

腎細胞癌に対する化学療法

—基礎的検討と臨床効果—

近畿大学医学部泌尿器科学教室（主任：栗田 孝教授）

神田 英憲，松浦 健，秋山 隆弘，栗田 孝

CHEMOTHERAPY FOR RENAL CELL CARCINOMA: EXPERIMENTAL STUDY AND CLINICAL EFFECT

Hidenori KANDA, Takeshi MATSUURA,
Takahiro AKIYAMA and Takashi KURITA

*From the Department of Urology, Kinki University School of Medicine
(Director: Prof. T. Kurita)*

In vitro sensitivity tests of 6 antineoplastic agents (mitomycin C, bleomycin, adriamycin, Vinblastin, cis-dichlorodiamine platinum, ACNU) were carried out on cultured cell line (OUR-10) established from human renal cell carcinoma and the results were compared with clinical results of 16 cases of renal cell carcinoma treated in our clinic. The effect of these drugs was estimated from the cell growth curve and DNA histogram determined by flow cytometry. All these drugs showed a concentration dependent effect. However, the usefulness of these drugs was not recognized in 10 clinical cases of advanced tumors.

(Acta Urol. Jpn. 34: 1879-1884, 1988)

Key words: Renal cell carcinoma, Chemotherapy, Flow cytometry

緒 言

腎細胞癌に対する化学療法の有用性については、悲観的な報告が多く、また化学療法の regimen も確立されていない。われわれはヒト腎細胞癌由来培養株を用いて、各種抗癌剤の細胞周期に及ぼす影響を flow cytometry (FCM) により検討してきた¹⁾。今回は、これらのデータを解析するとともに、実際の臨床症例での薬剤の有効性についても検討し、両者を比較することにより若干の知見を得たので報告する。

方 法

1. 培養細胞を用いた基礎的検討

使用した細胞株は、大阪大学医学部泌尿器科学教室から分与された OUR-10²⁾ で、ヒト腎細胞癌由来単層培養株である。OUR-10 は、20% 非動化牛胎児血清 (Flow Laboratories), 10 mg/l ゲンタマイシンを含む培養液 Eagle's minimum essential medium (阪大微生物研究会) で、5% CO₂ 存在下に、炭酸ガス培養器中で継代維持した。full sheet になった OUR-10 を 0.25% トリプシン (阪大微生物研究会)

で剥離し、トリプシンを除去後、細胞数を $0.5 \sim 1.0 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し、培養フラスコ (Corning 25,100) に細胞浮遊液 5 ml を入れ培養した。培養4日後に種々の濃度の抗癌剤を添加し、2時間あるいは持続的に接触させた。2時間接触は、抗癌剤添加2時間後に培養液を除去し、培養液で3回洗浄後静置培養した。持続接触は、抗癌剤添加直前に培養液を交換した。さらに、24時間および48時間培養後に細胞をトリプシンで剥離し、細胞数を算定して増殖曲線を得るとともに、一部を FCM 用検体として、核 DNA 量測定まで 70% エタノール中で保存した。DNA 染色は、propidium iodide (PI) 染色液 (50 mg/l PI in 10 mM Tris-EDTA buffer) に再浮遊させ、十分なピペッティング操作の後、45 μm 白金メッシュで濾過して粗大集塊を除去し、30分間以上染色した。使用したフローサイトメーターは、FCM-1 (JASCO) で、得られた DNA ヒストグラムのパターン変化から、抗癌剤の細胞周期に及ぼす影響を検討した。

Mitomycin C (MMC), bleomycin (BLM), adriamycin (ADM), vinblastine (VBL), cis-dichlorodiamineplatinum (CDDP), ACNU の 6

種類の抗癌剤について検討した。

2. 臨床的検討

1975年5月から1987年6月末までの約12年間に近畿大学医学部泌尿器科学教室において腎細胞癌と診断された症例は計78例あり、そのうち抗癌剤の投与を受けた16例を対象とした。そのうちわけは、5-FU 6例、ADM 4例、ADM+MMC 2例、ADM+VBL 1例、MMC 1例、CPM 1例、ACNU 1例である。各抗癌剤の投与量ならびに投与方法に関しては決められた regimen がないため、一定しておらず、なかでも5-FUの3例、ADMの2例、ADM+MMCの1例は予防的に投与されたものである。

結 果

1. 培養細胞を用いた基礎的検討

MMC は 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の4濃度で検討した (Fig. 1)。増殖曲線は、MMC の濃度依存性に抑制され、24時間以降も増殖傾向を認めなかった。2時間接触では 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 48時間後に S, G₂ 期の細胞が増加し、G₁ 期の細胞が減少したが、48時間後には対照の DNA ヒストグラムに近いパターンにもどった。持続接触では、0.01 $\mu\text{g/ml}$ 24時間で同様に S, G₂ 期の細胞の増加を認め、48時間後でも同じヒストグラムパターンを呈した。このことから、2時間接

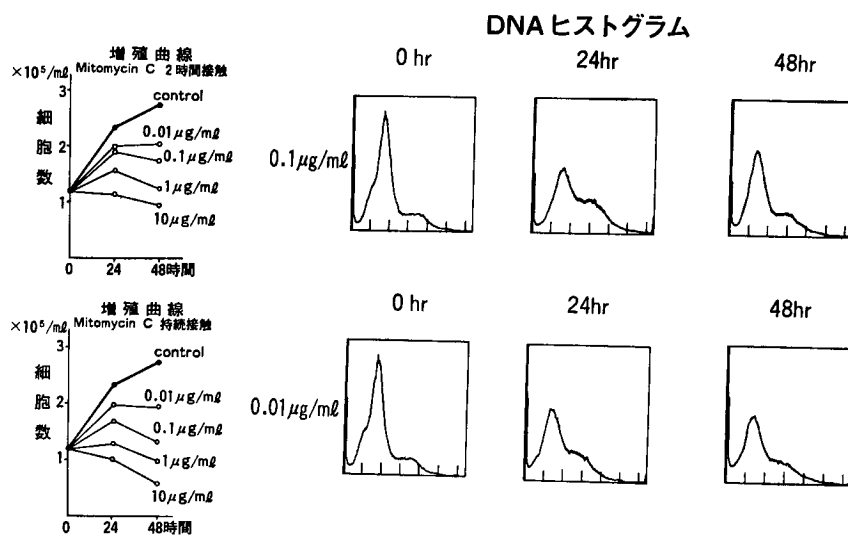


Fig. 1. Two-hour and continuous exposure of mitomycin C. Cell growth curves show concentration dependent effect. Cell cycle progression was delayed and blocked in G₂.

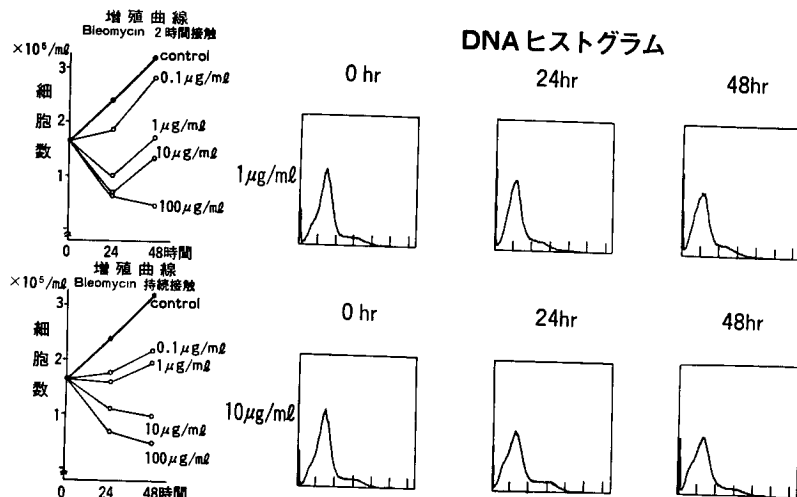


Fig. 2. Two-hour and continuous exposure of bleomycin. There was no marked change in DNA histogram.

触では48時間後には抗癌剤の効果は薄れるが, 持続接触では cell cycle が停止したままになっているものと考えられた。

BLM は 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ の4濃度で検討した (Fig. 2). 増殖曲線は, 2時間接触では, 100 $\mu\text{g/ml}$ の高濃度以外は48時間後に細胞増殖が回復し, 持続接触でも 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ では増殖抑制効果をみるが, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$ では48時間後には増殖が回復した。DNA ヒストグラムは, 2時間接触, 持続接触ともにほとんど変化を認めなかった。増殖曲線では濃度依存性に殺細胞効果を認めたことから, BLM は cell cycle を G_2 期でブロックし, また G_2 期に作用するためヒストグラムに変化がないものと推測された。

ADM は 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ の3濃度で検討した (Fig. 3). 増殖曲線は, 2時間接触では 100 $\mu\text{g/ml}$ 以外は48時間後に細胞増殖が回復した。持続接触させると 1 $\mu\text{g/ml}$ でも強く増殖を抑制し, ADM は濃度依存性ならびに時間依存性の薬剤であると考えられた。DNA ヒストグラムは, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2時間接触, 24時間で G_2 期に細胞の蓄積を認めるが, MMC の場合と異なり, S 期への蓄積は認められず, S 期に作用するものと考えられた。また, 48時間後には対照に近いヒストグラムパターンを呈した。1 $\mu\text{g/ml}$ 持続接触では24時間後に G_2 期に細胞の蓄積を認め, 48時間後も同じパターンを示し, cell cycle が停止しているものと考えられた。

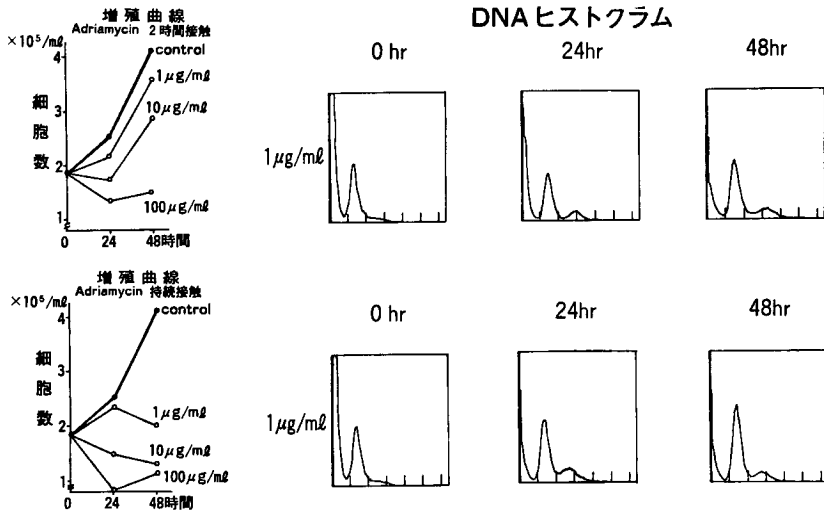


Fig. 3. Two-hour and continuous exposure of adriamycin. Cell growth curves show time dependent effect. Cell cycle was blocked in G_2 .

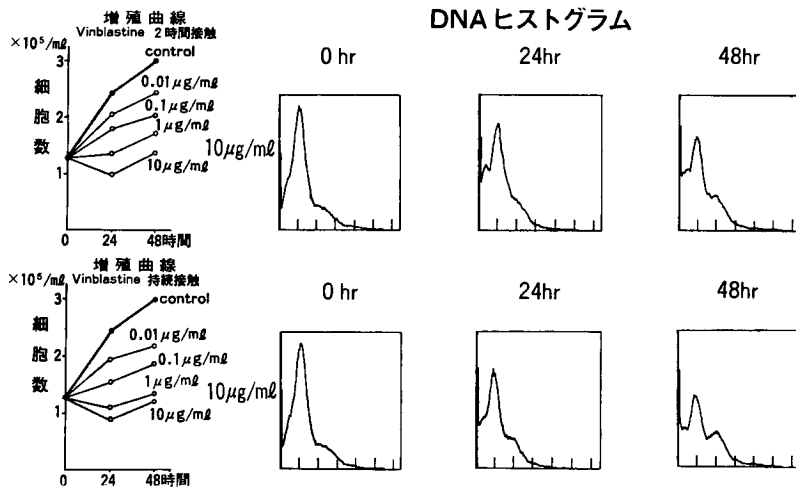


Fig. 4. Two-hour and continuous exposure of vinblastine. DNA histogram showed accumulation of cells in S and G_2M .

VBL は 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の 4 濃度で検討した (Fig. 4). 増殖曲線では, 2 時間接触, 持続接触ともに同程度に濃度依存性に増殖の抑制効果を認めた. DNA ヒストグラムでも, 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間接触と持続接触は同様の变化を示し, 48 時間後には著明に S, G₂ 期への細胞の蓄積を認めた.

CDDP は 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の 4 濃度で検討した (Fig. 5). 増殖曲線では, 2 時間接触と持続接触ともに濃度依存性に増殖抑制効果を認めた. DNA ヒストグラムでは 10 $\mu\text{g/ml}$, 2 時間接触, 24 時間後に S 期への著明な蓄積が認められ, 48 時間後には G₂ 期へのピークが明らかとなった. 1 $\mu\text{g/ml}$ 持続接触でもまったく同様の变化を認めた.

ACNU は 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で検討し

た (Fig. 6). 増殖曲線では 2 時間接触, 持続接触ともに濃度依存性に増殖抑制効果を認めるものの, 48 時間後には細胞増殖が回復した. DNA ヒストグラムでは, 2 時間接触, 24 時間後に S 期に細胞の蓄積を認め, 48 時間後には対照に近いパターンにもどっているが, G₂ 期に蓄積を認めた. cell cycle の進行が遅延していると考えられた. 1 $\mu\text{g/ml}$ 持続接触では, 48 時間後に S, G₂ 期に細胞の蓄積を認めた.

2. 臨床的検討

化学療法の内容と症例数ならびに効果判定を Table 1 に示した. 5-FU 投与のうち 3 例は Robson 分類での stage I で, 治癒摘除が可能と考えられた症例であり, 再発予防目的で与薬された. 3 例ともに転移, 再発なく生存している. 他の 3 例は, 肺転移あ

DNA ヒストグラム

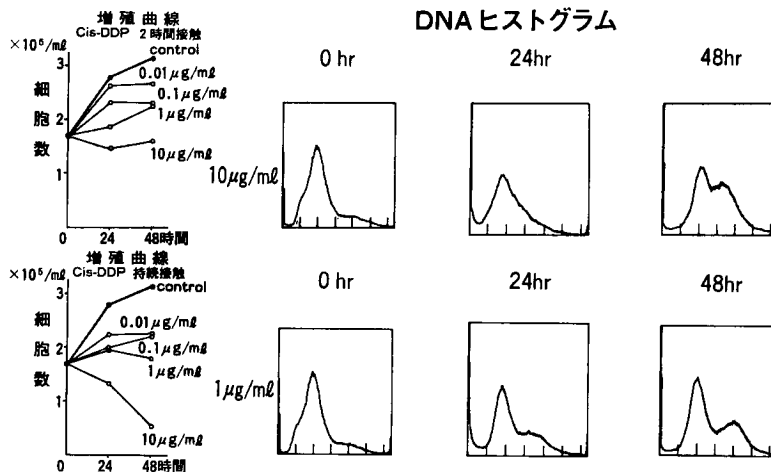


Fig. 5. Two-hour and continuous exposure of cis-dichlorodiamine-platinum. Cells were blocked in G₂ after slow progression through S.

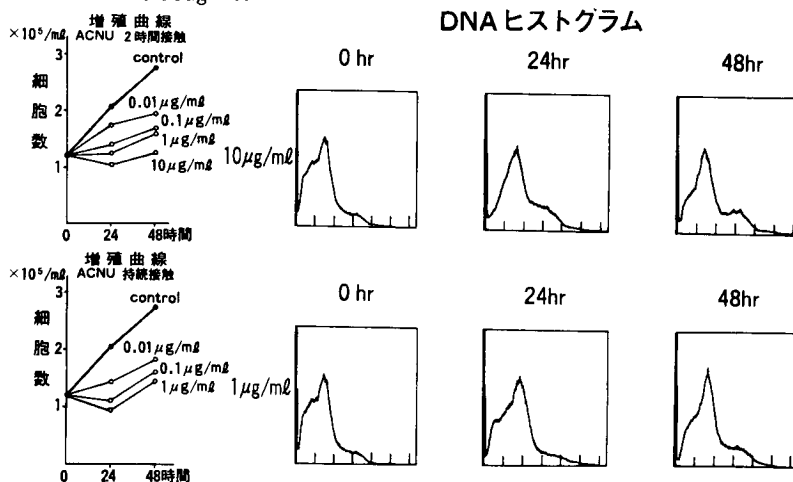


Fig. 6. Two-hour and continuous exposure of ACNU. Cell growth curves show time dependent effect but cells recover after 48 hours.

Table 1. Chemotherapy for renal cell carcinoma and clinical effect

Regimen of chemotherapy	total	PD
5-FU	6(3)	3
ADM	4(2)	2
ADM + MMC	2(1)	1
ADM + VBL	1	1
MMC	1	1
CPM	1	1
ACNU	1	1
total	16	10

PD Progressive Disease
() : Prophylactic therapy

り生存が1例, 死亡2例であった。ADMは4例に投与され, そのうち2例は再発予防投与であり, 2例ともに転移再発なく生存している。あとの2例は, 手術不能で1カ月後死亡1例, 術後2カ月で死亡1例であった。ADMの投与量は10 mg iv $\times$ 2 $\sim$ 20 mg iv $\times$ 2 までまちまちであった。ADM+MMCは1例が予防投与でADM 10 mg iv $\times$ 1, MMC 6 mg iv $\times$ 1, 他の1例はstage IIIでADM 20 mg iv $\times$ 2, MMC 6 mg iv $\times$ 3 + 2 mg iv $\times$ 4 投与したが2年5カ月で死亡した。MMCはstage IVの症例で, MMC 6 mg iv $\times$ 3 投与したが5カ月で死亡した。ADM+VBLはstage IVの症例, ADM 30 mg iv $\times$ 6, VBL 4 mg iv $\times$ 10 投与したが4カ月後に死亡した。CPMはstage IVの症例, CPM 100 mg $\times$ 10 投与, 1年7カ月で死亡した。ACNUはstage IV, 手術不能症例でACNU 50 mg iv $\times$ 4 投与, 4カ月で死亡した。

化学療法の治療目的別に分けると, 手術不能症例で原発巣を残したまま投与したのが2例で2例ともに効なく早期に死亡, 腎摘後の転移巣に対しては8例に施行し7例死亡, 他の1例は生存しているものの転移巣は増大, 再発予防目的では6例に施行し, 6例ともに再発なく生存している。

以上, 原発巣ならびに転移巣に対してはすべてprogressive diseaseであり, どの薬剤においても抗腫瘍効果は認めなかった。

考 察

癌化学療法を行うに際し, 個々の腫瘍に対しもっとも感受性のある薬剤を至適量投与することが治療効果を期待でき, かつ副作用を最小限にとどめ得る理想的な方法と考えられる。従来から *in vitro* あるいは *in vivo* における抗癌剤感受性試験は種々開発され, 一部臨床にも応用されている³⁻¹⁴⁾。FCMを用いて検討する場合, 検体は単離細胞でなければならず, しかも腫

瘍細胞以外の細胞の混入を避けなければ的確な結果を得られない。すなわち, 臨床で行うには個々の癌のprimary cultureが必要となる。技術的な問題もあり, 今回はヒト腎細胞癌由来培養細胞株であるOUR-10を用いて6種類の抗癌剤の抗腫瘍効果を, FCMで得られたDNAヒストグラムと同時に算出した細胞増殖曲線を比較することにより検討した。

抗癌抗生物質は, 細胞周期の進行に対してG₂ブロックをおこすと報告されている¹⁵⁾。今回の実験でも, MMC, ADM, VBL, CDDP, ACNUにG₂期への細胞蓄積がみられた。またBLMではDNAヒストグラムに著明な変化を認めなかったが, BLMの作用点がG₂期に感受性が高いことを考えると, BLMもやはりG₂ブロックをおこすが, G₂期細胞が死滅したためG₂ピークが明らかにならなかったものと推測される。さらに, MMC, VBL, CDDPではS期にも細胞の蓄積を認めたのに対しADMではS期の蓄積を認めなかった。これは, ADMがS期に作用し, 殺細胞効果を示しているものと考えられる。ADM 1 μ g/ml 2時間接触では24時間後にG₂ピークを認めたが, 48時間後には対照に近いヒストグラムパターンにもどり, また増殖曲線でも細胞増殖が回復していた。しかし, 持続接触では48時間後も増殖は抑制されていた。すなわち, ADMは時間依存性の薬剤であると考えられる。

このように, FCMによるDNAヒストグラムと細胞増殖曲線を比較検討することにより, 薬剤のcell cycleの進行を阻害する作用点, cell cycleにおける殺細胞効果を示す作用点, 濃度依存性あるいは時間依存性などの性質が明らかとなる。また, 臨床検体においては, 薬剤の有効性ならびに至適濃度の判定も期待できる。

腎細胞癌臨床における各種抗癌剤の効果について, 16例を対象とし検討したが, 再発予防投与の6例を除き, すべてprogressive diseaseであり, 抗癌剤の有効性は確認できなかった。この原因の1つとして薬剤の投与量ならびに投与方法が確立されていないことが挙げられるが, 現在腎癌そのものに単独治療で有効であるとされる抗癌剤がないとされていることから, 多剤併用療法など今後の課題であろう。

培養細胞を用いた*in vitro*の実験では, 6剤すべてに抗腫瘍効果を認めたのに対し, 臨床症例ではまったく抗腫瘍効果を認めなかった。このdiscrepancyについて, 以下の問題点が挙げられる。①培養細胞株を用いたこと, ②固形癌と単離細胞での薬効の差, ③癌細胞以外の細胞の除去。

培養細胞株が本来の腎細胞癌の生物学的特性を保っているか否か、また保っているとしても、個々の腫瘍により薬剤の感受性は異なっていると考えられ、培養細胞株を用いた感受性試験はその意義が半減すると思われる。

固形癌と単離細胞での薬効に差があることは、造血管腫瘍が抗癌療法によく反応することからみても明らかである。今回の実験でも濃度依存性に抗腫瘍効果を認めたことから、臨床効果を期待するには可能な限り高濃度の抗癌剤を使用することが必要と考えられる。

FCMを用いる場合、先に述べたように臨床検体の primary culture が必要である。最近では、手技的にもかなり改良され、成功率も高くなってきている。本法は今後、多剤併用療法の regimen 確立にも、抗癌剤感受性試験の 1 方法として期待できる。

結 語

1. ヒト腎細胞癌由来培養細胞株を用いて、各種抗癌剤の効果について細胞増殖曲線ならびに FCM により検討した。
2. *in vitro* の実験では各抗癌剤ともに濃度依存性に抗腫瘍効果を認めた。
3. 臨床治療成績では、これら抗癌剤の有効性は確認できなかった。
4. FCM は各薬剤の cell cycle に及ぼす影響および作用点を考慮することにより多剤併用療法に有用であるが、臨床での抗癌剤感受性試験として用いるには検体の primary culture を必要とする。

文 献

- 1) 松浦 健, 辻橋宏典, 神田英憲, 秋山隆弘, 栗田孝: 尿路悪性腫瘍における Flow cytometry の応用. 第 4 報. 培養細胞を用いた癌化学療法の基礎的検討. 日泌尿会誌 76: 96-103, 1985
- 2) 松田 稔, 長船匡男, 中野悦次, 石橋道男, 古武敏彦, 園田孝夫, 渡辺信一郎, 波田寿一, 大河内寿一, 東野 一, 山村雄一, 平岡 諒: ヒト腎細胞癌の基礎的研究. 第 5 報. ヒト腎細胞癌に由来する細胞株 OUR-10 の性質について. 泌尿紀要 26: 253-264, 1980
- 3) 松田 稔, 長船匡男, 中野悦次, 藤岡秀樹, 高羽 津, 園田孝夫, 渡辺信一郎, 波田寿一, 東野一: ヒト腎細胞癌の基礎的研究. 第 6 報. 培養系での腎癌細胞と正常細胞の各種抗癌剤に対する感受性の相異について. 泌尿紀要 27: 759-770, 1981
- 4) Day JW, Shrivastav S, Lin G, Bonar RA and Paulson DF: *In vitro* chemotherapeutic testing of urologic tumors. J Urol 125: 490-492, 1981
- 5) Lieber MM and Kovach JS: Soft agar clonogenic assay for primary human renal carcinoma. *In vitro* chemotherapeutic drug sensitivity testing. Invest Urol 19: 111-114, 1981
- 6) Sarosdy MF, Lamm DL, Radwin HM and Von Hoff DD: Clonogenic assay and *in vitro* chemosensitivity [testing] of human urologic malignancies. Cancer 50: 1332-1333, 1982
- 7) 北野司久, 長瀬千秋: 培養人癌細胞を用いた感受性テスト—Microcolonies Inhibition Test を中心に—. 癌と化学療法 9: 590-598, 1982
- 8) 関口 浩: 培養ヒト膀胱癌細胞株による制癌剤感受性試験. 日泌尿会誌 74: 25-31, 1983
- 9) 小泉久志: ノドマウスにおける膀胱癌由来培養細胞 KK-47 および腎癌由来培養細胞 KK-41 移植腫瘍の抗癌剤感受性の検討. 日泌尿会誌 74: 704-718, 1983
- 10) 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. 第一報. 軟寒天培地を用いた腎細胞癌の初代培養について. 日泌尿会誌 74: 1081-1085, 1983
- 11) 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
- 12) 大沢哲雄: 腎癌の化学療法. I ヒト腎癌細胞株を用いた再増殖法による抗癌剤感受性試験. 日泌尿会誌 77: 1796-1804, 1986
- 13) 神波照夫: 腎細胞癌化学療法の *in vitro* での実験的研究. 1. 細胞回転からみた各種制癌剤の併用効果について. 泌尿紀要 33: 1-14, 1987
- 14) 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関する研究—組織学的判定法による尿路癌の制癌剤感受性試験—. 日泌尿会誌 78: 643-648, 1987
- 15) Tobey RA and Crissman HA: Use of flow microfluorometry in detailed analysis of effects of clinical agents on cell cycle progression. Cancer Res 32: 2726-2732, 1972

(1988年6月27日受付)