

コロニー形成法を利用したヒト肺癌の 診断ならびに治療に関する研究

第 1 編

ヒト肺癌細胞株（腺癌，扁平上皮癌，小細胞癌）の *in vitro* 制癌剤感受性試験

岡山大学医学部第2内科学教室（主任：木村郁郎教授）

宮 井 正 博

（昭和57年3月15日受稿）

Key words: human lung cancer cell lines,
in vitro chemosensitivity test,
cloning assay

緒 言

ヒト肺癌は多彩な組織型を呈し、進展様式、治療に対する効果などの臨床像は組織型により著しく異なる。各組織型のヒト肺癌細胞株を用いた制癌剤感受性試験は、各組織型の肺癌に適した制癌剤を選択する上で重要な情報を与えてくれるものと思われる。こうした制癌剤感受性試験には dye-exclusion test^{1,2)}、酵素活性を利用する方法^{3,4)}、agar plate 法⁵⁾、核酸・蛋白合成阻害をみる方法⁶⁾など *in vitro* で行う方法や、ヌードマウス⁷⁾ など異種移植⁸⁾ を用いた方法、diffusion chamber⁹⁾ などの *in vivo* で行う方法が、種々試みられてきた。また組織培養法を用いても多くの報告がなされてきたが、従来行われてきたものの大部分は初代培養細胞を用いたものであり、継代されている細胞株を用いた報告は比較的少なく、特にヒト肺癌細胞株を用いた報告は下山¹⁰⁾、辻¹¹⁾、長瀬¹²⁾らの報告をみるにすぎない。

一般的に制癌剤の殺細胞作用を定量的に表わす最もよい方法は軟寒天培地におけるコロニー形成を利用した soft agar cloning assay 法である¹³⁾。今回、2層法による soft agar cloning assay 法を用いて、代表的なヒト肺癌の組

織型である腺癌，扁平上皮癌，小細胞癌の細胞株の各種制癌剤に対する感受性を検討したので、その結果を報告する。

実 験 材 料

検討した薬剤は Adriamycin (ADM), 40497 S, Mitomycin C (MMC), cis-Dichlorodiammineplatinum (CDDP), Methotrexate (MTX), Vincristine (VCR) の6剤である。40497 S は Cyclophosphamide (CPA) の活性型である^{14,15)}。

細胞株としては、我々の施設で樹立し継代培養している肺腺癌細胞株 ABC-1, 肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1, 肺小細胞癌細胞株 SBC-1, の3種類を用いた¹⁶⁾。3種類の細胞株の倍加時間、培養材料、donor に対する既往治療とその効果を Table 1 にまとめた。ABC-1 は CPA, VCR, MTX, Procarbazine (PCZ) による多剤併用療法や MMC の胸腔内投与を受けたが、まったく効果なく死亡した低分化型腺癌の患者の癌性胸水より樹立された。大部分の細胞は浮遊増殖し、その倍加時間は72時間である。EBC-1 は低分化型扁平上皮癌の組織像を呈した肺扁平上皮癌患者の皮膚転移病巣から樹立され、培養容器の底面に付着し、単層に増殖する。EBC-1 の donor

Table 1. Characteristics of ABC-1, EBC-1 and SBC-1

	ABC-1	EBC-1	SBC-1
doubling time	72 hr.	42 hr.	53 hr.
source	pleural effusion	skin metastasis	pleural effusion
drugs given to the donor	CPA, VCR, MTX, PCZ, MMC	CPA, VCR, MTX, PCZ, NCS	CPA, VCR, MTX, PCZ, ADM
chemotherapy effect in the donor	progression	progression	progression

CPA: Cyclophosphamide, VCR: Vincristine, MTX: Methotrexate
 PCZ: Procarbazine, MMC: Mitomycin C, NCS: Neocarzinostatin
 ADM: Adriamycin

は、生前 CPA, VCR, MTX, PCZ や Neocarzinostatin による強力な化学療法が行われたが、これにまったく反応せず死亡している。EBC-1 の倍加時間は42時間であった。SBC-1 は組織型不明のまま右肺下葉切除術をうけ、胸水貯留で再発した中間細胞型肺小細胞癌患者の癌性胸水から樹立された。SBC-1 の donor に対しては CPA, VCR, MTX, PCZ による多剤併用療法, ADM, MTX の胸腔内投与が行われたが著効を奏さなかった。この SBC-1 細胞は大部分の細胞は浮遊増殖し、互いに密に結合しており、その倍加時間は53時間である。

3 種類の細胞株は、ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g/ml}$ (明治製薬製)、ペニシリン100単位/ml (明治製薬製)、2-メルカプトエタノール10mEq/l (Sigma 製) を含む Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640; Gibco 製) に10%胎児ウシ血清 (Fetal Calf Serum; FCS, Gibco 製) を加えた培養液にて、37°C、5%炭酸ガス培養器で継代培養されている。実験には対数増殖期にある生細胞率90%以上の細胞を用いた。

実験方法

Fig. 1 に実験方法のあらましを図示するが、以下にその詳細を述べる。

1) 単一細胞浮遊液の作成

浮遊増殖する ABC-1 および SBC-1 については、ピペット操作により単一細胞浮遊液を作成した。培養容器の底面に付着し増殖する EBC-1

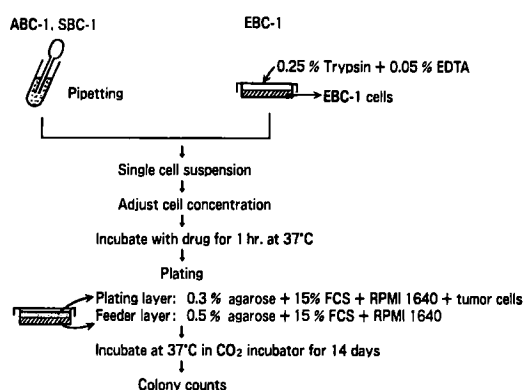


Fig. 1. Soft agar cloning assay for chemosensitivity test

では、培養液を除いたあと0.05% EDTA加0.25%トリプシン液 (Gibco 製) を加え37°Cで5分間作用させて単一細胞浮遊液を作成し、これを1500r.p.m. 5分間遠沈し培養液にて2回洗浄したものをを用いた。

2) 制癌剤への接触

ADM, 40497S, MMC, MTX, VCR は生理食塩水により最初の溶解を行い、以後の希釈は培養液により行った。CDDP は液体状であり、直接培養液により希釈を行った。細胞数は2~10 $\times 10^4$ /mlになるように調整し、制癌剤を5~9薬剤濃度に希釈し、37°Cで1時間 incubate した。各薬剤の最終濃度は Table 2 に示した。

3) 培養株細胞の plating

制癌剤に接触させたのち、1500r.p.m. で5分間遠沈し上清をすて培養液にて2回洗浄し、2

Table 2. Drug concentration studied in the experiments

Drug	Concentration(mcg/ml)									
ADM	0.01	0.05	0.07	0.1	0.2	0.5	1	5	10	
40497S	0.01			0.1	0.5	1	2	5	10	50
MMC	0.01	0.05		0.1	0.5	1	2	5		
MTX		0.05		0.1	0.5	1	5	10	50	100
VCR	0.01			0.1	0.5	1	5	10		
CDDP	0.01			0.1	0.5	1	5	10		

ニーとして、その数を算定した。

なお、実験結果は、1薬剤濃度について triplicate の測定を行った実験を少なくとも2回繰り返し、それを総括して表わした。各薬剤濃度における生細胞率は、薬剤無添加におけるコロニー数に対する比率で表わし、これをプロットして survival curve を作成した。薬剤感受性は survival curve から得られる90%致死濃

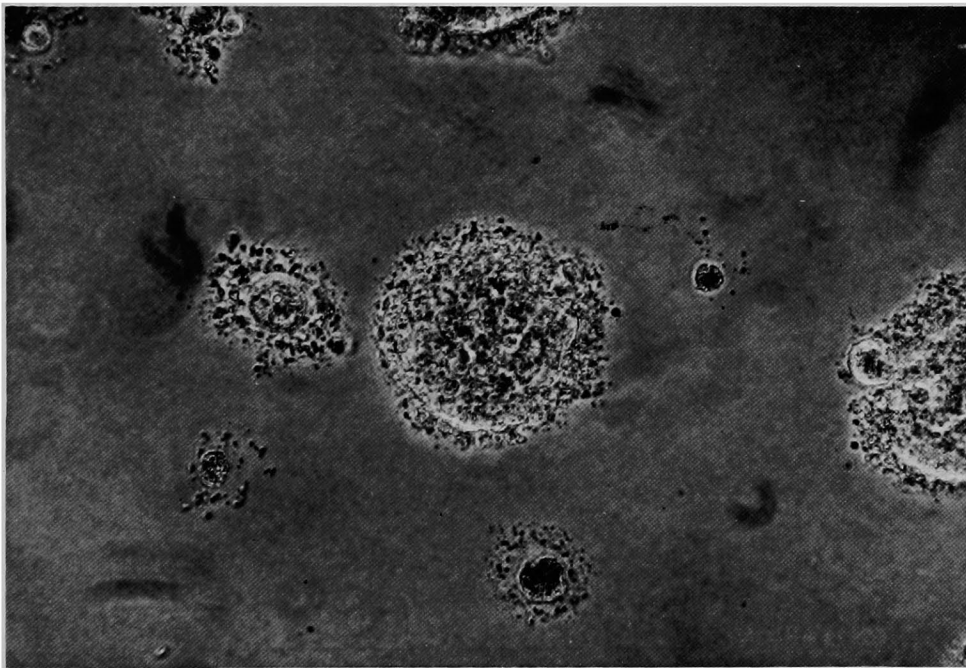


Fig. 2. Morphology of colonies of EBC-1 cell grown in soft agar on 14th day of plating

層法軟寒天培地を用い培養した。すなわち、2 mm グリッド付き直径35mm のプラスチックシャーレ (Lux 製) を用い、agarose 0.5% (Marine Colloids 製)、FCS 15%、炭酸水素ナトリウム1.2g/l、2-メルカプトエタノール10m Eq/l、RPMI 1640 を含む feeder layer 1 ml をあらかじめ室温にて固まらせておき、その上に agarose 0.3%、FCS 15%、炭酸水素ナトリウム1.2 g/l、2-メルカプトエタノール10m Eq/l、RPMI 1640 に培養株細胞を含む plating layer 1 ml を重層させた。低温室に約5分間静置して寒天を固まらせたのち37°C、5%炭酸ガス培養器にて2週間 incubate し、30個以上の細胞集塊をコロ

度 (Lethal Dose₉₀; LD₉₀) および70%致死濃度 (LD₇₀) で表わした。

成 績

ABC-1, EBC-1, SBC-1 の3種類の細胞株はいずれも軟寒天培地においてコロニーを形成し、コロニー形成率 (Colony Forming Efficiency; CFE) はそれぞれ2%, 4.5%, 1%であった。

Fig. 2 は EBC-1 細胞のコロニーであるが、いずれの組織型の肺癌細胞も、境界明瞭な細胞集塊を形成した。

ABC-1, EBC-1, SBC-1 の survival curve をそれぞれ Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 に示す。また90

Table 3. Lethal dose 70% (LD₇₀) and 90% (LD₉₀) of drugs tested in the three cell lines

	ABC-1		EBC-1		SBC-1	
	LD ₇₀	LD ₉₀	LD ₇₀	LD ₉₀	LD ₇₀	LD ₉₀
ADM	0.11	0.19	0.16	0.46	0.14	0.27
40497S	3.8	7.9	7.6	10.0	4.2	7.5
MMC	0.85	1.6	0.60	1.5	0.22	0.8
MTX	26	>100	100	>100	>100	>100
VCR	>10	>10	>10	>10	>10	>10
CDDP	0.55	1.48	>10	>10	0.8	3.0

(mcg/ml)

1時間の接触では十分な殺細胞作用を示さなかった。MTXは26($\mu\text{g/ml}$)でLD₇₀となったが、100($\mu\text{g/ml}$)でもLD₉₀に達しなかった。VCRは10($\mu\text{g/ml}$)の濃度でもLD₇₀に達しなかった。2) EBC-1の制癌剤感受性試験 (Fig. 4)

ADM, 40497S, MMC, MTX, VCR に関してはABC-1の場合と同様の傾向を示したが、EBC-1はCDDPに対しては耐性を有すると思われる10($\mu\text{g/ml}$)の濃度でも20%の殺細胞作用しか示さなかった。殺細胞作用はADM, MMC, 40497Sの順に強く、LD₉₀はそれぞれ0.46, 1.5, 10($\mu\text{g/ml}$)、LD₇₀はそれぞれ0.16, 0.6, 7.6

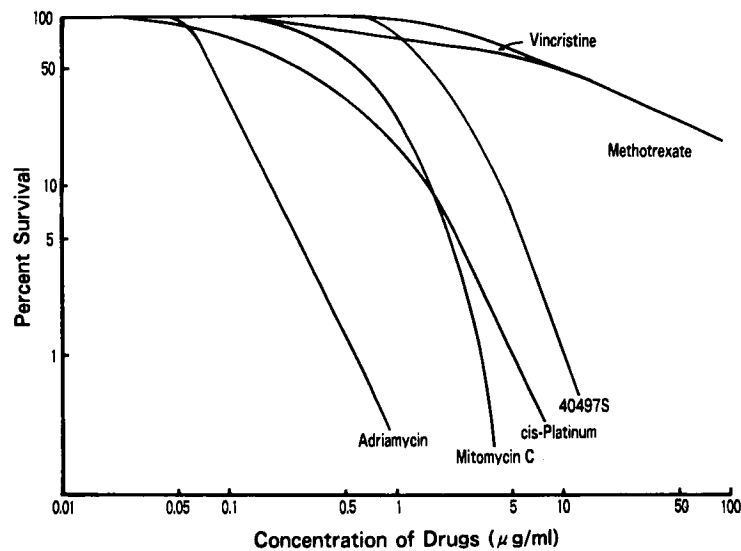


Fig. 3. Survival curves for ABC-1 cells by cloning assay

%致死濃度 (LD₉₀)と70%致死濃度 (LD₇₀)をTable 3にまとめた。

1) ABC-1の制癌剤感受性試験 (Fig. 3)

ADM, 40497S, MMC, CDDPは、いずれも濃度依存性の殺細胞性を示した。40497S, MMC, CDDPは両対数グラフで上に凸な曲線を示したのに対し、ADMではそれらよりも急峻な直線的なカーブを描いて生細胞率は減少した。殺細胞作用はADM, CDDP, MMC, 40497Sの順に強く、LD₉₀はそれぞれ0.19, 1.48, 1.6, 7.9 ($\mu\text{g/ml}$)、LD₇₀はそれぞれ0.11, 0.55, 0.85, 3.8 ($\mu\text{g/ml}$)であった。MTX, VCRはともに

($\mu\text{g/ml}$)であった。MTXに対してEBC-1はABC-1よりさらに感受性が低く100($\mu\text{g/ml}$)の濃度でもLD₇₀に達しなかった。VCRに関してはABC-1の場合と同様に、10($\mu\text{g/ml}$)の濃度でもLD₇₀に達しなかった。

3) SBC-1の制癌剤感受性試験 (Fig. 5)

SBC-1では、ABC-1, EBC-1に比して特にMTXに対する感受性が低く、100($\mu\text{g/ml}$)の濃度でも20%の殺細胞作用しか示さなかった。VCRはABC-1, EBC-1の場合と同じく10($\mu\text{g/ml}$)の濃度でもLD₇₀に達しない。ADM, 40497S, MMC, CDDPはABC-1の場合と同じ

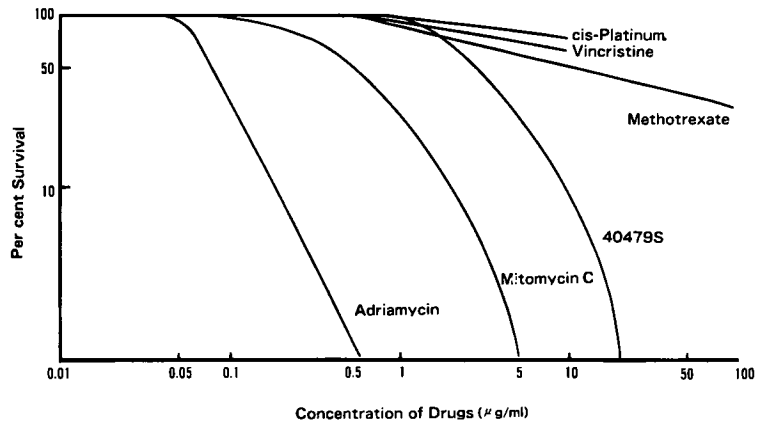


Fig. 4. Survival curves for EBC-1 cells by cloning assay

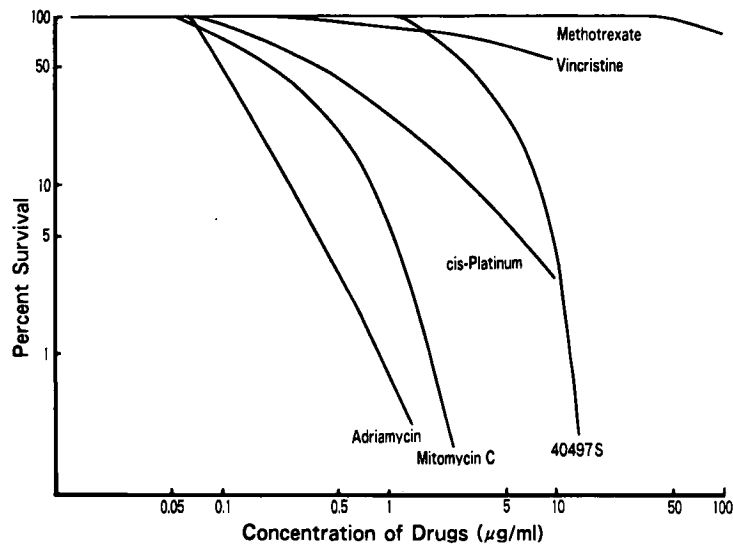


Fig. 5. Survival curves for SBC-1 cells by cloning assay

Table 4. Maximum blood levels of drugs given intravenously to patients

Drug	Dose and Route of Administration	Maximum Blood Level	Reference
ADM	30mg/m ² (i.v.)	0.5mcg/ml	24), 25)
40497S	20mg/kg (d.i.)	20-30mcg/ml	26), 27)
MMC	30mg/body (i.v.)	2.7mcg/ml	22), 23)
MTX	30mg/m ² (i.v.)	2.75mcg/ml	28), 29)
VCR	2mg/body (i.v.)	0.02mcg/ml	30)
CDDP	100mg/m ² (i.v.)	2.49mcg/ml	31)

Table 5. Response of bronchogenic carcinoma to monochemotherapy by cell type summarized and reported by Selawry and Leghra

Drug	Adeno.	Sq.	Small cell
ADM	15%	14%	28%
CPA	21%	20%	31%
MMC	27%	—	9%
MTX	32%	25%	39%
VCR	—	—	33%

く濃度依存性の殺細胞作用を示し、殺細胞作用は ADM, MMC, CDDP, 40497S の順に強く LD₉₀ はそれぞれ 0.27, 0.8, 3.0, 7.5 ($\mu\text{g}/\text{ml}$), LD₇₀ はそれぞれ 0.14, 0.22, 0.8, 4.2 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。

考 案

一般的に細胞死には、mitotic death (reproductive death; 増殖死) と non-mitotic death (interphase death; 間期死) がある¹⁷⁾。増殖死とは、放射線あるいは抗癌剤に接触させられた細胞が一見正常と異ならない機能を示しながら、細胞分裂直後あるいは分裂をくり返しながら死に至るものであり、間期死とは細胞分裂とは直接の関係なく死に至るものである。増殖死の場合は、細胞の増殖能の有無、すなわちコロニー形成能によって明確な生死の判定ができる。Roper と Drewinko はコロニー形成法と doubling time をみる方法、labeling index 法、dye-exclusion 法、⁵¹Cr release 法、^[3H] thymidine 摂取率をみる方法を比較して、コロニー形成法が細胞死を反映する最も適確な方法であることを証明している¹³⁾

従来行われてきた肺癌細胞株を用いた *in vitro* 抗癌剤感受性試験には下記の方法がある。すなわち下山は 1 層の軟寒天培地法を用い、CFE のよい細胞株のみについて検討しているが基本的には今回の方法と類似している¹⁰⁾。最近、インシュリン、トランスフェリン、Epidermal Growth Factor (EGF) などが細胞の成長促進因子として注目されており¹⁸⁻²⁰⁾、特に EGF は肺癌細胞からも産生されることが報告されている²¹⁾。Feeder layer を用いた今回の方法は、conditioning という点で改善の余地を残している。これは平板寒天法を用いているが、この方法は感受性をコロニーの形態により判定しているため厳密な定量的評価が下せない点と常時薬剤に接触している点に問題がある¹¹⁾。長瀬の行ったマイクロプレートを用いて微小コロニー形成能を見る方法は、培養液が節約できる長所があるが、腫瘍細胞の同定が困難であり、また微小コロニーでは正確な増殖死を表現しない欠点がある¹²⁾

以上より、今回用いた 2 層法軟寒天培地を用

いる方法は手技はやや複雑であるが、前述した他の方法に伴う欠点がなく薬剤への接触時間が任意であり細胞死を厳密に定量的に表現するという長所があり最適の方法であると考えられる。

ヒトにおける薬剤の体内動態を検討すると、one shot 静注後の血中濃度は多くの場合、急峻な distribution phase からゆるやかな elimination phase へ移行し、この変曲点における濃度は投与直後の最高血中濃度の 1/10~1/20 に相当し^{22,23)}、これは近似的に臓器内濃度を反映しているものと思われる。したがってこの濃度での 1 時間の接触における細胞死は臨床効果との相関を論ずる上でひとつの理論的根拠を与えるものといえる。今回検討した 6 剤について、臨床投与量で得られる最高血中濃度を文献から収録し Table 4 に示した。40497S は難溶性で one shot 静注は不可能であるが、20mg/kg を投与したと仮定すれば理論的には最高血中濃度は 260 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となる。最高血中濃度の 1/10 濃度において 70% 以上の殺細胞効果が得られたものを *in vitro* で感受性ありとすると判断すると、40497S が ABC-1, EBC-1, SBC-1 のいずれに対しても感受性を有するが、他の薬剤は *in vitro* で感受性を有さなかった。今回検討した 3 種の細胞株の donor は Table 1 に示したごとく CPA, MTX, VCR, PCZ による強力な化学療法のほか、MMC, ADM, MTX の胸腔内投与が行われたが著効は得られておらず¹⁶⁾、*in vitro* で各種抗癌剤に対して感受性が低く、donor においても生前化学療法の臨床効果が認められなかった点では一応の相関を示した。

肺癌は組織型により化学療法の有効率にかなりの差があり Selawry³²⁾、Leghra³³⁾ らが文献的に欧米の報告から検討した単剤における化学療法の臨床効果は Table 5 の如くである。ABC-1, EBC-1, SBC-1 の 3 種類の細胞株の LD₉₀ を比較すると、3 種類の細胞株の *in vitro* 抗癌剤感受性差はあまり認められなかった (Table 3)。このことは 3 種類の細胞株とも各種抗癌剤に対して耐性を示した患者から培養樹立されたことを反映しているものと思われる。

Barranco らは同一臓器癌で同一組織型由来の細胞株でも抗癌剤に対する感受性は異なること

を報告しており³⁴⁾、実地臨床の場においては今後個々の患者からのサンプルを用いて直接 *in vitro* 制癌剤感受性試験を行うことが望まれる。

結 語

代表的なヒト肺癌の組織型である腺癌，扁平上皮癌，小細胞癌の細胞株を用いて各種制癌剤に対する感受性試験を soft agar cloning assay 法により検討した。Adriamycin, 40497S, Mitomycin C, cis-Platinum は濃度依存性の殺細胞性を示し，Methotrexate, Vincristine は1時間の接触では十分な殺細胞性を示さなかった，90%致死濃度では3種類の細胞株間の感受性差は

少なかった。

今回の実験は既存の薬剤の投与法の再検討，多剤併用化学療法における相乗効果の基礎的実験，新しい制癌剤のスクリーニング，薬剤耐性の実験モデルの作成などきわめて多方面への応用の可能性を示している。

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った恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表わします。また，終始御懇篤なる御指導を賜った大塚泰亮講師，平木俊吉博士に深謝します。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）において発表した。

参 考 文 献

- Schrek, R.: A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions, *Am. J. Cancer* **28**, 389—392, 1936.
- Vycital, R.O., Schrek, R. and Clarke, T.H.: Unstained cell counts as a method of evaluating cancerocidal agents. *Cancer Res.* **102**, 304, 1952.
- Straus, F.H., Cheronis, N.D. and Straus, E.: Demonstration of reducing enzyme systems in neoplasms and living mammalian tissues by triphenyltetrazolium chloride. *Science* **108**, 113—115, 1948.
- Black, M.M. and Speer, F.D.: *In vitro* and clinical effects of urethane plus triethylene melamine on human breast cancer. *Surg. Gynecol. Obstet.* **102**, 420—426, 1956.
- Knock, F.H.: Sensitivity tests for cancer chemotherapy. *Arch. Surg.* **91**, 376—385, 1965.
- Bickis, I.J., Henderson, I.W.D. and Quastel, J.H.: Biochemical studies of human tumors. *Cancer* **19**, 103—113, 1966.
- Rygaard, J. and Povlsen, O.P.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **77**, 758—760, 1969.
- Rous, P. and Murphy, J.B.: Tumor implantation in the developing embryo. *J. Am. Med. Assoc.* **150**, 741, 1911.
- 副島清治：Diffusion chamber を用いた制癌剤感受性試験について，最新医学，**24**，1775—1778，1969.
- 下山正徳：人癌細胞培養とその化学療法への応用，医学のあゆみ，**90**，273—283，1975.
- 辻啓次郎，黄 鉄吉，高倉信孝：肺癌培養細胞の制癌剤感受性—平板寒天コロニー形成法による制癌剤スクリーニングの試み—，癌と化学療法，**3**，74—79，1976.
- 長瀬千秋：培養されたヒト肺癌細胞の制癌剤に対する感受性の測定に関する実験的研究，肺癌，**20**，11—20，1980.
- Roper, P.R. and Drewinko, B.: Comparison of *in vitro* methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Res.* **36**, 2182—2188, 1976.
- Takamizawa, A., Matsumoto, S., Iwata, T., Katagiri, K., Tochino, Y. and Yamaguchi, K.: Studies on cyclophosphamide metabolites and their related compounds. II. Preparation of an active species of cyclophosphamide and some related compounds, *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 985—986, 1973.
- Hill, D.L., Laster, W.R. and Struck, R.F.: Enzymatic metabolism of cyclophosphamide and nicotine

- and production of a toxic cyclophosphamide metabolite, *Cancer Res.* **32**, 658—665, 1972.
16. 平木俊吉, 宮井正博, 瀬戸 匠, 田村哲生, 渡辺洋一, 小沢志朗, 池田裕政, 中田康則, 大熨泰亮, 木村郁郎: ヒト肺癌(扁平上皮癌, 腺癌, 小細胞癌)細胞株の樹立と異種移植, *肺癌*: **22**, 53—58, 1982.
 17. 山田 武, 大山ハルミ: エネルギー代謝阻害と放射線による細胞間期死, *動物学雑誌*, **80**, 111—119, 1971.
 18. Bottenstein, J., Hayashi, I., Hutchings, S., Masui, H., Mather, J., McClure, D.B., Ohasa, S., Rizzino, A., Sato, G., Serrero, G., Wolfe, R. and Wu, R.: The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media, In *Methods in Enzymology*, vol. 58 (Cell Culture) ed. W.B. Jakoby, and I.H. Paston, Academic Press, N.Y., pp.94—109, 1979.
 19. Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.* **237**, 1555—1562, 1962.
 20. 山根 績, 菅 幹雄, 星 宏良: Growth factor と 組織培養, *日本医師会雑誌*, **85**, 796—803, 1981.
 21. Sherwin, S.A., Minna, J.D., Gazdar, A.F. and Todaro, G.J.: Expression of epidermal and nerve growth factor receptors and soft agar growth factor production by human lung cancer cells. *Cancer Res.* **41**, 3538—3542, 1981.
 22. Crooke, S.T. and Bradner, W.T.: Mitomycin C: a review, *Cancer Treat. Rev.* **3**, 121—139, 1976.
 23. Schwartz, H.S. and Philips, F.S.: Pharmacology of mitomycin C II. Renal excretion and metabolism by tissue homogenates, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **133**, 335—342, 1961.
 24. Benjamin, R.S., Riggs, C.E. and Bachur, N.R.: Plasma pharmacokinetics of adriamycin and its metabolites in humans with normal hepatic and renal function, *Cancer Res.* **37**, 1416—1420, 1977.
 25. Benjamin, R.S., Riggs, C.E. and Bachur, N.R.: Pharmacokinetics and metabolism of adriamycin in man, *Clin. Pharmacol. Ther.* **14**, 592—600, 1973.
 26. 青木行俊, 寺沢敏夫, 神前五郎: 40497S の培養細胞に及ぼす効果と投与後血中活性の推移, 第34回日本癌学会総会記事, 演題番号321
 27. 高見沢映, 原田 紘, 松下至博, 山口健二, 棚野義博, 太田和雄, 小川一誠, 青木行俊: Cyclophosphamide, Isophosphamide, 4-OOH-IP のヒト及び動物血中の消長, 第36回日本癌学会総会記事, 演題番号523
 28. Henderson, E.S., Adamson, R.H. and Oliverio, V.T.: The metabolic fate of tritiated methotrexate II. Absorption and excretion in man, *Cancer Res.* **25**, 1018—1024, 1965.
 29. Liguori, V.R., Giglio, J.J., Miller, E. and Sullivan, R.D.: Effects of different dose schedules of amethopterin on serum and tissue concentrations and urinary excretion patterns, *Clin. Pharmacol. Therapy* **3**, 34—40, 1962.
 30. Owellen, R.J., Root, M.A. and Hains, F.O.: Pharmacokinetics of vindesine and vincristine in humans. *Cancer Res.* **37**, 2603—2607, 1977.
 31. Patton, J.F., Himmelstein, K.J., Belt, R. Bannister, S.J., Sternson, L.A. and Repta, A.J.: Plasma level and urinary excretion of filterable platinum species following bolus injection and in iv infusion of cis-dichlorodiamineplatinum (II) in man. *Cancer Treat. Rep.* **62**, 1359—1362, 1978.
 32. Selawry, O.S.: The role of chemotherapy in the treatment of lung cancer, *Seminars Oncol.* **1**, 259—272, 1974.
 33. Legha, S.S., Muggia, F.M. and Carter, S.K.: Adjuvant chemotherapy in lung cancer. *Cancer* **39**, 1415—1424, 1977.
 34. Barranco, S.C., Ho, D.H., Drewinko, B. Romsdahl, M.M. and Hamphery, R.M.: Differential sensitivity of human melanoma cells grown *in vitro* to arabinosylcytosine, *Cancer Res.* **32**, 2733—2736, 1972.

**Studies on the diagnosis and treatment of human lung cancer using
double-layered soft agar cloning assay**

**I. In vitro chemosensitivity test on permanent cell lines from adeno—,
epidermoid and small cell carcinoma of the lung using double-layered
soft agar cloning assay**

Masahiro MIYAI

Department of Medicine, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director: Prof. I. KIMURA)

An in vitro chemosensitivity test on permanent cell lines from adeno—, epidermoid and small cell carcinoma of the lung was performed using a double-layered soft agar cloning assay. Drugs tested in the present study were Adriamycin, 40497S, Mitomycin C, cis-Dichlorodiammineplatinum, Methotrexate and Vincristine. Adriamycin, 40497S, Mitomycin C and cis-Dichlorodiammineplatinum showed dose-dependent cytotoxicity. Methotrexate and Vincristine did not show a significant cytotoxicity when the cell lines were exposed for one hour. Differences in chemosensitivity to the six drugs examined among the three cell lines was relatively small e.g. the lethal dose 90% (LD90) of Adriamycin was 0.19 mcg/ml in adenocarcinoma, 0.46 mcg/ml in epidermoid carcinoma and 0.27 mcg/ml in small cell carcinoma. The lack of a difference in chemosensitivity in vitro might be attributed to the fact that the cell lines had been established from bronchogenic carcinomas which were refractory to intensive combination chemotherapy.