

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 —

金沢大学医学部泌尿器科学教室（主任：久住治男教授）

内 藤 克 輔 ・ 久 住 治 男

浅 利 豊 紀 ・ 小 橋 一 功

天 野 俊 康 ・ 打 林 忠 雄

AN *IN VITRO* CHEMOSENSITIVITY STUDY USING
HUMAN TUMOR CLONOGENIC ASSAY IN
UROLOGIC MALIGNANCIESKatsusuke NAITO, Haruo HISAZUMI, Toyoki ASARI,
Kazunari KOBASHI, Toshiyasu AMANO and Tadao UCHIBAYASHI*From the Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University**(Director: Prof. H. Hisazumi)*

A soft agar colony formation assay, so called human tumor clonogenic assay (HTC assay) similar to that originally described by Salmon and colleagues, was utilized to measure the sensitivity of a total of 85 urologic malignancies including 36 urothelial cell carcinomas, 41 renal cell carcinomas, 5 testicular tumors, and 3 Wilms' tumors to anticancer drugs. In addition, the results obtained were compared with those of a novel dye exclusion method (NDE assay) described by Weisenthal and colleagues. The NDE assay was utilized to measure the sensitivity of a total of 63 urologic malignancies including 28 urothelial cell carcinomas, 25 renal cell carcinomas, 6 testicular tumors, and 4 Wilms' tumors to anticancer agents. In both assay series, the concentration of anticancer drugs tested was approximately one tenth of the maximum serum level achievable after single bolus injection. The colony forming rate inhibition of 70% or more in the HTC assay and the cell survival rate of 30% or less in the NDE assay were defined as "sensitive." Sixteen of the 36 urothelial cell carcinomas, 11 of the 41 renal cell carcinomas, and 1 of the 5 testicular tumors had both more than 30 colonies grown in control plates and enough cells in the specimens to provide at least one drug sensitivity testing. In urothelial cell carcinomas, 3 out of 13 tumors were "sensitive" to adriamycin, 3 out of 16 to cis-platinum, and 4 out of 15 to carboquone. In renal cell carcinomas, 2 out of 9 tumors were "sensitive" to adriamycin, 4 out of 11 to vinblastine, and none of 4 to Interferon alpha. Sufficient cell survival for the NDE assay was obtained in 19 out of 28 urothelial cell carcinomas, and 17 out of 25 renal cell carcinomas. Two out of 14 urothelial carcinomas were "sensitive" to adriamycin, 6 out of 19 to cis-platinum, and 1 out of 17 to carboquone. In renal cell carcinomas, the results for "sensitive" to adriamycin were obtained in 3 out of 12 tumors, 1 out of 14 to vinblastine, and 3 out of 5 to Interferon alpha. A comparison between the HTC and NDE assays was possible in 31 testings of 11 tumors. There was no agreement in any of the 31 testings for "sensitive," while there was good agreement in 24 of the 31 testings for "resistant." The HTC assay might be useful in clinical medicine for a variety of purposes, including di-

agnosing tumors and giving information of prognostic value; testing a patient's tumor for chemosensitivity when selecting the drugs. However, there are several problems in the use and interpretation of the HTC assay. One of them is the low plating efficiency and the small proportion of tumors suitable for testing. A great deal of additional development work is necessary to improve the assay systems for each type of tumor to be studied, including exploration of better growth media.

Key words: Human tumor clonogenic assay, Novel dye exclusion method, *in vitro* chemosensitivity testing, Anticancer drug, Urologic malignancies

緒 言

癌化学療法の効果には腫瘍特異性や個体特異性に乏しく、場合によっては薬剤毒性のみが顕著となること少なくない。したがってその有効性を薬剤投与前に知ることは極めて重要である¹⁾。われわれもこの目的にそって、当初は当教室において樹立した培養細胞株を中心にコロニー形成法にて薬剤感受性を検討、報告してきた²⁻⁵⁾。その後いっそう個体特異性の高い方法として Salmon らの方法⁶⁻⁷⁾に準じて human tumor clonogenic (cell) assay (HTC assay) を 1982 年 12 月より泌尿器悪性腫瘍 127 例中 85 例に施行した。また Weisenthal ら⁸⁻¹⁰⁾の報告した novel dye exclusion method (NDE assay) に準じた抗癌剤感受性試験を 63 例に施行したので併せて報告する。

材料および方法

外科的にまたは生検により得られた泌尿器悪性腫瘍 127 例中腎盂尿管移行上皮癌 16 例、膀胱移行上皮癌 20 例、腎細胞癌 41 例、睾丸腫瘍 5 例、Wilms 腫瘍 5 例の合計 85 例に HTC assay を施行した (Table 1)。これら全例が組織学的に悪性腫瘍であることが確認された。無菌的に培養室に運ばれた癌組織は Mac-Kintosh らの方法に準じて pronase 0.5 mg/ml, collagenase type I 0.2 mg/dl, DNase I 0.2 mg/ml の 3 剤混合液にて 37°C, 30 分間処理した。次いで滅菌ガーゼ 2 枚にて濾過後、26 ゲージ注射針を通して単離浮遊細胞を得た。0.5% trypan blue 液により青染されない生細胞数を算定し、15% 胎児牛血清含有 Ham

F12 培養液を用いて 25×10^4 cells/ml の細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液を polypropylen 製の Falcon 2005 tube に 1.0 ml あて注入し、1 時間抗癌剤と接触させ、1,000 rpm, 5 分間遠心し、新鮮培養液にて 3 回洗浄し抗癌剤を除去した。なお interferon を用いた場合には持続接触とした。あらかじめ直径 35 mm の組織培養 dish (Falcon 3001) に 0.4% agarose (Sigma, type I) にて basal layer を作成したものの上に、薬剤処理された生細胞を 10×10^4 /ml の濃度にて含む 0.24% agarose を正確に 1.0 ml 重ね culture layer とし、軟寒天 2 層培地にて 5% 炭酸ガス中水蒸気飽和状態にて 3—4 週間培養した。50 個以上の癌細胞集団のものをコロニーとしてコロニーカウンター (白井松株式会社, Automatic particle counter, CP-2000) にて算定した。今回使用した抗癌剤は 10 剤でそれらの濃度は臨床常用量時の最高血中濃度の 10 分の 1 とした (Table 2)。対照群の 1 dish 当たり 30 個以上のコロニーが認められた場合に抗癌剤感受性試験が可能とし、抗癌剤処理群と対照とした未処理群とを比較した。抗癌剤にて処理された癌細胞のコロニー形成抑制率が 70% 以上の場合を感受性ありと判定した。

一方 HTC assay と同様にして得られた泌尿器悪性腫瘍 63 例よりの単離浮遊細胞を用いて NDE assay にて抗癌剤感受性試験を行ない、HTC assay における感受性結果と比較した。方法は 15% 仔牛血清含有 Ham F12 培養液を用いて 15×10^4 cells/ml の細胞浮遊液を作成し、polypropylene 製 Falcon 2005 tube に 1.0 ml あて注入し、1 時間抗癌剤と接触させた。1,000 rpm, 5 分間遠心し、培養液にて 2 回洗浄したあと、1.0 ml の新鮮培養液を注入し腫瘍細胞を再浮遊させたあと 5% 炭酸ガス下、水蒸気飽和状態、37°C にて 4 日間培養した。interferon を用いた場合には 4 日間の薬剤接触とした。4 日間の培養後、培養液にて 1 回洗浄後 0.2 ml の培養液に腫瘍細胞を再浮遊させた。2% Fast green (Sigma) 0.2 ml を加え正確に 10 分間染色した。次いで浮遊細胞収集装置

Table 1. Materials

Tumor type	No. of specimens
Renal	61
Urothelial	54
Renal pelvic & ureteral	21
Bladder	33
Testicular	8
Wilms	4
Total	127

(トミー精工)に細胞浮遊液をすみやかに移し、1,200 rpm, 10分間遠心し腫瘍細胞をスライドガラス上に固着させた。次いで対比染色として90秒間の hematoxylin 染色, および30秒間の eosin 染色を行ないバルサムにて封入し永久標本を得た。光顕的に300個以上の細胞について Fast green 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た。対照群と比較し, 薬剤処理群の腫瘍細胞の生残率を算出した。測定はすべて triplicate とした。薬剤処理された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。今回の使用した抗癌剤は10剤で, それらの濃度は HTC assay と同じとした (Table 2)。

結 果

HTC assay において 1 dish 当たり 30個以上のコロニーを形成し, 1 剤以上の抗癌剤に対する感受性試験可能例は, 腎盂尿管移行上皮癌にて16例中6例, 膀胱移行上皮癌にて20例中10例, 腎細胞癌にて41例中11例であり, その他睪丸腫瘍5例や Wilms 腫瘍3例を含めた合計85例中28例 (33%) であった (Table 3)。

形成されたコロニー数は腎盂尿管移行上皮癌, 膀胱移行上皮癌, および腎細胞癌においてそれぞれ115, 67 および70個であるが, コロニー形成率は0.05ないし0.09%と極めて低率であった。

抗癌剤に対する感受性を検討すると, 腎盂尿管移行上皮癌においては adriamycin (ADR) に対して4例中1例が, cis-platinum (CDDP) に対して6例中1例が, THP adriamycin (THP) に対して2例中1例が感受性を示した。膀胱移行上皮癌においては, ADR に対して9例中2例が, CDDP および carbouquone (CQ) に対してそれぞれ10例中3例が感受性を示した (Table 4)。すなわち尿路移行上皮癌においてはいずれの抗癌剤に対しても感受性を示す症例は20—30%と低率であった。一方, 腎細胞癌においては ADR に対して9例中2例, Vinblastine (VLB) に対して11例中4例が感受性を示したが, 尿路移行上皮癌と同様に抗癌剤に感受性を示す症例は少数であった。

他方, NDE assay における抗癌剤感受性試験可能例は腎盂尿管移行上皮癌13例中10例, 膀胱移行上皮癌15例中9例, 腎細胞癌25例中17例, 睪丸腫瘍6例中4例であり, 合計63例中40例 (64%) であった (Table

Table 2. Anticancer drugs investigated *in vitro*

Drug	Concentration range tested ($\mu\text{g/ml}$)	Single concentration used in study ($\mu\text{g/ml}$)
Adriamycin	0.005 — 0.5	0.05
Cis platinum	0.025 — 2.5	0.25
Carboquone	0.0005 — 0.05	0.005
Vinblastine	0.01 — 1.0	0.1
THP adriamycin	0.0005 — 0.05	0.005
Interferon- α a)	10 — 1,000	100
Peplomycin	0.01 — 1.0	0.1
Vincristine	0.005 — 0.5	0.05
Actinomycin D	0.001 — 0.1	0.01
VP-16	0.3 — 30.0	3.0

a) 1u/ml

Table 3. Growth of urological tumors

Tumor type	Adequate growth ^{a)} for drug testing(%)	No. of colonies ^{b)}	Plating efficiency ^{c)}
Renal	11/41 (27)	69.70 $\pm$ 32.38	0.05 $\pm$ 0.03
Renal pelvic & ureteral	6/16 (38)	114.95 $\pm$ 74.07	0.09 $\pm$ 0.05
Bladder	10/20 (50)	66.93 $\pm$ 35.56	0.05 $\pm$ 0.04
Testicular	1/5 (20)	33	0.03
Wilms	0/3 (0)		
Total	28/85 (33)	78.10 $\pm$ 51.25	0.06 $\pm$ 0.04

a) : Defined as 30 or more colonies on control plates.

b) : Mean $\pm$ SD of control plates.

c) : (No. of colonies / No. of plating cells) $\times$ 100, mean $\pm$ SD.

Table 4. Number of specimens susceptible to anticancer drugs (70% inhibition of colony growth)

Drug	Tumor type			
	Renal (%)	Renal pelvic & ureteral (%)	Bladder (%)	Testicular (%)
ADR	2/9 (22)	1/4 (25)	2/9 (22)	0/1 (0)
CDDP	1/3 (33)	1/6 (17)	3/10 (30)	0/1 (0)
CQ		1/5 (20)	3/10 (30)	
VLB	4/11 (36)			0/1 (0)
THP		1/2 (50)	0/2 (0)	
VCR				1/1 (100)
VP-16				1/1 (100)
IFN- α	0/4 (0)			
Total	7/27 (26)	4/17 (24)	8/31 (26)	2/5 (40)

Table 5. Assay success rate

Tumor type	Assays successful / specimens studied (%)
Renal cell cancer	17/25 (68)
Renal pelvic & ureteral transitional cell cancer	10/13 (77)
Bladder transitional cell cancer	9/15 (60)
Testicular tumor	4/6 (67)
Wilms' tumor	0/4 (0)
Total	40/63 (64)

Table 6. Number of specimens susceptible to anticancer drugs ($\leq 30\%$ cell survival)

Drug	Tumor type			
	Renal (%)	Renal pelvic & ureteral (%)	Bladder (%)	Testicular (%)
ADR	3/12 (25)	1/6 (17)	1/8 (13)	0/4 (0)
CDDP	0/7 (0)	4/10 (40)	2/9 (22)	0/3 (0)
CQ	0/1 (0)	0/8 (0)	1/9 (11)	
VLB	1/14 (7)			2/3 (67)
THP	1/3 (33)	0/6 (0)	0/3 (0)	
PEP				1/1 (100)
VCR	1/1 (100)			1/1 (100)
ACD	1/1 (100)			1/2 (50)
VP-16				0/2 (0)
IFN- α	3/5 (60)			
Total	10/44 (23)	5/23 (17)	4/30 (14)	5/16 (31)

5). 抗癌剤感受性は腎尿管移行上皮癌においては ADR に対して6例中1例が, CDDP に対して10例中4例が感受性を示したが, CQ および THP に対してはそれぞれ8例および6例ともに感受性を示さなかった (Table 6). 膀胱移行上皮癌においては ADR に対して8例中1例が, CDDP に対して9例中2例が, CQ に対して9例中1例が感受性を示した. 腎細胞癌では ADR に対して12例中3例が, VLB に対して14例中1例が感受性を示したが, CDDP に対しては7例中全例が感受性を示さなかった.

同時に同じ濃度の抗癌剤にて施行された HTC assay と NDE assay による感受性結果を比較すると, 11症例における31感受性試験中, 両 assay にて感受

Table 7. A comparison of the results obtained by the chemosensitivity tests ($\leq 30\%$ cell survival)

Tumor type	Drug					
	ADR	CDDP	CQ	THP	VLB	IFN- α
TCC	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			
RCC	R/R				R/R	
RCC	R/R				R/R	
RCC	R/R				R/R	R/S

HTCA/NDEM
S : sensitive
R : resistant

TCC : Transitional cell carcinoma
RCC : Renal cell carcinoma

性ありと判定された試験結果は0、一方、感受性なしと判定された結果は24試験(77%)に認められた(Table 7)。これらの感受性試験結果の臨床応用例はNDE assayにおける3例のみであり、1例に false negative、2例に true negative であった。

考 察

軟寒天培地を二重にすることによって fibroblast などの正常細胞の増殖を抑制し、人癌細胞の初代培養を行ない抗癌剤の感受性試験を行なう方法は Ham-burger および Salmon⁶⁻⁷⁾ により確立されたもので human-tumor stem cell assay と呼ばれる。すなわち本法においては自己複製 (self renewal) を行ないうる stem cell の概念をヒトの癌に適応し、stem cell の薬剤感受性に基づいた抗癌化学療法により臨床治療効果を向上させることにある。その後の数多くの研究によりコロニーを形成する clonogenic cell は stem cell のみであるとの証明ができず、最近では human tumor clonogenic (cell) assay (HTC assay) と呼ばれている¹⁾。呼称はいずれにせよ、個々の患者の癌組織から得られた初代培養細胞は従来の人癌由来樹立培養細胞株に比し、より患者の癌細胞に近い性格を有し、その抗癌剤に対する感受性も個々の癌の感受性を保有しているものと考えられている。したがって抗癌剤に対する細菌の感受性試験と同様に個々の癌の抗癌剤に対する感受性を *in vitro* にて得ることができる。現在多くの施設にて HTC assay による抗癌剤感受性結果と臨床効果との相関が分析されている。西條¹⁾は文献上組織型別に抗癌剤感受性結果と臨床効果との相関を集計しているが、総計766例においてはHTC assay における感受性と臨床効果がいずれも有効となる true positive rate は203例中137例(67%)であり、一方、HTC assay における感受性と臨床効果がいずれも無効となる true negative rate は563例中512例(91%)であった。この HTC assay の目的は個々の症例に応じた、より有効な抗癌剤を予測し、抗癌化学療法の治療成績を向上させることにあるが、一方、抗癌剤の副作用のみ顕著に表われ全く効果のない薬剤の選別にも用いられるべきである。西條の集計結果はHTC assay は有効な抗癌剤を選択するよりも無効な抗癌剤を選別するのに有用であることを示している。泌尿器科領域の臨床においては *in vitro* にて薬剤感受性が認められた症例が存在しても、その症例に対する化学療法の必要性や時期の問題などにて抗癌化学療法が施行できない場合が多い¹¹⁾。われわれの感受性結果では抗癌剤に感受性を示す症例は、感受性判定可能症

例中の20—30%と低率であったが、これらを基にした抗癌化学療法の経験はなく、HTC assay の感受性結果と臨床効果の相関性の検討には症例の蓄積が必要である。

抗癌剤感受性試験は、個々の癌に適用するものであり、全例に成功することが理想であり、さらに多数の薬剤について感受性試験ができることが望ましい。われわれの今回の検討においては、腎盂尿管移行上皮癌では37.5%、膀胱移行上皮癌では50%、尿路移行上皮癌全体では36例中16例(44.4%)と半数にも満たない症例においてのみ抗癌剤感受性試験が可能であった。また腎細胞癌や睪丸腫瘍などを含めた泌尿器悪性腫瘍85症例においては28例(33%)と極めて少数例においてのみ抗癌剤に対する感受性試験が可能であった。Von Hoff ら¹²⁾によると種々の人癌800例中199例(25.0%)においてのみ抗癌剤感受性試験が可能であり、われわれの成績とはほぼ同様である。その後培養液の改善を重ね、最近の報告によれば¹³⁾470例の種々の癌において303例(64%)に抗癌剤感受性試験が可能となっている。感受性試験可能症例増加の理由として、培養液中に glutamine, Cacl 2 や insulin の添加、また軟寒天培地である culture layer や feeder layer に asparagine, DEAE-dextran や tryptic soy broth を nutrients として添加し、培養条件を改善している。さらに抗癌剤感受性試験可能症例として、以前は対照群におけるコロニー数が1dish 当たり30個以上であったが、今回の報告では20個以上としていることも感受性試験成功率向上の大きな factor と思われる。一方、泌尿器科領域における HTC assay の成績は桜本ら¹⁴⁾は腎細胞癌および尿路移行上皮癌52例中28例(53.8%)、Hashimura ら¹⁴⁾は腎細胞癌および尿路移行上皮癌77例中63例(81.8%)に薬剤感受性試験が可能であったと報告している。一方、欧米における泌尿器科領域の HTC assay の成績は Von Hoff—派の Sarosdy らは¹⁵⁾尿路移行上皮癌47例中20例(43%)、腎細胞癌50例中37例(64%)に、Zabbo ら¹⁶⁾は尿路移行上皮癌124例中62例(50%)、腎細胞癌37例中13例(35%)に、Lieber¹⁷⁾は腎細胞癌159例中80例(50%)にそれぞれ薬剤感受性試験が可能であったと報告されている。Hashimura ら¹⁴⁾の成績は極めて良好であったが、その他の報告者達の成績はわれわれのそれとはほぼ同等であった。前述したようにわれわれは培養液としては Ham F12 に15% fetal calf serum を加えたのみであり、また軟寒天培地として agarose を用いているが添加物はいっさい使用していない。今後培養液、培地の改善が必要である。山本¹⁸⁾も培養液や培

地には血清以外に添加物を使用しないで、尿路移行上皮癌および腎細胞癌60例中22例(36.7%)に薬剤感受性試験が可能と、われわれとはほぼ同様の成績を発表している。

すでに報告された HTC assay を用いた泌尿器悪性腫瘍の抗癌剤に対する感受性を Table 8 にまとめた。同じ抗癌剤に対する同じ臓器由来の癌細胞の感受性は報告者により大きな差異が認められた。この理由として感受性試験に用いた抗癌剤濃度、抗癌剤への接触時間、および感受性判定法が統一されていないためと思われる。早急にこれらの統一化が必要と思われる。一方、これらの *in vitro* の成績は抗癌化学療法の効果には腫瘍特性に乏しいことを反映した所見とも考えられる。

HTC assay における抗癌剤感受性が低い理由として、Lieber ら^{19,30)}は次の2つの事項を挙げている。すなわちコロニーは single cell より形成されるのではなく、集合した細胞群より形成される。この細胞の集合体は抗癌剤に接触しても殺細胞効果を受けにくい。ため感受性が低下する可能性がある³⁰⁾。また通常コロニーを光顕的に計測するが、計測時すでに死細胞の集団に陥っているコロニーの存在がある。これも感受性を低下させる大きな原因となる。対策としては tetrazolium により生細胞を染色することにより、死細胞のみのコロニーを見分けることができる。以上の理由により彼らは HTC assay はコロニー形成能を有する細胞の抗癌剤感受性を反映するものではないとし、もっと簡便でしかも抗癌剤感受性試験成功率の高い

assay として、Tanigawa ら²²⁾が確立した ³H-thymidine の癌細胞への取り込みを指標とした ³H-TdR incorporation assay を評価している²³⁾。Tanigawa ら²²⁾は scintillation counting assay による感受性結果は HTC assay のそれとよく相関すると報告し、Lieber ら²³⁾は HTC assay よりも ³H-TdR incorporation assay の方が感受性が高くまた再現性も高いと報告している。この方法は比較的簡便で、しかも早期に感受性結果を得ることができ有望な感受性試験法と思われる。

Weisenthal ら⁸⁻⁹⁾は従来の dye exclusion method に比し信頼性が高いとされる NDE assay を発表した。すなわち本法では HE 染色を対比染色として用いるため腫瘍細胞と非腫瘍細胞の鑑別が可能となった。さらに本法は HTC assay よりも簡便で、早期に感受性結果が得られ、永久標本が得られることより後日の再検討が可能であり、また non-dividing cells における抗癌剤の細胞毒性を検討できるなどの利点をもつ⁸⁾。一方、問題点として、薬剤による致死効果を受けた細胞が細胞膜の正常機能を失うまでに4日以上時間を要する場合や、reproductive death をもたらす薬剤においては培養期間が4日間と短いため抗癌剤感受性を underestimate する傾向にある。われわれは HTC assay による抗癌剤感受性結果と NDE assay におけるそれとを比較したが、11例、31感受性試験と少数例のためどちらの assay が臨床治療効果とよく相関するかの結論は得ていない。

HTC assay は人癌の抗癌剤感受性試験にはもちろん

Table 8. *In vitro* chemosensitivity in transitional cell carcinoma and renal cell carcinoma

	TCC						RCC				
	CDDP	ADR	MTX	Thio-tepa	MMC	VLB	VLB	CDDP	ADR	VM-26	ACD
Sarosdy et al., 1982	2/11 (18.2)	1/9 (11.1)	0/6 (0.0)				4/36 (11.1)	1/8 (13.0)	0/5 (0.0)		
Zabbo et al., 1984	1/19 (5.3)	3/15 (20.0)	0/10 (0.0)	6/23 (26.1)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)	0/5 (0.0)	0/3 (0.0)			
Lieber, 1984							3/63 (5.0)	0/51 (0.0)	4/58 (7.0)	11/40 (28.0)	8/40 (20.0)
Hashimura et al., 1984	4/26 (15.0)				2/22 (9.0)	0/4 (0.0)	0/10 (0.0)	8/32 (25.0)		0/14 (0.0)	*
Sakuramoto et al., 1985	4/8 (50.0)	4/8 (50.0)				6/8 (75.0)	3/15 (20.0)	4/17 (23.5)			
Present study, 1985	4/16	3/13			-	-	4/11	1/3	2/9		

TCC: Transitional cell carcinoma
RCC: Renal cell carcinoma

-: Not reported
*: VP-16

んのこと、さらには尿や膀胱洗浄液を材料として用いて、膀胱癌再発モニターなどの²⁴⁻²⁶⁾ biology の領域にも高い有用性をもつと考えられる。しかしこれら2つの目的を達するには HTC assay は多くの問題点を含んでいる²⁴⁾。bedside での抗癌剤感受性試験や biology の研究に適用するには、単離細胞が得にくいことおよびコロニー形成率が極めて低いことなどを早急に改善しなければならない。癌の治療においては腫瘍の大きさや患者の performans status なども治療効果を大きく左右する因子であるが、適切な抗癌剤選択を行なうことが重要である。今後 HTC assay を中心として bedside にて行なえる抗癌剤感受性試験法について検討を加えたい。

ま と め

泌尿器悪性腫瘍127例（腎盂尿管移行上皮癌21例、膀胱移行上皮癌33例、腎細胞癌61例、辜丸腫瘍8例、および Wilms 腫瘍4例）の手術材料および一部生検により得られた材料を用いて、human tumor clonogenic assay (HTC assay) および novel dye exclusion method (NDE assay) による抗癌剤感受性試験を行なった。さらに HTC assay の感受性結果と NDE assay のそれとを比較した。

HTC assay は85例に施行され、コロニー形成率は腎盂尿管癌にて $0.09 \pm 0.05\%$ 、膀胱移行上皮癌にて $0.05 \pm 0.04\%$ 、および腎細胞癌にて $0.05 \pm 0.03\%$ であった。感受性評価可能例は28例（33%）であり、その内訳は腎盂尿管移行上皮癌にては ADR に対して4例中1例が、CDDP に対して6例中1例が、CQ に対して5例中1例が感受性を示した。また膀胱移行上皮癌においては ADR に対して9例中2例が、CDDP に対して10例中3例が、CQ に対して10例中3例が感受性を示した。腎細胞癌にては ADR に対して9例中2例が、VLB に対して11例中4例が感受性を示した。いずれの癌においても抗癌剤に対して感受性を示す症例は20—30%と低率であった。NDE assay は63例に施行され、40例（64%）に抗癌剤感受性試験が可能であった。同時に同じ濃度の抗癌剤にて施行可能であった11症例、31感受性試験における HTC assay と NDE assay では、両 assay にて感受性ありと判定された感受性結果は31試験中0、一方、感受性なしと判定された結果は31試験中24試験（77%）に認められた。

HTC assay の問題点、および今後の展望について文献的に考察した。

文 献

- 1) 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
- 2) 田谷 正・小林徹治・塚原健治・打林忠雄・内藤克輔・久住治男・黒田恭一：ヒト尿路上皮悪性腫瘍の組織培養。日泌尿会誌 68：1003～1010, 1977
- 3) 内藤克輔・久住治男・鹿子木基二・加藤正博・中嶋和喜・塚原健治・小林徹治・黒田恭一・松原藤継：ヒト腎癌および膀胱癌由来培養細胞株 (KH-39, KN-41 および KW-103) の樹立とその性状。日泌尿会誌 73：1019～1031, 1982
- 4) Hisazumi H, Uchibayashi T, Kato M, Kobayashi T, Nakajima K, Naito K, Misaki T and Kuroda K: Anticancer drug sensitivity in vitro in the bladder cancer cell line, KK-47 and prophylactic use of carbazilquinone and urokinase in bladder cancer. Urol Res 9: 231～235, 1981
- 5) 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
- 6) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 197 461～463, 1977
- 7) 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 Engl J Med 298: 1321～1327, 1978
- 8) 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
- 9) Weisenthal LM, Marsden JA, Dill PL and Macaluso CK: A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. Cancer Res 43: 749～757, 1983
- 10) Weisenthal LM, Lalude AO and Miller JB: In vitro chemosensitivity of human bladder cancer. Cancer 51: 1490～1496, 1983
- 11) 桜本敏夫・三浦 猛・窪田吉信：Stem cell assay による制癌剤感受性試験 第2報 腎細胞癌およ

- び尿路上皮癌の成績. 日泌尿会誌 76: 645~648, 1985
- 12) Von Hoff DD, Casper J, Bradley E, Sandbach J, Jones D and Makuch R: Association between human colony-forming assay results and response of an individual patients tumor to chemotherapy. Am J Med 70: 1027~1032, 1981
- 13) Von Hoff DD, Clark GM, Stogdill BJ, Sarosdy MF, OBrien 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
- 14) Hashimura T, Tanigawa N, Okada K and Yoshida O: Clonogenic assay for urologic malignancies. Gann 75: 724~728, 1984
- 15) 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
- 16) Zabbo A, Montie JE, Budd GT and Livingston RB: Initial observations and problems with *in vitro* predictive assay in genitourinary malignancies. Urology 23: 370~373, 1984
- 17) Lieber MM: Soft agar colony formation assay for in vitro chemotherapy sensitivity testing of human renal cell carcinoma: Mayo clinic experience. J Urol 131: 391~393, 1984
- 18) 山本憲男: Colony assay 研究の現況 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
- 19) Lieber MM: In vitro culture and chemotherapy sensitivity testing of human transitional cell carcinoma. Urologic Clinics of North America 11: 725~733, 1984
- 20) Agrez MV, Kovach JS and Lieber MM: Cell aggregates in the soft human tumour stem-cell assay. Br. J Cancer 46: 880~887, 1982
- 21) Alley MC and Lieber MM: Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumour cells. Br J Cancer 49: 225~233, 1984
- 22) Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y and Marton DL: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. Cancer Res 42: 2159~2164, 1982
- 23) Jones CA, Tsukamoto T, O'Brien PC, Uhl CB, Alley MC and Lieber MM: Soft agarose culture human tumour colony forming assay for drug sensitivity testing: ³H-Thymidine incorporation vs colony counting. Br J Cancer 52: 303~310, 1985
- 24) Stanisic TH, Buick RN, Trent JM, Fry SE and Salmon SE: An *in vitro* clonal assay for bladder cancer: Studies of the biologic potential of the urothelium and determination of *In vitro* sensitivity to cytotoxic agents. J Surg Oncol 18: 67~72, 1981
- 25) Niell HB and Soloway MS: Use of the tumour colony assay in the evaluation of patients with bladder cancer. Br J Urol 55: 271~274, 1983
- 26) Kirkels WJ, Pelgrim OE, Debruyne FMJ, Vooijs GP and Herman CJ: Soft agar culture of human transitional cell carcinoma colonies from urine. Am J Clin Pathol 78: 690~694, 1982
- 27) Selby P, Buick RN and Tannock I: A critical appraisal of the "human tumor stem-cell assay". New Engl J Med 308: 129~134, 1983

(1986年3月1日受付)