

Human tumor colony forming assay による 抗癌剤感受性試験について

京都大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 吉田 修教授)

金丸 洋史, 橋村 孝幸, 笥 善行

李 南 奎*, 吉 田 修

IN VITRO CHEMOSENSITIVITY TEST BY HUMAN TUMOR COLONY FORMING ASSAY

Hiroshi KANAMARU, Takayuki HASHIMURA, Yoshiyuki KAKEHI,
Lee Nam Kyu and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director : Prof. O. Yoshida)

In vitro chemosensitivity of urological cancers was assessed by a human tumor colony forming assay (HTCA) and a ^3H -thymidine incorporation assay. Primary tumor cells from 160 of 253 (63%) urological cancers showed adequate colony growth (>30 colonies per well), and there was a 57% true positive and 100% true negative rate for predicting clinical response of anticancer agents. On the other hand, cells from 37 of 45 (82%) urologic cancers incorporated a sufficient amount of ^3H -thymidine (>300 cpm). However, when the positive control drug (chromomycin A3 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was used for the assay quality control, the successful assay rate of the HTCA (38%) was lower than that of the ^3H -thymidine incorporation assay (75%), while there was a significant correlation in drug sensitivities between the two assays. Thus, the ^3H -thymidine incorporation assay seemed to be more useful than the HTCA for evaluating the chemosensitivity of urologic cancers.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1917-1921, 1988)

Key words: Urological cancer, Chemosensitivity test, Human tumor colony forming assay, ^3H -thymidine incorporation assay

緒 言

Human tumor colony forming assay (HTCA) は Salmon および Hamburger¹⁾ によって開発され、初代培養細胞を用いた *in vitro* 抗癌剤感受性試験として広く用いられてきた。今回、当教室で施行した泌尿器科悪性腫瘍に対する HTCA の成績を報告するとともに、HTCA における問題点の検討、およびその改良法としての [^3H] サイミジン取り込み試験と HTCA との比較を行い、今後の抗癌剤感受性試験の展望について検討した。

材料および方法

1) 腫瘍組織 : 1982年8月から1987年10月の間に京都

大学医学部付属病院泌尿器科および関連病院において、手術・生検によって得た悪性腫瘍組織を用いた。

2) 腫瘍細胞浮遊液の作成 : 腫瘍を細切後、0.14% コラゲナーゼ (Sigma) および0.03% DNase (Sigma) よりなる酵素液にて1時間 37°C で消化し、滅菌ガーゼを通したのち、0.03% DNase で再度処理した。遠心後、細胞を15% ウシ胎児血清 (FCS; Flow) 添加 MEM 培養液 (Flow) に浮遊させ、26G 注射針、60 μm ナイロンメッシュを通し単離細胞浮遊液を得た。腫瘍細胞数はトリパンプル法にて生細胞数を算定した。

3) Human tumor colony forming assay (HTCA) : Salmon らの方法に準じて以下のごとく行った^{1,2)}。15% FCS 添加 MEM に Bacto-Agar (Difco) を混合して0.5% agar 液を作成し、35 $\times$ 10 mm プラスチック皿 (Linbro 76-247-05) に1 ml

* 現 : 順天郷大学医学部泌尿器科

注入し、下層とした。続いて腫瘍細胞浮遊液に Bac-to-Agar を混合して 0.3% agar 液とし、1 ml を 0.5% agar の上層に播種した。腫瘍細胞数は最終的に $5 \times 10^6/\text{m}$ になるように調整した。37°C 5% CO₂ の条件下で 2 週間培養後、50 μm 以上のコロニーを automatic particle counter CP-2000 (白井松器械) にて計測した。抗癌剤非治療群のコロニー数が 30 個以上の場合、感受性評価可能とした。また、コロニー形成率 (plating efficiency) は、コロニー数/播種細胞数 $\times 100(\%)$ で計算した。

なお、[³H] サイミジン取り込み試験との比較の際には、さらに positive control drug としてクロモマイシン A3 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を使用し、クロモマイシン A3 にて 80% 以上のコロニー形成抑制を示した場合のみ、感受性評価可能とした。

4) [³H] サイミジン取り込み試験: Friedman らの方法に準じて以下のごとく行った³⁻⁵⁾。HTCA と同様に作成した 0.5% agar 下層の上層に、腫瘍細胞浮遊液 1 ml ($5 \times 10^6/\text{ml}$) を播種し、4 日間培養後、2.5 μCi の [メチル-³H] サイミジン (NEN) を加え、さらに 24 時間培養後、腫瘍細胞を含む上層を回収した。細胞を磷酸緩衝食塩水で洗浄後、5% トリクロル

酢酸を加えて得られた酸不溶分画を、水酸化メチルペンゼトニウム 0.5 ml に溶解し、これをアクアゾール-2 (NEN) 4 ml と混合し、シンチレーションカウンタ (Aloka) にて放射活性を計測した。抗癌剤非治療群のサイミジン取り込みが 300 cpm 以上で、クロモマイシン A3 により 80% 以上のサイミジン取り込み抑制が得られた場合、感受性評価可能とした。

5) 抗癌剤感受性判定: 各種抗癌剤を、臨床常用量投与時の人体血中最高濃度に相当する濃度⁶⁾ で培養上層内に混入し、培養終了時まで腫瘍細胞と持続接触させた。薬剤接触によって非治療群の 70% 以上のコロニー形成 (あるいはサイミジン取り込み) の抑制が得られた場合、薬剤感受性ありと判定した。

結 果

1) HTCA の評価可能率 泌尿器科悪性腫瘍 253 検体に対して HTCA を行った結果 (Table 1), 感受性判定に必要な 30 個以上のコロニーを形成したものは 160 例 (63%) であり、腫瘍別では腎癌の評価可能率 (70%) が最も高かった。コロニー数、コロニー形成率は腫瘍の種類によって有意な差を認めなかった。

2) HTCA による薬剤感受性: 各種抗癌剤に対する

Table 1. Results of HTCA in urologic malignancies

Tumor type	Successful assays (%)	Colony No.	Plating Efficiency
Renal	68/97 (70)	138 $\pm$ 124	0.039 $\pm$ 0.038
Uroepithelial	72/122 (59)	110 $\pm$ 122	0.038 $\pm$ 0.043
Prostate	10/18 (56)	151 $\pm$ 152	0.057 $\pm$ 0.050
Testis	10/16 (63)	121 $\pm$ 124	0.026 $\pm$ 0.033
Overall	160/253 (63)	126 $\pm$ 126	0.040 $\pm$ 0.042

Table 2. In vitro sensitivities of urologic malignancies to antitumor agents in HTCA

Drug	Sensitive in vitro / No. tested (Sensitivity rate %)			
	Renal	Uroepithelial	Prostate	Testis
MMC	8/25 (32)	9/37 (24)	0/1 (0)	0/1 (0)
5-FU	7/26 (27)	1/21 (5)	0/3 (0)	
CDDP	4/27 (15)	8/48 (17)	0/6 (0)	5/9 (56)
ADR	1/14 (7)	2/28 (7)	0/2 (0)	0/1 (0)
BLM	3/18 (18)	1/23 (4)	1/7 (14)	2/8 (25)
VCR	1/20 (5)	2/17 (12)	0/2 (0)	0/4 (0)
VBL	0/11 (0)	0/6 (0)	0/2 (0)	1/5 (20)
VP16	0/8 (0)	0/11 (0)		1/4 (25)
IFN	2/16 (13)			
MTX	0/6 (0)	0/1 (0)		
ACTD				2/5 (40)
Overall	26/171 (15)	23/192 (12)	1/23 (4)	11/37 (30)

HTCA による感受性結果を Table 2 に示す. 延べ 423 の薬剤に対して, 61 (14%) の薬剤が感受性陽性であった. 腫瘍別にみると, 精巣腫瘍が感受性陽性率が30%で最も高く, 前立腺癌が4%と最も低かった. 3) HTCA と臨床効果との相関: HTCA の結果と臨床での治療効果の比較が可能であった12例について検討した (Table 3). HTCA で感受性のあった7薬剤中, 臨床でも有効であったのは4剤 (true positive rate 57%), また HTCA で感受性のなかった5剤は臨床でもすべて無効であった (true negative rate

Table 3. Correlation between in vitro sensitivity and clinical response to chemotherapy

No. of trials	S/S*	S/R	R/S	R/R
12	4	3	0	5

*in vitro response(HTCA) / clinical response

S:sensitive	R:resistant
True positive rate	4/7 (57%)
True negative rate	5/5 (100%)

Table 4. Comparison of ^3H -thymidine incorporation assay and colony forming assay in urologic malignancies

Tumor type	No. of assays	Successful assays*	
		Thymidine	Colony
Renal	10	7	3
Uroepithelial	4	3	2
Testicular	1	1	0
Other	1	1	1
Overall	16	12 (75 %)	6 (38 %)

* >80% inhibition of ^3H -thymidine uptake or colony growth by positive control drug.

Table 5. Comparison of drug sensitivities between ^3H -thymidine incorporation and colony forming assay

	Inhibition of colony growth		
		<70%	>70%
	Inhibition of thymidine uptake		
	<70%	9	4
	>70%	3	16

* $P < 0.01$ (χ^2 test)

100%).

4) HTCA と [^3H] サイミジン取り込み試験の比較: 同一検体に対して HTCA と [^3H] サイミジン取り込み試験の両者を施行できた16例について, positive control drug を使用して, 評価可能率の比較を行った (Table 4). その結果, [^3H] サイミジン取り込み試験での評価可能率は75%であったのに対し, HTCA の評価可能率は38%と低かった.

Table 6. Results of ^3H -thymidine incorporation assay in urologic malignancies

Tumor type	No. of assays	Successful assays(%)
Renal	29	25 (86)
Uroepithelial	10	6 (60)
Testis	6	6 (100)
Overall	45	37 (82)

さらに, この16例中, 二種類の感受性試験が同時に評価可能であった6例における, 抗癌剤感受性の一致率について検討した (Table 5). 6症例32薬剤による, コロニー形成抑制とサイミジン取り込み抑制の関係をみると, 両者とも感受性陽性, あるいは両者とも陰性であったのは32剤中25剤で, 有意の相関を示した ($P < 0.01$).

5) [^3H] サイミジン取り込み試験の評価可能率: 上

Table 7. In vitro sensitivities of urologic malignancies to antitumor agents in ^3H -thymidine incorporation assay

Drug	Sensitive in vitro / No. tested (%)		
	Renal	Uroepithelial	Testis
ADR	11/21 (52)	4/6 (67)	2/5 (40)
CDDP	10/18 (56)	6/6 (100)	5/7 (71)
VBL	2/25 (8)	4/5 (80)	3/5 (60)
MMC	10/13 (77)	2/2 (100)	1/1 (100)
Overall	33/77 (43)	16/19 (84)	11/18 (61)

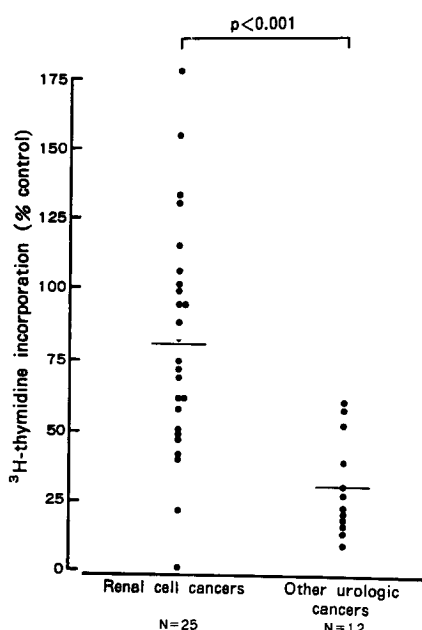


Fig. 1. Comparison of in vitro sensitivity to vinblastine between renal cell cancers and other urologic malignancies

記の結果に基づき、45検体に対して positive control drug を使用しつつ、 ^3H サイミジン取り込み試験を行った (Table 6)。その結果、37例 (82%) が評価可能であった。

6) ^3H サイミジン取り込み試験における抗癌剤感受性：各種抗癌剤に対する、 ^3H サイミジン取り込み試験による感受性結果を Table 7 に示す。HTCA の結果と比較して、全体的に感受性陽性率が高いが、その中で腎癌の感受性が比較的低く、特にビンブラスチンに対する感受性が低い点が特徴的であった。そこで、腎癌とその他の泌尿器科癌のビンブラスチンに対する感受性 (サイミジン取り込み率；% of control)

を比較すると、腎癌において有意なビンブラスチンへの低感受性が認められた (Fig. 1)。

考 察

HTCA は、初代培養細胞を用いた種々の *in vitro* の抗癌剤感受性試験のなかで、これまで最も広く用いられてきた検査法といえる。HTCA の結果と臨床効果との相関についての報告も多く、true positive rate 90%前後、true negative rate 60%前後と、ほぼ一致した結果が示されている⁷⁾。今回のわれわれの泌尿器科悪性腫瘍に対する HTCA の成績においても、これに類似した臨床相関が得られた。腫瘍別の感受性も、Sarosdy ら⁸⁾の報告と同様に、精巣腫瘍で最も感受性陽性率が高く、前立腺癌で最も低いという、臨床での化学療法の奏効率と類似した傾向を示した。

このように、HTCA の抗癌剤感受性結果と臨床効果との相関については、比較的定まった評価があると言えるが、HTCA が臨床でのルーチン検査として利用されるまでには至っていない。その理由として、培養成功率の低さ (30~60%)、培養期間の長さ (2, 3 週間)、コロニー算定の難しさなどの問題点があげられる⁹⁾。

これらの問題点を克服する試みとして、谷川ら¹⁰⁾や Friedman ら⁹⁾は、HTCA を改良した ^3H サイミジン取り込み試験を開発し、また一方では、感受性試験の精度を高めるために、positive control drug を用いた quality control の導入が提唱されてきた¹¹⁾。

そこで今回、われわれも positive control drug を使用して、HTCA と ^3H サイミジン取り込み試験の比較を行った。その結果、同一検体 (16例) において、 ^3H サイミジン取り込み試験の評価可能率は 75%であったのに対して、HTCA の評価可能率は 38%と低かった。これは、positive control drug を使用しなかった、従来のわれわれの HTCA の成績 (評価可能率 63%) と比べても低い結果であった。一方、この二つの感受性試験が同時に評価可能であった症例では、両者の抗癌剤感受性はよく相関していた。

以上から、positive control drug による quality control を行った場合、HTCA と ^3H サイミジン取り込み試験は互いに相関した感受性結果を示すが、HTCA の評価可能率は低く、迅速さ、手技の簡便さなどを併せ考えると、現時点では ^3H サイミジン取り込み試験の方が HTCA より有用性が高いと考えた。

この結果に基づき、泌尿器科悪性腫瘍 45 検体に対して ^3H サイミジン取り込み試験を行ったが、pos-

itive control drug を使用しても, 高い評価可能率 (82%) が得られた。

[³H]-サイミジン取り込み試験による抗癌剤感受性結果をみると, HTCA の成績と比較して, 全体として感受性陽性率が高い傾向が認められた。Sondak ら¹²⁾も同様の結果を報告し, HTCA より false positive rate が高いことを指摘している。従って, 良好な臨床効果との相関を得るために, *in vitro* での抗癌剤の適正な濃度設定について, 今後の検討が必要と考えられた。

一方, [³H]-サイミジン取り込み試験によるビンブラスチンに対する感受性をみると, 腎癌が他の泌尿器科癌と比較して有意に低感受性であった点は興味深い。最近, ビンカルカロイドを中心とした抗癌剤の多剤耐性機序に関する研究の結果, MDR1 遺伝子によってコードされる P 糖蛋白が多剤耐性細胞で多く産生され, 細胞膜において, 抗癌剤の細胞外排出に関与していることが明らかとなった¹³⁾。そこでわれわれは, 腎癌を含めた各種悪性腫瘍における, MDR1 遺伝子の発現の有無につき検討し, 腎癌において MDR1 遺伝子が有意に高く発現していることを報告した⁵⁾。さらに, MDR1 mRNA 量と [³H]-サイミジン取り込み試験による抗癌剤感受性との関係を検討した結果, MDR1 mRNA レベルとビンブラスチンに対する感受性に有意な負の相関を認め, 腎癌の抗癌剤自然耐性機序として MDR1 遺伝子が関与している可能性を指摘した。

従って, 今後の抗癌剤感受性検査の展望として, 既存の抗癌剤による, 臨床効果との相関性を改善する努力を続けるとともに, 前述の MDR1 遺伝子に関連した多剤耐性を克服する薬剤の開発を含めた, 新しい抗癌剤のスクリーニング法として活用するべきであると考えらる。

文 献

- Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463, 1977
- Hashimura T, Tanigawa N, Okada K and Yoshida O: Clonogenic assay for urologic malignancies. *Gann* **75**: 724-728, 1984
- Friedman HM and Glaubiger DL: Assessment of *in vitro* drug sensitivity of human tumor cells using [³H] thymidine incorporation in a modified human tumor stem cell assay. *Cancer Res* **42**: 4683-4689, 1982
- 李 南奎, 金丸洋史, 吉田 修: コロニー形成試験および [³H]-サイミジン取り込み試験を用いた膀胱癌細胞株の放射線感受性に関する検討. 泌尿紀要 **34**: 32-36, 1988
- Kakechi Y, Kanamaru H, Yoshida O, Ohkubo H, Nakanishi S, Gottesman MM and Pastan I: Measurement of multidrug-resistant messenger RNA in urogenital cancers; elevated expression in renal cell carcinoma is associated with intrinsic drug resistance. *J Urol* **139**: 862-865, 1988
- Alberts DS and Chen HSG: Tabular summary of pharmacokinetic parameters relevant to *in vitro* drug assay. In: Cloning of human tumor cells. pp.351-359, Liss AB, New York, 1980
- Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, Sarosdy MF, O'Brien MT, Casper JT, Mattox DE, Page CP, Cruz AB and Sandbach JF: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res* **43**: 1926-1931, 1983
- Sarosdy MF, Lamm DL, Radwin HM and Von Hoff DD: Clonogenic assay and *in vitro* chemosensitivity testing of human urologic malignancies. *Cancer* **50**: 1332-1338, 1982
- Weisenthal LM and Lippman ME: Clonogenic and nonclonogenic *in vitro* chemosensitivity assays. *Cancer Treat Rep* **69**: 615-632, 1985
- Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y and Morton DL: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar cultures. *Cancer Res* **42**: 2159-2164, 1982
- Shoemaker RH, Wolpert-DeFilippes MK, Kern DH, Lieber MM, Makuch RW, Melnick NR, Miller WT, Salmon SE, Simon RM, Venditti JM and Von Hoff DD: Application of human tumor colony forming assay to new drug screening. *Cancer Res* **45**: 2145-2153, 1985
- Sondak VK, Bertelsen CA, Kern DH and Morton DL: Evolution and clinical application of a rapid chemosensitivity assay. *Cancer* **55**: 1367-1371, 1985
- Chen C, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM and Roninson IB: Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the MDR1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* **47**: 381-389, 1986

(1988年6月21日受付)