

尿路性器癌に対する各種抗癌剤感受性試験の検討

金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 久住治男教授)

打林 忠雄, 久住 治男, 江川 雅之, 浅利 豊紀

小橋 一功, 天野 俊康, 内藤 克輔

金沢大学がん研究所化学療法部 (主任: 佐々木琢磨教授)

佐々木琢磨, 田中 基裕, 遠藤 良夫

CHEMOSENSITIVITY STUDIES OF UROLOGICAL MALIGNANCIES

Tadao UCHIBAYASHI, Haruo HISAZUMI, Masayuki EGAWA,

Toyoki ASARI, Kazunori KOBASHI, Toshiyasu AMANO and Katusuke NAITO

From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director: Prof. H. Hisazumi)

Takuma SASAKI, Motohiro TANAKA and Yoshio ENDO

From the Department of Experimental Therapeutics, Cancer Research Institute, Kanazawa University

(Director: Prof. T. Sasaki)

Chemosensitivity tests to anticancer agents using human tumor clonogenic assay (HTCA), novel dye exclusion method (NDE assay), sub-renal capsule assay (SRCA), and chick embryo method (CE method) were utilized to measure the sensitivity of urological malignancies. Surgical tumor specimens from 67 patients with urological malignancies were subjected to HTCA developed by Hamburger and Salmon. An appreciable growth of colonies was obtained in 20 out of 33 renal cancers, 20 out of 30 urothelial cancers and 1 out of 4 testicular tumors examined and colonial growth adequate for chemosensitivity was obtained in 30 of the 67 patients. More than 70% decrease in the plating efficiency after anticancer drug exposure according to Von Hoff's definition, or more than 1.0 value of the "in vivo -in vitro therapeutic index" in terms of the ratio of IC_{90} to the peak plasma concentration of the drug tested was defined as susceptible. According to Von Hoff's definition, susceptibility to vinblastin (VBL) and cis-dichlorodiammine platinum (CDDP), was seen in 4 out of 11 patients with renal cancer, in 4 out of 15 patients with urothelial cancer and 1 out of 4 patients with renal cancer, respectively. With adriamycin (ADM) it was seen in 3 out of the 15 patients with urothelial cancer, 2 out of 10 patients with renal cancer and 1 patient with testicular tumor. According to TI, susceptibility to VBL was seen in 3 out of 7 patients with renal cancer, and with CDDP it was seen in 2 out of 12 patients with urothelial cancer, and 1 out of 2 patients with renal cancer. The NDE assay was utilized to measure the sensitivity of a total of 79 urological malignancies including 33 urothelial carcinomas, 29 renal cell carcinomas, 13 testicular tumors, and 4 Wilms' tumors. The cell survival rate of 30% or less in this assay was defined as "sensitive". Sufficient cell survival for the NDE assay was obtained in 22 out of 33 urothelial carcinomas, 21 out of 29 renal cell carcinomas, and 8 out of 13 testicular tumors, 2 out of 15 urothelial carcinomas were susceptible to ADM, 6 out of 22 urothelial carcinomas to CDDP, and 1 out of 18 urothelial carcinomas to carboquone. In renal cell carcinomas, susceptibility to ADM, VBL and Interferon alpha were seen in 3 out of 13 patients, 1 out of 17 patients, and 3 out of 5 patients. Chemosensitivity testing using subrenal capsule assay was performed in 33 bladder tumors. An evaluation of the results obtained was possible in 32 out of the 33 bladder tumors. The B16-F10 melanoma, the KK-47 cell line derived from a transitional cell carcinoma of the bladder and surgical specimens from 14 urological malignancies were subjected to a chick embryo method. The effects of intravascularly injected anticancer agents in combination with or without hyperthermia were investigated. A combined use of hyperthermia and CDDP, cyclophosphamide (CY) or ADM demonstrated a significantly high tumor regression rate in B16-F10 grafts. In KK-47 grafts, a single use of CY and a combined use of hyperthermia and CY exhibited a highly significant anticancer regression. Growth adequate for sensitivity test was obtained in 11 of the 14 malignancies.

These data suggest that chemosensitivity may be potentially useful for choosing the most effective drug.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1873-1878, 1988)

Key words: Human tumor clonogenic assay, Novel dye exclusion method, Subrenal capsule assay, Chick embryo method

緒 言

初代培養細胞または初代移植腫瘍を用いた各種抗癌剤の感受性試験は、これまでに *in vivo*, *in vitro* のいずれにおいても種々の方法が報告されている。これらのうち1977年 Salmon および Hamburger により開発された human tumor clonogenic assay¹⁻³⁾ は臨床効果との相関性が高いことから、現在広く臨床応用されている。当教室でもこの assay を中心に、各種抗癌剤感受性試験の検討を行っており、今回著者はこれらの assay の特徴および問題点につき若干の文献的考察を加え報告する。

材料および方法

材料

金沢大学医学部附属病院泌尿器科および関連病院で外科的に摘出された尿路性器悪性腫瘍組織を用いた。

実験方法

すべての手術材料は滅菌ガーゼに被覆し、当施設に集められた。当施設で行っている抗癌剤感受性試験法は Table 1 に示す4つの assay である。

Table 1. Chemosensitivity testings employed

- | |
|-------------------------------------------|
| 1. Human Tumor Clonogenic Assay (HTCA) |
| 2. Novel Dye Exclusion Method (NDE assay) |
| 3. Subrenal Capsule Assay (SRCA) |
| 4. Chick Embryo Method |

I. human tumor clonogenic assay (HTCA)

既報のごとく⁴⁾、摘出材料を無菌的に酵素処理し $12.5 \sim 25.0 \times 10^4$ cells/ml 濃度の単離細胞浮遊液を作製する。各種抗癌剤を培養液にて各段階濃度に希釈後、 37°C にて1時間薬剤処理を行う。ついで2層軟寒天培地の culture layer に処理後の細胞を播種し、2~4週間、 37°C , 7% CO_2 -air incubator 中で培養し、軟寒天培地中に増殖してくるコロニーを算定した。倒立顕微鏡下に50個以上の細胞集団をコロニーと判定した。処理薬剤濃度は臨床常用投与量における最高血中濃度、その1/10濃度および10倍濃度を用いた。

感受性判定法

1. colony inhibition rate (IR) を Fig. 1 により算出し、Von Hoff らの判定基準に準じ70%以上の

Colony Inhibition Rate (%)

$$= \left(1 - \frac{\text{薬剤処理群のコロニー数}}{\text{コントロール群のコロニー数}} \right) \times 100$$

Fig. 1. Calculation of colony inhibition rate

IR を示す場合を感受性ありと判定する。

2. 3濃度薬剤処理によりえられた dose response curve より90%発育阻止濃度 IC_{90} を算出し、臨床常用投与量における最高血中濃度との比を *in vivo-in vitro* therapeutic index (TI) とし、1.0以上の値がえられた場合を有感受性と判定する。

II. novel dye exclusion method (NDE assay)

既報のごとく⁵⁾、HTCA と同様の操作により 15×10^4 cells/ml の細胞浮遊液を作製後、1時間抗癌剤処理を行う。ついで新鮮培養液にて洗浄したのち、polypropylene 製 Falcon 2005 tube に1ml あて注入し、 37°C , 95% CO_2 -air incubator 中で4日間培養を行う。2% Fast green (Sigma) 染色後、浮遊細胞収集装置(トミー精工)にて遠心し、スライドガラス上に腫瘍細胞を固定する。対比染色として hematoxylin eosin 染色を行い、光顕的に300個以上の細胞について Fast green により緑染された死細胞、HE 染色によりピンク色に染色された生細胞を計測し、コントロール群と比較した。コントロール群と比較し、腫瘍細胞の生残率が70%以上抑制された場合に感受性ありと判定した (Fig. 2)。

III. subrenal capsule assay (SRCA)

Bogden らの方法に準じ、摘出材料を約 1 mm^3 に細切後、実体顕微鏡下に CDF₁ マウスの腎被膜下へ移植し、翌日抗癌剤を投与する。移植時および移植6日目に実体顕微鏡下で腫瘍の長径と短径を計測し、直径+短径/2を腫瘍増殖度として算出する。この値により抗癌剤の殺細胞効果の判定を行う⁶⁾。

IV. chick embryo method (CE method)

Fig. 3のごとく、孵卵10日目の受精鶏卵漿尿膜上に腫瘍片または腫瘍細胞を移植し、3日間、 37°C にて保温する。ついで漿尿膜内の血管内に抗癌剤を投与後さらに4日間保温し、腫瘍塊を摘出して重量測定を行う。コントロール群との重量比を腫瘍発育阻止率 (Inhibition rate:IR) とし、推計学的検定により感受

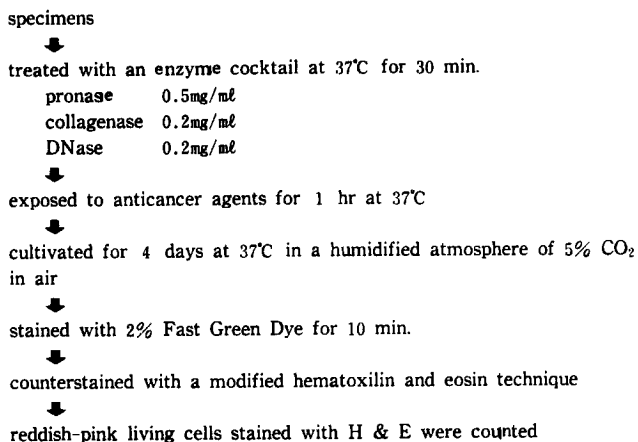


Fig. 2. Procedure of NDE method

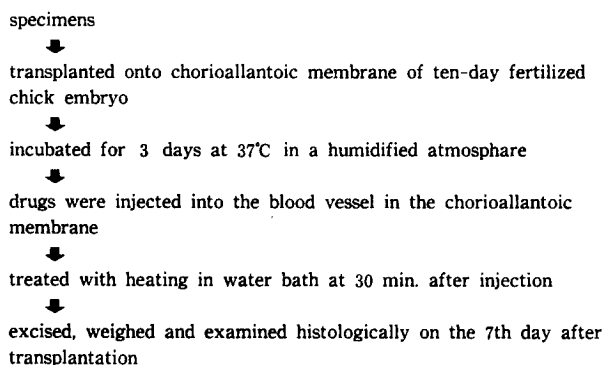


Fig. 3. Procedure of chick embryo method

Table 2. Growth of primary tumor cells

Type of tumor	Na of tumors put in culture	Growth	Incidence of colonial growth adequate for cherosensitivity
Renal	33	20 (61%)	13 (39%)
Urothelial	30	20 (67%)	16 (53%)
Renal pelvis	5	3 (60%)	2 (40%)
Ureter	8	5 (63%)	4 (50%)
Bladder	17	12 (71%)	10 (59%)
Testicular	4	1 (25%)	1 (25%)
Total	67	41 (61%)	30 (45%)

性を判定する。さらに判定時に得られた組織について病理組織学的にも検討を行った。

結 果

1. これまで67症例に対し, HTCA を用いた抗癌剤感受性試験を施行し, 67例中30例 (45%) において感受性判定の評価が可能であった (Table 2). これら感受性可能症例について検討してみると, Von

Hoff らの判定法で試験薬剤のすべてが resistant であっても, TI 値により有効性の期待できる薬剤がある程度予測することが可能となる. つまり Von Hoff らの判定基準では, sensitive または resistant のいずれかの結果のみしか得られない. しかし症例によっては試験薬剤がすべて resistant であるが抗癌化学療法に頼らざるをえない場合があり, その際 TI 値を参考にする, 各薬剤の TI 値が 1.0 に近いものは臨

Table 3. Assay success rate in novel dye exclusion method

Type of tumor	Specimens studied	Assay successful (%)
Renal	29	21 (72.4%)
Urothelial	33	22 (66.7%)
Testicular	13	8 (61.5%)
wilms'	4	0 (0.0%)
Total	79	51 (64.6%)

Table 4. A comparison of the results obtained by the chemosensitivity tests

Tumor type	Drug						
	ADR	CDDP	CQ	THP	VBL	IFN- α	
RCC ^{b)}	R/R				R/R		
RCC	R/R				R/R		
RCC	R/R				R/R	R/S	
RCC		R/R			R/R		
TCC ^{c)}	R/S	R/S	R/R				
TCC	R/R	R/S	R/R				
TCC	R/R	R/R	R/R				
TCC	R/R	S/R	S/R				
TCC		R/S	R/R	R/R			
TCC		R/R	R/R	R/R			
TCC	R/R	R/R	R/R				
TCC	R/R	R/R	R/R				
TCC	R/S	R/R					
TCC		R/R					

a) HTC assay / NDE assay

b) Renal cell carcinoma

c) Urothelial transitional cell carcinoma

S : Sensitive

R : Resistant

床常用量における最高血中濃度が IC_{90} に近似していることから、これらの薬剤の臨床応用に際し得られる効果は十分に期待しえるものと予想される。

2. NDE assay の成績についてみると、79例中51

例 (64.6%) において薬剤感受性の評価が可能であった (Table 3). 組織型別の検討では、腎細胞癌で29例中21例 (72.4%) に評価可能であり最も高値がえられた。HTCA および NDE assay 同時施行例の結果は Table 4 に示すごとく、両感受性試験とも有感受性を示した症例は認められず、4症例において異なる結果がえられた。

3. SRCA を施行した結果、33例中32例 (97.0%) において薬剤感受性評価が可能であった。この assay の結果に基づき臨床応用し、良好な成績がえられた1例を供覧する。症例は grade III の左尿管移行上皮癌で、腹部大動脈周囲および左鎖骨上リンパ節転移が認められ、左鎖骨上リンパ節生検材料を用いて SRCA を行った。その結果 adriamycin および methotrexate に有感受性を認め (Fig. 4)、この2剤を用いた併用抗癌化学療法を行った。3コース終了後には左鎖骨上リンパ節転移巣は消失し、4コース終了後には腹部大動脈周囲リンパ節は90%、原発巣においても50%の縮小がえられ、左腎尿管全摘除術および腹部リンパ節郭清術が施行された。

4. CE method による温熱・抗癌剤併用効果の検討を、継代培養細胞株 (B16-F10 メラノーマ、ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47) および臨床材料14例につき行った。その結果 B16-F10 メラノーマでは adriamycin 単独処理群および adriamycin+温熱、cisplatinum+温熱、cyclophosphamide+温熱併用群において有意に高い腫瘍発育阻止率が得られ、KK-47 では cyclophosphamide 単独、cyclophosphamide+温熱処理群で同様に有意に高い腫瘍発育阻止が認められた。臨床材料を用いた検討では14例中11例 (79%)

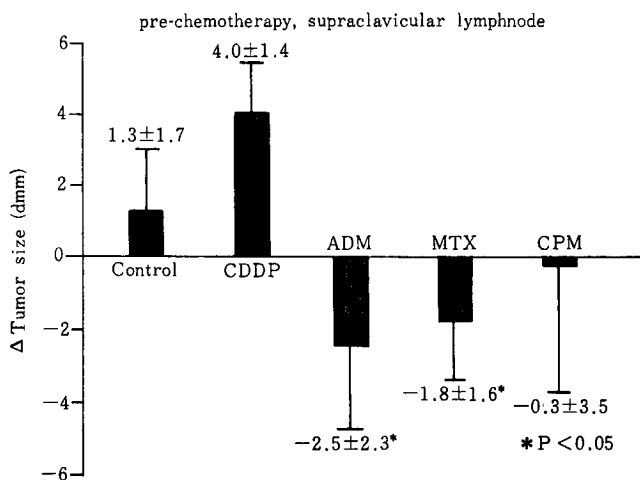


Fig. 4. Change in tumor size transplanted in subrenal capsule

において感受性試験の評価が可能であった。推計学的処理により得られた結果につき、組織学的にも同時に検討したところ、対照群での腫瘍増大がみられた症例に関しては両群間に相関性が認められた。しかし対照群で判定時に腫瘍縮小が認められた症例においては、組織学的にも壊死性変化を生じていた。今後判定時における組織学的判定を併用することにより、より正確な感受性判定結果が得られるものと考えられる。

考 察

初代培養細胞を用いた抗癌剤感受性試験として当教室では1977年 Salmon and Hamburger により開発された 1. human tumor clonogenic assay, Weisenthalら^{7,8)}により発表された 2. novel dye exclusion method, Bogdenら⁹⁻¹¹⁾により報告された 3. subrenal capsule assay および 1912年 Murphy により報告され¹²⁾、その後感受性試験として開発された 4. chick embryo method を施行してきた。これらの感受性試験はいずれも長所およびいくつかの問題点があり、最良の感受性試験法を決定し得ないのが現状である。HTCA は先に述べたように、この方法により得られた結果と臨床効果との相関性が高いといわれており、1. clone 形成能のある細胞における薬剤感受性をみるのが可能である、2. 初代培養であり、存在する細胞構成が採取材料と類似している、3. 従来の培養法に比べ、高いコロニー形成率を得ることが可能である、4. 軟寒天培地を用いることにより、fibroblast や lymphocyte の発育を抑制し clone 形成能を有する腫瘍細胞の発育を知ることが可能である、5. TI 値を用いることにより、ある程度有効性の期待できる薬剤の選択が可能である、といった点の特徴としてあげられている。しかし一方では、1. 判定結果がえられるまでに2~4週間を要する、2. コロニー形成率が予想したほど高くない、3. single cell より形成されたコロニーか、それとも cell aggregate より形成されたのか鑑別が困難である^{13,14)}、4. 感受性可能症例が予想されたほど高くない、といった問題点が指摘されている。これに対し NDE assay では、1. HTCA に比較し、短期間に結果がえられる、2. 永久標本を得ることができる、3. 腫瘍細胞とそうでないものの鑑別が容易である、といった特徴があるが、一方、1. reproductive death をもたらす薬剤においては抗癌剤感受性を underestimate する傾向にある、2. damage を受けた細胞が正常機能を失うまでに4日以上を要する場合、同様その薬剤感受性を underestimate することになる点

が問題とされている。HTCA に対し近年 ³H-TdR incorporation assay の評価も行われており¹⁵⁾、その有用性については今後の検討結果を待たざるをえない。SRCA に関しては、1. 操作が比較的簡単で、短期間に判定可能である、2. 組織の生着率が高く、少ない臨床材料で試験可能である、3. 通常の CDF₁ マウスを用いて施行可能であり、特殊な飼育設備を必要としない、4. ノードマウスを用いる背部皮下移植法に比較し、明らかに安価である、5. *in vivo* での実験系であることから masked compound を含む薬剤の評価も可能であるといえる。しかし、この方法にも問題が残されており、その1つとしてマウスにより生ずる宿主反応の問題がある。移植腫瘍を組織学的に検討してみると、移植4~6日目に高度の細胞浸潤が認められており、現在行われている day 6 すなわち細胞浸潤の著明な時期に腫瘍サイズまたは容量等の変化により腫瘍増殖度を判定することは、このような理由から妥当ではないと考えられる。第2の問題点としては抗癌剤投与開始時期があげられる。つまり移植後早期に抗癌剤を投与することは、いまだ血管新生のない移植片の着床を単に妨げているだけの可能性があり、抗癌剤の直接的殺細胞効果による腫瘍縮小を判定していないとする意見もある。今後はこのような意味から投与薬剤の腫瘍内での薬物動態に関する検討が、是非必要であると考えられる。しかしながら HTCA, NDE assay に比べ本法による薬剤感受性の評価は33例中32例(97%)において可能であったことから、これらの問題点を解決することにより今後広く臨床応用される可能性のある assay の1つと考えられる。CE method は Murphy が腫瘍組織の鶏卵漿膜上への移植に成功したことに着目し、佐々木らが抗癌剤感受性試験として開発したもので¹⁶⁻¹⁸⁾、1. 簡便、安価でかつ迅速に結果が得られ、2. 生着率が高く、3. 凍結保存材料でもくり返し利用でき、さらに 4. prodrug を含む薬剤の感受性試験も行いえる、などの条件を満たす可能性が高い assay であると述べている。SRCA との比較検討の意味からも、今後さらに検討されその有効性が期待し得る感受性試験と考えられる。

以上のごとく、今回著者は当教室で行っている抗癌剤感受性試験を中心に検討を行ったが、いずれの方法も種々の問題点をかかえており、今後症例を重ね検討してゆく必要があると考えられる。現在のところ特殊な培養技術、飼育施設を必要としない点、温熱治療を含む抗癌剤感受性試験が可能であり、さらに安価で短期間で結果が得られることから、CE method により得られた結果を第一に臨床応用し、同時に基礎的研究

の推進を考慮中である。

文 献

- 1) Hamburger A and Salmon SE: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* **60**: 846-854, 1977
- 2) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human stem cells. *Science* **197**: 461-463, 1977
- 3) Von Hoff DD, Casper J, Bradley E, Sandbach J and Makuch R: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* **70**: 1027-1032, 1981
- 4) 打林忠雄, 久住治男, 浅利豊紀, 小橋一功, 天野俊康, 内藤克輔: 尿路悪性腫瘍における human tumor clonogenic assay を用いた抗癌剤感受性試験の検討. *泌尿紀要* **33**: 1575-1580, 1987
- 5) 内藤克輔, 久住治男, 浅利豊紀, 小橋一功, 天野俊康, 打林忠雄: 尿路上皮悪性腫瘍における抗癌剤感受性試験-human tumor clonogenic assay を中心として-. *泌尿紀要* **32**: 1959-1966, 1986
- 6) 小橋一功, 長野賢一, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男: Adriamycin と Methotrexate の併用療法が有効であった進行性尿管移行上皮癌の一例-subrenal capsule assay の臨床応用例-. *癌と化学療法* **14**: 3359-3363, 1987
- 7) Weisenthal LM, Dill PL, Kurnick NB and Lippman ME: Comparison of dye exclusion assays with a clonogenic assay in the determination of drug-induced cytotoxicity. *Cancer Res* **43**: 258-264, 1983
- 8) Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL and Macaluso GK: A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. *Cancer Res* **43**: 749-757, 1983
- 9) Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR and Esber HJ: A rapid screening method for testing chemotherapeutic agents against human xenografts. In: *Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research*, pp. 231-250, Gustav Fisher, New York, 1978
- 10) Griffin TW, Bogden AE, Reich SD, Anotocelli D, Hunter RE, Award A, YUDT, Greene HL and Costanza ME: Initial clinical trials of subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. *Cancer* **52**: 2185-2192, 1983
- 11) Bogden AE and Von Hoji DD: Comparison of the human tumor cloning and subrenal capsule assays. *Cancer Res* **44**: 1087-1090, 1984
- 12) Murphy JB: Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *J Am Med Assoc* **59**: 874-875, 1912
- 13) Liebe M M: In vitro culture and chemotherapy sensitivity testing of human transitional cell carcinoma. *Urol Clin North Am* **11**: 725-733, 1984
- 14) Agrez MV, Kovach JS and Lieber MM: Cell aggregates in soft human tumour stem-cell assay. *Br J Cancer* **46**: 880-887, 1982
- 15) Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y and Morton DL: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* **42**: 2159-2164, 1982
- 16) 佐々木琢磨: 鶏卵法の抗癌剤感受性試験への応用. *実験医学* **5**: 562-564, 1987
- 17) 佐々木琢磨: 鶏卵漿尿膜上のヒト癌に対する抗癌剤感受性試験. *病態生理* **6**: 31-32, 1987
- 18) Uchida H, Sasaki T, Tanaka M, Endo Y, Nitta K, Nisikawa K, Chuman H, Fukuma H and Matsumoto K: Response to antitumor agents of murine transplantable tumors implanted onto chorioallantoic membrane of chick embryo. *Jpn J Cancer Res* **78**: 729-736, 1987

(1988年7月19日受付)