

ヒト多発性骨髄腫コロニー形成能と 薬剤感受性試験への応用

川崎医科大学 検査診断
(指導: 上田 智教授)

井 上 信 正

(昭和58年2月28日受付)

A Human Myeloma Cell Colony Assay for the Drug Sensitivity Test

Nobumasa Inoue

Department of Clinical Pathology
Kawasaki Medical School

(Accepted on February 28, 1983)

ヒト骨髄腫細胞のコロニー形成能を11名の多発性骨髄腫患者の骨髄細胞で検討し、更に活動性病変を有する5名についてコロニー形成法を用いて薬剤感受性試験を行った。

未治療および増悪症例の骨髄細胞から多数のコロニーが形成され、寛解例では少数のコロニーが形成されるか、またはコロニーが形成されなかった。コロニーは **single cell** 由来で、コロニー形成に **conditioned medium** を要し、コロニー構成細胞は細胞内免疫グロブリンを有することから骨髄腫由来と考えられた。

薬剤感受性テストの結果は、5例中4例においてメルファラン、アドリアマイシンに高い感受性のあることが示され、ACNUに対する感受性は5例全例に認められなかった。臨床効果との比較は、2例で行われ、有意の相関が有ると考えられた。

以上より **in vitro** コロニー形成法は、骨髄腫細胞の薬剤感受性試験を施行する際、有用な方法と考えられる。

A simplified assay method of colony formation of B cells was developed for measurement of *in vitro* sensitivity of the cells to anticancer drugs in order to predict clinical response to the drugs in patients with multiple myeloma. The colony formation depended on the medium conditioned by mononucleated cells in the presence of phytohemagglutinin (PHA-MNC CM). A linear relationship was obtained between the number of nucleated bone marrow cells plated and the number of colonies formed after 7 days in culture. The plot could be back-extrapolated through zero, suggesting that each colony originated from a single cell. Cells in individual colonies appeared to be lymphocytes or mature plasma cells from the finding of morphology of the cells stained with Wright-Giemsa and of the production of the same type of immunoglobulin in cultured cells as that in patient's serum. Myeloma cells colonies cultured from four of five patients were sensitive to both melphalan and adriamycin, but resistant to ACNU.

Two of the four patients showed a good therapeutic response to melphalan. These result indicated that the present colony assay method proved to be useful for the prediction of effectiveness of anticancer drugs in patients with myeloma.

Key Words ① Multiple Myeloma ② Myeloma colony ③ Drug sensitivity test

緒 言

悪性腫瘍の患者より腫瘍細胞を取り出し、in vitro のコロニー形成法により薬剤感受性を調べようとする試みは、以前より行われている。多発性骨髄腫（骨髄腫）についても同様の試みが行われているが、手技が煩雑な上、コロニー形成能も悪く、いまだ一般化されるに至っていない。私達も骨髄腫の治療法の改善のため、数年前より従来の方法に多少の改変をほどこし、骨髄腫細胞のコロニー形成能と薬剤の感受性について検討してきた。今回、十分実用に供し得ると考えられる薬剤感受性実験法を確立することができたので、その詳細を報告する。

対象と方法

1) 患者および試料の採取

患者は当院および関連病院で骨髄腫と診断された11例である (Table 1)。

患者より heparinized syringe で採取した骨髄穿刺液に α -MEM (Flow Laboratory) を加え、Ficoll Hypaque に重層し、遠心して単

核細胞を分離¹⁾し、2回洗浄後、viability を確認し、骨髄細胞浮遊液として使用した。なお、加療中の患者については治療による薬剤の影響を考慮し、治療終了6週後の骨髄細胞について検討した。

2) conditioned medium の作製

正常者よりヘパリン加採血した静脈血から、Ficoll Hypaque 比重遠心法¹⁾で単核細胞を採取し、1%の PHA-P(Difco) と10%の牛胎児血清 (FCS, Gibco) とを含む RPMI 1640(Flow Laboratory) に、 1×10^6 個/ml の割合で浮遊させ、37°C、5% CO₂ フラン器で3日間培養した。培養後、遠心して集めた上清を濾過滅菌 (Millipore) し、conditioned medium (PHA-MNC CM) として使用した。

3) 骨髄細胞に対する薬剤処理

薬剤処理は Salmon ら^{2), 3)} の方法に準じ、採取した骨髄細胞をメルファラン (Sigma, 0.025~1.25 μ g/ml), アドリアマイシン (協和醸酵, 0.025~0.1 μ g/ml), ACNU (三共, 0.01~1 μ g/ml) と共に 37°C、1時間孵置し、 α -MEM で2回洗浄後、播込み細胞として使用した。

Table 1. Clinical materials and colonies formation

Patient	Myeloma typing	Clinical status	Treatment	No. of Colonies per 2×10^5 cells	Plating efficiency (%)
1 S. M.	IgG·K	remission	{CPPO**	5.7±0.58	0.0028
2 H. S.	IgG·K	remission	{MPPO***	3.3±2.52	0.0017
3 J. M.	IgG·K	remission	none	5±1.73	0.0025
4 I. I.	BJP-K*	remission	CPPO	0	0
5 T. N.	IgA·K	remission	MPPO	0	0
6 H. N.	IgG· λ	replapse	MPPO	138±8.5	0.072
7 S. O.	IgD· λ	new case	CPPO	140±3.0	0.007
8 H. M.	IgD· λ	new case	MPPO	172.3±22.5	0.086
9 K. M.	IgG· λ	new case	MPPO	29.5±4.9	0.017
10 R. U.	IgG·K	new case	MPPO	23±0	0.012
11 Y. K.	IgA· λ	new case	CPPO	21.3±4.62	0.011

* Bence Jones protein type

** Cyclophosphamide, Procarbazine, Prednisolone and Vincristine

*** Melphalan, Procarbazine, Prednisolone and Vincristine

4) 培 養

PHA-MNC CM 20%, FCS 15%, メチルセルロース 0.8% を加えた α -MEM 培養液中に、最終的に骨髄細胞が $2\sim 5 \times 10^5$ 個/ml となるように、35 mm プラスチックシャーレ (Falcon) に triplicate として播込んだ。37°C, 5% CO₂ のフラン器で7日間培養後、倒立位相差顕微鏡でコロニーを観察した。

5) コロニー構成細胞の検討と薬剤感受性の判定

コロニーの観察は、倒立位相差顕微鏡で行い、7日目に20個以上の細胞をもつ集塊をコロニーとして数えた。

個々のコロニーは、7~10日目にパスツールピペットでとり、浮遊細胞収集器(富永)にて塗抹標本を作製し、Wright-Giemsa 染色、peroxidase 染色⁴⁾ を行った。細胞内免疫グロブリン(cIg)は、蛍光抗体直接法でみた。

薬剤感受性の判定は、薬剤で処理した細胞と同時に薬剤非処理細胞を同様条件で培養し、(薬剤処理した場合のコロニー数)/(薬剤非処理の場合のコロニー数) $\times 100$ (%)として生存率を求めて行った。

結 果

1) コロニー形成能とコロニー構成細胞の性状の検討

骨髄細胞は、培養約48時間で4~8個の細胞よりなるクラスターを形成し、4, 5日目頃よりコロニーとなり、7日目で最大となって、10日目以降は徐々に融合、死滅する傾向を示した。

倒立位相差顕微鏡下で観察すると、コロニーは比較的小型で、細胞間の結合は緩く、ピペティングで容易に単個状にすることができた (Fig. 1, A)。

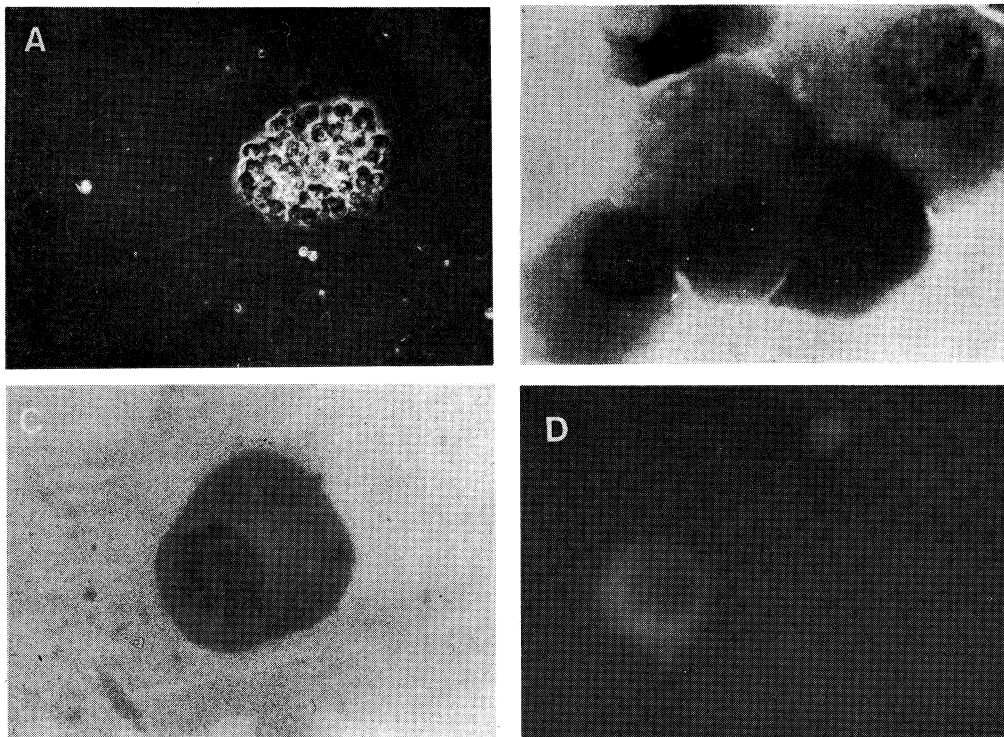


Fig. 1. Characterization of myeloma colonies.

(A) Myeloma colony ($\times 130$). Inverted microscope. (B) (C) Wright-Giemsa stain cells ($\times 400$). (D) cIg positive cell ($\times 1000$).

算定コロニー数は、播込み細胞数に比例して増加し、両者の間に原点を通過する直線関係が得られ、single cell 由来のコロニーと考えられた (Fig. 2).

PHA-MNC CM の効果をみた。Fig. 2 に示したように PHA-MNC CM は、conditioned medium のない場合に較べ、著明にコロニー形成率を高めた。

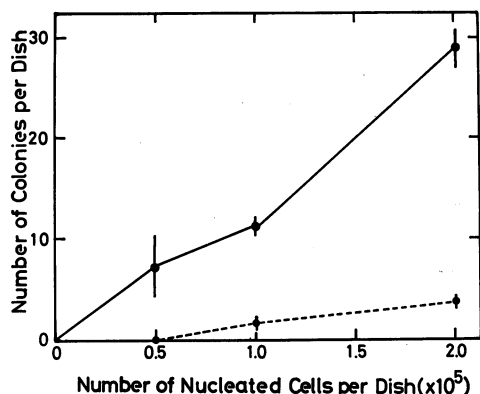


Fig. 2. Linear relationship between colony formation and the number of nucleated bone marrow cells plated. Each points represent the mean of three dish \pm S. D.

The solid line: with PHA-MNC CM
The dotted line: without PHA-MNC CM

パスツールピペットで取り出したコロニーを遠心塗抹し、構成細胞について検討すると、Wright-Giemsa 染色すると、リンパ球様ないしは成熟形質細胞様の形態を呈し (Fig. 1 B, C), peroxidase 染色陰性で、胞体内に骨髄腫の免疫グロブリンタイプと同様の免疫グロブリンを有していた (Fig. 1, C).

以上の結果をまとめると、骨髄腫患者の骨髄細胞は、conditioned medium で single cell 由来のコロニーを形成し、しかもそのコロニーは骨髄腫の免疫グロブリンのタイプと同じ免疫グロブリンを産生する細胞から構成されていることを示している。

抗癌剤非処理群の算定コロニー数について検討すると、播込み細胞数 2×10^5 個当たりの形成コロニー数は、0~197 個であり、コロニー形成

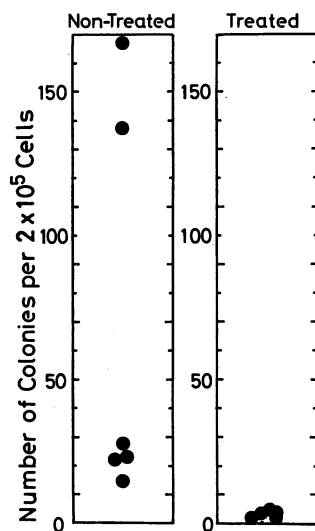


Fig. 3. Number of colonies in non-treated and treated patients with multiple myeloma.

率 (plating efficiency, P. E.) は 0~0.086 % であった。個々の症例について検討すると (Fig. 3), 未治療および増悪症例では、コロニーの形成されなかった症例はなく、形成コロニー数は 66.4 ± 69.8 個/ 2×10^5 であった。コロニー形成率は、寛解例の 2.8 ± 2.7 個/ 2×10^5 に較べ高い傾向を示した。しかし、両者の間に有意の差は認められなかった ($0.1 > p > 0.05$).

2) 薬剤感受性についての検討

P. E. の高い未治療および増悪例 5 例の骨髄腫患者の薬剤処理時のコロニー形成能について検討した。なお、ヒト骨髄腫細胞培養株 KMM-1⁵⁾ およびマウス骨髄腫細胞培養株 X63-Ag8-653 についても同様実験を行い参考とした。

メルファラン処理群では、4 例中 3 例において $1.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度で生存率は 10 % 以下に抑制された。培養細胞株でも同様な結果を得た。一方、4 例中残りの 1 例 S. O. 例では、他の症例に較べ濃度に対応した生存率の抑制は認められず、 $0.025 \mu\text{g/ml}$ 以上の薬剤濃度で生存率の低下はなく、感受性は低かった (Fig. 4).

アドリアマイシン処理群では、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ の

濃度で、5例中4例において30%以下の生存率の低下を認めた。しかし、S.O.例はメルファランで処理した場合と同様顕著な抑制は認められず、反対に生存率の再上昇を認めた。ま

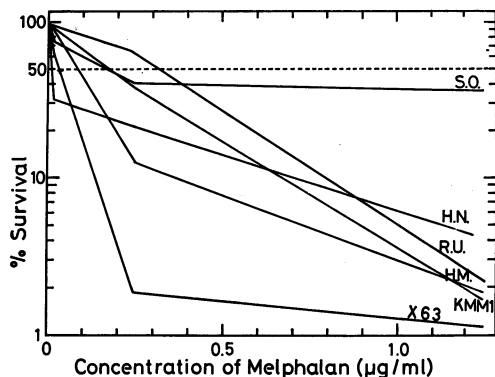


Fig. 4. Effect of melphalan on myeloma colony formation.

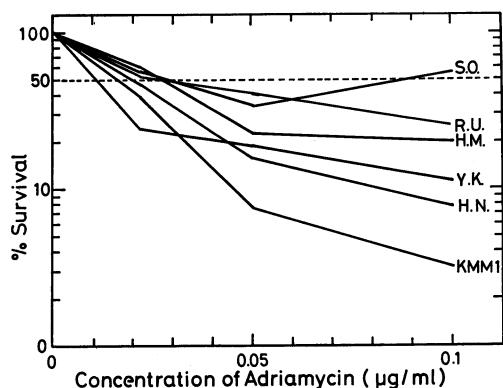


Fig. 5. Effect of adriamycin on myeloma colony formation.

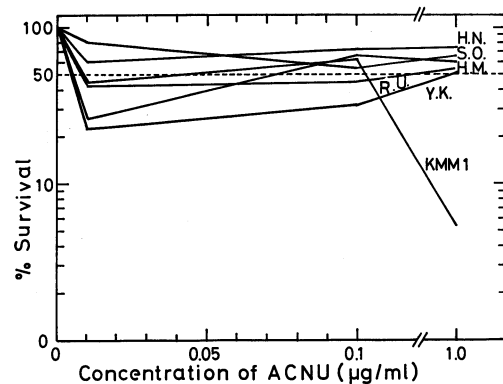


Fig. 6. Effect of ACNU on myeloma colony formation.

た、骨髄細胞培養 KMM-1 の感受性は、臨床例 5 例に較べ高かった (Fig. 5)。

ACNU で処理した場合、メルファラン、アドリマイシンで処理した場合と異なり、0.01 µg/ml までは生存率の減少を認めるが、それ以上の濃度となると、生存率の減少は認められず、著明なコロニー形成能の抑制は認められなかった (Fig. 6)。

考 按

1967年 Senn ら⁶⁾が、二重寒天法を用い CFU-C の培養に成功して以来、種々の conditioned medium および growth factor を使用して、赤芽球系 (CFU-E, BFU-E)⁷⁾ および T⁸⁾、Bリンパ球^{9),10)} 由来のコロニーを形成させることが可能となり、現在では in vitro コロニー形成法は hematopoietic progenitor cell の研究に必要不可欠となっている。骨髄腫細胞の in vitro コロニー形成に関する最初の報告は、Hamburger (1977)ら¹¹⁾によるもので、彼らはミネラルオイルを腹腔内に投与した BALB/C マウスの脾リンパ球培養上清と共に骨髄腫患者の骨髄細胞を二重寒天法で培養し、骨髄腫由来のコロニーが形成されることを報告した。Izaguirre (1980)ら¹²⁾は、PHA-T cell conditioned medium (PHA-T CM) と放射線照射 Tリンパ球の存在下で、骨髄腫およびその他の B-cell 腫瘍細胞由来のコロニーをメチルセルロース中に形成させ、骨髄腫細胞由来コロニーに限り PHA-T CM のみでもコロニーが形成されることを報告した。Izaguirre らの方法は、軟寒天を利用した Hamburger らの方法に較べ、conditioned medium の作製の容易な点も含め、手技が簡単で、短期間にコロニーが完成し、P.E. (0.25-2.69%) が高いという利点があり、抗癌剤感受性スクリーニングに適していると考えられる。

今回私達は、Izaguirre らの方法に多少の改変を加え、彼らが T cell より作製した PHA-T CM を使用し、microtiter plate を用いた方法を変えて、私達は作製のより簡単な PHA-MNC CM を使用し、35 mm プラスチックシャーレ

を用いて播込み細胞数を増やし、コロニー数を増加させる試みをした。

その結果は、conditioned medium の効果も良く、骨髓腫細胞由来と考えられるコロニー形成能も十分で、未治療および増悪群のみ例をとると、P. E. は 0.007~0.086% であり、Hamburger らの 0.001~0.1% と較べて大差なく、抗癌剤感受性テストを施行するのに十分満足のできるものであった。ただ、こうした *in vitro* のコロニー形成を行う場合常に問題となるすべてのコロニーが目的とする細胞から構成されているか否かの問題は未解決である。私達の場合、毎回の症例各に 5~10 個のコロニーを調べ、各コロニーが免疫グロブリン産生細胞で構成されていることをみている。しかし、播込んだ骨髓細胞の中には当然 T, B cell その他の細胞も含まれているので、それらコロニーの混入の危険性は少しある。これからは、播込む細胞の精製法あるいは、conditioned medium の改善を測ってこの問題を解決してゆきたい。

私達の検討では、治療により寛解状態に有る患者 (M1群) 5 例中 2 例 (40%) においてコロニー形成は認められず、他の 3 例についても P. E. は低値 (0.0017~0.0028%) であった。反対に未治療および増悪期患者 (M2群) 6 名すべてが M1 群に較べ高い P. E. (0.007~0.072%) を示した。両者の間に計算上有意の差が認められなかったのは、M2 群における個々の症例の P. E. のばらつきが大きかったためである。このようなコロニー形成群内における P. E. の差は、培養条件は一定であることから、細胞自体の性状、例えば腫瘍幹細胞 (malignant stem cell) の成熟度との関連性も考えられ今後この点を追求していきたい。

これらの結果より、骨髓腫細胞由来コロニーは、未治療および増悪時に高い形成能を示し、寛解時には低いことが考えられる。また、臨床的には、個々の患者のコロニー形成能の差および同一患者における経時的变化を観察することにより、骨髓塗沫標本では知り得ない malignant stem cell の状態を把握でき、患者の病態をよ

り深く知り得る可能性がある。

一方、癌細胞の薬剤感受性試験については、培養株を用いて行ったもの^{13)~15)}は以前よりあるが、患者より生検で採取した腫瘍細胞について行われるようになったのは比較的最近のことである。1978年 Salmon ら²⁾が、骨髓腫および卵巣癌について報告し、その後種々の癌についても^{16), 17)}検討しており、1981年には Hoff ら¹⁸⁾が、Salmon らと同様の方法により、18種類の悪性腫瘍、800 例の患者について検討し、199 例について成功し、いずれの報告も臨床と高い相関性を認めている。

私達が今回行った薬剤感受性の検討では、メルファラン、アドリアマイシンでコロニー生存率の抑制が顕著であったが、ACNU では十分な抑制は認められなかった。従って私達のデータをみるかぎり、骨髓腫患者に化学療法を施行する場合、ACNU 単独では十分な効果が期待できないということになる。

個々の症例において薬剤をみると、調べられた薬剤のうちメルファランのみが臨床例で用いられており、それも 2 例の患者 H. N. 例、T. U. 例だけに多剤併用療法の中の一剤として用いられているので評価は難しいが、*in vitro* の成績に相応して臨床的には有効であった。こうした結果から、臨床との関連について述べることは時期尚早であるが、少なくともこれらの薬剤感受性テストは、骨髓腫患者の初回治療薬の選択、再発時の治療薬の変更および新薬の開発時に有用と思われる。

一方、cycle dependency を示す種々の抗癌剤について検討を行う場合、被試験細胞の細胞回転との関係から、処理時間が問題となる。私達が培養細胞において検討した結果、1 時間処理と 24 時間処理に差を認めなかったが (データ未発表)、処理時間と生存率との間に関連性を認めたとの報告¹⁹⁾もあり、薬剤感受性を見る場合、薬剤処理時間の検討は今後共必要と思われる。

また、血液悪性疾患では、多剤併用療法を施行することが多く、私達が今回検討した単剤に

おける薬剤感受性テストでは、薬剤の相乗効果および相加効果についての検討はできない。

Park らは、急性非リンパ球性白血病由来コロニー (L-CFU) で4種類の抗癌剤を使用し、drug mixture expose²⁰⁾を行った場合 pulse expose²¹⁾と異なり相乗効果を認めたと報告している。このように臨床の使用法により近い細胞の処理法は、今後、薬剤感受性スクリーニング上重要なことである。

本論文の要旨は、昭和57年10月、第24回日本臨床血液学会で発表した。

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜った本学検査診断学上田智教授、ならびに直接御指導いただいた本学血液内科学教室戸川助教教授に深謝します。また細胞培養について御指導 および御校閲を賜った本学実験病理学教室難波正義助教教授、ならびに御校閲を賜った本学血液内科教室八幡義人教授に深謝します。

参 考 文 献

- 1) Boyum, A.: Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. clin. lab. Invest.* 21: Suppl. 97:7, 1968
- 2) Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehnlen, S., Durie, B. G. M., Alberts, D. S. and Moon, T. E.: Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.* 298: 1321—1327, 1978
- 3) Alberts, D. S. and Chen, H-SG.: Tabular summary of pharmacokinetic parameter relevant to in vitro drug assay. In *Cloning of human tumor stem cells*, ed. by Salmon, S. E., New York, Alan R. Liss. 1980, pp. 351—354
- 4) Kaplow, L. S.: Simplified myeloperoxidase stain using benzidine dihydrochloride. *Blood* 26: 215—219, 1965
- 5) Togawa, A., Inoue, N., Miyamoto, K., Hyodo, H. and Namba, M.: Establishment and characterization of a human myeloma cell line (KMM-1). *Int. J. Cancer* 29: 495—500, 1982
- 6) Senn, J. S., McCulloch, E. A. and Till, J. E.: Comparison of colony-forming ability of normal and leukemic human marrow in cell culture. *Lancet* 2: 597—598, 1967
- 7) Metcalf, D.: Hemopoietic colonies. *In vitro cloning of normal and leukemic cells*, Berlin-Heidelberg-New York, Springer Verlag. 1977
- 8) Rozenszajn, L. A., Shoham, D. and Kalechman, I.: Clonal proliferation of PHA-stimulated human lymphocytes in soft agar culture. *Immunology* 29: 1041—1055, 1975
- 9) Fibach, E., Gerassi, E. and Sachs, L.: Induction of colony formation in vitro by human lymphocytes. *Nature* 259: 127—129, 1976
- 10) Radnay, J., Goldman, I. and Rozenszajn, L. A.: Growth of human B-lymphocyte colonies in vitro. *Nature* 278: 351—353, 1979
- 11) Hamburger, A. W. and Salmon, S. E.: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J. clin. Invest.* 60: 846—854, 1977
- 12) Izaguirre, C. A., Minden, M. D., Howatson, A. F. and McCulloch, E. A.: Colony formation by normal and malignant human B-lymphocytes. *Br. J. Cancer* 42: 430—437, 1980
- 13) Ogawa, M., Bergsagel, D. E. and McCulloch, E. A.: Differential effects of melphalan on mouse myeloma (Adj, PC5) and hemopoietic stem cells. *Cancer Res.* 31: 2116—2119, 1971
- 14) Valeriote, F., Lynch, R., Berger, N. A., White, E. and Coulter, D.: Growth characteristics of MOPC-315 plasmacytoma and response to anticancer agents. *J. N. C. I.* 66: 1083—1088, 1981
- 15) Alexander, P. and Mikulski, Z. B.: Differences in the response of leukemia cells in tissue culture to nitrogen mustard and dimethyl myleran. *Boichem. Pharmacology* 5: 275—281, 1961
- 16) Salmon, S. E., Alberts, D. S., Durie, B. G. M., Meyskens, F. L., Jones, S. E., Soehnlen, B., Chen,

- H-SG. and Moon, T.: Clinical correlations of drug sensitivity in human tumor stem cell assay. *Recent Result. Cancer Res.* 74: 300—305, 1980
- 17) Salmon, S. E., Meyskens, F. L., Alberts, D. S., Soehnlen, B. and Young, L.: New drugs in ovarian cancer and malignant melanoma: In vitro phase 2 screening with the human tumor stem cell assay. *Cancer Treat. Rep.* 65: 1—12, 1981
- 18) Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J. and Makach, R.: Association between human colony-forming assay result and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.* 70: 1027—1032, 1981
- 19) Koeffler, H. P., Yen, J. and Lowe, L.: An in vitro model for acute myelogenous leukemia chemotherapy. *Cancer* 48: 1958—1963, 1981
- 20) Park, C. H., Amare, M., Morrison, F. S., Maloney, T. R. and Goodwin, J. W.: Chemotherapy sensitivity assessment of leukemic colony-forming cells with in vitro simultaneous exposure to multiple drugs: Clinical correlations in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Treat. Rep.* 66: 1257—1261, 1980
- 21) Park, C. H., Amare, M., Savin, M. A., Goodwin, J. W., Newcomb, M. M. and Hoogstraten, B.: Prediction of chemotherapy response in human leukemia using an in vitro chemotherapy sensitivity test on the leukemic colony-forming cells. *Blood* 55: 595—601, 1980