頭頸部癌に対する抗癌剤感受性試験 ATP 法の検討

田 中 信 之 野 田 一 郎 藤 枝 重 治
津 田 豪 太 斎 藤 等

論文要旨

頭頸部悪性腫瘍に対して、細胞内 ATP 量を指標とした抗癌剤感受性試験 ATP 法を行った。原発臓器または転移リンパ節より外科的に採取した頭頸部悪性腫瘍症例 9 検体、HTC/ C3 細胞株、甲状腺良性腫瘍および KB 細胞株にて検討した。評価可能率は 88.9% (8/ 9) であり、薬剤別感受性陽性率は、CDDP 55.6% (5/ 9), CBDCA 33.3% (1/ 3), 5-FU 25.0% (2/ 8), PEP 55.6% (5/ 9), ADM 50.0% (3/ 6), MMC 66.6% (2/ 3), ACR 100.0% (4/ 4), Act-D 50.0% (2/ 4) であった。臨床応用を行えたものは手術後再発例 2 例で、臨床相関は true positive rate 100% (1/ 1), true negative rate 100% (1/ 1) であった。全体の症例数も少なく今後の集積が必要である。

Key words: 頭頸部癌 (Head and neck cancers), 抗癌剤感受性試験 (Chemosensitivity test), ATP 法 (ATP assay)

はじめに

最近の癌化学療法は新制薬剤の開発や投与法の改良で、ある程度臨床的治療成果をあげつつある。その際治療前に薬剤の効果を予測する感受性試験を導入することにより有効な薬剤を選択し、より高い臨床効果を得ることが可能となり、少しでも副作用を軽減することが可能となる。今回我々は 3 日間で結果のでる細胞内 ATP 量を指標とした感受性試験 (ATP 法) を行い、基礎的検討をしたので報告する。

対象と方法

1. ヒト腫瘍組織 (材料)

原発臓器または転移リンパ節より外科的に採取した頭頸部悪性腫瘍症例 9 検体 (口腔 2, 鼻腔 1, 喉頭 1, 上顎 1, 甲状腺 2, 頸部リンパ節 2), HTC/ C3 細胞株 (甲状腺癌株), 甲状腺良性腫瘍および KB 細胞株 (咽頭癌株) にて検討した。

2. 方 法

手術時、無菌的に採取した新鮮材料を剪刀にて細切り抗生物質で数回洗浄後、酵素処理を行った。酵素は type I collagenase および DNase を用い、37°C 1 時間処理を行った。次に、得られた細胞浮遊液を 70%, 100% 段階 Ficoll-Hypaque 層上に重層後比重遠沈法にて腫瘍細胞層を採取し、これを腫瘍細胞浮遊液とした (図 1)。培養液は 10% RPMI-1640 を用い、生細胞数の

図 1 腫瘍細胞浮遊液採取方法

調整は Trypan blue dye exclusion test により行った。

3. 使用薬剤

抗癌剤は Cisplatin (CDDP), Carboplatin (CBDCA), 5-Fluorouracil (5-FU), Peplomycin (PEP), Adriamycin (ADM), MitomycinC (MMC), Aclacinomycin (ACR), ActinomycinD (Act-D) を使用

福井医科大学耳鼻咽喉科

Nobuyuki TANAKA, Ichiro NODA, Shigeharu FUJIEDA, Gota TSUDA, Hitoshi SAITO : *In vitro* chemosensitivity test of head and neck cancer evaluated by ATP assay

Department of Otorhinolaryngology, Fukui Medical School, Fukui

表 1 使用抗癌剤濃度

Drug	Final in vitro concentration (μ g/ml)
CDDP	0.1
CBDCA	3.611
5-FU	10.0*
PEP	0.05
ADM	0.04
MMC	0.1
ACR	0.1
Act-D	0.2

最高血中濃度の 1/10

* 時間依存性である 5-FU は peak 濃度

図 2 細胞内 ATP 測定原理

図 3 腫瘍細胞内 ATP 量測定方法

した。薬剤濃度は、基礎的検討から血中濃度の約10分の1を原則とし、時間依存性である 5-FU は血中 peak 濃度とした (表1)。

4. 測定法

細胞内 ATP 量は生物発光法で測定した。この方法はルシフェリンと ATP がルシフェラーゼ存在下で反応が起こり、オキシルシフェリンの生成と発光を伴うことにより、この発光をルミノメーターで測定し、細胞内 ATP 量を定量するものである (図2)。

抗癌剤存在下72時間培養後、細胞浮遊液を調整し Tris-HCL (pH 7.75) EDTA 4mM buffer (Tris-EDTA buffer) を加え、さらに Luciferin-Luciferase reagent を混和し、ルミノメーター (LKB WALLAC 1250) にて測定した。薬剤感受性の判定は薬剤処理群 ATP 量のコントロール ATP 量に対する百分率にて行い、薬剤処理群がコントロールの50%以下に低下したものを薬剤感受性陽性と判定した (図3)。

図 4 腫瘍細胞数と ATP 量の関係

図 5 細胞種類別 ATP 量

結 果

1. 生細胞数と ATP 量との相関

KB 細胞株を用い、 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 個の細胞数での ATP 量を測定した。各々の生細胞数と ATP 量との関係をグラフにすると正の相関を示した (図4)。

2. 癌、良性腫瘍、リンパ球の ATP 量

1×10^6 個の癌、良性腫瘍、リンパ球の ATP 量は、癌 > 良性腫瘍 > リンパ球の順であった (図5)。

3. 抗癌剤感受性試験結果 (表2)

手術的に切除された9例に ATP 法を施行し、8例 (88.9%) が評価可能であった。1例は検体不良であった。薬剤別感受性陽性率をみると、CDDP 55.6% (5/9), CBDCA 33.3% (1/3), 5-FU 25.0% (7/8), PEP 55.6% (5/9), ADM 50.0% (3/6), MMC 66.6

表 2 ATP 法による抗癌剤感受性結果

case	drug	CDDP	5-FU	PEP	ADM	MMC	ACR	Act-D	CBDCA
1. nasal cavity ca. (small cell ca.)		55.9 *	68.7	100.0	73.2	N. T.	N. T.	73.2	N. T.
2. oral floor ca. (s. c. c.)		69.5	55.3	24.0	N. T.	N. T.	3.7	N. T.	N. T.
3. laryngeal ca. (s. c. c.)		35.1	36.1	35.6	21.7	37.8	N. T.	35.3	N. T.
4. thyroid ca. (papillary ca.)		6.9	14.9	37.8	100.0	N. T.	1.5	92.0	N. T.
5. maxillary ca. (s. c. c.)		34.9	N. T.	12.1	28.6	76.5	26.5	8.7	N. T.
6. bladder ca. neck L.N. meta (t.c.c.)		16.3	82.7	21.9	N. T.	N. T.	5.5	N. T.	N. T.
7. gingival ca. (s. c. c.)		34.1	67.9	69.1	N. T.	N. T.	N. T.	N. T.	28.9
8. thyroid ca. (papillary ca.)		82.1	79.3	81.5	67.2	N. T.	N. T.	N. T.	87.5
9. skin tumor neck L.N. meta (trichogenic ca.)		84.8	93.1	72.3	50.0	35.6	N. T.	N. T.	95.7
10. HTC/C3 cell line		6.9	14.9	37.9	100.0	N. T.	1.5	92.0	N. T.
11. thyroid adenoma		86.6	N. T.	24.0	63.6	65.8	28.0	47.5	N. T.

s.c.c. ; squamous cell carcinoma

t.c.c. ; transitional cell carcinoma

N. T. ; not tested

*percent of control ; control = 100

有効薬剤 (—で示す) ; 対照に比べ50%以下のものを有効薬剤とした

% (2/3), ACR 100.0% (4/4), Act-D 50.0% (2/4)であった。また、扁平上皮癌によく使用される薬剤を検討すると、薬剤陽性率は CDDP 75.0% (3/4), CBDCA 100.0% (1/1), 5-FU 33.3% (1/3), PEP 75.0% (3/4) という結果であった。

4. 臨床応用例

感受性試験の結果をもとに臨床応用を試みたのは、表2における症例 1. 鼻腔癌 (small cell ca.) と 7. 歯肉癌 (s. c. c.) の2例である。両者とも手術施行後における再発例であり、全身的に投与を行った。臨床効果は日本癌治療学会の定めた固定癌化学療法直接効果判定基準により判定した。前者は有効薬剤がなく、CDDP + 5-FU 全身投与を試みたが NC だった。後者では感受性試験で sensitive であった CBDCA を全身投与し PR を示した。臨床相関は、true positive rate 100% (1/1), true negative rate 100% (1/1) となった。

考 察

抗癌剤による化学療法は現在癌治療の重要な位置を占め、多彩な生物学的特性を有する悪性腫瘍に対して有効

な化学療法を行うために、各種の抗癌剤感受性試験が工夫されてきた^{1,2)}。当科においても、in vitro でのシンチレーション法およびコロニー法を導入し、薬剤に対する感受性率およびその臨床相関を検討してきた^{3,4,5)}。今回我々は、頭頸部悪性腫瘍に対して極めて迅速 (3日) に結果が出る細胞内 ATP 量を指標とした感受性試験 (ATP 法) を行い、頭頸部悪性腫瘍に対する応用の可能性を検討した。ATP は細胞にとって最も重要なエネルギー源であり、細胞が障害を受けると早急に分解される不安定な物質で、その変化は細胞の生物学的活性をよく反映すると考えられている^{6,7,8)}。

ATP 量と生細胞数は高い相関を示し、生物学的活性が高い癌は、良性腫瘍、リンパ球に比べ約10倍の ATP を含有していた。問題となる腫瘍浸潤リンパ球も Ficoll-Hypaque 比重遠沈法によりできる限り除去しているが、上記の結果をみるとリンパ球の若干の混入も感受性試験には何ら影響がないと考えられる。本報告では症例数は少ないものの、評価可能率は88.9%であり、消化器悪性腫瘍に対して報告されている佐伯ら⁹⁾、地主ら¹⁰⁾の94.7%、87.0%と同様に高い結果を得ることができた。薬剤別感

受性陽性率では、5-FU 25.0%, CBDCA 33.3%以外は50%以上と予想よりかなり高いものであるが、まだ全体の症例数も少なく今後の集積が必要である。

感受性試験の臨床効果との相関では、頭頸部領域は手術根治例が多く、adjuvant 的化学療法施行が多く化学療法効果判定が困難なため今回評価できたのは再発例2例であった。2例ともに ATP 法と臨床効果は相関していたが、症例数が少ないため今後さらに症例を重ねていきたいと考えている。

ATP 法の利点は、(1) 判定時間が短く (3 日) 簡便である。(2) そのため腫瘍の heterogeneity を反映する、(3) ^3H -TdR のような放射性同位元素を使用しないのでどのような施設でも行える、(4) 少ない腫瘍細胞でも ATP 量の測定が可能である (1×10^4 cell でも可能)、(5) 評価可能率が高い、などがあげられる。今後このような特徴をもつ ATP 法と、当科において検討してきたシンチレーション法およびコロニー法との比較検討をすすため、患者の QOL, CR 率向上をめざしていきたいと考えている。

SUMMARY

For the purpose of achieving individually effective chemotherapy against head and neck cancers, the chemosensitivity was determined by using the cellular ATP analysis. Nine tumors derived from surgical specimens of head and neck cancer, HTC/ C3 cell line, thyroid benign tumor and KB cell line were examined by ATP assay.

As a result, the evaluable rate of ATP assay was 88.9% (8/ 9). The positive evaluation of this assay was defined as more than 50% decrease of the cellular ATP contents, compared with the non-treatment tumors. The positive rates of ATP assay were CDDP 55.6%, CBDCA 33.3%, 5-FU 25.0%, PEP 55.6%, ADM 50.0%, MMC 66.6%, ACR 100.0%, and Act-D 50.0%, respectively. Two patients, postoperative recurrent cases, were treated according to the results of ATP test. One was true positive and the other was true negative. Clinical correlation rate was 100% so far. As the number of cases is small in this investigation, continuous study should be performed.

文 献

- 1) 田口鐵男：制癌剤感受性試験の意義と歴史．癌と化学療法 9：570-574, 1982.
- 2) 星 昭夫, 北原武志, 佐々木康綱：抗癌剤受性テスト (末舛恵一, 西條長宏編) メジカルビュー社, 東京, p21-46, 1986.
- 3) 斎藤 等：頭頸部腫瘍—最近の治療の動向：化学療法—方法と適応, 限界, 感受性試験からみた薬剤の選択. 医学のあゆみ 152 (6)：363-366, 1990.
- 4) 大坪俊雄, 他：制癌剤感受性試験の頭頸部癌への臨床応用. 頭頸部腫瘍 Vol. 17 No. 2：76-80, 1991.
- 5) Tanigawa N., Kern D. H. et al.: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in toft agar culture. Cancer Research, 42：2159-2164, 1982.
- 6) Kangas L., Gronroos M., Nieminen A. L.: Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agent in vitro. Med. Biol. 62：338-343, 1984.
- 7) 坂口善久, 他：細胞生物活性の指標としての細胞内 ATP 量, Cyto-protection and biology Vol. 7：p275-281, 1989.
- 8) Garewal H. S., Ahmann F. R., et al.: The ATP assay; anti-cancer drug effects on malignant cell growth. Sci. Proc. Am. Assoc. Cancer RES. 26：334, 1985.
- 9) 佐伯俊昭, 他：消化器固形癌に対する In vitro 抗癌剤感受性試験としての SDI 法と ATP 法の臨床成績の比較. 癌と化学療法 16 (5)：2025-2030, 1989.
- 10) 地主和人, 他：消化器癌に対する ATP Assay の臨床的検討. 癌と化学療法 17 (11)：2235-2239, 1990.