

尿路悪性腫瘍に対する腎被膜下移植法 (Subrenal capsule assay) による制癌剤感受性試験

山口大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 酒徳治三郎教授)

三井 博, 島袋 智之, 山本 光孝

山本 憲男, 酒徳治三郎

SUBRENAL CAPSULE ASSAY FOR CHEMOSENSITIVITY TEST OF UROLOGICAL MALIGNANCY

Hiroshi Mitsui, Tomoyuki Shimabukuro, Mitsutata Yamamoto,
Norio Yamamoto and Jisaburo Sakatoku

From the Department of Urology, Yamaguchi University of Medicine

We evaluated the subrenal capsule assay with a chemosensitivity test using 47 fresh surgical explants, including 16 renal cell carcinomas and 10 uroepithelial cancers. Forty-one explants were evaluable and 166 drug tests were performed. Forty-seven tests (28.3%) were found to be sensitive. Ten of 16 renal cell carcinomas involved a sensitive drug, 3 involved more than 2 sensitive drugs. VP-16, ADM, BLM and 5-FU were the most sensitive compared with the others. Concerning the uroepithelial cancers, 8 of 10 involved a sensitive drug, 5 involved more than 2 sensitive drugs. CDDP and VP-16 were more effective than the other drugs. This result showed a good correlation with the clinical therapeutic efficacy using CDDP. In the future, we hope to evaluate the clinical correlation between clinical efficacy and this assay.

(Acta Urol. Jpn. 36: 753-763, 1990)

Key words: Subrenal capsule assay, Chemosensitivity test, Renal cell carcinoma, Uroepithelial cancer

緒 言

1979年より Bogden らによって始められた subrenal capsule assay 法¹⁾ (以下 SRC assay 法と略す) は in vivo の制癌剤感受性試験のひとつとして、手技の簡便さと生着率の高さ、臨床治療効果との相関性の高さなどの利点があるため、諸家により応用が試みられてきている^{2,3)} われわれの教室では、以前より colony forming assay 法を行っているが、SRC assay 法にも着目した。SRC assay 法の問題点の1つに host の免疫能を抑えるかにあり、免疫抑制剤の効果を比較してみた。その結果として、mizoribine 投与による6日目判定が最も有用であるという結果を得た⁴⁾。この結果を用いて、47例の泌尿器科領域の悪性腫瘍に対して mizoribine を使い、SRC assay 法による感受性試験を行い検討したので報告する。

対象および方法

1, 対象

手術および生検にて摘出した泌尿器科腫瘍を検体として用いた。対象症例は Table 1 に示したごとくで腎細胞癌20例、尿路上皮癌10例、睪丸腫瘍4例、前立腺癌1例、神経芽細胞腫2例、陰茎癌2例、副腎癌1例、尿膜管癌1例、前立腺肉腫2例、膀胱肉腫1例、悪性黒色腫2例、乳腺肉腫1例の47例であった。

2, 方法

SRC assay の方法は Bogden らの原法に準じておこなった。すなわち、新鮮な手術または生検にて摘出した検体を 1× high GEM 培養液内で約 1 mm 大に細切し、CDF 1 マウスの腎被膜下に Avertine 麻酔 (2% tribromoethanol + tertiary amyl alcohol, 98% ethanol) 下で移植し、実体顕微鏡で移植腫瘍片の長径 (L) と短径 (W) を計測した (Day 0)。1 薬剤につき各 3 匹の 8 ~ 10 週齢の CDF1 雌マウスを用いて、1 検体につき 4 ~ 5 種類の抗癌剤を検定し

Table 1. The objected cases

Malignancies	Total cases	Evaluable cases
Renal cell carcinoma	20	16
Uroepithelial cancer	10	10
Prostatic cancer	1	1
Testicular tumor	4	3
Penile cancer	2	1
Urachal tumor	1	1
Prostatic sarcoma	2	2
Adrenocortical cancer	1	1
Vesical sarcoma	1	1
Neuroblastoma	2	2
Mammary sarcoma	1	1
Malignant melanoma	2	2
Total	47	41 (87.2%)

Table 2. Chemotherapeutic agents and dose levels

一般名	略名	投与量 (mg/kg)
Cisplatin	CDDP	2
Adriamycin	ADM	4
Cyclophosphamide	CPM	50
Bleomycin	BLM	30
VP-16	VP	32
Methotrexate	MTX	4
Vinblastine	VLB	2
Vincristine	VCR	2
Fluorouracil	5-Fu	50
Ifosfamide	IFO	50
Dacarbazine	DTIC	400
Tegafururacil	UFT	50
Interferon	INF	2×10 ⁷

た。抗癌剤を投与しない対照群は同量の生食水を注射した。抗癌剤の投与は移植翌日 (Day 1) より5日間連日で原則として皮下投与したが、UFTについてはアラビアゴムに溶かして経口にて投与した。抗癌剤の投与量は Table 2 に示す通りであり、原法の投与量に準じたが⁵⁾、VP-16、IFO、DTIC についてはBDF 1 マウスの1回投与時のLD 10量を用いた。INFについてはα/ADを用いてLD 10量を参考にし、投与量を決定した⁶⁾。宿主の免疫反応を抑制する目的で基礎検討で報告したように mizoribine 200 mg/kg を Day 0, 2, 4 に皮下に投与した。マウスは6日目に屠殺して (day 6)、移植腫瘍を植え込んだ腎臓を取り出し、移植腫瘍片の長径 (L') と短径 (W') を計測して判定した。薬剤の効果判定は対照群の腫瘍径が Day 0 に比べて判定日の Day 6 において腫瘍径の増大がみられる場合のみを判定可能例として扱い、増大傾向がないか、または day 0 に比べて腫瘍

Table 3. Criteria for subrenal capsule assay

Sensitive	Complete response (CR)	dL ≤ -4
	Partial response (PR)	-4 < dL ≤ -2
Resistant	Minor response (MR)	-2 < dL ≤ -1
	No change (NC)	-1 < dL ≤ 0
	Progressive disease (PD)	0 < dL

径が減少している場合は感受性の判定不能例として取り扱った。判定可能例は腫瘍径をつぎのように計測し、腫瘍径の変化 (dL) を求め、3匹のマウスの平均を出した。

$$dL = (L' + W'/2) - (L + W/2) \text{ (dmm)}$$

各検体に対する抗癌剤の効果判定基準は、Table 3 に示す通りであり、CR: $dL \leq -4.0$, PR: $-4.0 < dL \leq -2.0$, MR: $-2.0 < dL \leq -1.0$, NC: $-1.0 < dL \leq 0$, PD: $dL < 0$ とし、PR 以上を sensitive 例、MR 以下を resistant 例とし判定した。

結 果

47例の臨床検体に対して SRC assay 法を施行したが、対照群の腫瘍径の増大が認められ、感受性判定が可能であった症例は87.2% (41/47例) であった。判定可能例を各疾患別にみると、腎細胞癌では80.0% (16/20例)、尿路上皮癌では100.0% (10/10例)、睾丸腫瘍では50.0% (1/2例)、以下 Table 1 に示すごとくの結果が得られた。判定可能であった41例の対照群における腫瘍径の増大の変化は 0.17~19.7 dmm (平均 3.5 dmm) であった。41例の判定可能例に対して合計166回の感受性テストの判定が行われており、1症例当りの平均 trial は4.0回であった。PR 以上の感受性を示す sensitive 例は28.3% (47/166 trials) であった。逆に MR 以下の感受性を示さない resistant 例は71.7% (117/166 trials) であった。

各抗癌剤別の有効率を trial の多い順にみると、CDDP では25.0% (8/32 trials)、ADM では19.4% (6/31 trials)、CPM では50.0% (4/8 trials)、BLM では30.0% (3/10 trials)、MTX では16.7% (2/12 trials) が有効であった。以下、Table 4 に示すごとくの結果であった。

つぎに各疾患別の感受性の結果を比較検討してみた。腎細胞癌は16例について12薬剤で合計60回の trials が行われているが、sensitive 例はわずか23.3% (14/60 trials) のみであり、逆に resistant 例は76.7% (46/60 trials) であった (Table 5)。各症例別にみると、PR 以上の薬剤があった症例は16例中10例 (62.5%) で、さらに16例中3例 (18.8%) で2薬剤以上に感受性が認められた (Table 6)。腎細胞癌に

おける薬剤別効果についてみると, CDDP は13例中1例 (7.7%), ADM では12例中4例 (33.3%), VP-16 では7例中4例 (57.1%), UFT では8例中1例 (12.5%) にPR 以上の結果が認められた (Fig.1). すなわち, 腎細胞癌に対して VP-16, BLM, ADM, 5-FU 等は30%以上の症例に対して優れた感受性を示すが, CDDP, UFT, IFO, は30%以下の症例に対して中程度の感受性を示した. VBL, MTX, IFN, CPM, VCR はいずれも感受性を示す症例は認められなかった. したがって, SRC assay の結果からは腎細胞癌には VP-16, ADM, BLM, 5-FU 等が比較

的効果が期待できる薬剤であると考えられた.

尿路上皮癌 10 例については 11 薬剤で合計 41 回の trials が行われ, そのなかで, sensitive 例は 34.1% (14/41 trials), resistant 例は 65.9% (27/41 trials) であった (Table 5). 各症例別にみても, PR 以上の薬剤があったのは10例中8例 (80.0%) であり, 2 薬剤以上に感受性を示した症例は5例 (50.0%) に認められた (Table 7). 尿路上皮癌における薬剤別効果についてみると, CDDP は8例中4例 (50.0%), ADM では8例中1例 (12.5%), MTX では5例中1例 (20.0%), CAP 併用療法では2例中2例 (100%) に感受性が認められた (Fig. 2). すなわち, 尿路上皮癌に対しては, CDDP, VP-16, IFO, VBL, UFT は50%以上の感受性を示し, ADM, MTX, CPM は15~25%の中等度の感受性を

Table 4. Sensitivity on each chemotherapeutic agent

Drugs	Sensitive (%)	Resistant (%)	Total
CDDP	8 (25)	24 (75)	32
ADM	6 (19)	25 (81)	31
CPM	4 (50)	4 (50)	8
BLM	3 (30)	7 (70)	10
VP-16	7 (35)	16 (65)	20
MTX	2 (17)	10 (83)	12
VBL	2 (22)	7 (78)	9
VCR	1 (20)	4 (80)	5
IFO	5 (46)	6 (54)	11
DTIC	2 (40)	3 (60)	5
5-FU	1 (25)	3 (75)	4
UFT	2 (18)	9 (82)	11
IFN	0 (0)	4 (100)	4
VM-26	0 (0)	1 (100)	1
CAP	3 (100)	0 (0)	3
VAC	1 (100)	0 (0)	1
Total	47 (28.3%)	119 (71.7%)	166

Table 5. Sensitivity on each malignancy

	Sensitive
Renal cell carcinoma	14/60 (23.3)
Uroepithelial cancer	14/41 (34.1)
Prostatic cancer	0/ 6 (0)
Testicular tumor	4/13 (30.8)
Penile cancer	0/ 5 (0)
Urachal tumor	3/ 6 (50.0)
Neuroblastoma	6/ 8 (75.0)
Adrenocortical carcinoma	3/ 5 (60.0)
Prostatic sarcoma	0/ 6 (0)
Vesical sarcoma	2/ 5 (40.0)
Mammary sarcoma	0/ 4 (0)
Malignant melanoma	1/7 (14.3)
Total	47/166 (28.3%)

Table 6. Result of subrenal capsule assay on renal cell carcinomas

No.	CDDP	ADM	CPM	BLM	MTX	VP-16	5-Fu	IFO	VCR	VBL	UFT	IFN	sens./trials
1	-	-	-	-									0/4
2							+						1/1
3	-	-				-							0/3
4	-	+						-		-			1/4
5	+	-		-						-			1/4
6	-	-		+				-		-			1/5
7	-	+		+	-			-					2/5
8	-	+				+				-	-		2/5
9	-											-	0/2
10	-										-		0/2
11	-	-				-	-		-				0/5
12	-	-				-					+		1/4
13	-					-					-	-	0/4
14						+					-	-	1/3
15	-	+				+		+			-		3/5
16		-				+					-	-	1/4

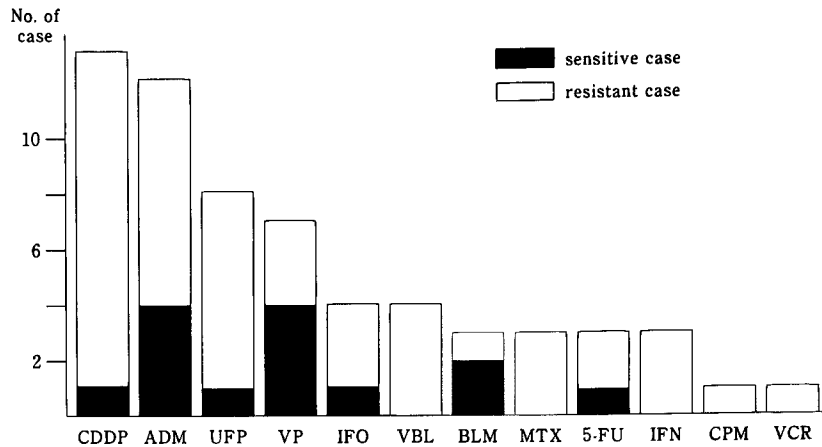


Fig. 1. Sensitivity of each chemotherapeutic agent for renal cell carcinomas

Table 7. Result of subrenal capsule assay on uroepithelial cancers

No.	CDDP	ADM	CPM	BLM	MTX	VP-16	IFO	VCR	CAP	VBL	UFT	sens./trials
1	+	-	+									2/3
2	+	-	-					-				1/5
3						+			+			2/2
4	-	+		-			+					2/4
5	+	-	-		-							1/4
6	-	-			-			-				0/4
7					-	+		-	+			2/4
8	+	-		-	+					+		3/5
9	-	-	-			-					+	1/5
10	-	-		-	-					-		0/5

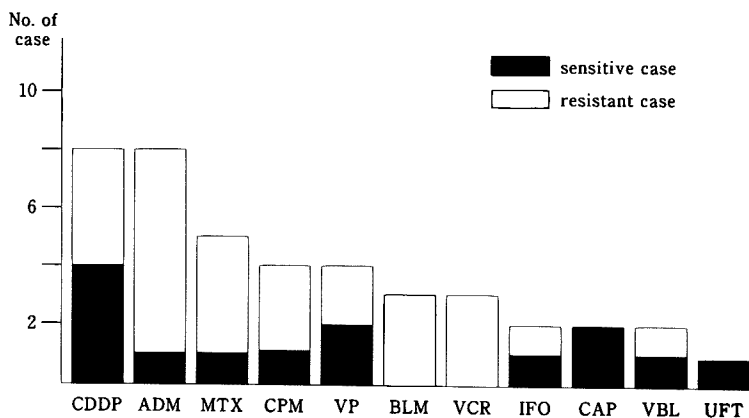


Fig. 2. Sensitivity of each chemotherapeutic agent for uroepithelial cancers

示した。BLM, VCR は感受性を示す症例は認められなかった。尿路上皮癌に対して、CDDP 単独療法で50%, CDDP を含む CAP 療法にて100%の有効性が認められ、両者を合わせると10例中6例(60%)に PR 以上の効果が認められた。このことは臨床的

にも CDDP が尿路上皮癌に最も有効であるということと考え合わせると興味深い結果である。その他の検体について興味ある症例を示す。症例は31歳の陰茎癌で化学療法前に生検を行い SRC assay 法を施行した (Fig. 3-A)。MTX+BLM の combination による

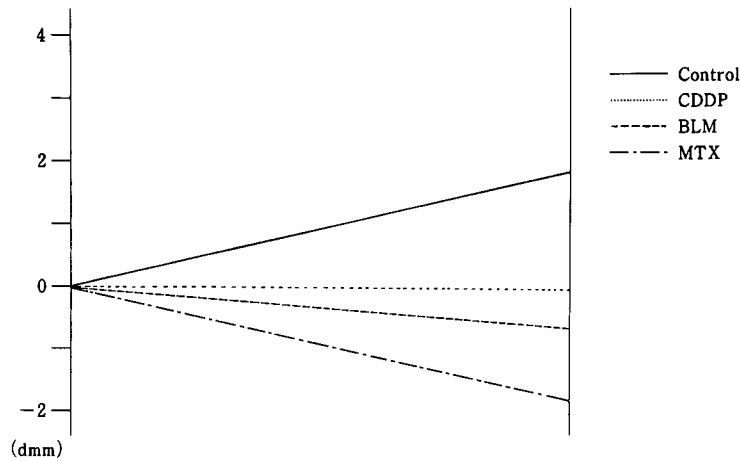


Fig. 3-A. A case of penile cancer. Result of subrenal capsule assay before chemotherapy

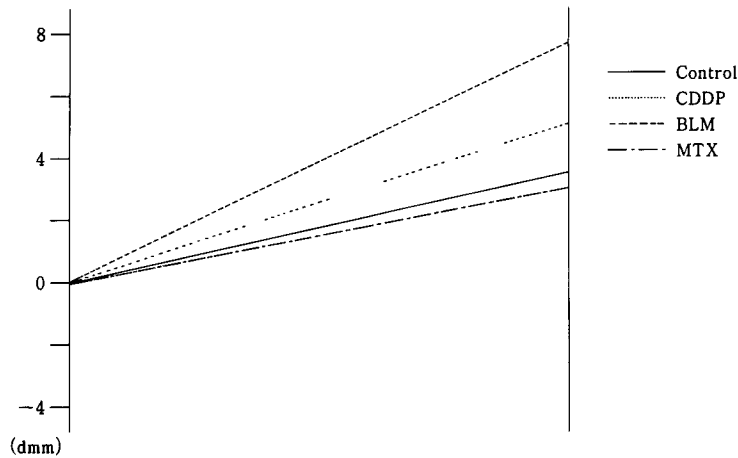


Fig. 3-B. Result of subrenal capsule assay after chemotherapy

化学療法と放射線療法の併用を3クール行った。原発巣は縮小したが、鼠径部リンパ節転移が残存するために、陰茎部分切除と鼠径部リンパ節郭清を行った。摘出腫瘍部を用いて再び本 assay 法を施行した (Fig. 3-B)。

治療前は無処置群が1.75, MTX 群が-1.7, BLM 群が-0.5, CDDP 群が0であったが、治療後は無処置群が5.2, MTX 群が3.2, BLM 群が7.7, CDDP 群が3.5となった。すなわち、無処置群は治療後の方が成長が早くなり、治療にて淘汰され生き残った癌細胞がより強い増殖力を示してきたものと推定される。治療前は MTX, BLM に対して-1.7, -0.5とやや有効性を示したが、3クール治療後は MTX +3.2, BLM +7.7 と抗腫瘍効果が認められ

なくなったのは、化学療法に用いられた MTX や BLM に対して抵抗性ができてきたことを assay の結果は示唆している。CDDP に対しても同様に、化学療法前に比べると抵抗性が出現しているが、BLM に比べれば MTX, CDDP の方が腫瘍の成長を抑制している。したがって、もしこの時点で抗癌剤をさらに追加せねばならないとすれば BLM よりむしろ MTX, CDDP の方が選ばれるべきかと考えられる。このように、SRC assay 法という同一の手段を用いて治療前後の抗癌剤感受性の変化を比較することによって、感受性の変化、薬剤耐性の問題を実証する手がかりとなりうるし、さらに治療後の抗癌剤選択の目安となりうるのではないかと考えられる。

考 察

本実験は正常の免疫応答能を有するマウスを用いて、腎被膜下にヒト腫瘍片を移植して抗癌剤の感受性を評価した。われわれがおこなったマウス可移植膀胱腫瘍 (MBT-2 腫瘍) を用いた xenograft モデルによる SRC assay 法の基礎的検討では移植6日目ではすでに腎被膜下での腫瘍の成長は抑制され始めている。われわれは xenograft に対する免疫応答を抑えるために免疫抑制剤として mizorbine を投与し腫瘍移植後6日目の判定で homograft と変わらない腫瘍の良好な成長を得ることができることを報告してきた⁹⁾。

感受性試験判定の評価可能な基準としては6日目では対照群の腫瘍片が移植日に比べて少なくとも成長していることを必要条件とした。成長のないものは判定不能例として取り扱ったが、6日目の対照群の腫瘍径が0.5 mm 以上の縮小がなければ評価可能としている報告もある^{7,8)}。尿路上皮癌では判定不能例は認められなかったが、腎細胞癌では判定不能例が20%の trials において認められた。この理由としては、腎細胞癌では vivid な腫瘍細胞部分と間質組織部分が混在するため1 mm 大の腫瘍片に細切すると腫瘍細胞部分だけをうまく取り出すことが難しいためではないかと考えられる。

腎細胞癌での感受性試験判定可能率は23.3%であり、30%以上の効果が期待できる比較的有效な抗癌剤としては VP-16, ADM, BLM, 5-FU が SRC assay の結果から挙げられる。Lieber ら⁹⁾は腎細胞癌80例に対して colony forming assay を行い、33%の症例で判定が可能であり、有効な抗癌剤として VM-26 (28%), Actinomycin D (20%), BLM (18%) が比較的高い感受性を示したと報告している。根本ら¹⁰⁾は腎細胞癌7例に対して SRC assay を施行し、CDDP, ADM とともに14% (7例中1例) に感受性があつたと報告している。

また、村橋ら¹¹⁾はヌードマウス腎被膜下移植法にて腎細胞癌7例に対し UFT の経口投与を行い、44% (7例中4例) に有効な腫瘍の縮小を認めたと報告している。腎細胞癌は臨床ほとんど有効な抗癌剤はないが、Lieber らの報告やわれわれの結果から考えて、植物アルカロイド系に期待が持てるのではないかと推定される。また、本 assay にて腎細胞癌に対して感受性のない抗癌剤を除外することにより、臨床的に用いる抗癌剤をある程度限定することが可能であると考えられる。われわれの尿路上皮癌に対する SRC

assay の結果では、CDDP, VP-16 で sensitive 例が30%以上に認められた。長谷川ら¹²⁾も尿路上皮癌7例について同様に本 assay 法を用いて検討し、CDDP, ADM で28.5%, VBL, IFO で33.3%の症例に50%の腫瘍抑制効果を認めたと報告している。尿路上皮癌に対する山本ら¹³⁾の報告では CDDP 1.0 μ g の1時間接触にて7例中3例に CDDP の感受性を認めたとしている。臨床的には尿路上皮癌に対する CDDP 単剤の有効率としては、Yagoda ら¹⁴⁾は36%, Rossof ら¹⁵⁾は33%であったと報告している。また他の抗癌剤との併用効果については、Yagoda ら¹⁴⁾は ADM との併用で54%, Williams ら¹⁶⁾は CDDP, ADM, 5-FU の併用にて65%の有効率を報告している。本 assay 法で尿路上皮癌で得た CDDP の有効性と相関するものと考えられる。有用性の高い抗癌剤に対しては高い感受性が期待でき、抑制の程度から臨床での治療効果が予想できるのではないかと考えられる。

尿路悪性腫瘍は尿路上皮癌、嚢丸腫瘍のように抗癌剤によく反応するものから、腎細胞癌、肉腫のように化学療法に難治性のあるものまで様々であるが、評価可能率が高く簡便で安価な本 assay 法は術後6日目に抗癌剤に対する感受性がわかり新しい抗癌剤のスクリーニング検査としての臨床への応用性は高いと思われる。今後もより適切な効果判定基準を検討しながら、clinical-assay correlation についても検討を加えてゆきたい。

結 語

泌尿器科領域の悪性腫瘍を中心に47例に腎被膜下移植法による制癌剤感受性試験を行った。

1) 41例 (87.2%) が評価可能で、全体で13薬剤について166回の感受性試験が行われ、47回 (28.3%) が陽性であった。

2) 腎細胞癌では16例中10例 (62.5%) に感受性を示す薬剤を認め、60回中14回 (23.3%) が陽性を示し、VP-16, ADM, BLM, 5-FU で30%以上の症例で感受性が認められた。

3) 尿路上皮癌では10例中8例 (80%) に感受性を示す薬剤を認め、41回中14回 (34.1%) が陽性を示し、CDDP, VP-16, UFT で30%以上の症例で感受性が認められた。

文 献

- 1) Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR, Ebser HJ: A Rapid Screening Method of Testing Chemotherapeutic Agents against Human

- Tumor Xenografts. In . Proceedings of Symposium on the Use of Athymic Mice in Cancer Research. pp. 231-250, Fischer, New York, 1978
- 2) 坂井保信, 佐々木常雄, 岩本昌平: 新しい抗癌剤感受性試験 Subrenal Capsule Assay. 癌と化療 **13**: 1249-1257, 1986
 - 3) Cobb WR, Bogden AE, Reich SD, Griffin TW, Kelton DE and LePage DJ: Activity of two phase I drugs, homoharringtonine and tricycline nucleotide, against surgical explant of human tumors in the 6-day subrenal capsule assay. Cancer Treat Rep **67**: 173-178, 1983
 - 4) 三井 博: 制癌剤感受性試験としての腎被膜下移植法 (subrenal capsule assay) における各種免疫抑制剤投与の効果. 泌尿紀要 **36**: 749-755, 1990
 - 5) Bogden AE, Cobb WR, LePage DJ, Haskell PM, Gulkin TA, Ward A, Kelton DE and Ebser JE: Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse. Cancer **48**: 10-20, 1981
 - 6) Bakwill FR, Moodie EM, Freedman V and Fantes KH: Human interferon inhibits the growth of established human breast tumours in the nude mouse. Int J Cancer **30**: 231-235, 1982
 - 7) Bogden AE, Costanza ME, Reich SD, Griffin TW and Cobb WR: Chemotherapy responsiveness of human breast tumors in the 6-day subrenal capsule assay: an update. Breast Cancer Res Treat **3**: 33-38, 1983
 - 8) Bogden AE and Von Hoff DD: Comparison of the human tumors cloning and subrenal capsule assay. Cancer Res **44**: 1087-1090, 1984
 - 9) 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
 - 10) 根本良介, 内田克紀, 鳥居 徹, 石川 悟, 小磯謙吉: マウスの腎被膜下移植法による制がん剤感受性試験. 癌と化療 **13**: 1235-1240, 1986
 - 11) 村橋 勲, 本田幹彦, 迎 圭一郎, 細谷吉克, 高崎悦司: ノードマウスの皮下および腎被膜下に移植した泌尿生殖器系癌に対する UFT の感受性テストの結果について. 癌と化療 **15**: 231-235, 1988
 - 12) 長谷川 潤, 山中吉郎, 堀内和孝, 秋元成太: 尿路悪性腫瘍に対するノードマウス腎被膜下移植法 (Subrenal Capsule Assay) による制癌剤感受性試験. 日泌尿会誌 **80**: 856-860, 1988
 - 13) Yagoda A: Phase II trials with cis-diamminedichloroplatinum (II) in the treatment of urothelial cancer. Cancer Treat Rep **63**: 1565-1572, 1979
 - 14) Rossof AH, Talley RW, Stephens R, Thigpen T, Sanson MK, Groppe C Jr, Eyre HJ and Fisher R: Phase II evaluation of cis-diamminedichloroplatinum (II) in advanced malignancies of the genitourinary and gynecologic organs: a Southwest Oncology Group Study. Cancer Treat Rep **63**: 1557-1564, 1979
 - 15) Williams DS, Donohue JP and Einhorn LH: Advanced bladder cancer: therapy with cis-diamminechloroplatinum (II), adriamycin, and 5-fluorouracil. Cancer Treat Rep **63**: 1573-1576, 1979

(Received on December 18, 1989)

(Accepted on February 26, 1990)

(迅速掲載)