

胃・大腸癌の制癌剤感受性の検討 —clonogenic assay を用いて—

京都大学医学部外科学教室第2講座（指導：日笠頼則教授）

水 野 恵 文

〔原稿受付：昭和58年12月22日〕

Difference in Colony Growth and Drug Sensitivity between Human Gastric and Colorectal Cancers in Clonogenic Assay

YOSHIHUMI MIZUNO

The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

Clonogenic assay has been used to study the in vitro colony growth and drug sensitivity of human gastric and colorectal cancers. In this study, the following results were obtained:

① Appropriate colony growth required for determining chemosensitivity (an average of 30 or more colonies on control plates) was obtained in 51 of 104 (49%) gastric cancers and 76 of 102 (75%) colorectal cancers. There was significant difference in colony growth between gastric and colorectal cancer ($P < 0.001$).

② Taking $\geq 50\%$ colony inhibition as a definition of sensitivity in vitro, colorectal cancer was significantly more sensitive to the anticancer drugs used in this study than was gastric cancer ($P < 0.001$).

③ Mitomycin C showed remarkably higher efficacy against tumor colonies derived from colorectal cancer than against those from gastric cancer ($P < 0.025$).

④ Correlation of in vitro sensitivity between human tumors and corresponding xenografts in nude mice proved that the colonies grown in vitro had originated from cancer cells.

結 言

善されているが、その多くは、腫瘍の種別に有効な制癌剤併用療法が開発されて来たことによる。

近年、悪性腫瘍に対する化学療法の成績は著明に改

しかし、以前より制癌剤に低感受性であるとされて

Key Word: Clonogenic assay, Colony growth, Chemosensitivity, Gastric cancer, Colorectal cancer.

索引語：クロノジェニックアッセイ，コロニー形式，制癌剤感受性，胃癌，大腸癌。

Present address: The 2nd Department of Surgery, Faculty Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

きた胃・大腸癌に関しては、今だその臨床成績に目立った改善を見ていない。

胃・大腸癌に効果的な制癌剤として 5FU が導入されて以来、臨床的に有効であると判定された制癌剤は数種類にすぎず、現在、それらの併用療法が検討されているが、胃癌と大腸癌を区別して、使用する制癌剤を選択するということは特に行われていない^{3,6,15,20,21,22)}。

in vitro の制癌剤感受性試験である clonogenic assay^{7,8)} は、その判定結果と臨床効果との高い相関が報告され、現在、非常に予言性の高い感受性試験と評価されている。

著者は、胃・大腸癌に clonogenic assay を施行し、個々の症例の制癌剤感受性を測定し、臨床へ feed back するだけでなく、両腫瘍の in vitro におけるコロニー形成能、制癌剤感受性を比較し、その差異について検討した。

対象及び方法

(I) 症例：当教室及び関連施設において手術摘出された胃癌104例、大腸癌102例を対象とした。これらの手術摘出標本の一部を可及的無菌的に採取し、培養液中にて移送、clonogenic assay を施行した。

(II) Clonogenic assay¹⁹⁾：

腫瘍細胞の酵素学的分離には、0.14% Collagenase type I, 0.03% (500 KU/ml) Deoxyribonuclease type I (以上 Sigma Chemical Company, ST Louis USA) 加 α-MEM (以下, Enzyme Solution) 及び 0.03% Deoxyribonuclease 加 α-MEM (以下, DNase Solution) を用いた。

又、腫瘍細胞の培養には、Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 mcg/ml), Amphotericin-B (1.2 mcg/ml) (Gibco Laboratories, Grand-island Biological Company), 15%牛胎児血清加 CEM (Chee's modification of Eagle's medium) (以下, Culture Solution) を用いた。

実験室に移送された腫瘍は鋭剪刀にて十分に細切し、腫瘍 1 gr あたり 10~20 ml の Enzyme Solution 中にてゆるやかに攪拌しながら、37°C CO₂ incubator 内で30~60分間酵素を作用させ、腫瘍細胞の分離を行った。これを滅菌した 2枚ガーゼにて濾過し、残渣を除去、800~1000 rpm にて遠沈し、上清の酵素液は吸引廃棄した。沈澱した腫瘍細胞に DNase Solution を加え、軽くピペッティングを行い細胞を浮遊させ、再

表 1 Drug Concentration

Drug	Concentration
Adriamycin	0.4 (μg/ml)
Bleomycin	2.0
BCNU	2.0
Cis-platinum	2.0
5-FU	10.0
Mitomycin	3.0
Melphalan	1.0

度遠沈后、上清の DNase Solution は吸引廃棄した。腫瘍細胞は culture Solution にて suspend し、trypan blue exclusion test にて生細胞比率を測定した後、生細胞数が 1.5×10⁶/ml となるように調整した。

Culture Solution に Bacto-agar (Difco Lab. Detroit, Mich) を0.5%となるように加え、35×10 mm の Petri dish に 1 ml ずつ分注し下層を作成した。調整された腫瘍細胞浮遊液を 1 ml ずつ試験管に分注、無制癌剤の control 1~2 本を除き、各々に制癌剤と 50°C に温められた 2 ml の Agar 加 culture solution を加え、0.3% Agar 加腫瘍細胞浮遊液とし、3枚の Petri dish 下層上に 1 ml ずつ分注、上層を作成した。

使用した制癌剤は 7 種類であり、腫瘍細胞と各制癌剤との接触濃度は、制癌剤常用量の人体血中ピークレベル濃度を参考に決定した²⁾ (表 1)。

腫瘍細胞と制癌剤とは持続接触であり、1枚の Petri dish には 5×10⁵ 個の腫瘍細胞が plate されたことになる。plate の終わった Petri dish は 37°C CO₂ incu-

表 2 コロニー形成

コロニー形成を来した症例*/症例数(%)			
胃 癌			
原 発 巣	25/ 65	(38%)	
転 移 巣**	26/ 39	(67)	
計	51/104	(49)	
大 腸 癌			
原 発 巣	57/ 73	(78)	
転 移 巣***	19/ 29	(66)	
計	76/102	(75)	

* control dish で30個あるいはそれ以上のコロニー形成を来したもの

*** リンパ節36, 腹水 1, 大網 1, 腹壁 1

*** リンパ節25, 腹壁 2, 肝 2

bator 内で2〜3週間培養，倒立顕微鏡でコロニー形式を確認した後，Biotran III 全自動コロニーカウンターを用いて，各 dish のコロニー数を測定した．50個あるいはそれ以上の細胞の集団をコロニーと判定し，control dish において30個以上のコロニー形成を認めただけのものを制癌剤感受性判定可能とした．plate 時に冷蔵保存した dish を用いて，少数の cell cluster による誤差を調整した．

制癌剤の抗腫瘍効果は，無制癌剤の control dish に形成されたコロニー数に対して，制癌剤とともに plate された dish のコロニー形成数が，何パーセント抑制されたか（コロニー形成抑制率）を計算して判定した．なお，感染を来した症例は，コロニー無形成と判定した．

(III) ヌードマウスへの移植

酵素学的分離にて作成された胃癌1例，大腸癌1例の腫瘍細胞浮遊液の一部を，ヌードマウス背部皮下に移植し，生着した腫瘍に対しても clonogenic assay を施行した．

原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の同一性は，組織学的に確認し，両者の制癌剤感受性を比較検討した．

結 果

(I) コロニー形成（表2）

制癌剤感受性判定に必要な，30個以上のコロニー形成を来したものは，胃癌104例中51例（49%），大腸癌102例中76例（75%）であり，胃癌は大腸癌に比し，著明にコロニー形成が不良であった（ $p<0.001$ ）．原発・転移の別で検討すると，胃癌は，原発巣65例中25例（38%），転移巣39例中26例（67%）と，転移巣のコロニー形成が良好であり，大腸癌は，原発巣73例中57例（78%），転移巣29例中19例（66%）と，著明な差を認めなかった．

(II) 胃・大腸癌の制癌剤感受性（表3）：

50%以上のコロニー形成抑制を示した制癌剤を有効と判定し，各制癌剤の示した有効率（有効であった症例／検討した症例）に関して検討を加えた．

検討し得た全制癌剤の有効率は，胃癌に対して26%（60/233），大腸癌に対して36%（115/322）であり，大腸癌は胃癌に比し，有意に制癌剤に対する感受性が高かった（ $p<0.001$ ）．

個々の制癌剤に関し検討すると，MMC の有効率は，胃癌に対し19%（9/47），大腸癌に対し38%（26/

表3 制癌剤感受性

制癌剤	胃癌 有効症例数*	胃癌 症例数（%）	大腸癌 有効症例数	大腸癌 症例数（%）
Adriamycin	13/ 40	(33%)	19/ 67	(28%)
BCNU	6/ 27	(22)	12/ 30	(40)
Bleomycin	6/ 18	(33)	9/ 20	(45)
Cis-platinum	8/ 31	(26)	21/ 47	(45)
5-FU	14/ 43	(33)	22/ 66	(33)
Melphalan	4/ 27	(15)	6/ 24	(25)
Mitomycin C	9/ 47	(19)	26/ 68	(38)
計	60/233	(26)	115/322	(36)

* 50%以上のコロニー形成抑制

68）であり，MMC は，胃癌に比し，大腸癌に対し抗腫瘍効果が良好であった（ $p<0.025$ ）．他の制癌剤に関しては，胃癌と大腸癌に対する有効率に有意の差を認めなかった．

(III) 制癌剤感受性の相関：

ヌードマウスに生着した胃癌，大腸癌各1例の腫瘍の組織標本を作成し，原腫瘍との比較を行い，両者に差異のない事を確認した（図1）．又，ヌードマウス移植腫瘍より作成された腫瘍細胞浮遊液には，ほとんど正常細胞が含まれていなかった．

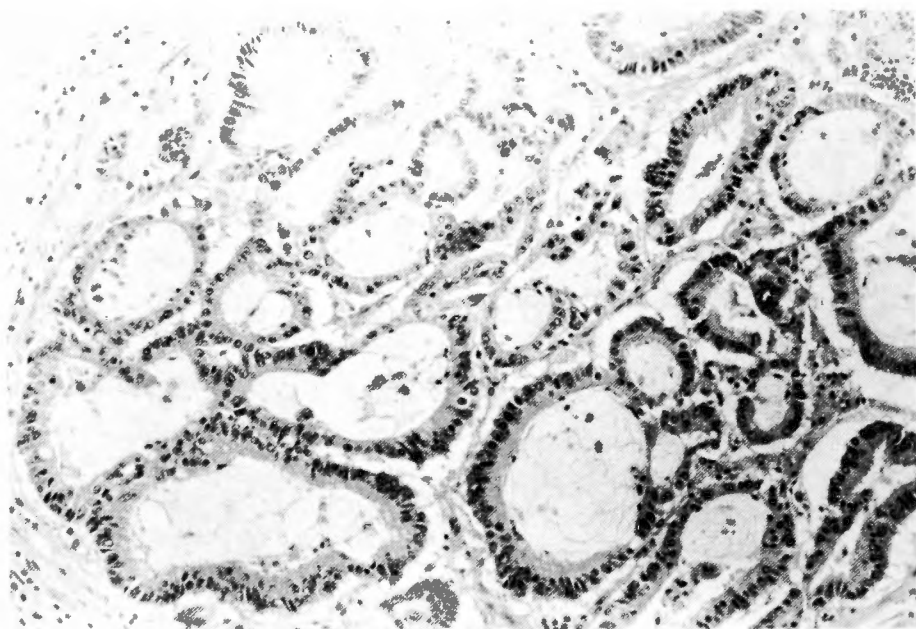
原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性を検討し，両者の感受性スペクトラムには，有意の相関を認めた（ $p<0.025$ ）（図2）．

考 按

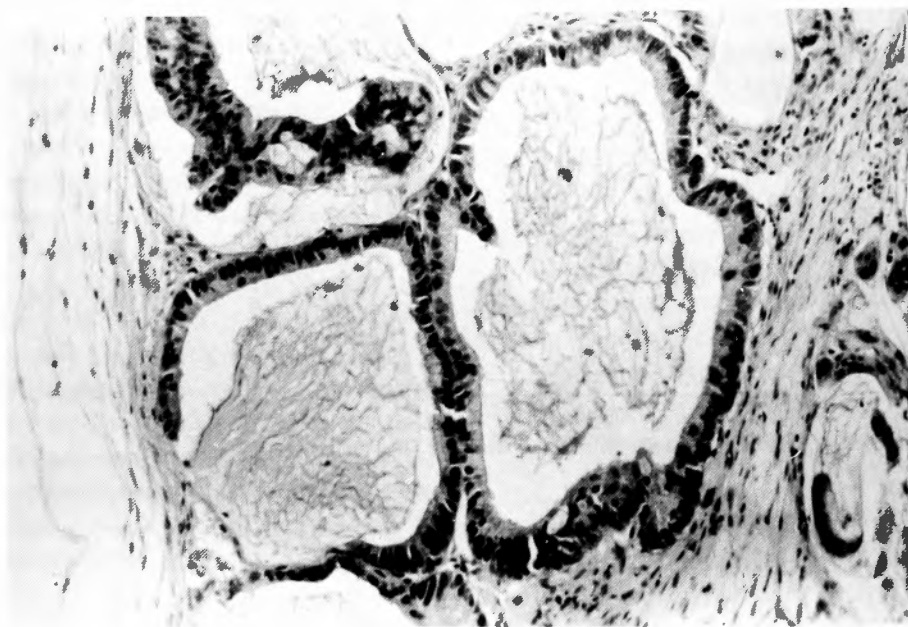
clonogenic assay は，Hamburger，Salmon により開発された in vitro の制癌剤感受性試験で^{7,8)}，制癌剤の抗腫瘍効果を定量的に評価することができる．感受性判定結果と臨床効果との相関について，Von Hoff ら³¹⁾は，有効－有効の相関（true positive rate）は71%，無効－無効の相関（true negative rate）は98%と有無に高い相関を報告し，他の報告も同様の結果を示している^{1,17,23,26,32)}．

種々の悪性腫瘍に対する clonogenic assay の報告が行われているが^{7,8,9,18,24,26,30)}，胃・大腸癌の報告は少数である^{4,13,25)}．

本研究において，良好なコロニー形式を来したものは，胃癌症例49%，大腸癌症例75%であったが，胃癌12例（12%），大腸癌6例（6%）が，感染の為コロニー無形成と判定されており，消化器癌に対しては，感



A



B

図1 Light Microscopy, A: original human colonic cancer which was diagnosed as well differentiated tubular adenocarcinoma. (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 100$), B: tumor xenograft in nude mouse. The histologic picture was consistent with that of the original tumor. (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 100$).

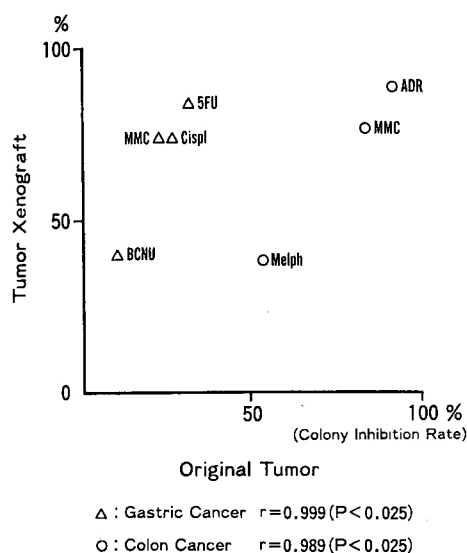


図2 Correlation of In Vitro Chemosensitivities

染防止が問題となった。

胃癌症例の39%は、制癌剤感受性判定に必要な30個のコロニーを形成しなかったが、Laboisie ら¹³⁾も、胃癌7例、大腸癌8例の検討において、胃癌が大腸癌よりコロニー形成率が不良であったと報告している。

胃癌及び大腸癌の制癌剤感受性に関して、50%以上のコロニー形成抑制を有効と判定した場合、両者には著明な制癌剤感受性の差が認められた。clonogenic assay において、有効制癌剤の判定には、75%以上のコロニー形式抑制を基準とした報告が多いが^{17,27)}、Von Hoff ら³³⁾、Sandbach ら²⁴⁾は、固型腫瘍に関しては、50%のコロニー形式抑制を基準とし、in vitro-in vivo の相関があったと報告している。

本研究において、75%のコロニー形成抑制を基準とすると、臨床的に胃・大腸癌に有効とされている5-FUの様な制癌剤までもが、かなり低い有効率となり、in vitro の有効率と臨床における有効率とが相違する。

しかし、50%のコロニー形成抑制を判定基準に使用した場合は、各制癌剤の in vitro における有効率と、臨床における有効率とは、ほぼ一致した値となる。ADM, Cisplatin, 5-FU, MMC 等の制癌剤は、進行胃癌に対して、20~30%の臨床有効率を示し^{12,14,21,34)}、本結果も類似の値を示し、本法において、胃・大腸癌の制癌剤感受性を判定する場合には、in vitro の感受性判定基準として、50%コロニー形成抑制を用いた方が適当であると考えられた。

Trope ら²⁹⁾は、tritiated thymidine, tritiated deoxyuridine の癌細胞への取り込みを利用して、胃・大腸癌の、制癌剤に対する感受性の heterogeneity に関し検討し、胃癌と大腸癌の制癌剤に対する感受性は異なっているであろうと述べている。

本研究においては、大腸癌は胃癌に比し、制癌剤に対する感受性は著明に高く、特に MMC に対して、大腸癌は胃癌に比し有意に感受性が高いという結果を得た。

しかし、臨床における治療効果は、一般に胃癌が大腸癌に比し良好であり^{3,5,11,12,15,16,34,35)}、本結果と相違している。この理由として、臨床的效果判定を行い得る症例が、ほとんど進行癌であるのに対し、本研究対象は、外科治療切除例が多い事、clonogenic assay を施行した胃癌症例の半数近くが不十分なコロニー形成しか示さず、感受性判定を行い得た症例がすでに選択されている可能性、又、大腸癌の方がコロニー形成率が高く、この為、in vitro においてより高感受性と判定された可能性が考えられる¹⁹⁾。画一的な方法で、性格を異にする異種腫瘍を比較する事が問題なのかもしれないが、この点については、今後の検討が必要である。

clonogenic assay において、コロニーを形成する細胞が腫瘍細胞である事は、多数の報告において確認されている^{7,8,9,10,13,24,28,30)}。

本研究では、in vitro における感受性判定結果が、腫瘍細胞のみの感受性を反映している事を確認する為、ヌードマウスを用いた比較実験を行った。原腫瘍とヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性スペクトラムは、有意の相関を示し、in vitro でコロニーを形成する細胞が腫瘍細胞であることが証明された。

結 語

胃癌と大腸癌の制癌剤に対する感受性の差異を検討する目的で、胃癌104症例、大腸癌102症例に clonogenic assay を施行し、in vitro におけるコロニー形成能、制癌剤感受性を検討し、以下の結論を得た。

(1) 制癌剤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、胃癌49% (51/104)、大腸癌75% (76/102) であり、胃癌のコロニー形成は、大腸癌に比し、有意に不良であった ($p<0.001$)。

(2) 全制癌剤に対する感受性は、大腸癌が胃癌に比し、有意に高感受性であった ($p<0.001$)。

(3) MMC は、胃癌に比し、大腸癌に対して著明に

高い抗腫瘍効果を示した ($p < 0.025$).

(4) ノードマウスを用いた感受性比較実験において, *in vitro* でコロニーを形成する細胞は, 腫瘍細胞であることが確認された.

稿を終えるにあたり, 御懇篤な御指導と御校閲を賜りました. 京都大学第2外科, 日笠頼則教授に深甚なる感謝の意を表します.

さらに, 直接の御指導・御鞭撻をいただきました. 京都大学第2外科, 里村紀作助教授, 福井医科大学第2外科, 谷川允彦助教授に深く感謝いたします.

参考文献

- 1) Alberts DS, Chen HSG, Soehnlen B, et al: *In vitro* clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer to chemotherapy. *Lancet* 1980; 8190: 340.
- 2) Alberts DS, Salmon SE, Chen HS G, et al: Pharmacologic studies of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. *Cancer Chemother Pharmacol* 1981; 6: 253-264.
- 3) Baker LH, Talley RW: Phase III comparison of the treatment of advanced gastrointestinal cancer with bolus weekly 5-FU VS. Methyl-CCNU plus bolus weekly 5-FU. A Southwest Oncology Group Study *Cancer* 38: 1-7, 1976.
- 4) Buick RN, Fry SE, Salmon SE: Application of *in vitro* soft agar techniques for growth of tumor cells to the study of colon cancer. *Cancer* 1980; 45: 1238-1242.
- 5) Engstrom PP, Macintyre: Combination chemotherapy of advanced colorectal cancer utilizing 5-Fluorouracil, Semustine, Dacarbarim, Vincristine, and Hydroxyurea: A phase III trial by the Eastern Cooperative Oncology Group (EST: 4275) *Cancer* 49: 1555-1560, 1982.
- 6) Falkson G, Falkson HC: Fluorouracil, methyl CCNU and vincristine in cancer of the colon. *Cancer* 1976; 38: 1468-1470.
- 7) Hamburger AW, Salmon SE: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* 1977; 60: 846-854.
- 8) Hamburger AW, Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science (Wash, DC)* 1977; 197: 461-463.
- 9) Hamburger AW, Salmon SE, Kim MB, et al: Direct cloning of human ovarian carcinoma in agar. *Cancer Res* 1978; 35: 3438-3443.
- 10) Harris GJ, Zeagler J, Hodach A, et al: Ultrastructural analysis of colonies growing in a human tumor cloning system. *Cancer* 1982; 50: 722-726.
- 11) Kemeny N, Yagoda A: Therapy for metastatic colorectal carcinoma with a combination of Methyl-CCNU, 5-Fluorouracil, Vincristine and Streptozotocin (MOF-Strep). *Cancer* 45: 876-881, 1980.
- 12) Kovach JS, Moertel CG: A controlled study of combined 1,3-BIS-(2-chloroethyl)-1-Nitrosourea and 5-Fluorouracil therapy for advanced gastric and pancreatic cancer. *Cancer* 33: 563-567, 1974.
- 13) Laboisie CL, Augeron C, Potet F: Growth and differentiation of human gastrointestinal adenocarcinoma stem cells in soft agarose. *Cancer Res* 1981; 310-315.
- 14) Leichman L, MacDonald B, Dindogru A, et al: Platinum: a clinical active drug in advanced adenocarcinoma of the stomach. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1982; (Abstr) 23: 110.
- 15) Lokich JJ, Skarin AT: Lack of effectiveness of combined 5-Fluorouracil and Methyl-CCNU therapy in advanced colorectal cancer. *Cancer* 40: 2792-2796, 1977.
- 16) Macdonald JS, Woolley PV: 5-Fluorouracil, Adriamycin, and Mitomycin-C(FAM) combination chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer. *Cancer* 44: 42-47, 1979.
- 17) Mann BD, Kern DH, Guiliano AE, et al: Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. Retrospective pilot study. *Arch Surg* 1982; 117: 33-36.
- 18) Meyskens FL: Human melanoma colony formation in soft agar. *Prog Clin Biol Res* 1980; 48: 85-99.
- 19) 水野恵文: ヒト悪性腫瘍とノードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性の相関に関する研究. *日本外科宝函* 1984; 53: 221-231.
- 20) Moertel C: Chemotherapy of gastrointestinal cancer. *N Engl J med* 1978; 229: 1049.
- 21) Moertel CG, Lavin PT: Phase II, III chemotherapy studies in advanced gastric cancer. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1816-1869.
- 22) Moertel CG, Mittelman JA: Sequential and combination chemotherapy of advanced gastric cancer. *Cancer* 38: 678-682, 1976.
- 23) Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen BJ, et al: Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells in anticancer agents. *N Engl J Med* 1978; 198: 1321-1327.
- 24) Sandbach J, Von Hoff DD, Clark G, et al: Direct cloning of human breast cancer in soft agar culture. *Cancer* 1982; 50: 1315-1321.
- 25) Schlag P, Schreml W: Heterogeneity in growth pattern and drug sensitivity of primary tumor and metastases in human tumor colony-forming assay. *Cancer Res* 1982; 42: 4086-4089.
- 26) Stanistic TM, Buick RN: *In vitro* clonal assay for bladder cancer: clinical correlation with states of urothelium in 33 patients. *J Urol* 1980; 124:

- 30-33.
- 27) Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y, et al: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* 1982; **42**: 2159-2164.
- 28) Thomson SP, Meyskens FLJ: Method for measurement of self-renewal capacity of clonogenic cells from biopsies of metastatic human malignant melanoma. *Cancer Res* 1982; **42**: 4606-4613.
- 29) Trope C, Hakansson L, Dencker H: Heterogeneity of human adenocarcinomas of the colon and the stomach as regards sensitivity to cytostatic drugs. *Neoplasma* 1975; **22**: 423-430.
- 30) Von Hoff DD, Casper J, Bradley E, et al: Direct cloning of human neuroblastoma cells in soft agar culture. *Cancer Res* 1980; **40**: 3591-3597.
- 31) Von Hoff DD, Casper J, Bradley E, et al: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* 1981; **70**: 1027-1032.
- 32) Von Hoff DD, Cowan J, Harris G, et al: Human tumor cloning: feasibility and clinical correlations. *Cancer Chemother Pharmacol* 1981; **6**: 265-271.
- 33) Von Hoff DD, Page C, Harris G, et al: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1981; (Abstr) **22**: 154.
- 34) Wasserman TH, Comis RL, Goldsmith M, et al: Tabular analysis of the clinical chemotherapy of solid tumors. *Cancer Chemother Rep* 1975; **6**: 399-419.
- 35) Phase II-III chemotherapy Studies in Advanced Gastric Cancer. The Gastrointestinal Tumor Study Group. *Cancer Treat Rep* **63**: 1871-1876, 1979.