

ヌードマウス可移植性腫瘍を用いた in vivo, in vitro 制癌剤感受性の検討

*京都大学医学部外科学教室第2講座

**福井医科大学第2外科

水野 恵文*, 里村 紀作*, 田中 紘一*, 谷川 允彦**

〔原稿受付：昭和60年8月2日〕

Correlation of in vitro Clonogenic Assay Data with in vivo Chemosensitivity of Human Rhabdomyosarcoma Xenografts

YOSHIHUMI MIZUNO*, KISAKU SATOMURA*, KOICHI TANAKA*
and NOBUHIKO TANIGAWA**

*The 2nd Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

**The 2nd Department of Surgery, Fukui Medical College

In order to investigate whether the results of in vitro clonogenic assay were predictive of in vivo results, we examined both the in vitro and in vivo chemosensitivity of two human rhabdomyosarcoma xenografts (Rh-P and Rh-M) maintained in nude mice. The following results were obtained:

(1) In vitro colony inhibition and in vivo growth inhibition by anticancer drugs showed a significant correlation ($r=0.96$, $p<0.01$) in Rh-M and showed a tendency to correlate ($r=0.81$, $p<0.1$) in Rh-P.

(2) Separating tumors into anticancer drug-sensitive or -resistant categories on the basis of in vitro colony inhibition, the results showed prediction of sensitivity to be 67% accurate, and prediction of resistance to be 100% accurate. This correlation of in vitro and in vivo results was similar to that observed in previous clinical reports.

(3) In vitro clonogenic assay may be a useful tool for predicting the in vivo chemosensitivity of human tumors.

Key word: Nude mouse, Tumor xenograft, Rhabdomyosarcoma, Clonogenic assay, Chemosensitivity.

索引語: ヌードマウス, 異種移植腫瘍, 横紋筋肉腫, クロノジェニックアッセイ, 制癌剤感受性,

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

要 旨

ヌードマウス可移植性横紋筋肉腫2系を用いて, *in vitro* の制癌剤感受性試験である clonogenic assay の判定結果と, ヌードマウスを用いた *in vivo* の実験化学療法の結果とを比較検討し, 以下の結論を得た.

Clonogenic assay の効果判定基準を50%以上のコロニー抑制, ヌードマウスを用いた実験化学療法の効果判定基準を58%以上の増殖抑制とすると, clonogenic assay の効果薬剤予測率は67%, 無効薬剤予測率は100%であった. これは臨床例における clonogenic assay の効果予測率と類似の結果であった. 又, *in vitro* における各制癌剤のコロニー抑制率と, ヌードマウスにおける増殖抑制率との間には, 1例において良好な相関($r=0.96, p<0.01$)が, 1例において相関する傾向($r=0.81, p<0.1$)が認められた.

ヌードマウス-ヒト腫瘍系とともに, clonogenic assay は人癌化学療法の有力な実験系と考えられた.

緒 言

悪性腫瘍に対する化学療法は, 近年著しく進歩し, 臨床効果も他療法との併用もあいまって, かなり良好な成績をあげつつある. 化学療法の成績を向上させる為に, 有効制癌剤の開発が待たれるが, 臨床的には現在使用されている制癌剤で, よりいっそうの効果をあげることが要求されている.

この為には, 個々の腫瘍に対する制癌剤の効果をあらかじめ予測することが必要であり, 近年, 種々の制癌剤感受性試験が考案され, 臨床応用もなされている.

1977年, Hamburger, Salmon が二層軟寒天培地を用いた clonogenic assay を報告し, 腫瘍細胞の生死を *in vitro* におけるコロニー形成能として把握し, その判定結果と臨床効果との良好な相関が報告されている.

我々も, 200例を超す臨床症例に clonogenic assay を施行し, それらのコロニー形成能, 制癌剤感受性に関し検討を行ってきたが, 判定結果と臨床効果との相関について検討し得た症例は少数である.

そこで, ヌードマウス可移植性腫瘍2系を用いて, それらの *in vivo* 及び clonogenic assay における *in vitro* の制癌剤感受性を測定し, *in vitro* の判定結果と *in vivo* の薬剤効果との相関に関し検討した.

方 法

(I) ヌードマウス: 4~8週齢の雄 BALB/c nu/

nu マウス(日本クレア)を使用した. ヌードマウスの飼育及び実験操作は, specific pathogen free 条件下に行った.

(II) 腫瘍: 6才男児横紋筋肉腫症例の腋窩原発巣及び1年2ヶ月後の転移再発巣より, ヌードマウスに継代移植可能で良好な発育を示す Rh-P, Rh-M の2株を得た. Rh-P, Rh-M の2株の組織型には若干の差異を認めるものの, 両株ともに embryonal type rhabdomyosarcoma であり, 継代移植成功率は95%であった. 両腫瘍は, ヌードマウス背部皮下において卵型の発育を示し, central necrosis は巨大化した場合にのみ認められた. Rh-P は継代10代目で, 体積倍加時間(以下 TVDT)は8日間, Rh-M は継代4代目で TVDT は5日間であり, 増殖の速さは Rh-M の方がかなり速い性質を持っていた.

腫瘍の移植は, 16G トロカー針を用いて行い, ヌードマウス背部皮下に1mm 角数個の腫瘍片を移植した.

(III) ヌードマウスを用いた実験化学療法: 制癌剤投与量は, マウスにおける LD₅₀ 量を参考に決定した. すなわち, Mitomycin C (MMC) 2 mg/kg, Adriamycin (ADM) 3 mg/kg, Vincristin (VCR) 0.5 mg/kg, Actinomycin D (ACTD) 0.1 mg/kg, Cisplatin (Cispl) 5 mg/kg, Cyclophosphamide (CPA) 80 mg/kg を生食 0.2 ml に溶解し週2回2週, 計4回腹腔内投与した. 対照群は生食のみを投与した. 各実験群はヌードマウス6匹を使用した.

効果判定: 週2回ヌードマウスの体重と腫瘍の大きさを測定した. 腫瘍の長径(L), 短径(W), 及び高さ(H)を測定し, 腫瘍体積を $L \times W \times H / 2$ として, 腫瘍増殖曲線を求めた.

各種制癌剤の抗腫瘍効果は, 薬剤非投与群(対照群)に対する薬剤投与群の腫瘍体積の相対的増殖抑制率を下記の式にて計算し, 観察期間中の最大増殖抑制率で表した.

$$\left[1 - \left(\frac{T_n}{T_0} \cdot \frac{C_0}{C_n} \right) \right] \times 100(\%)$$

ここで,

C₀: 治療開始時の対照群の腫瘍体積

C_n: 治療開始後 n 日目の対照群の腫瘍体積

T₀: 治療開始時の薬剤投与群の腫瘍体積

T_n: 治療開始後 n 日目の薬剤投与群の腫瘍体積

増殖抑制率58%以上を有効と判定した¹⁵⁾.

(IV) clonogenic assay¹⁰⁾: ヌードマウスより

無菌的に摘出した腫瘍を鋭剪刃にて細切し、これを collagenase, DNase を用いた酵素法により分離、腫瘍細胞浮遊液を作成した。MMC 3.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ADR 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, VCR 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ACTD 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Cispl 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Melphalan (CPA の代用として使用) 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるように制癌剤を加え、37°C, CO₂ incubator 内で1時間作用させた。制癌剤を除去した後、二層軟寒天培地において腫瘍細胞を培養した。

効果判定：2～3週間後、倒立顕微鏡にてコロニー形成（50個あるいはそれ以上の細胞集団）を確認した後、Biotran III 全自動コロニーカウンター（New Brunswick Co.）を用いて、各 dish のコロニー数を測定した。各制癌剤の抗腫瘍効果は、control dish に形成されたコロニー数に対して、制癌剤を作用させたもののコロニー形成数が、何%抑制されたか（コロニー形成抑制率）を計算して判定した。

結 果

(I) ヌードマウスを用いた実験化学療法

Rh-P, Rh-M の対照群及び制癌剤投与群の増殖曲線を図1、図2に示した。

ADM 投与群は、制癌剤副作用の為体重減少が著明で、実験途中でマウスの死亡が認められた。他群には、特に副作用を認めなかった。

各制癌剤の示した増殖抑制率を表1に示した。Rh-P に対しては、CPA, Cispl が良好な効果を示し、VCR, MMC にも効果を認めた。しかし、ACTD は全く効果を示さなかった。Rh-M に対しては、CPA, Cispl が高い増殖抑制率を示したが、有効と判定された薬剤はなかった。

Rh-M が Rh-P に比し、全体に制癌剤に対し抵抗性になっている結果であった。

(II) clonogenic assay

in vivo の結果と同じく、Rh-P, Rh-M 両者に対して Melph (CPA の代用) が最も効果を示した。又、Rh-M が Rh-P に比し、薬剤抵抗性となっているのも同様であった(表2)。

(III) in vitro—in vivo の関連

ADM は、マウスへの副作用が強かった為除外して検討した。in vivo の増殖抑制率58%以上、in vitro のコロニー形成抑制率50%以上を有効と判定すれば¹³⁾、in vitro で有効と判定され、in vivo においても効果を

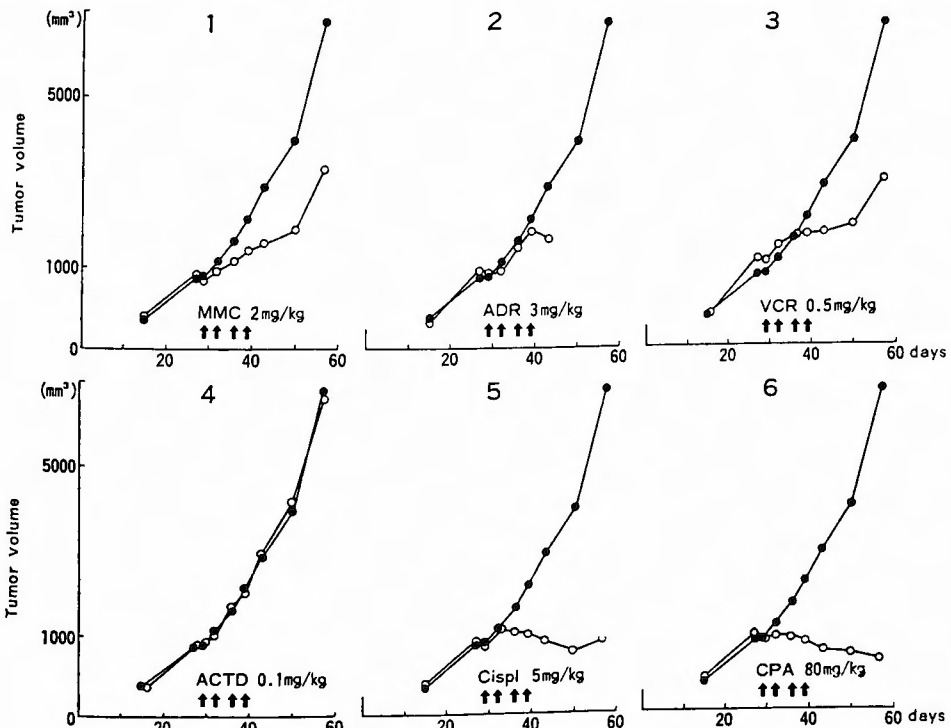


図1 Growth curve of Rh-P

表1 Growth inhibition rate of anticancer drugs in vivo

		Growth inhibition rate (%)	
		Rh-P	Rh-M
1.	MMC	71*	11
2.	ADR	—	—
3.	VCR	78*	9
4.	ACTD	6	29
5.	Cispl	87*	50
6.	CPA	96*	54

*Defined sensitive as $\geq 58\%$ growth inhibition in vivo

表2 Colony inhibition rate of anticancer drugs in vitro

		Colony inhibition rate (%)	
		Rh-P	Rh-M
1.	MMC	52*	34
(2.)	ADR	90	(62)
3.	VCR	61*	35
4.	ACTD	0	23
5.	Cispl	59*	62*
6.	Melph	93*	69*

*Defined sensitive as $\geq 50\%$ colony inhibition in vitro.

示したものは4薬剤, in vitro で無効と判定され, in vivo でも無効であったものは4薬剤であった. in vitro と in vivo で解離を示したものは2薬剤であった(表3).

各制癌剤の示した in vitro のコロニー形成抑制率と in vivo の増殖抑制率との間には, Rh-P において, 有意の直線的相関を ($r=0.96, p<0.01$), Rh-M において相関する傾向を ($r=0.81, p<0.1$) 認めた(図3).

考 按

Clonogenic Assay は, Hamburger, Salmon^{5,6)} により開発された in vitro の制癌剤感受性試験で, 二層軟寒天培地で腫瘍細胞を培養し, その生死をコロニー形成により判定する方法である. 本法は, 腫瘍の cell population の一部 (colony forming unit) を対象とする特色を持っており, その判定結果と臨床効果とのすぐれた相関が報告されている.^{1,9,16,18,25)}

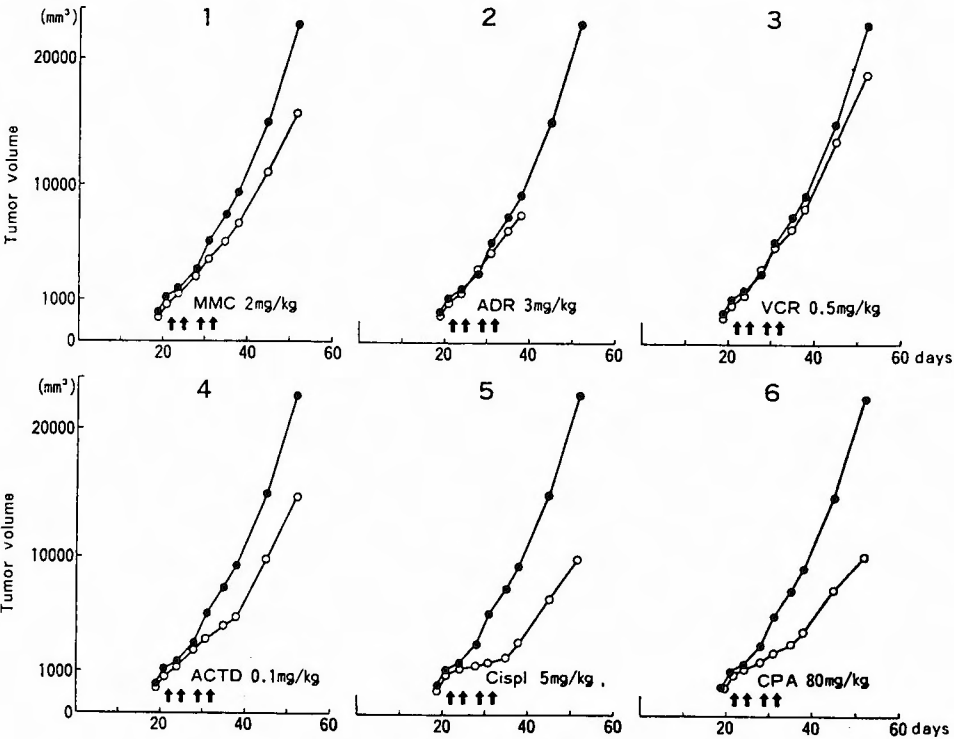


図2 Growth curve of Rh-M

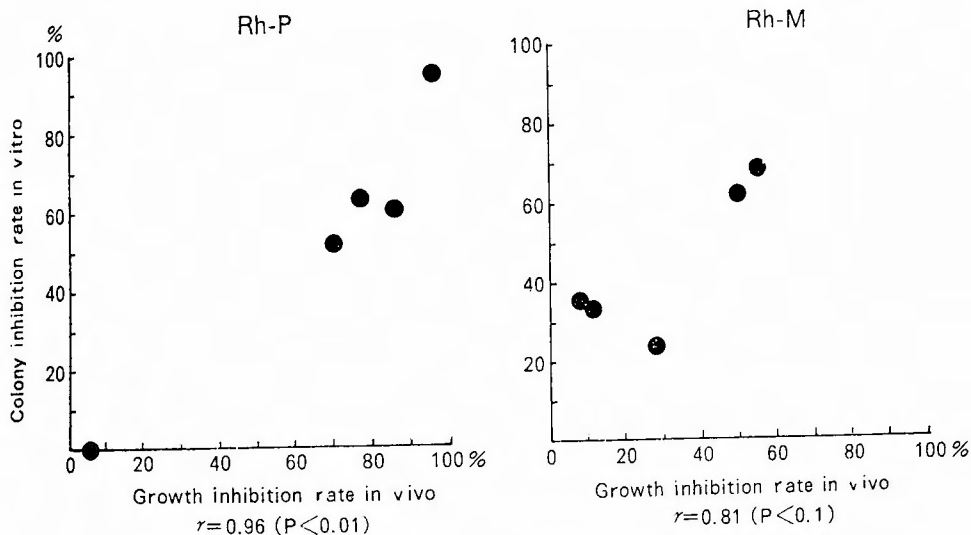


図3 Correlation of in vitro and in vivo and in vivo sensitivity to anticancer drugs

又、本法は2～3週間の短時日で結果判定が出来、比較的早期に臨床への feed back が可能である。

一方、1969年 Povlsen, Rygaard¹⁷⁾ によって初めてヌードマウスにヒト結腸癌が移植され、以後種々の悪性腫瘍が移植、継代され、その腫瘍が原腫瘍の性格を良好に維持することが報告されている。^{8,10,13,21,22,23)} ヌードマウス移植腫瘍を用いて実験化学療法を行い、制癌剤に対する腫瘍の感受性を調べ、臨床へ feed back しようとする試みは、近年、その成績が生まれつつある¹⁴⁾。しかし本法は、結果判定までに最低2～3ヶ月を要し、早期の feed back という点で問題を含んでいるが、in vivo の系として非常に有用と考えられている。ヌードマウスを用いた実験化学療法において、藤田ら⁷⁾ は、時間依存性の制癌剤は連日投与、その他の制癌剤は1～2回/週で計5回投与を行い、それによって得られた実験結果と臨床効果がよく相関したと報告している。他の報告も^{8,12,20)} 投与回数、投与期間によって差はあるものの、大略マウスの LD₅₀ 量を参考

に制癌剤投与量を決定し、我々も 1/4 LD₅₀ 量の4回投与を行った。

効果判定は、Battelle Columbus Laboratories の効果判定基準 T/C ≤ 42%を用いた¹⁵⁾。

我々は、in vitro の制癌剤感受性試験である clonogenic assay の判定結果と in vivo の薬剤効果とが相関しているかどうかを、ヌードマウス可移植性腫瘍を用いて検討した。

Clonogenic assay において、腫瘍細胞と制癌剤との接触濃度に関しては、未だ定説がないが、^{2,9,17,24)} 我々は、制癌剤常用量の人体血中ピークレベルを参考に決定している¹⁰⁾。

又、cyclophosphamide は in vitro では活性でない為、clonogenic assay においてはアルキル化剤として melphalan を用いた⁹⁾。

各制癌剤の示した in vivo の増殖抑制率と in vitro のコロニー形成抑制率との間には、直線的な相関がみられ、clonogenic assay が in vivo の制癌剤効果を良好

表3 In vivo-in vitro associations

NO. of trials	Sensitive both in vitro and in vivo	Sensitive in vitro and resistant in vivo	Resistant in vitro and sensitive in vivo	Resistant both in vitro and in vivo	NO. of Associations
10	4	2	0	4	8

に予測し得る結果が得られた。

Tveit ら²⁴⁾, Gupta ら⁴⁾ もヌードマウス可移植性メラノーマを用いて、制癌剤の *in vitro* の抗腫瘍効果と、ヌードマウスにおける腫瘍の発育遅延が良好に相関したと報告している。

又、効果判定基準を *in vivo* においては58%の増殖抑制、*in vitro* においては50%のコロニー形成抑制とすれば、本実験における clonogenic assay の効果薬剤予測率は4/6 (67%)、無効薬剤予測率は4/4 (100%)となり、この結果は clonogenic assay 判定結果と臨床効果との相関を検討した報告^{19,16,18,25)}と類似している。

Clonogenic assay における効果判定基準として、主に75%のコロニー形成抑制率が用いられているが、Von Hoff ら²⁶⁾ Sandbach ら¹⁹⁾ は、固型腫瘍に関しては50%のコロニー形成抑制を基準として、*in vitro-in vivo* の相関があったと報告している。我々は、200例の胃、大腸癌に対する clonogenic assay の検討において¹¹⁾、*in vitro* において各制癌剤が示したコロニー形成抑制率と、それらの臨床例における有効率とを検討し、50%のコロニー形成抑制を基準とした方が、相関が良い事を報告している。

本実験のヌードマウス可移植性腫瘍2系を用いた検討においても、75%より50%のコロニー形成抑制率を用いた方が、*in vivo* の結果との相関は良好であった。

結 語

in vitro の制癌剤感受性試験である clonogenic assay が *in vivo* の制癌剤効果を良好に反映し得るかを検討する為に、ヌードマウス可移植性腫瘍2系を用いて *in vivo*, *in vitro* 両者の制癌剤感受性判定を行い、以下の結論を得た。

① 各制癌剤の示した *in vivo* の増殖抑制率と *in vitro* のコロニー形成抑制率との間には、直線的な相関が認められた。

② *in vivo* において58%以上の増殖抑制を、*in vitro* において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すれば、clonogenic assay の効果薬剤予測率は67%、無効薬剤予測率は100%と良好な相関を認めた。

③ clonogenic assay は、制癌剤の臨床効果を良好に予測し得る感受性試験であると考えられた。

参 考 文 献

1) Alberts DS, Salmon SE, et al: In-vitro

- clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer to chemotherapy. *Lancet*: 340-342, 1980.
- 2) Bateman AE and Peckham MJ: Assays of drug sensitivity for cells from human tumors: *in vitro* and *in vivo* tests on a xenografted tumor. *Br J Cancer*, **40**: 81-88, 1979.
- 3) Giovannella BC, Stehlin JS, et al: Heterotransplantation of human cancers into nude mice. A model system for human cancer chemotherapy. *Cancer* **42**: 2269-2281, 1978.
- 4) Gupta V, Krishan A, et al: Correlation of *in vitro* clonogenic assay data with *in vivo* growth delays and cell cycle changes of a human melanoma xenograft. *Cancer Res* **43**: 2560-2564, 1983.
- 5) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* **197**: 461-463, 1977.
- 6) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J Clin Invest* **60**: 846-854, 1977.
- 7) 藤田昌英, 田口鐵男: ヌードマウスを用いる制癌剤感受性テスト. 癌と化学療法 **9**: 606-615, 1982.
- 8) 加藤孝子, 石毛英男: ヌードマウス継代人絨毛癌を用いた実験的化学療法とその臨床応用. 癌と化学療法 **8**: 1974-1981, 1981.
- 9) Mann BD, Kern DH, et al: Clinical correlations with drug sensitivities in the clonogenic assay. *Arch Surg* **117**: 33-36, 1982.
- 10) 水野恵文: ヒト悪性腫瘍とヌ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 **53**: 221-231, 1984.
- 11) 水野恵文: 胃・大腸癌の制癌剤感受性の検討—clonogenic assay を用いて—. 日本外科宝函 **53**: 371-377, 1984.
- 12) 永井完治, 雨宮隆太: ヌードマウス移植ヒト肺癌による研究—特に小細胞癌について—. 癌と化学療法 **7**: 924-930, 1980.
- 13) 永井完治, 下里幸雄, 他: 人の腫瘍のヌードマウスへの移植—移植成績と移植腫瘍の性状について—. 癌の臨床 **22**: 745-754, 1976.
- 14) Osieka R and Houchens DP: Chemotherapy of human colon cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer* **40**: 2640-2650, 1977.
- 15) Ovejera AA and Houchens DP: Selection of potential anticancer agents using human tumor xenografts in athymic nude mice, Contract No. 1-CM-67099-NCI, Battelle Columbus Laboratories, Columbus, Ohio 43201, U.S.A.
- 16) Park CH, Wiernik PH, et al: Clinical correlations of leukemic clonogenic cell chemosensitivity assessed by *in vitro* continuous exposure to drug. *Cancer Res* **43**: 2346-2349, 1983.
- 17) Rygaard J and Povlsen Co: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice.

- Acta path microbiol scand **77**: 758-760, 1969.
- 18) Salmon SE, Hamburger AW, et al: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* **298**: 1321-1327, 1978.
 - 19) Sandback J and Von Hoff DD: Direct cloning of human breastcancer in soft agar culture. *Cancer* **50**: 1315-1321, 1982.
 - 20) 下里幸雄, 久保田哲朗: スードマウス移植人癌の化学療法. 癌と化学療法 **6**: 67-75, 1979.
 - 21) 下里幸雄: スードマウス, その癌研究への応用. 蛋白質核酸酵素 **23**: 719-732, 1978.
 - 22) Shimamoto Y, Kameya T, et al: Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **56**: 1251-1260, 1976.
 - 23) Sordat B, Fritsché R, et al: Morphological and functional evaluation of human solid tumors serially transplanted in nude mice. *Proc 1st Intl Workshop on Nude Mice*: 269-278, 1974.
 - 24) Tveit KM, Fodstad O, et al: In vitro sensitivity of human melanoma xenografts to cytotoxic drugs. Correlation with in vivo chemosensitivity. *Int J Cancer* **26**: 717-722, 1980.
 - 25) Von Hoff DD, Casper J, et al: Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* **70**: 1027-1032, 1981.
 - 26) Von Hoff DD and Page C.: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Proc Am Assoc Cancer Res (Abstr)* **22**: 154, 1981.