

ヌードマウス移植ヒト睾丸腫瘍を用いた 抗癌剤感受性試験と臨床成績

大阪府立成人病センター泌尿器科 (主任: 古武敏彦)
三木 恒治, 古武 敏彦

ANTI-CANCER DRUG SENSITIVITY TEST AGAINST HUMAN TESTICULAR CANCER XENOGRAFT

—COMPARISON WITH CLINICAL RESULTS OF CHEMOTHERAPY—

Tsuneharu MIKI and Toshihiko KOTAKE

From the Center for Adult Diseases, Osaka
(Director: T. Kotake)

The antitumor effect of vinblastine (VBL), vincristine (VCR), etoposide (VP-16), teniposide (VM-26), cisplatin (CDDP), CBDCA (JM-8, Carboplatin), CHIP (JM-9), DWA2114R and recombinant human tumor necrosis factor (TNF) on four human testicular cancers heterotransplanted in nude mice were studied.

The treatments with CDDP, CBDCA or CHIP significantly reduced the transplanted tumors. Combination chemotherapy with CDDP, bleomycin and VBL or VCR or VP-16 or VM-26 also revealed significant tumor regression. The antitumor effect of TNF on human testicular xenografts was much more evident when it was given intratumorally than when given intravenously. Teratoma was resistant to TNF even when it was administered intratumorally. Those results are briefly discussed and compared with the clinical results of chemotherapy. Several problems in anticancer drug sensitivity test against human tumor xenografts are also discussed.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1903-1909, 1988)

Key words: Testicular cancer, Nude mice, Chemotherapy

緒 言

ヌードマウス可移植腫瘍株は、そのオリジナル腫瘍とほぼ同一の組織形態、および機能を示し、ヒト腫瘍を担癌生体に近い状態で長期間維持することが可能であり、容易に再現性のある実験を行うことができるようになった。それゆえ *in vivo* の抗癌剤のスクリーニングシステムとして広く応用されている。しかしながら、生着率は40~50%であり¹⁾、primary screeningの感受性試験という点からみてもまだ多くの問題点をもっているのも事実である。

今回われわれは、大阪府立成人病センター泌尿器科で継代に成功した4株のヒト睾丸腫瘍株を用いて各種抗癌剤および tumor necrosis factor (TNF) の抗癌効果効果を報告するとともに、ヌードマウスを用いた抗癌剤感受性試験の問題点について検討した。

実験材料および方法

1) 実験動物

BALB/c, nu⁺/nu⁺, 雄マウス5~6週齢(日本クレア)を用いた。

2) 実験腫瘍

大阪府立成人病センター泌尿器科にて確立、維持中のヌードマウス可移植ヒト睾丸腫瘍株、TTSC-1,

Table 1. Characteristics of human testicular cancers heterotransplanted in nude mice

Tumor lines	Histology of original tumor	Histology of xenograft	Serial transplantation
TTSC-1	Tca	Tca → E	F ₂₃
TTSC-2	Tca	Tca → E	F ₂₈
TTSC-3	Tca	Tca → E	F ₂₃
TTSC-4	Tca+S+C	Tca	F ₇

Tca : Teratocarcinoma E : Embryonal carcinoma
S Seminoma C : Choriocarcinoma

TTSC-2, TTSC-3 (胎児性癌), TTSC-4 (奇形癌) の4株を用いた²⁾ (Table 1). これらの継代移植率はほぼ100%であった.

3) 実験方法

2~3 mm 角に細切した腫瘍片を 14 G のトラカール針にて、ヌードマウス背部皮下に移植し、推定腫瘍体積が約 500 mm³ に達した時点で無作為に群分けし、1群5匹として薬剤を投与した.

4) 効果判定方法

Houchens ら³⁾の方式に従い、腫瘍径をノギスで測定し、長径×(短径)²×1/2 を推定腫瘍体積 (V) とした. さらに制癌剤投与開始時と投与後計測時の腫瘍の大きさの比を求め、relative tumor volume (RV) とし、さらに Table 2 に示すように T/C 比を求め、42%以下を有効と判定した. これにより腫瘍発育抑制効果を検討した. さらに実験終了時には、腫瘍の HE 染色によって、組織学的検索を行った. なお、抗腫瘍効果の統計学的検討には student's t-test を用いた. P-value はコントロール群に対する実験群判定時における推定腫瘍体積の比較によるものである.

Table 2. Evaluation of antitumor effects

Tumor volume (V) = (width) ² × (length) × 1/2
Relative tumor volume (RV) = Vi/Vo
Vi : mean tumor volume at any given time
Vo : mean tumor volume at initiation of treatment
T/C ratio : ratio of RV for treated mice to RV for control mice, multiplied by 100
(T/C < 42% is evaluated as effective)

5) 制癌剤投与方法

用いた制癌剤は、ビンブラスチン (VBL), ビンクリスチン (VCR), エピポドフィロトキシンの半合成体である VP-16, VM-26, シスプラチン (CDDP), プラチナ誘導体のカルボプラチン (CBDCA, JM-8), イプロプラチン (CHIP, JM-9), DWA2114R, および CDDP, プレオマイシン (BLM) と VBL, VCR, VP-16, VM-26 の併用療法を試みた. その投与量などの詳細は後述する. 投与方法は、4日毎に3回経腹腔的 (IP) に投与し、3週後に判定した.

さらに human recombinant tumor necrosis factor (TNF, 大日本製薬) についても、静脈内投与 (IV) および腫瘍内投与 (IT) の双方について検討した. 投与方法は4日間投与して、6日間休薬を1クールとして、4クール投与後効果判定を行った. IV 群は 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 単位, IT 群は、1,250, 2,500, 5,000, 7,500, 10,000 単位を投与した. 詳細は後述する.

結果と考察

1) ビンカルカロイドおよびポドフィロトキシンの抗腫瘍効果

ビンカルカロイドとして VBL, VCR およびポドフィロトキシンの抗腫瘍効果を Table 3 に示す. 各薬剤の投与量は Table 3 に示すごとくで T/C および生存率からみて、VP-16 がやや有効かという印象をうけるが統計学的有意差は認めなかった. この4剤ではいずれも単剤ではやや有効ではあるが、著明な抗腫瘍効果は望めないといえよう. これらの結果は、Carter⁴⁾ や Issel⁵⁾ のヒト睾丸腫瘍症例に対する各薬剤の単剤投与における臨床成績と一致するものである.

Table 3. Antitumor effects of vinca alkaloids and podophyllotoxins on human testicular cancers heterotransplanted in nude mice

Tumor lines	Drugs	Dose (mg/kg)	T/C (%)	P-value	Survival rate (%)
TTSC-2 F ₅	VM-26	9	20.9	< 0.05	20
	VP-16	18	13.9	< 0.05	100
	VBL	2	5.0	< 0.05	0
TTSC-2 F ₁₃	VM-26	6	30.2	NS	60
	VP-16	12	48.8	NS	100
	VBL	1	33.1	NS	100
TTSC-2 F ₁₄	VM-26	9	32.9	NS	20
	VP-16	18	24.9	NS	100
	VBL	1.5	36.1	NS	20
	VCR	0.15	25.3	NS	100

NS : not statistically significant

2) CDDP+BLM+VBL, VCR, VM-26, VP-16 の多剤併用療法の抗腫瘍効果

CDDP (2.5 mg/kg), プレオマイシン (BLM) と VBL, VCR, VM-26, VP-16 の各薬剤との三者併用療法の抗腫瘍効果を Table 4 に示す. 各薬剤の投与量は Table 4 に示すごとくで、三剤は同時に投与した. TTSC-3 (胎児性癌) の平均腫瘍体積が 500 mm³ で投与開始した群では、T/C は1%前後といずれも著しい抗腫瘍効果を示し、腫瘍はほぼ消失した. また survival rate もすべての群で100%であった. さらに投与開始時期を遅らせ、平均腫瘍体積が 2,400 mm³ で投与を開始してみると、T/C は3.2%~13.7%と 500 mm³ 開始群にくらべ、やや抗腫瘍効果は劣る. これは臨床上でも bulky tumor の PVB 療法の完全奏効率 (CR 率) が、50%前後と minimal tumor の CR 率90%に比べて著しく劣ることと対比しうるものである⁶⁾. いずれにせよ、CDDP と BLM

Table 4. Antitumor effects of combination chemotherapy on human testicular cancers heterotransplanted in nude mice

Tumor lines	Drugs	Dose (mg/kg)	T/C (%)	P-value	Survival rate (%)
TTSC-3 F ₃₀ (500mm ³)	VM-26	10	0.6	< 0.01	100
	VP-16	20	0.6	< 0.01	100
	VBL	1	1.4	< 0.01	100
	VCR	0.1	0.6	< 0.01	100
TTSC-3 F ₃₁ (2400mm ³)	VM-26	10	3.9	< 0.05	100
	VP-16	20	6.0	< 0.05	80
	VBL	1	3.2	< 0.05	100
	VCR	0.1	13.7	< 0.05	100
TTSC-4 F ₁₄ (500mm ³)	VM-26	10	2.6	< 0.05	100
	VP-16	20	3.2	< 0.05	100
	VBL	1	8.8	< 0.05	100
	VCR	0.1	4.5	< 0.05	100

NS not statistically significant

に VM-26, VP-16, VBL, VCR のいずれかの併用による三者併用療法は睾丸腫瘍に対し著しい抗腫瘍効果を示し, これらの結果は臨床的にもいわゆる PVB 療法⁷⁾, VAB-6 療法⁸⁾, BEP 療法⁹⁾, CDDP, BLM, VCR 併用療法¹⁰⁾の完全奏効率が60~80%に達する結果とはほぼ一致するものである。またわれわれの実験結果からみれば, VM-26, VP-16, VBL, VCR のいずれを使用してもその抗腫瘍効果はほぼ同程度であり, 前述の多剤併用療法でもほぼ同程度の治療成績を示している。これらの結果から, 実際の臨床においても VM-26, VP-16, VBL, VCR のいずれの抗癌剤をもちいてもその治療成績はかわらないのではないかと考えられる。それゆえどの抗癌剤を選択するかは, 使いやすさや副作用などの点から検討してゆけばよいと思われる。

次に TTSC-4 (奇形癌) を用いて, 同様の実験を行った。投与開始時の平均腫瘍体積は 500 mm³ であった。結果は Table 4 に示すごとく, 胎児性癌であ



Fig. 1. Histology of TTSC-4 in control group showing teratocarcinoma (HE, x10)

る TTSC-3 の平均腫瘍体積が 2,400 mm³ に近似した抗腫瘍効果を示した。すなわち奇形癌では胎児性癌に比べ抗腫瘍効果は低いといえよう。これを組織学的に検討すると, TTSC-3 では化学療法後の残存腫瘍はほぼ認められないか, また残存腫瘍を認めても壊死組織か線維組織を示すのみであった。しかしながら, TTSC-4 では (control 群の奇形癌の組織像を Fig. 1 に示す), 化学療法後の残存腫瘍が認められ, その組織像は一部では奇形癌の組織像も認められたが



Fig. 2. Histology of TTSC-4 after chemotherapy showing residual cancer and cartilage (HE, x20)



Fig. 3. Histology of TTSC-4 after chemotherapy showing cysts (HE, x10)

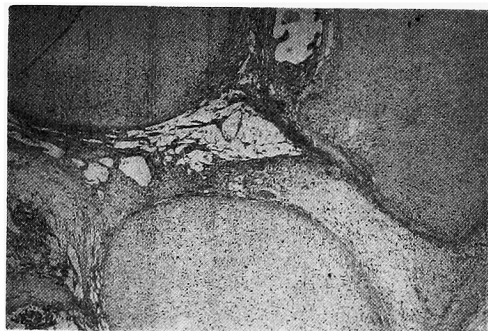


Fig. 4. Histology of TTSC-4 after chemotherapy showing cartilage (HE, x10)

Table 5. Antitumor effects of cisplatin analogues on human testicular cancers heterotransplanted in nude mice

Tumor lines	Drugs	Dose (mg/kg)	T/C (%)	P-value	Survival rate (%)
TTSC-1 F ₁₃	CDDP	6	0.03	< 0.05	100
	CBDCA (JM-8)	50	0.05	< 0.05	100
	CHIP (JM-9)	25	5.4	< 0.05	100
TTSC-2 F ₁₅	CDDP	6	0.01	< 0.05	100
	CBDCA	50	1.02	< 0.05	100
	CHIP	25	0.06	< 0.05	100
TTSC-3 F ₁₂	CDDP	6	0.03	< 0.05	100
	CBDCA	50	0.05	< 0.05	100
	CHIP	25	5.4	< 0.05	100
TTSC-3 F ₂₉	CDDP	6	0.8	< 0.01	100
	CBDCA	60	2.9	< 0.01	100
	CHIP	30	0.6	< 0.01	100
	DWA2114R	60	25.3	< 0.05	100

NS : not statistically significant

(Fig. 2), そのほとんどは嚢胞や (Fig. 3), 軟骨 (Fig. 4) であり, 奇形腫の成分が, 残存腫瘍の成分の主体であることがわかった。これらの結果から奇形腫では化学療法に対する感受性の低い奇形腫の成分が残存するために抗腫瘍効果が胎児性癌に比べ劣ると考えられる。Donohue ら¹¹⁾の化学療法後の残存腫瘍の切除組織検討では 1/3 が壊死又は線維組織, 1/3 が奇形腫, 1/3 が残存癌組織であったと報告しているが, われわれの実験結果と同じ組織型を示しており, この実験系は, ヒト睾丸腫瘍の化学療法モデルとして, 非常に有用であると考えられる。

3) シスプラチンおよびプラチナアナログの抗腫瘍効果

CDDP, CBDCA (JM-8), CHIP (JM-9), DWA 2114R の4種類のプラチナアナログの抗腫瘍効果を比較検討した。腫瘍系, 投与量, T/CなどをTable 5に示す。CDDP, CBDCA, CHIPは今回の実験結果ではほぼ同等の抗腫瘍効果を示した。移植腫瘍はほぼ消失し, 組織型でも残存腫瘍を認めるものは少なかった。しかしながら, TTSC-3, F₂₉の実験結果では, DWA 2114RのT/Cは25.3%であり抗腫瘍効果は認められるものの, 他の3剤のT/C比0.8%, 2.9%, 0.6%に比べ抗腫瘍効果が劣ることが示された。さらにFig. 5に示すように, CDDP, CBDCA, CHIPでは再増殖は認めなかったが, DWA 2114Rでは再増殖を認めた。

以上の結果から, われわれのヒト睾丸腫瘍移植株に対する抗腫瘍効果は, CDDP, CBDCA, CHIPではほぼ同等であるが, DWA 2114Rではやや劣るといえる。

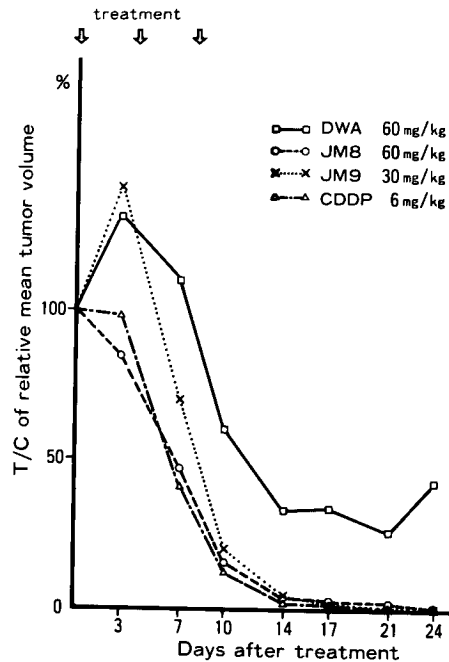


Fig. 5. Response of testicular cancer xenografted on nude mice to DWA2114R, CBDCA, CHIP and CDDP

これらのプラチナアナログのヒト睾丸腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討は現在進行中であり, 臨床的結果と実験結果の比較検討ははまだ適確にはなしていない。

Peckham ら¹²⁾の報告でもヒト睾丸腫瘍症例に対してCDDPとCBDCAではほぼ同等の抗腫瘍効果が得られているようではあるが, 今後さらに検討すべきであると指摘している。

Table 6. Antitumor effects of i.v. administration of TNF on human testicular cancers heterotransplanted in nude mice

Tumor lines	Dose(× 10 ³ U)	T/C (%)	P-value	Survival rate (%)
TTSC-1	2.5	54	NS	80
F ₈	5	59	NS	80
	7.5	31	< 0.01	80
	10	30	NS	57
TTSC-4	2.5	80	NS	100
F ₅	5	74	NS	80
	7.5	35	< 0.01	80
	10	33	NS	50

NS : not statistically significant

Table 7. Antitumor effects of i.t. administration of TNF on human testicular cancers heterotransplanted in nude mice

Tumor lines	Dose(× 10 ³ U)	T/C (%)	P-value	Survival rate (%)
TTSC-1	5	10	< 0.01	100
F ₂₁	7.5	2	< 0.01	100
	10	1	< 0.01	100
TTSC-3	1.25	52	NS	100
F ₃₉	2.5	24	NS	100
	5	14	< 0.05	100
	7.5	6	< 0.05	100
TTSC-4	1.25	74	NS	100
F ₂₀	2.5	81	NS	100
	5	54	NS	100
	7.5	31	< 0.05	100

NS : not statistically significant

4) Human recombinant tumor necrosis factor (TNF) の抗腫瘍効果

TNF の抗腫瘍効果については、静脈内投与 (IV) と腫瘍内投与 (IT) の双方について検討を加えた。TTSC-1 (胎児性癌) と TTSC-4 (奇形癌) の2つの腫瘍系を用い、投与量、T/C などは Table 6 に示すとおりである。

IV 投与群では、7,500単位 (U)、10,000 U で T/C は各々、TTSC-1 が31%、30%、TTSC-4 が35%、33%とやや有効ではあるが、10,000 U では生存率が57%、50%と低くなるため統計学的には7,500 U のみで有意差を認めたとすぎない。それゆえ TNF、IV 群では7,500 U が最も有効な投与量と考えられた。

これらの結果からは、いずれにせよ TNF の IV 投与では満足できる抗腫瘍効果は得られないといえよう。

つぎに IT 投与群の抗腫瘍効果を TTSC-1, 3, 4 で検討、その結果を Table 7 に示す。TTSC-1 では著効を示し7,500 U、10,000 U では腫瘍はほぼ消失し再増殖を認めずほぼ完治の状態であった。TTSC-3

でも7,500 U では T/C、6%と著効を示した。また、いずれも生存率は100%であった。これらの結果から胎児性癌では、TNF の腫瘍内投与は非常に有効であることがわかった。

一方、奇形癌である TTSC-4 では、7,500 U で T/C、31%とやや有効であったにすぎず、前述の胎児性癌の結果と比較すると、その効果は非常に劣るといえる。

組織学的検討では、胎児性癌では腫瘍は壊死組織におきかえられているが、奇形癌では、多剤併用療法 Fig. 2, 3, 4 で示したと同様に奇形癌の成分が残存し、抗腫瘍効果が劣る結果になったと考えられる。これは奇形癌では、その胎児性癌などの成分は TNF に感受性があり消失するが軟骨やのう胞などは TNF に感受性がないため残存するからであろうと考えられる。

以上の結果をまとめると、TNF はヒト辜丸腫瘍移植株に対しては、静脈内投与では有効とはいえないが、腫瘍内投与では非常に有効であるといえよう。それゆえ今後、臨床面での応用は腫瘍内投与を中心に検

討すべきと考えられる。

5) ノードマウスを用いた抗癌剤感受性試験の問題点

まず、臨床で得られる腫瘍のノードマウスへの生着率の低さがあげられよう。一般的に生着率は30~40%とされている^{1,2)}。われわれの睾丸腫瘍の生着率も26%と低率であった。さらに感受性試験の実行可能な安定した増殖を示す、継代株まで移行させるには2~3カ月必要である³⁾。この生着率の低さと、安定した継代株を得るまでに期間がかかるため個々の癌患者の治療に先だって、ノードマウス移植腫瘍を用いた抗癌剤感受性試験の成績を応用することは困難である。すなわち primary screening に用いることは異例な場合を除き難しいといえよう。

ノードマウスを用いた抗癌剤感受性試験の実施方法については、一般的には Battle Columbus Laboratory の方法が行われている⁴⁾。すなわち、推定腫瘍重量 300~400 mm³ で4日ごとに3回投与するというものである。われわれも TNF 投与に関してこの投与方法を行ったが効果が思わしくないため、試行錯誤の後4日間連続投与、6日間休薬という方法に至った。すなわち薬剤によっては投与方法によって効果が異なることがあるため、一つの投与方法で効果がないからといって無効と決めるのは早計であり、他のいく種類かの方法も試みるべきである。

投与経路に関しては、一般的には経腹腔的が簡単なため採用されている。しかしながら TNF のように腫瘍内投与で著効を示すものもあり、経静脈的投与も加え3種の投与方法を試みるべきであろう。

ノードマウスは一匹3,000円~4,000円と高価であり、さらに一般のマウスやラットと異なり通常の飼育施設では飼育は感染症のため難しく、高価な施設が必要である。以上のことからコストパフォーマンスについても議論の余地がある。

今後ノードマウスを用いる抗癌剤感受性試験は secondary screening を中心に、ヒト癌の特性を形態や機能の点から研究するという方向で用いるべきかと考えている。

結 語

ノードマウス移植ヒト睾丸腫瘍を用いて VM-26, VP-16, VBL, VCR, CDDP, CBDCA, CHIP, DWA 2114R, TNF の感受性試験結果を報告するとともに、ノードマウス移植ヒト睾丸腫瘍を用いた抗癌剤感受性試験の問題点を述べた。

稿を終えるにあたり、ご指導をいただいた大阪府立成人病センター、婦人科・澤田益臣先生、同病理・石黒信吾先生に

深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Ovejera AA, Houchens DP and Barker AD: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* **8**: 50-56, 1978
- 2) 三木恒治, 細木 茂, 木内利明, 黒田昌男, 清原久和, 宇佐美道之, 澤田益臣, 古武敏彦: ヒト睾丸胚細胞性腫瘍のノードマウス異種移植の研究. *日泌尿会誌* **79**: 265-273, 1988
- 3) Houchens DP, Ovejera AA, and Baker AD: The therapy of human tumors in athymic (nude) mice. In: *Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research*, pp. 267, Gustav Fisher, New York, 1978
- 4) Carter SK: The management of testicular cancer. In: *Recent results in cancer research 85. Urologic cancer: Chemotherapeutic principles and management*. Edited by Torti, F.M. pp. 70-122, Springer-Verlag, Berlin, 1983
- 5) Issel BF: The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26. *Cancer Chemother Pharmacol* **7**: 73-80, 1982
- 6) 古武敏彦, 三木恒治: 睾丸腫瘍に対する化学療法後の salvage surgery. *癌と化学療法*. **14**: 1671-1679, 1987
- 7) Einhorn LH and Donohue JP: Cisdiamminedichloroplatinum, vinblastine and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Intern Med* **87**: 293-298, 1977
- 8) Vugrin D, Whitmore WF Jr and Golbey RB: VAB-6 combination chemotherapy without maintenance in treatment of disseminated cancer of the testis. *Cancer* **51**: 211-215, 1983
- 9) Peckham MJ, Barret A, Liew KH, Horwick A, Robinson B, Dobbs HJ, McElwain TJ and Hendry WF: The treatment of metastatic germ cell testicular tumors with bleomycin, etoposide and cis-platin (BEP). *Br J Cancer* **47**: 613-619, 1983
- 10) Wattlauffer JN, Feiner AS and Robinson WA: Vincristine, cisplatin, and bleomycin with surgery in the management of advanced metastatic nonseminomatous testis tumors. *Cancer* **53**: 203-209, 1984
- 11) Donohue JP and Rowland RG: The role of surgery in advanced testicular cancer. *Cancer* **54**: 2716-2721, 1984
- 12) Peckham MJ, Horwick A, Drury A and Hendry WF: Cis-diammine, l-cyclobutane dicarboxylase platinum II (carboplatin) in

the treatment of testicular germ-cell tumors:
a preliminary report. *Cancer Treat Rev*
12: 101-110, 1985

ドマウス異種移植の研究—移植成績と移植組織の
性状—. *泌尿紀要* **30**: 1749-1767, 1984

(1988年7月15日受付)

13) 岡田謙一郎, 吉田 修: 尿路性器悪性腫瘍のヌー