

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

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・浅利 豊紀

小橋 一功・天野 俊康・内藤 克輔

AN *IN VITRO* CHEMOSENSITIVITY STUDY USING THE HUMAN TUMOR CLONOGENIC ASSAY IN UROLOGICAL MALIGNANCIES: A PRELIMINARY REPORT

Tadao UCHIBAYASHI, Haruo HISAZUMI, Toyoki ASARI,
Kazunori KOBASHI, Toshiyasu AMANO, Katsusuke NAITO

From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University
(Director: Prof. H. Hisazumi)

Surgical tumor specimens from 67 urological malignancy patients were subjected to a human tumor clonogenic assay (HTCA) developed by Hamberger and Salmon. Appreciable growth of colonies was obtained in 20 of the 33 renal cancers, 20 of the 30 urothelial cancers and 1 of the 4 testicular cancers examined. Using HTCA, a plating efficiency ranging from 0.01 to 0.5% was obtained in these urologic malignancies. However, colonial growth adequate for chemosensitivity was obtained in 30 of these 67 patients. According to Von Hoff's definition, more than a 70% decrease in the plating efficiency after anticancer drug exposure was defined as susceptible. Susceptibility to vinblastine (VBL) was seen in 4 of the 11 patients with renal cancer. Susceptibility to cis-dichlorodiamine platinum (CDDP) was seen in 4 of the 15 patients with urothelial cancer, 1 of the 4 patients with renal cancer, and that to adriamycin (ADM) was seen in 3 of the 15 patients with urothelial cancer, 2 of the 10 patients with renal cancer and 1 patient with testicular cancer. For comparison, the ratio of IC_{50} to the peak plasma concentration of the drug tested was used as the "*in vivo* - *in vitro* therapeutic index (TI)". According to TI, susceptibility to VBL was seen in 3 of the 7 patients with renal cancer, and that to CDDP was seen in 2 of the 12 patients with urothelial cancer, and 1 of the 2 patients with renal cancer. Susceptibility to ADM was seen in 3 of the 15 patients with urothelial cancer, and 1 of the 6 patients with renal cancer. These data suggest that chemosensitivity is a matter of individual susceptibility and HTCA is potentially useful for choosing the most effective drug.

Key words: Human tumor clonogenic assay, Urological malignancies, Von Hoff's definition, *in vivo* - *in vitro* therapeutic index

緒 言

種々の薬剤感受性試験のうち、臨床効果と最も良好な相関を示すとされているものが Hamburger, Salmon¹⁻³⁾ により開発された human tumor clonogenic assay である。以来多くの施設で本法が試みられるようになり、臨床治療効果との一致率もきわめて高いとする報告がなされてきた^{4,5)}。各担癌患者自身

により得られた腫瘍組織の初代培養であるため、存在する細胞構成が採取材料及類似していることから、従来の継代培養細胞を用いた薬剤感受性試験^{6,7)}に比較し、より個々の患者に適した判定結果が得られるものと考えられる。

これまで報告された human tumor clonogenic assay の成績を検討すると、確かに Von Hoff らも述べているように true negative rate がきわめて高

いことから、副作用のみ強くかつ臨床効果の期待しえない薬剤の選択が可能となった。つまり抗癌化学療法を行なうに際し、はじめにこれらの resistant な薬剤を除外し、ついで臨床効果を期待しうる抗癌剤を単独または併用で臨床応用することにより、既存の抗癌化学療法に比しより高い治療効果が得られるものと考えられる。

しかし一方では手技の繁雑さ、至適接触薬剤の濃度および作用時間の設定、判定方法の確立などの他に *ture positive rate* が期待したほど高くないことが問題点として挙げられる。今回著者は判定法を中心とした検討を、human tumor clonogenic assay を用いて行なってきたのでその成績を報告する。

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泌尿器科悪性腫瘍組織64例を用いた (Table 1)。

実験方法 (Fig. 1)

すべての手術摘出標本は滅菌ガーゼで被覆し、当施設に集められた。感受性試験の方法は常に無菌操作とし、腫瘍組織をハサミで 1mm^2 以下になるよう細切した。同時に壊死組織、出血巣はできるだけ除去した。細切組織片を Hank's 液 (GIBCO 社) にて数回洗浄後、0.5 mg/ml 濃度 pronase (科研化学(株),

東京, 750,000単位/g), 0.2 mg/ml 濃度 collagenase (Type I, Sigma 社, U.S.A.) および 0.2 mg/ml 濃度 DNase (Type I, Sigma 社, U.S.A.) の3剤混合液中で 37°C , 30分間酵素処理を行ない、白金メッシュ (No. 80) または滅菌ガーゼにて濾過し 26 gauge 注射針を通し単離浮遊液を得た。症例によっては3剤混合液の代りに 1.8 mg/ml 濃度の collagenase 溶液中のみで 37°C , 2時間の酵素処理を行なった。ついで 900~1,000 rpm で10分間遠心したのち、上清を捨て15%胎児牛血清 (Microbiological Associates, Md., U.S.A.) を Ham's F12 培地 (日本製薬(株), 東京) に加えた培養液 (以下 FC-15 と略す) に浮遊させる。0.5% trypan blue 液 (GIBCO 社) 染色にて生細胞数を算定後、さらに FC-15 を加え $12.5\sim 25.0 \times 10^4$ cells/ml 濃度の細胞浮遊液に調整した。このようにして得られた単離細胞浮遊液に各段階濃度の各種抗癌剤を 37°C にて1時間薬剤処理後培養

Table 1. Number of tumors submitted to chemosensitivity study.

Renal Cell Carcinoma	33	cases
Urothelial Carcinoma	30	cases
Renal Pelvis	5	cases
Ureter	8	cases
Bladder	17	cases
Testicular Tumor	4	cases
Total	67	cases

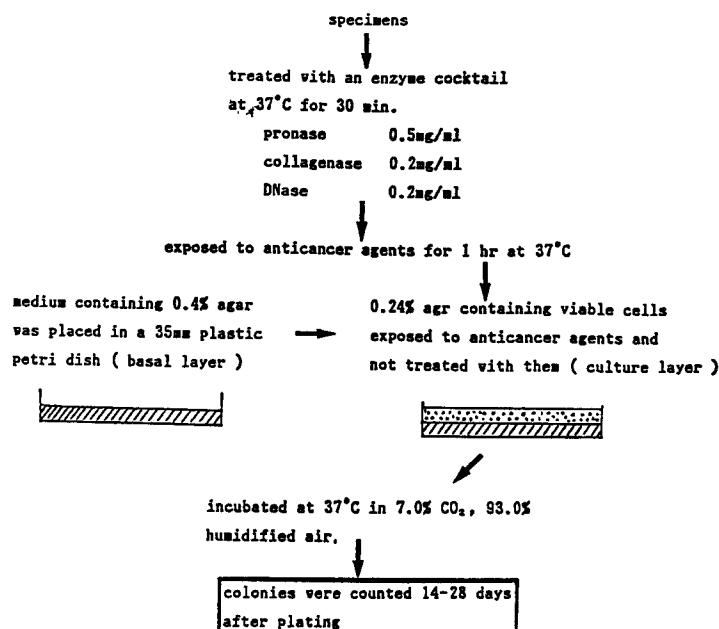


Fig. 1. Procedure of human tumor clonogenic cell assay.

Table 2. Anticancer drugs investigated *in vitro*

Drug	Concentration Range Tested (ug/ml)
Adriamycin	0.005-0.5
Cis platinum	0.025-2.5
Carboquone	0.005-0.05
Vinblastine	0.01-1.0

Table 3. Growth of primary tumor cells.

Type of tumor	No. of tumors put in culture	Growth	Incidence of colonial growth adequate for chemosensitivity
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%)

液を除去し、Ham's F12 培養液を用いて3回洗浄し抗癌剤を除去した。ついで FC-15 を加えた0.24%軟寒天培地 (Type I, Sigma 社) $5 \sim 10 \times 10^4$ cells/dish (3002 tissue culture dish, Falcon, Oxnard, Cal., U.S.A.) 濃度の細胞を播種し、culture layer とした。最後にあらかじめ準備しておいた0.4%軟寒天培地である basal layer に、culture layer を重層させ二層軟寒天培地で培養した。実験は原則として各種抗癌剤各濃度当り 3 dish 作成し、37°C、7% CO₂-air incubator 中で2~4週間培養後、軟寒天培地中に増殖してくるコロニーを算定した。倒立顕微鏡にて50個以上の細胞集団をコロニーと判定した。使用した抗癌剤および濃度は cis-platinum (CDDP), carbazil-quinone (CQ), adriamycin (ADM) および vinblastin (VLB) であり、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。実験に用いた抗癌剤および薬剤濃度を Table 2 に示す。

感受性判定方法

I. 臨床常用投与量における最高血中濃度の1/10量で薬剤接触により、未処理群の70%以上のコロニー減少率を示す場合を有感受性と判定する (Von Hoff らの方法)。

II. 各抗癌剤の臨床常用投与量における最高血中濃度と、3濃度薬剤処理により得られた dose response curve より算出した90%発育阻止濃度 (IC₉₀) 値との比を *in vivo-in vitro* therapeutic index とし、1.0以上を示す場合を有感受性と判定する。

結 果

1. 尿路悪性腫瘍67例のうち尿路上皮癌30例中20例

(67%), 腎細胞癌33例中20例 (61%) および睪丸腫瘍4例中1例 (25%) に1 dish 当り5個以上のコロニー形成を認めた。

2. コロニー形成率は尿路上皮癌では0.01~0.5%, 腎細胞癌0.05~0.3%および睪丸腫瘍では0.01%であった。

3. 抗癌剤感受性試験は67例中30例 (45%) において、評価可能であった。

4. 抗癌剤感受性試験の結果を Table 3~5 に示した。尿路上皮癌30例中16例 (53%), 腎細胞癌33例中13例 (39%) および睪丸腫瘍4例中1例 (25%) の評価可能症例計30例につき検討した。Von Hoff らによる判定基準によれば ADM に対して、尿路上皮癌15例中3例 (膀胱移行上皮癌 case 4, 6 および尿管癌 case 13), 腎細胞癌10例中2例 (case 17, 26) および睪丸腫瘍1例 (case 30) に有感受性と判定された。CDDP に対しては尿路上皮癌15例中4例 (膀胱移行上皮癌 case 4, 6, 7 および腎盂癌 case 11) および腎細胞癌4例中1例 (case 26) が有感受性と判定された。CQ に対しては尿路上皮癌15例中3例 (case 4, 6, 7), VLB に対しては腎細胞癌11例中4例 (case 17, 18, 21 および 26) が有感受性と判定された。これに対し *in vivo-in vitro* therapeutic index 値 (以下 TI 値と略す) は、理論的には1.0以上を一応有感受性と判定するが、それに近い値を示すものも臨床応用に際し、その有効性が期待できるものと考えられる。いずれにせよ1.0以上の TI 値を示すものを感受性ありとすると、ADM に対しては尿路上皮癌11例中2例 (膀胱移行上皮癌 case 2, 尿管癌 case 13) および腎細胞癌6例中1例 (case 17) が有感受性と判定された。CDDP に対しては尿路上皮癌12例中2例

Table 4. Chemosensitivity of urologic malignant cells to anticancer drugs in HTCA.

Drug / Case	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Susceptibility	ADM	R	R	R	S	R	S	R	R	R	-	R	S	R	R
According to	CDDP	R	R	R	S	R	S	S		R	R	S	R	R	R
Von Hoff's	CQ	R	R	R	S	R	S	S	R	R		R	R	R	R
Definition	VLB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
in vivo	ADM	0.02	1.01	0.24	0.11	-	0.08	0.53	0.15	-	-	0.15	1.16	0.77	0.07
-in vitro	CDDP	0.03	0.53	0.04	0.15		0.24	2.54			7.81	0.07	0.84	0.47	0.02
Therapeutic	CQ	0.08	0.84	0.29	0.39		0.39	0.01	0.01			0.13	0.07	0.83	0.01
Index	VLB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Drug / Case	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Susceptibility	ADM	R	S	R	R	R	-	R	R	R	R	S		R	S
According to	CDDP	R						R				S	R	R	R
Von Hoff's	CQ	R												R	
Definition	VLB	-	S	S	R	R	S	-	R	R	R	S	R	-	R
in vivo	ADM	-	3.46	0.56	0.04	-		0.21	0.29	-	0.20	-	-	-	-
-in vitro	CDDP	0.35									41.32	0.06			
Therapeutic	CQ	0.07													
Index	VLB	-	100.00	1.59	0.02	-	-	-	0.16	0.22	-	32.05	0.65		-

- : not examined S : Sensitive R : Resistant T.I. : Peak Plasma Concentration / IC₅₀
 1 - 10 : Bladder 11,12 : Renal Pelvis 13 - 16 : Ureter 17 - 29 : Renal 30 : Testicular

Table 5. Chemosensitivity of urologic malignant cells to anticancer drugs.

Drug	Renal	Urothelial	Testicular			
			Renal pelvis	Ureter	Bladder	
Susceptibility	ADM	2/10(20%)	3/15(20%)	0/1(0%)	1/4(25%)	2/10(33%)
according to	CDDP	1/3 (33%)	4/15(27%)	1/2(50%)	0/4(0%)	3/9 (33%)
Von Hoff's	CQ	0/1 (0%)	3/15(20%)	0/1(0%)	0/4(0%)	3/10(30%)
definition	VLB	4/11(36%)				0/1(0%)
Susceptibility	ADM	1/6 (17%)	2/11(18%)	0/1(0%)	1/3(33%)	1/7 (14%)
according to	CDDP	1/2 (50%)	2/12(17%)	1/2(50%)	0/4(0%)	1/6 (17%)
therapeutic	CQ		0/12(0%)	0/1(0%)	0/4(0%)	0/7 (0%)
index	VLB	3/7 (43%)				

- : not examined

(膀胱移行上皮癌 case 7, 腎盂癌 case 11) および腎細胞癌 2 例中 1 例 (case 26) が有感受性と判定された。CQ に対しては膀胱移行上皮癌 case 2 で 0.94, 尿管癌 case 14 で 0.83 とやや高い TI 値を示したが、いずれも 1.0 未満であり判定としては感受性なしとした。VLB に対しては腎細胞癌 7 例中 3 例 (case 17, 18 および 26) が有感受性と判定された。

考 察

初代培養細胞を用いた抗癌剤感受性試験として 1977 年 Hamburger, Salmon らは human-tumor stem cell assay を開発し報告した。彼らは二層軟寒天培地を使用することにより、高いコロニー形成率を得るとともに fibroblast や lymphocyte のような正常細胞の発育を抑制し、腫瘍細胞を実体として確認することが可能となり、その上この assay により得られた *in vitro* の結果と臨床治療効果との一致率もきわめて

高いと報告した。その後本法を用いた各施設での報告も相ついで行なわれるようになり⁸⁻¹¹⁾、一方近年コロニーを形成する clonogenic cell は stem cell のみであるとの証明が得られないことから、human tumor clonogenic assay と呼称されるようになった¹²⁾。いずれにせよこれらの報告によれば、この assay により sensitive と判定された薬剤が臨床効果としても有効となる true positive rate は 50~70% で、反対に本 assay により resistant と判定された薬剤が臨床効果としても無効となる true negative rate は 85~100% という結果であった。すなわち抗癌剤の副作用のみ強くかつ効果の期待できない薬剤の選択には、本 assay がきわめて有用であることを示唆しており、またこの方法が各担癌患者の腫瘍組織より得られた初代培養細胞を用いていることから、当初感染症に対する化学療法の分野で既に確立されている感受性測定に準じた成績が得られるものと期待され

た。従来より行なわれてきた抗癌化学療法の基本的な考え方は、できるだけ臨床効果の期待しうる薬剤を第一に選択し、これらを単独または併用することによりさらに相加および相乗効果を期待することであった。当然これらの抗癌化学療法の regimen は各抗癌剤の薬理作用および体内薬理動態を考慮し、疾患群別に臨床応用されてきた。しかし、同一疾患であっても個々の症例により薬剤感受性に差がみられることは周知の事実であり、より高い臨床効果を得るためにはこのような画一的な regimen の決定法では十分とはいえなくなった。これに対し Hamburger, Salmon らにより開発された human tumor clonogenic assay はこの点各担癌患者が有する腫瘍組織に対し、それぞれの抗癌剤が臨床効果を期待しうるかを示唆する結果を提供することから、より高い臨床効果が得られるものと考えられる。実際本 assay の結果に基づき得られた臨床治療効果に関する報告も増加しており、その有用性が期待されている。しかし一方ではこのような利点とともに、接触薬剤濃度および薬剤接触時間、培養時間、cell aggregate、コロニー自体の性状および発育様式さらに判定法などに関する諸問題が提起されている。腫瘍細胞と抗癌剤との接触濃度および接触時間については、通常抗癌剤の臨床常用量における最高血中濃度の 1/10 濃度を 1 時間接触作用させている施設が多い。しかし抗癌化学療法を行なう場合抗癌剤の作用だけでなく、その代謝・排泄さらに腫瘍組織での血流をも考慮することが重要であり、山本¹³⁾は条件設定の 1 つの基準として AUC を用いた結果を検討し、その有用性を報告している。抗癌剤の pharmacokinetics を中心に設定した条件であり正今後さらに検討されてゆくものと考えられる。

培養期間については、当然短期間で判定結果が得られる assay が望ましいが、本 assay ではコロニー形成に 2～4 週間を要し、かつコロニー形成率も満足すべき結果が得られなかった。assay 施行全症例で感受性試験結果が得られることが理想であり、この意味からも近年各種ホルモン剤や growth factor などの培地内添加が行なわれており^{14,15)}、われわれも今後この点につき検討する予定である。

コロニー自体の判定は、これまで自動コロニーカウンター、画像解析処理装置さらに倒立位相差顕微鏡などを用いた方法により行なわれてきているが、single cell および cell aggregate より形成されたコロニーの鑑別はかなり困難であり、positive control plate をおき増殖のみられない aggregate や cluster を除く試みや、viable colony のみを染色する方法¹⁶⁾さら

に colony volume の変化により感受性を判定する方法などが試みられてきている。しかし現在のところ、いずれの方法が最良であるかはまだ結論が得られていない。

今回著者は、おもに本 assay での判定法を中心に若干の検討を行なった。Table 4 においてみられるように、case 2 および case 14 のごとく Von Hoff らの感受性判定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をある程度予測することが可能である。つまり Von Hoff らの判定法では sensitive または resistant のいずれかの判定結果のみしか得られないが、各薬剤の TI 値が 1.0 に近い場合臨床常用量における最高血中濃度が IC₉₀ 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。組織型別感受性については Table 5 でみられるように、腎細胞癌での CDDP および VLB を除いて有効率は約 20% 前後であり、臨床的に抗癌剤の有効率が 10～20% といわれている結果にほぼ相当する。今後の課題は、この assay により得られたこれらの有感受性薬剤をいかに有効に組み合わせ、併用療法を行なうことによりどの程度高い臨床効果が得られるかを検討することにある。

最後にこの TI 値を用いた判定法の問題点については、3 濃度薬剤処理により得られた回帰直線より理論値としての IC₉₀ 値が算出され、この値を基に TI 値が求められることより、当然従来の方法に比較し多数の腫瘍細胞を必要とするのみならず、その煩雑性は否定しえない。今後解決すべき課題の 1 つであると考えられる。

結 語

1982年12月より当教室では尿路悪性腫瘍の手術材料を用いて、human tumor clonogenic assay による抗癌剤感受性試験を行なっている。尿路悪性腫瘍 67 例（腎盂・尿管移行上皮癌 13 例、膀胱移行上皮癌 14 例、腎細胞癌 33 例および睪丸腫瘍 4 例）に本 assay が施行され、そのコロニー形成率は尿路上皮癌では 0.01～0.5%、腎細胞癌 0.05～0.3% および睪丸腫瘍では 0.01% であった。抗癌剤感受性判定基準として Von Hoff らに準じた方法とともに、一方では TI 値による感受性判定を行なった。いずれかの判定法で感受性評価可能例は尿路上皮癌 30 例中 16 例（53%）、腎細胞癌 33 例中 13 例（39%）および睪丸腫瘍 4 例 1 例（25%）にみられ、計 67 例中 30 例（45%）であった。尿路上皮癌において Von Hoff らの判定基準では CDDP に対

して27% (4/15), ADM および CQ に対してはいずれも20% (3/15) が有感受性と判定された. TI 値による判定基準では ADM に対して18% (2/11), CDDP に対し17% (2/12) が有感受性と判定された. 腎細胞癌については前者の判定基準によれば, VLB に対し36% (4/11), CDDP および ADM に対してそれぞれ25% (1/4), 20% (2/10) で有感受性と判定された. 後者の判定基準では CDDP に対し50% (1/2), VLB に対し43% (3/7), ADM に対しては17% (1/6) が有感受性と判定された. 以上の2つの判定法でまったく一致した結果は14例で得られており, 残る症例において今後の臨床応用での結果によりいずれの判定法が有効性が高いか判断せざるを得ないと考えられる.

今後症例を重ね, 今回われわれが用いた判定法の有用性につき検討する予定である.

文 献

- Hamburger A and Salmon SE: Primary bioassay of human myeloma stem cells. J Clin Invest 60: 846~854, 1977
- Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 197: 461~463, 1977
- Hamburger AW, Salmon SE, Klim MB, Trent JM, Soehnlen BJ: Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar. Cancer Res 38: 3438~3443, 1978
- Moon TE, Salmon SE, White CS, Chen HG, Meysken FL, Durie BM and Alberts DS: Quantitative association between the *in vitro* human tumor stem cells assay and clinical response to cancer chemotherapy. Cancer Chemother Pharmacol 6: 211~218, 1981
- 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. Amer J Med 70: 1027~1032, 1981
- 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47, KW-103 および HeLa 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌 74: 1606~1620, 1983
- 西野昭夫: Exponential phase および Plateau phase におけるヒト腎癌由来培養細胞 KN-41 の核 DNA 量と抗癌剤感受性に関する研究. 日泌尿会誌 76: 1368~1380, 1985
- Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BGM, Alberts DS and Moon TE: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. N Eng J Med 298: 1321~1327, 1978
- Von Hoff DD, Cowan J, Harris G and Reisdorf G: Human tumor cloning: feasibility and clinical correlations. Cancer Chemother Pharmacol 6: 265~271, 1981
- Mann BD, Kern DH, Guiliano AE, Burk MW, Campbell MA, Kaiser LR and Morton DL: Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. Arch Surg 117: 33~36, 1982
- Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, Sarosdy MF, Obrien MT, Casper JI, Mattox DE, Page CP, Cruz AB and Sandbach JE: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. Cancer Res 43: 1926~1931, 1983
- 西條長宏: Human tumor clonogenic cell の生物学と抗癌剤感受性テストへの応用. Oncologia 13: 80~98, 1985
- 山本憲男: 泌尿器科癌—Dose response curve と cut-off point を中心として—. 癌と化学療法 12: 1573~1581, 1985
- Sikic BI and Taber RL: Human tumor clonogenic assays. Cancer Chemother Pharmacol 6: 201~203, 1981
- Sandbach J, Von Hoff DD, Clark G, Cruz AB, Obrien M and the South Central Texas Human Cloning Group: Direct cloning of human breast cancer in soft agar culture. American Cancer Society 50: 1315~1321, 1982
- Alley MC and Lieber MM: Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells. Br J Cancer 49: 225~233, 1984

(1987年3月20日迅速掲載受付)