表在性膀胱腫瘍に対する膀胱内注入療法をモデルとした dye exclusion assay による制癌剤感受性試験

米沢市立病院泌尿器科

小 関 清 夫

福島医大泌尿器科

入 沢 千 晴 白 岩 康 夫

CHEMOSENSITIVITY TEST ON SUPERFICIAL URINARY BLADDER CANCER USING THE DYE EXCLUSION ASSAY —A Model of Intravesical Chemotherapy—

Kiyoo Koseki

Department of Urology, Yonezawa City Hospital

Chiharu Irisawa and Yasuo Shiraiwa

Department of Urology, Fukushima Medical College

A chemosensitivity test was carried out on superficial bladder cancers using the trypan blue dye exclusion assay for the purpose of screening chemosensitive drugs for intravesical chemotherapy.

Transplantable murine bladder tumor cells (MBT-2) were incubated, *in vitro*, in the presence of adriamycin (4, 40, 400, 1000 $\mu\text{g/ml}$) as well as verapamil (3, 30, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$) at 5% CO_2 , 37°C for two hours. After cellular viabilities were calculated, MBT-2 cells were inoculated into the hind limbs of mice. The cellular viability was correlated well with the ratio of tumor appearance, tumor growth inhibition and prolongation of survival, and was dose dependant in the adriamycin treated groups. On the other hand, a reduction of cellular viability, tumor growth inhibition and prolongation of survival were seen in the high dose verapamil (100, 500 $\mu\text{g/ml}$) treated groups.

Human superficial bladder cancer cells were incubated in the presence of adriamycin, 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin, mitomycin C and pepleomycin (1000 $\mu\text{g/ml}$) and/or verapamil (500 $\mu\text{g/ml}$). The reduction rates of cellular viability markedly varied with the kind of anticancer drugs. A reduction of cellular viability of human tumor cells as well as MBT-2 cells was seen in the verapamil treated groups.

This rapid and handy assay seems to be useful for the purpose of screening chemosensitive drugs for intravesical chemotherapy.

Key words: intravesical chemotherapy, dye exclusion assay, chemosensitivity test

要旨: 表在性膀胱腫瘍に対する膀胱内注入療法時の薬剤のスクリーニングを目的として, trypan blue 染色を用いた dye exclusion assay による各種制癌剤の感受性試験を試みた。

マウス可移植膀胱腫瘍細胞 (MBT-2) を用い, *in vitro* で各種濃度の adriamycin (4, 40, 400, 1,000 $\mu\text{g/ml}$) 存在下に, 5% CO_2 , 37°C で2時間インキュベートし, cellular viability 算定後マウス大腿皮下に移植した。cellular viability と腫瘍生着率, 腫瘍発育抑制, 生存期間延長とはよく相関し, adriamycin 処理群では濃度依存性が認められた。一方, verapamil 高濃度処理群 (100, 500 $\mu\text{g/ml}$) でも, cellular viability の低下, 腫瘍発育抑制, 生存期間延長が認められた。

表在性膀胱腫瘍症例を対象として, 生検により得られた腫瘍細胞を用い, adriamycin, 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin, mitomycin C, pepleomycin 各々1,000 $\mu\text{g/ml}$ 存在下に同様に処理し, cellular viability を算定した。また, 症例によっては verapamil を500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で単剤処理, また

は併用した。臨床例においては制癌剤の種類により cellular viability にかかりの差が出る事、また、verapamil 単剤でも高濃度で用いた場合、MBT-2と同様に cellular viability が低下する事が確認された。

本法により、膀胱内注入療法時の薬剤選択において、迅速、簡便なスクリーニングが可能であり、有用と思われる。

キーワード：膀胱内注入療法，色素染色拒否試験，制癌剤感受性試験

緒 言

表在性膀胱腫瘍に対する治療として、経尿道的腫瘍切除術(TUR-Bt)が行われているが、腫瘍切除後の再発率は40～70%と高く^{1)~3)}，そのうち20%内外は浸潤性に進展するとされている⁴⁾。このため腫瘍切除後の再発予防を目的として、現在、各種制癌剤の膀胱内注入療法(膀胱療法)が行われておりその有用性が報告されているが⁵⁾，一般に薬剤の選択は経験的になされている事が多い。また、これらの治療に抗して頻回の再発を繰り返す症例も多く、膀胱療法による効果は必ずしも十分ではない。近年、薬剤耐性癌細胞における抗癌剤排出阻害剤である verapamil と制癌剤併用膀胱療法により、より高い有効率を得られたとの報告も見られる⁶⁾。

今回、我々はこれら膀胱療法時の薬剤の選択を簡便かつ迅速にスクリーニングする事を目的として、dye exclusion assay による各種制癌剤の膀胱療法を模した薬剤感受性試験を試みた。すなわち、可移植マウス膀胱腫瘍、および生検により得られたヒト表在性膀胱腫瘍を対象として、trypan blue 染色を用いた超生体染色により、色素吸着性の有無により死細胞と生細胞とを染め分け、cellular viability を算定する方法⁷⁾を用いた訳である。今回、各種制癌剤のみならず、verapamil 使用群に関しても検討を加えた。

材料および方法

実験1：N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-formamide(FANFT)により発癌した同系可移植膀胱移行上皮癌細胞(MBT-2)⁸⁾を用いた。C3H/He マウスの皮下に継代された MBT-2腫瘍塊を洗浄後、trypsin 処理にて単離浮遊細胞液を作製した。マイクロプレートを用い、adriamycin(4, 40, 400, 1,000 μ g/ml)存在下に、RPMI-1640培養液にて臨床使用例に準じ、5% CO₂, 37℃で2時間インキュベートした。0.25%trypan blue 染色を行ない、血球計算板上にて cellular viability を算出後、同培養液にて3回洗浄し、6週齡、雌 C3 H/He マウス70尾を用い、その大腿皮下に8 $\times$ 10⁵cells を移植し、腫瘍生着率、腫瘍増殖曲線、生存曲線を求

め無処置コントロールと対比した。なお、移植された腫瘍塊はほぼ球形を呈するため、平均腫瘍径($\bar{R}$)を毎週測定し、腫瘍容積を $V=4/3\pi(\bar{R}/2)^3$ で表示し、腫瘍増殖曲線を作製した。

実験2：MBT-2を用い、verapamil (3, 30, 100, 500 μ g/ml)存在下に実験1と同様に処理し、C3H/He マウス75尾を用い、cellular viability, 腫瘍生着率、腫瘍増殖曲線、生存曲線を求め無処置コントロールと対比した。

実験3：表在性膀胱腫瘍症例を対象として、生検により得られた腫瘍塊を用い、実験1と同様に処理し、cellular viability を算出し無処置コントロールと対比した。制癌剤として、mitomycin C (MMC), adriamycin (ADM), 4'-O-tetrahydropyranyladriamycin (THP-ADM), pepleomycin (PLM) を臨床使用例に準じ1,000 μ g/mlの濃度で用いた。また、症例によっては verapamil を吉本ら⁶⁾の報告に準じ500 μ g/mlの濃度で、単剤、または併用で用いた。この際、あらかじめマイクロプレート内に薬剤を注入、凍結保存しておいたものを用い、症例ごとに融解後、細胞浮遊液を滴下し検体処理を行なった。

結 果

実験1：Fig. 1に ADM 処理濃度と、cellular viability との関係を示した。MBT-2での cellular viability は ADM の濃度依存性に低下した。Fig. 2に cellular viability と腫瘍生着率との関係を示した。cellular viability と腫瘍生着率とはよく相関し、ADM 40 μ g/ml 以上の高濃度処理群では、コントロール、および ADM 4 μ g/ml 処理群に比して有意に腫瘍生着率は低下していた。Fig. 3に腫瘍増殖曲線を、Fig. 4に生存曲線を示すが、いずれも ADM 40 μ g/ml 以上の高濃度処理群では、コントロール、および ADM 4 μ g/ml 処理群に比して有意に、腫瘍増殖抑制、生存期間の延長を認めた。以上の事から、MBT-2での cellular viability は ADM の濃度依存性に低下し、その cellular viability と腫瘍生着率とはよく相関する事が判明した。また、腫瘍発育抑制、生存期間の延長にも濃度依存性

Fig. 1 ADM Concentration and Cellular Viability

Fig. 2 The Ratio of Tumor Appearance and Cellular Viability

Fig. 3 Tumor Growth Curve

Fig. 4 Survival Curve

Fig. 5 Verapamil Concentration and Cellular Viability

Fig. 6 The Ratio of Tumor Appearance and Cellular Viability

Fig. 7 Tumor Growth Curve

の認められる事が判明した。

実験 2: Fig. 5 に verapamil 処理濃度と, cellular viability との関係を示すが, MBT-2での cellular viability verapamil の濃度依存性に低下していた, Fig. 6 に cellular viability と腫瘍生着率との関係を示した, cellular viability と腫瘍生着率とはよく相関し, verapamil 500 μg/ml 処理群では, 他の群に比して有意に腫瘍生着率は低下していた。Fig. 7 に腫瘍増殖曲線を, Fig. 8 に生存曲線を示すが, いずれも verapamil 100 μg/ml 以上の高濃度処理群では verapamil 30 μg/ml 以下, およびコントロール群に比して有意に腫瘍増

Fig. 8 Survival Curve

Fig. 9

殖抑制, 生存期間の延長を認めた. 以上の事から, verapamil には高濃度で用いた場合, それ自体が腫瘍細胞に対して cytotoxic に働く作用のある事が判明した.

実験 3 : Fig. 9 に 6 症例における制癌剤感受性試験の結果を示した. 症例 3 を除き, すべて病理組織学的に表在性腫瘍であり, 症例 3 に対しては, 後に根治手術を施行した. Fig. 9 の縦軸には, コントロールに対する薬剤処理群での cellular viability の % を示した. これらの検討により, 臨床例では, 制癌剤の種類によりその制癌効果にかなり差が出る可能性のある事, verapamil 単剤でも cellular viability のかなり低下する症例のある事, および制癌剤と verapamil 併用群で cellular viability の低下がより顕著な傾向のある事が判明した.

写真 1 に症例 5 における trypan blue 染色によるコントロールの染色様式を示した. 生細胞は染色されず, 死細胞のみが染色され, 細胞の生死を明瞭に区別する事ができた. 写真 2 に同一検体を Sternheimer 染色による細胞診として示した. 形態学的には異型細胞の存在は確認しうるが, その生死についての判定はできなかった. これらの事から, trypan blue 染色により, 細

写真 1 Trypan-blue stain (Case 5, Control)×200

写真 2 Sternheimer stain (Case 5, Control)×800

胞の生死を形態学的変化をきたす以前に判定しうる事が判明した.

なお, 臨床例においては, 原則として制癌剤単独で最も cellular viability の低下が著しかった薬剤を術後の膀胱療法に用いる事とし, 現在, 再発の有無などに関して経過観察中である.

考 察

表在性膀胱腫瘍は再発率が高く, 現在まで腫瘍切除後に各種制癌剤の膀胱療法が行われてきているが, 必ずしも満足のいく結果は得られていないが現状である^{1)~5)}. 近年, BCG の膀胱療法が試みられる様になり, その有用性が報告されている⁹⁾¹⁰⁾. BCG は, 他の制癌剤に比して有意に再発率が低いとされているが, 20%前後は再発をきたす^{10)~12)}. これらの症例に対しては, 他の制癌剤によるより効果的な膀胱療法が依然として必要であると思われる. しかし, これまでの所, 膀胱療

法時の薬剤の選択は経験的になされているのが現状である。また、膀胱療法に用いる制癌剤そのものが potential carcinogen である事、膀胱に対する機械的、化学的刺激そのものも promotor となりうる可能性もある事から^{13)~16)}、その薬剤の選択、投与回数、および投与期間などに関しての十分な配慮が必要であると思われる。

今回、我々は膀胱療法時の、より効果的な薬剤の選択を迅速、簡便にスクリーニングする事を目的として、dye exclusion assay による制癌剤感受性試験を臨床使用例に準じた方法で試みた。

実験1の結果より MBT-2での cellular viability と腫瘍生着率とはよく相関し、cellular viability の低い群程有意にその生着率が低く、腫瘍発育抑制、生存期間の延長を認める事が判明した。また、実験3の結果より、臨床例においては、選択した制癌剤の種類により、その制癌効果にかなりの差が出る可能性が示唆された。臨床的には、腫瘍再発の大きな要因として、腫瘍細胞の播種、および TUR-Bt の際の不十分な切除なども考えられる事から¹⁴⁾、本 assay を用い、より cellular viability を低下させる薬剤の選択により、より再発率を低下せしめる可能性があると思われる。また、本 assay には、検体処理から cellular viability の算定まで約3.5時間を要するのみであり、極めて簡便、迅速なスクリーニングが可能である。また、あらかじめマイクロプレート内に薬剤を注入、凍結保存しておくことにより、必要に応じた融解使用が可能であり、検体処理のたびごとの感受性試験用のマイクロプレートの作製という煩わしさもないと思われる。

実験2の結果から、verapamil には高濃度で用いた場合、それ自体が腫瘍細胞に対して cytotoxic に働く可能性のある事が示唆された。吉本ら⁹⁾は、制癌治療に抵抗性を示す再発性膀胱腫瘍症例に対しては、ADM 1,000 μ g/ml 単独注入療法に比して、ADM 1,000 μ g/ml と verapamil 500 μ g/ml 併用注入療法で有効率が高く、また重篤な副作用をきたすこともなかったと報告している。これらの一因としては、verapamil の制癌剤の細胞外排出阻害による低感受性癌の増感¹⁷⁾のみならず、verapamil そのものによる cytotoxicity が関与している可能性も考えられる。実験3の臨床例において、verapamil 単剤でも cellular viability の低下している症例のある事も、これを裏付けるものと思われるが、詳細に関しては更に検討を要すると思われる。

現在までの所、臨床例において初発、再発を問わず

11症例に対して、本 assay に基づく術後の膀胱療法を施行中である。現在まで平均観察期間6.9カ月(3.5~14カ月)を経て、再発例は認めていない。今後、さらに症例を増やして検討していく予定である。

結 語

1) 表在性膀胱腫瘍に対する膀胱療法をモデルとした dye exclusion assay による制癌剤感受性試験法を開発した。

2) MBT-2使用による本 assay の結果、cellular viability と腫瘍生着率、腫瘍発育抑制、生存期間の延長はよく相関し、ADM 処理群では濃度依存性が認められる事が判明した。

3) verapamil には、高濃度で用いた場合、それ自体が腫瘍細胞に対して cytotoxic に働く作用のある可能性が示唆された。

4) 臨床例において、選択した薬剤の種類により制癌効果にかなりの差が出る可能性が示唆された。

5) 本 assay に要する時間は約3.5時間である。本法は、簡便、迅速に膀胱療法時の薬剤スクリーニングを行なう事が可能であり、有用と思われる。

なお、本論文の要旨は第27回日本癌治療学会総会において報告した。

文 献

- 1) Althausen, A.F., Prout, G.R. and Daly, J.J.: Non-invasive papillary carcinoma of bladder associated with carcinoma in situ. J. Urol., 116, 575-580, 1976.
- 2) Williams, G.L., Hammond, J.C. and Sanders, N.: T₁ bladder tumors. Br. J. Urol., 49, 663-668, 1977.
- 3) Soloway, M.S.: Rationale for intensive intravesical chemotherapy for superficial bladder cancer. J. Urol., 123, 461-446, 1980.
- 4) Barnes, R., Hadley, H., Dick, A., Johnstone, O. and Dexter, J.: Changes in grade and stage of recurrent bladder tumors. J. Urol., 118, 177-178, 1977.
- 5) Niiijima, T., Koiso, K. and Akaza, H.: Randomized clinical trial on chemoprophylaxis of recurrence in cases of superficial bladder cancer. Cancer Chemother. Pharmacol., 11 (Suppl), 79-82, 1983.
- 6) 吉本 純, 三枝道尚, 越智淳三, 原 雅弘, 赤木隆文, 小浜常昭, 松村陽右, 大森弘之, 棚橋豊子: 表在性膀胱癌再発例に対する Verapamil 併用 Adriamycin 膀胱内注入療法, 癌と化学療法, 14(6), 1950-1952, 1987.
- 7) 佐々木康綱: In vitro, in vivo 感受性テストの臨

- 床的意義。癌化学療法の進歩, メジカルビュー社, 38—46, 1988.
- 8) Soloway, M.S.: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Research*, 37, 2918—2927, 1977.
 - 9) Morales, A., Eidinger, D. and Bruce, A.W.: Intracavitary bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J. Urol.*, 116, 180—183, 1976.
 - 10) 亀山周二, 赤座英之, 阿曾佳郎: BCG 膀胱内注入療法. *泌尿器外科*, 1(10), 935—940, 1988.
 - 11) Lamm, D.L.: BCG immunotherapy for superficial bladder tumors. In: *Genitourinary Cancer*, Catalona, W.J. (eds). Martinus Nijhoff Publishers. Boston, 205—222, 1987.
 - 12) Lamm, D.L., 森 勝志, Crawford, E.D.: 表在性膀胱腫瘍に対する BCG 療法とアドリアマイシン膀胱内注入の臨床比較研究. *日泌尿会誌*, 77, 1784—1789, 1986.
 - 13) Koseki, K., Akaza, H. and Nijijima, T.: Mutual neoplastic promotion by instillation of mitomycin-C and cauterization on rat bladder urothelium. *Cancer*, 57(4), 774—778, 1986.
 - 14) 小関清夫: 膀胱発癌における経尿道的電気焼灼および Mitomycin-C 膀胱内注入の影響. *日泌尿会誌*, 78, 60—70, 1987.
 - 15) Akaza, H., Murphy, W.N. and Soloway, M.S.: Bladder cancer induced by noncarcinogenic substances. *J. Urol.*, 131, 152—155, 1984.
 - 16) Ohtani, M., Fukushima, S., OKamura, T., Sakata, T., Ito, N., Koiso, K. and Nijijima, T.: Effect of intravesical instillation of antitumor chemotherapeutic agents on bladder carcinogenesis in rats treated with N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine. *Cancer*, 54, 1525—1529, 1984.
 - 17) Rogan, A.M.: Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science*, 244, 994—996, 1984.

(1990年11月12日受理)