乗効果テスト)

3. 低濃度の Chr. A<sub>3</sub>  $10^{-2} \gamma$ ,  $10^{-4} \gamma$ /ml 48 時間処理後 96 時間培養群:  $10^{-2} \gamma$ /ml 48 時間処理後培養群では, Chr. A<sub>3</sub> 除去後 96 時間目では持続処理群に比較してはもちろん, 非付加対照群に比しても相対的に, より高い増殖率をしめしている (図 6). この傾向は

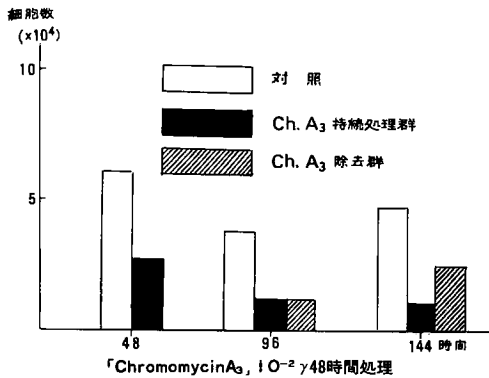


図 6. 癌性腹水初代培養細胞 (ヒト胃癌)

$10^{-4} \gamma$ /ml 処理群でさらに鮮明となり, adverse effect ともいえる増殖促進効果が著明に認められる (図 7)  $10^{-4} \gamma$ /ml 付加では, 持続付加の場合も一

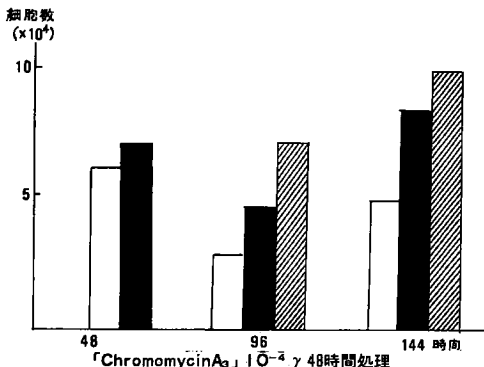


図 7. 癌性腹水初代培養細胞 (ヒト胃癌)

定期間付加の場合も, いずれにも増殖促進効果がえ

られている。

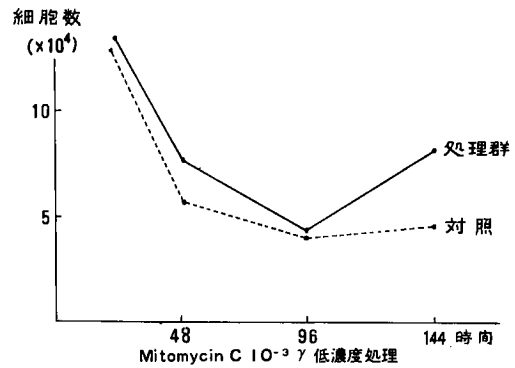


図 8. 癌性腹水初代培養細胞 (ヒト胃癌)

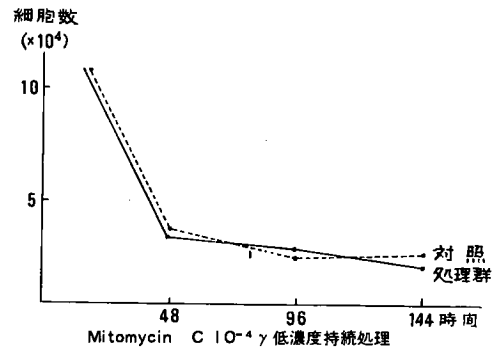


図 9. 癌性腹水初代培養細胞 (ヒト胃癌)

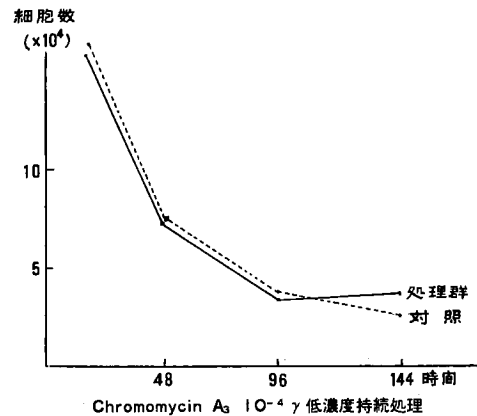


図 10. 癌性腹水初代培養細胞 (ヒト胃癌)

4. 低濃度制癌剤の持続付加培養群

a. MMC  $10^{-3} \gamma$ ,  $10^{-4} \gamma$ /ml 持続付加培養群: MMC 付加培養開始 144 時間目より, 腹水初代培養細胞の著明なる増殖促進がみられる (図 8). しかし,  $10^{-4} \gamma$ /ml と低濃度になると増殖促進作用はみられなくなる (図 9)

b. Chr. A<sub>3</sub>, 10<sup>-3</sup>γ, 10<sup>-4</sup>γ, 10<sup>-6</sup>γ/ml 持続付加培養群

図7のごとく、腹水初代培養細胞に10<sup>-4</sup>γ/ml 付加した場合には著明なる増殖促進効果がえられるが、腹水初代培養細胞の場合には144時間目にわずかに促進の傾向がえられたにすぎない(図10). 10<sup>-6</sup>γ/ml 付加では促進効果はえられない(図11). 乳癌初代培養細胞に10<sup>-3</sup>γ/ml 作用させると多少の増殖抑制効果がみられるが、10<sup>-4</sup>γ/ml 作用させると逆に増殖効果がみられる(図12)

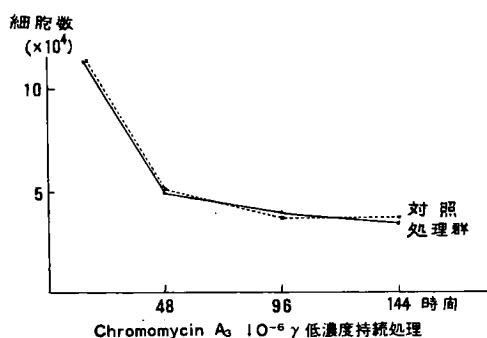


図11. Solid Tumor よりのfree cell培養細胞 (ヒト乳癌)

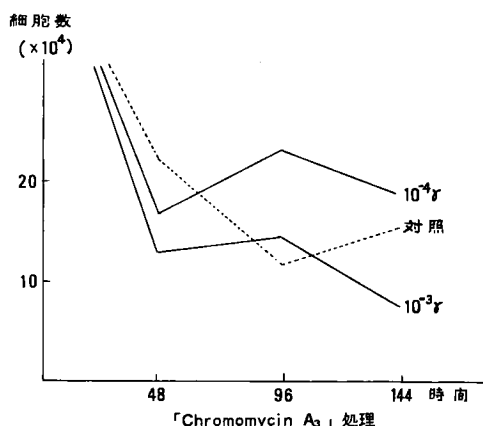


図12 Solid Tumor よりのfree cell培養細胞(ヒト乳癌)

#### IV. 考 案

癌に対する宿主の抵抗性とは何か。In vitro の adverse effect は宿主の何が傷害されておこってくるのかむずかしい問題である。すでに折田<sup>5, 6)</sup> は血清 properdin 値を宿主の有する非特異的抗腫瘍性因子として用い、有効なる制癌剤の投与では腫瘍の発育を抑え、血清 properdin 値の低下が抑えら

れるが、無効な制癌剤の投与では腫瘍の発育がむしろ促進され、血清 properdin 値もより急速に低下することを動物移植癌や人癌で明らかにしている。三宅<sup>7)</sup> は血清 properdin 値を上昇せしめる操作をしておく、宿主の抗腫瘍性がたかまることをしめしている。その他、藤浪<sup>8)</sup> の血清の喰菌作用物質価、沢田ら<sup>9)</sup> の congo red 価などが個体の抵抗性の尺度として用いられている。また手術創に再発、転移が好発することにより局所的抗腫瘍性因子も考えられているがこれらは、いずれも非特異的全身性、あるいは局所性の抵抗因子である。最近になり癌にたいする特異的抵抗力、すなわち、癌免疫が人癌においても成立するであろうことが各方面より明らかにされている。癌細胞のわずかな質的差異を宿主の免疫産生系が not-self と認め、リンパ系細胞を介して腫瘍細胞に抗増殖性に作用するものと考えられる。In vitro で担癌生体のリンパ球が直接対応の腫瘍細胞に群集接着し、これを破壊ないしは増殖を抑えることをみいだした田中一門の多数の仕事がある。<sup>10-13)</sup> 換言すれば、担癌生体に同種移植免疫あるいは自己免疫のような機作があることをしめしたものである。

すでに同種移植の領域で、宿主の免疫系を抑えて移植片の生着をはかるために免疫抑制剤が常用されて輝しい成果をあげていることはよく知られているが、いずれの制癌剤にも白血球減少を惹起せしめる免疫抑制剤の一面があることは重要視しなくてはならない。弱いながらも担癌生体の有するリンパ系を主軸とした特異免疫系を制癌剤が抑え、その結果腫瘍の増殖を促進し adverse effect なる現象があらわれるものと思われる。近藤<sup>3)</sup> らによると Nitro-min, Nitrogen mustard, Actinomycin D, Endoxan など癌患者に投与し、いずれの場合も約1割に adverse effect を認めている。制癌剤の作用を腫瘍自体に作用するものと、宿主に作用するもの(副作用)とに分離するため、吉田肉腫移植前に Nitromin, Azan, Carzinophyllin を宿主ラットに投与すると、いずれの投与の場合も、非投与対照群の2倍以上に腫瘍の転移が高く、移植局所の皮下腫瘍の平均重量も1.5倍前後と増殖が促進されている。Mitomycin C の前投与では、adverse effect がえられていない。しかし Mitomycin C を前投与して、同種移植片の生着を延長せしめることもしられ、その白血球減少作用からみても、Mitomycin C に免疫抑制作用の強いことは明らかである。Chromomycin A<sub>3</sub> や

Cobalt protoporphyrin についてもその程度は軽いにしても同様といえよう。

従来の adverse effect は宿主の抵抗因子と癌の増殖力との相関の場で専ら解析がすすめられ、癌細胞自体への制癌剤の直接作用の見地から adverse effect をみたものは極めて少い。腫瘍細胞自体にたいする adverse effect の機作は全く不明である。

Mitomycin C は細菌レベルで蛋白合成や RNA 合成に影響せず、DNA 合成を阻止することが認められ<sup>14, 15)</sup> deoxyribonucleotide 磷酸化反応あるいは DNA への重合化段階を阻害するとされている。化学構造からみると一種のアルキル化剤とも考えられ、DNA と covalent linkage をおこすこともしられ<sup>16)</sup> Mitomycin C が Nitrogen mustard と同様に DNA に cross-linkage を招来し、そのために DNA の複製のとき、primer としての働きを阻害するのだと推論されよう<sup>17)</sup>。

Chromomycin A<sub>3</sub> は DNA 阻害よりも RNA を選択的に阻害し、ことに RNA の合成を阻害することが知られている。In vivo の少量投与では宿主の代謝機能あるいは生体防禦機構をたかめるといわれており、臨床投与しても白血球減少の少いことが一つの特徴としてあげられている。Copp (Cobalt protoporphyrin) は腫瘍細胞との親和性が大きく、<sup>18)</sup>特に癌細胞の不溶性リポ蛋白のリピド部分に親和性が強く、細胞膜の透過性をかえることにより腫瘍細胞を破壊するものとされている。他方 Copp の投与は宿主の網内系機能を亢進し、肝カタラーゼ活性低下を抑制し、<sup>19)</sup>癌抵抗性を増強せしめることが知られている。<sup>20)</sup>

3様の機作をもつこれらいずれの制癌剤においても、高濃度処理において Mitomycin C, Chromomycin A<sub>3</sub> は極めて良く人癌由来初代培養細胞の増殖を抑制し、これにややおとるが Copp にも増殖阻止作用がみられるが、これは従来の細菌レベルや腫瘍細胞を使つての作用機作から十分に説明のつくところである。Chromomycin A<sub>3</sub> 10<sup>-3</sup> γ/ml 48時間処理後、培養液を替えて Chromomycin A<sub>3</sub> を除去してさらに96時間培養してやると、144時間の持続処理に比してわずかに増殖力が回復してくる。この差が単なる Chromomycin A<sub>3</sub> の作用時間の長さによるものであるかどうか詳しくみるために、Chromomycin A<sub>3</sub> 10<sup>-4</sup> γ/ml の低濃度で癌性腹水初代培養細胞に作用せしめると、144時間持続して作用せしめても、48時間で除去してさらに96時間培養しても、いずれでも非

付加対照群に比して、著明なる細胞の増殖がみられる。作用時間もさることながら、付加濃度が重要な因子であることをしめしているものといえよう。同様のことは Mitomycin C を 10<sup>-3</sup> γ/ml 144時間持続作用せしめてもみられるところで、単なる制癌剤の刺激とは考えにくい。一時的刺激が薬剤除去後さらに96時間も持続するとは考えがたいからである。上述の制癌作用に関する知見以外の何らかの細胞自体に対する低濃度における作用機作を別の角度から検討する必要がある。

In vitro の組織培養での腫瘍細胞増殖は、用いる細胞が株細胞であれ(第一編)、癌性腹水、癌性胸水、あるいは乳癌よりの初代培養細胞であれ、いずれを問わず Mitomycin C, Chromomycin A<sub>3</sub> 10<sup>-3</sup> γ/ml 濃度の付加で抑制され、10<sup>-4</sup> γ/ml の付加で、ある細胞には強い adverse effect がおこり、ある細胞には増殖抑制作用も adverse effect も及ぼさないという結果がえられる。

In vitro の成績を in vivo にそのまま置き換えるのは危険であるが、制癌剤投与時の濃度の重要性を支持するものである。

したがって、これら制癌剤を臨床上に用いるには、腫瘍組織内濃度が 10<sup>-3</sup> γ/ml 以上になるように絶対に 10<sup>-4</sup> γ/ml 前後あるいはこれ以下の低濃度にはならぬような方法で使用すべきである。かかる critical point ともいべき有効濃度と逆の adverse effect をきたす濃度の分岐点がそれぞれの制癌剤にあるわけであろうが、in vivo に投与するさいには多くの因子が介入してくる。Martin ら<sup>21)</sup> によっても指摘されているがごとく、screening test で合格した薬剤を用いても、in vitro と in vivo の成績が必ずしも一致しないことは、体内に分布する全腫瘍細胞数や宿主の defense mechanism や腫瘍発生臓器の種類などが大きな要因となっている。大きな原発腫瘍の増殖を抑えるほど制癌剤の力や宿主の defense mechanism が大きいとは思われないが、手術後おこり易い少数細胞による局所の再発や血行性あるいはリンパ行性の転移防止には大いに力があると思われる。この少数細胞が制癌剤や宿主の腫瘍免疫をも含めた defense mechanism で制禦されるかどうかは、腫瘍細胞に感受性が高く、リンパ系を含めた正常組織に可及的感受性の低い制癌剤を screening して、いかなる有効な投与形式で投与するかにかかってくる。4-6週間の間隔での宿主の耐えうる限りの間歇的大量投与が少量持続投与よりも

すぐれているという報告が<sup>22,23)</sup>最近あいついでいるが、間歇的大量投与の方が、adverse effect を惹起する危険性が少ない点でも有利であるといえよう。制癌剤の血中より腫瘍組織内への移行濃度がいまだ十分に研究されていないが、血中濃度に比し極めて低濃度しか腫瘍組織に移行しないものと思われる。藤田、木村<sup>24)</sup>によると、Mitomycin C をマウスに1回静注し各臓器内の分布をみているが、血中濃度の数分の一から $\frac{1}{100}$ 位の濃度が組織に移行し、臓器別に大なる差があることをしめしている。転移性肝癌患者に、開腹時、肝動脈より30mgの Mitomycin C を注入し10分後に肝組織および癌組織を剔出して Mitomycin C を測定した結果では、肝組織には Mitomycin C は検出されなかったが、癌組織では0.015  $\gamma/g$  が検出され、肺癌患者に10mgの Mitomycin C を気管支動脈内に注入して、投与30分後にみると肺では0.18  $\gamma$ 、癌組織では0.033  $\gamma/g$  の濃度が測定されている。これらとて、腫瘍組織内の血管や血清成分が十分に除去されているとはいえないから、腫瘍細胞内の濃度はさらに低くなるものと考えられる。

以上より、癌患者の体力が充分あって手術により腫瘍の主病巣の剔除がおこなわれた直後に剔出腫瘍を用いて *in vitro* で迅速に screening して決定した感受性の高い制癌剤を、患者の耐えうる限りの大量に投与すれば、*in vitro* の screening の結果が *in vivo* の制癌効果を正しく反映してくるものと思われる。少くとも、宿主の腫瘍抵抗性を傷害したり、腫瘍細胞自体に作用して増殖促進をきたすような制癌剤の投与量、投与法は厳に避けるべきであることを強調したい。

#### 結 語

癌患者の癌性胸水、癌性腹水、および剔出乳癌組織より初代培養細胞を採り、これらに Mitomycin C (MMC), Chromomycin A<sub>3</sub> (Chr. A<sub>3</sub>) Cobalt

protoporphyrin (Copp.) を単独、あるいは併用付加して組織培養し、核数計算により初代培養細胞の増殖態度を検討した。

1. 制癌剤単独持続付加培養：MMC, Chr. A<sub>3</sub> いずれも  $10^{-1}$ ,  $10^{-2} \gamma/ml$  の付加で、いずれの初代培養細胞にも著明なる増殖抑制ないしは細胞破壊がみられる。Copp の付加では10  $\gamma$ ,  $10^{-1} \gamma$ ,  $10^{-2} \gamma/ml$  いずれにも抑制効果はえられない。

2. 制癌剤2者併用持続付加培養：MMC  $10^{-1} \gamma/ml$  に Copp 1  $\gamma/ml$  を併用しても、培養細胞に対する相乗的抑制効果はえられない。Chr. A<sub>3</sub>  $10^{-1} \gamma/ml$  を併用すると相乗効果がみられ、著明なる増殖抑制がえられる。

3. 低濃度 Chr. A<sub>3</sub> で48時間処理後96時間培養：Chr. A<sub>3</sub>,  $10^{-3} \gamma$ ,  $10^{-4} \gamma/ml$  を付加して48時間培養後 Chr. A<sub>3</sub> を除去して更に96時間培養すると著明なる adverse effect がえられ、初代培養細胞の増殖促進がみられる。

4. 低濃度制癌剤持続付加培養：MMC  $10^{-3} \gamma/ml$  では著明なる adverse effect がえられるが、更に低濃度の  $10^{-4} \gamma/ml$  となると adverse effect はみられなくなる。Chr. A<sub>3</sub> の付加の場合も同様で、 $10^{-4} \gamma/ml$  で著しい初代培養細胞の増殖促進作用がえられるが、 $10^{-5} \gamma/ml$  となると、僅かな促進作用がみられるにすぎない。

以上より、ある低濃度での制癌剤付加は、癌細胞自体に作用して、増殖促進効果 (adverse effect) をもたらす場合がある。宿主の抵抗力と腫瘍増殖力との相関の場で論ぜられてきた制癌剤投与時の従来の adverse effect に新しい角度からの検討を必要とし、*in vivo* での制癌剤の投与法の選択に慎重であることを示唆するものといえよう。

稿を終るにあたり御指導をうけた田中早苗教授、折田薫三講師に厚く御礼申上げる。

#### 文 献

- 1) Kondo, T & Moore, G. E. : The limitations and adverse effects of cancer chemotherapy  
Surgical Forum. 9: 607, 1959
- 2) Kondo, T & Ichihashi, H: Induction of metastases by treatment with carcinostatic agent
- II. Depression of host resistance and antibody production.  
Gann 55 : 403, 1964
- 3) 近藤達平, 市橋秀仁, 山田久義, 桃井能正, 志津有一: 制癌剤の adverse effect の発生機転, 癌の臨床 9 : 241, 1963
- 4) 須原銀兵衛: 組織培養を用いた制癌の Scree-

- ning に関する研究
- 1) 腫瘍株細胞および腫瘍初代培養細胞における Screening  
岡山医学会誌, 投稿中
  - 5) Orita, K.: Studies on the serum properdin levels of tumor bearing animals and patients with malignant tumors.  
*Acta Med. Okayama* **15**: 39, 1960
  - 6) Orita, K. Influence of anticancer agents on the serum properdin level.  
*Acta Med. Okayama*, **15**: 59, 1960
  - 7) 三宅一忠: 血清 properdin 上昇作用を有する薬剤の担癌生体におよぼす影響に関する実験的研究.  
岡山医学会誌, **77**: 1201, 1965
  - 8) 藤浪修一, 盛田英明: 腫瘍の発育と全身免疫力, **48**: 340, 1957
  - 9) 沢田平十郎, 杉田幸男, 井崎昭, 石川育夫: 癌転移に関する研究 (第2報)  
日外会誌, **59**: 16, 1959
  - 10) Hara, S.: A quantitative study on antitumor activity of cellular antibody in vitro.  
*Acta Med. Okayama*, **19**: 91, 1965
  - 11) Sato, K.: Inhibitory effect of lymph-node cells from the tumor bearing isologous C<sub>3</sub>H mouse on the proliferation of the tumor cells.  
*Acta Med. Okayama*, **20**: 261, 1966
  - 12) 田中早苗, 折田薫三: 癌局所リンパ節細胞の抗腫瘍について  
日本臨床, **24** (秋秀特別号): 122, 1966
  - 13) 折田薫三: 細胞性抗体と癌免疫  
臨床科学, **3**: 931, 1967
  - 14) Shiba, S. Terawaki, A. Taguchi, T. & Kawamata, J.: Selective inhibition of formation of deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli* by Mitomycin C, *Nature*, **183**: 1056, 1959
  - 15) Sekiguchi, M. & Takagi, Y: Effect of mitomycin C on the synthesis of bacterial and viral deoxyribonucleic acid.  
*Biochem. biophys. Acta*, **41**: 434, 1960
  - 16) Lyer, V. N & Szybalski, W: A molecular mechanism of mitomycin action. Linking of complementary DNA strands.  
*Proc. Nat. Acad. Sci.*, **50**: 355, 1963
  - 17) Sartorelli, A. C. & Booth, B. A.: The synergistic antineoplastic activity of combinations of mitomycin with either 6-Thioguanine or 5-Fluorouracil.  
*Cancer Res.*, **25**: 1393, 1965
  - 18) 倉田自章ら: プロトポールフィリンコバルト錯塩の作用機序に関する研究  
*chemotherapy*, **11**: 349, 1963
  - 19) 渡辺良三ら: プロトポールフィリンコバルト錯塩の担癌宿主に対する作用  
*Chemotherapy*, **11**: 354, 1963
  - 20) 竹内美恵子, 山本正: 生体の抵抗性増強に関連して制癌剤の検定法について  
*J. Antibiotics, Ser. B*, **16**: 1, 1963
  - 21) Martin, D. S., Fugmann, R. A. & Hayworth, P.: Surgery, cancer chemotherapy, host defenses and tumor size  
*J. Nat. Cancer Inst.*, **29**: 817, 1962
  - 22) Holland, J. F.: Chemotherapy and chemoprevention of cancer, 1961.  
*Cancer Res.*, **21**: 1086, 1961
  - 23) Druckrey, H., Steinhoff, D., Nakayama, M., Pressmann, R. & Anger, K.: Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebs-Chemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan.  
*Dtsch. Med. Wschr.*, **88**: 651, 1963
  - 24) 藤田浩, 木村禧代二: Mitomycin C の血中組織内濃度: 癌化学療法 (石川七郎他) 医歯薬出版, 東京P. 80. 1966

## Screening of Antitumor Agents by Tissue Cultures

## 2. Adverse effect of various antitumor agents on the primary cultured cells

Ginnochoe Suhara

Department of Surgery Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director: Prof. Sanae Tanaka)

## ABSTRACT

Using the primary cultured cells of cancerous thoracic fluid, cancerous ascites and mammary cancer tissue obtained from cancer patients at operation, these cells were cultured in the presence of antitumor agents such as Mitomycin (MMC), Chromomycin (Chr. A<sub>2</sub>) and Cobalt protoporphyrin (Copp) either singly or in combination, and the proliferation of the primary cultured cells was observed. The results of the study are briefly summarized as follows.

1. Cultures in the presence of a single antitumor agent: On addition of MMC or Chr. A<sub>2</sub> in the concentration of  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml and  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml respectively shows a marked inhibitory effect or destructive effect on the proliferation of the primary cultured cells. Copp, on the other hand, does not show any inhibitory effect at the concentration of 10  $\gamma$ /ml,  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml, or  $10^{-2}$   $\gamma$ /ml.

2. Cultures in the presence of two antitumor agents: When  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml of MMC and 1  $\gamma$ /ml Copp are added, there can be observed no cumulative inhibitory effect. In the presence of  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml Chr. A<sub>2</sub> together with  $10^{-1}$   $\gamma$ /ml MMC there can be seen a cumulative effect resulting in a marked inhibition of the proliferation.

3. After treating the primary cultured cells with Chr. A<sub>2</sub> at a low concentration for 48 hours, then cultured for 96 hrs: When the primary cultured cells are cultured in the presence of Chr. A<sub>2</sub> at the concentration of  $10^{-2}$   $\gamma$ , or  $10^{-4}$   $\gamma$ /ml for 48 hours, and after removing Chr. A<sub>2</sub> by washing, when the cells are further cultured for 96 hours, there can be observed an adverse effect; namely, the growth of the primary cultured cells is accelerated.

4. Cultures with continuous addition of antitumor agent at a low concentration: In the presence of  $10^{-2}$   $\gamma$ /ml MMC there can be observed a marked adverse effect, but on further addition of  $10^{-4}$   $\gamma$ /ml MMC adverse effect can not longer be seen. On the addition of Chr. A<sub>2</sub> at the concentration of  $10^{-4}$   $\gamma$ /ml, similarly a marked acceleration of the growth can be seen, but at a lower concentration of  $10^{-6}$   $\gamma$ /ml there can be observed only a slight accelerative effect.

These results indicate that the addition of antitumor agent at a certain low concentration, acting on the cancer cells themselves may bring about an accelerative effect (adverse effect). Therefore, it is desirable to consider the adverse effect so far thought to be induced by the unbalance between the cumulative effect of the resistance of host and tumor proliferative capacity, from a new angle. Hence, on administering antitumor agent in vivo we should do it with utmost precaution.

Acknowledgement: The author wishes to express profound thanks to Prof. Sanae Tanaka and Dr. Kunzo Orita for kind guidance throughout this work.

---