膀胱癌に対する動注治療の効果の予測因子の検討

—ATP -法による抗癌剤感受性試験の有用性について—

大垣市民病院泌尿器科 (主任: 磯貝和俊部長)

山田伸一郎 藤本 佳則 磯貝 和俊

岐阜大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 河田幸道教授)

出口 隆 根笹 信一 川本 正吾 西田 泰幸

玉木 正義 江原 英俊 高橋 義人 岡野 学

竹内 敏視 河田 幸道

岐阜大学医学部第一病理学教室 (主任: 森 秀樹教授)

田 中 卓 二

A STUDY ON PREDICTING FACTORS OF THE EFFECT OF INTRA-ARTERIAL INFUSION CHEMOTHERAPY IN PATIENTS WITH BLADDER CANCERS:

The Usefulness of In-Vitro Chemisensitivity Test Measuring Intracellular
ATP Contents (ATP Assay)

Shin-ichiro Yamada, Yoshinori Fujimoto and Kazutoshi Isogai

Department of Urology, Ogaki Municipal Hospital

(Chief: Dr. K. Isogai)

Takashi Deguchi, Shinichi Nezasa, Shogo Kawamoto, Yasuyuki Nishida,
Masayoshi Tamaki, Hidetoshi Ehara, Yoshito Takahashi, Manabu Okano,

Toshimi Takeuchi and Yukimichi Kawada

Department of Urology, Gifu University School of Medicine

(Chief: Prof. Y. Kawada)

Takuji Tanaka

First Department of Pathology, Gifu University School of Medicine

(Chief: Prof. H. Mori)

We studied a relationship between in vitro sensitivity of the tumors to anti-cancerous drugs and histopathological effectiveness of an intra-arterial infusion chemotherapy in 15 patients with bladder cancers. The in vitro sensitivity test was performed by measuring intra-cellular ATP contents (ATP assay). The intra-arterial chemotherapy were performed by injecting methotrexate (MTX), adriamycin (ADM) and cisplatin (CDDP) from the internal iliac artery. When the intra-cellular ATP contents of the tumor cells treated with an anti-cancerous drug decreased to less than 50% of the untreated tumor cells, the tumor was evaluated as sensitive to the drug. The effectiveness of the chemotherapy were histopathologically evaluated by a pathologist according to the response criteria for bladder cancer treatment. When the histopathological responses of higher than grade 2 were observed in the tumor, the chemotherapy was evaluated as effective. In 8 of 9 tumors sensitive to ADM, chemotherapy were effective histopathologically and in all 6 tumors resistant to ADM, histopathological response of the chemotherapies were poor. The overall coincidence ratio between sensitivity to ADM and the histopathological effectiveness of the chemotherapy was 93%, showing statistically significant correlation. In 7 of 12 tumors

sensitive to CDDP, the chemotherapies were effective and in 2 of 3 tumors resistant to CDDP, the chemotherapies were ineffective. Although the overall coincidence ratio between the sensitivities to CDDP and chemotherapeutic effectiveness was 60%, there was no significant correlation between them. In 7 of 8 tumors sensitive to both of ADM and CDDP, the chemotherapies were effective and in 6 of 7 tumors resistant to at least one of them, the chemotherapies were ineffective. The chemotherapies were significantly more effective on the tumors sensitive to ADM and CDDP than on those resistant to at least one of them. Therefore, the ATP assay to assess the in vitro chemosensitivity of the tumor would be a potential tool to predict the chemotherapeutic effectiveness in bladder cancers.

Key words: ATP assay, bladder cancers, intra-arterial infusion chemotherapy

要旨: 進行膀胱癌15例において動注化学療法前に施行した in vitro 抗癌剤感受性と動注化学療法の組織学的効果との関係を検討した。抗癌剤感受性試験は細胞内 ATP 量を指標とした ATP 法により行い、動注化学療法は内腸骨動脈より methotrexate (MTX), adriamycin (ADM), cisplatin (CDDP) の one-shot 動注にて行った。抗癌剤で処理した腫瘍の細胞内 ATP 量が抗癌剤未処理の腫瘍の細胞内 ATP 量の 50% 以下であった場合を感受性有りとし、動注化学療法後の組織学的効果の判定は、膀胱癌の組織学的治療効果判定基準で grade 2 以上の変化を認めたものを有効とした。ADM に感受性のある 9 例中 8 例で化学療法が組織学的に有効であり、ADM に耐性である 6 例すべてで化学療法が無効であった。ADM に対する感受性と組織学的効果との一致率は 93% であった。CDDP に感受性のある 12 例中 7 例で化学療法は有効であり、CDDP に耐性である 3 例中 2 例で化学療法が無効であった。CDDP に対する感受性と組織学的効果との一致率は 60% であった。ADM と CDDP 2 剤に感受性のある 8 例中 7 例で化学療法が有効であり、少なくとも 1 剤に耐性である 7 例中 6 例で化学療法が無効であった。両剤に感受性のある腫瘍は少なくとも 1 剤に耐性を示す腫瘍に比較して有意に良好な反応を示した。以上より今回の ATP 法による感受性試験は化学療法の効果の予測に有用であることが示された。

キーワード: ATP 法, 膀胱癌, 動注化学療法

緒 言

われわれは、尿路性器腫瘍に対して細胞内 ATP 量を指標とした in vitro 抗癌剤感受性試験（以下 ATP 法）を行い、各種腫瘍により抗癌剤に対する感受性に差異のあることと、同種腫瘍においても各々の症例により感受性が異なることを報告してきた¹⁾。今回われわれは膀胱腫瘍において ATP 法による in vitro での抗癌剤感受性と、動注化学療法の組織学的効果を比較し、in vitro での抗癌剤感受性試験が化学療法の治療効果の予測に役立つかどうかについて検討した。

対象および方法

(1) 対象

内視鏡下組織生検で組織学的に移行上皮癌と診断され、超音波検査、CT で深達度が T2 以上の進行癌と判定された膀胱腫瘍 15 例を対象とした。

(2) 抗癌剤感受性試験

ATP 法は前報¹⁾でも述べたごとく、生検時得られた腫瘍組織をハサミで細切後、酵素処理で single cell に

し、15% 牛胎児血清を加えた DM-160 培地内に浮遊させ、24-well に各 well $10^4 \sim 10^5$ 個になるように分注した。抗癌剤を各濃度加え 37°C、5% CO₂ の条件下で 72 時間培養後、bioluminescence 法で細胞内 ATP 量を測定した。使用した抗癌剤は methotrexate（以下 MTX）、adriamycin（以下 ADM）、cisplatin（以下 CDDP）で、臨床上通常使用する量での血中ピーク濃度、MTX 1.0 μg/ml、ADM 0.4 μg/ml、CDDP 2.0 μg/ml で処理した際の細胞内 ATP 量が抗癌剤非添加のコントロール細胞の 50% 以下に抑制された場合を感受性ありとした。

(3) 動注化学療法

動注化学療法²⁾は Seldinger 法に従ってカテーテル先端を内腸骨動脈より腫瘍支配動脈に置き、原則として MTX 30mg/m²、ADM 30mg/m²、CDDP 70mg/m² を one-shot で注入した。治療回数は全例 1 回とした。

(4) 組織学的効果判定

動注化学療法後3ないし4週間後に膀胱全摘出術あるいはTURにより得られた病理標本について、動注治療による組織学的効果を判定した。判定は感受性成績および臨床効果を全く関知しない病理診断医が、膀胱癌の組織学的治療効果判定基準³⁾に従って行った。

(5) 解析

組織学的効果と年齢、性別、腫瘍の大きさ、腫瘍の組織学的異型度(grade)、腫瘍の深達度(stage)、ADMの投与量、CDDPの投与量、MTXの投与量、ADMに対する腫瘍の感受性、CDDPに対する腫瘍の感受性の各因子との相関をSpearmanの順位相関係数(rs)とその有意確率(p値)で検討した。またin vitro抗癌剤感受性と組織学的効果との関係をFisherの直接確率計算法を用いて検討した。

結 果

(1) 症例の背景因子、in vitro抗癌剤感受性および組織学的効果

Table 1に全症例の一覧を示した。15例中男14例女1例であり、年齢は55歳から83歳、平均70歳であった。移行上皮癌の異型度ではgrade 1が3例、grade 2が8例、grade 3が4例であった。深達度は、T2が9例、T3が5例、T4が1例であった。ADMの投与量は最少20mgから最大50mgで平均36.3mgであった。CDDPの投与量は最少50mgから最大140mgで平均76mgで

あった。MTXの投与量は最少0から最大50mgで平均39mgであった。これら3剤の投与量が原則からかなりはずれた症例があるが、これは各症例の主治医が患者の状態を考慮し、動注の効果をより高めようと判断した結果であると思われる。そうした投与量の差の治療効果への影響も統計学的に検討した。ADMによる細胞内ATP量の抑制率は0から94%であり平均48%であった。50%以上の抑制率を示しADMに対し感受性ありと判定したのは9例60%であった。CDDPによる抑制率は0から99%であり平均64%であった。同様にCDDPに対し感受性ありと判定したのは11例73%であった。

動注化学療法前後の標本の検討の結果、grade 1aが1例、1bが6例、2が4例、3が4例であった。

(2) 各因子と組織学的効果との相関およびin vitro抗癌剤感受性と組織学的効果との関係

組織学的効果と年齢、性別、腫瘍の大きさ、腫瘍の組織学的異型度(grade)、腫瘍の深達度(stage)、ADMの投与量、CDDPの投与量、MTXの投与量、ADMに対する腫瘍の感受性、CDDPに対する腫瘍の感受性の各因子との相関をSpearmanの順位相関係数(rs)とその有意確率(p値)で検討したところ、そのうち組織学的効果と有意の相関を認めたものは、ADMに対する感受性(rs=0.6760, p=0.006) (Fig. 1)と、CDDP

Table 1 Patients list

	年齢	性	ADM 感受性	CDDP 感受性	ADM 量	CDDP 量	MTX 量	T	Grade	大きさ	病理効果
1	70	M	3	62	30	50	50	4	2	50×30	1 b
2	71	M	80	55	30	70	50	2	2	20×15	3
3	55	M	94	74	30	70	0	3	2	40×20	3
4	65	M	50	55	50	100	50	3	2	40×15	2
5	77	F	60	62	30	140	50	2	2	25×15	3
6	77	M	39	98	30	50	50	2	1	30×15	1 a
7	71	M	82	61	45	140	45	2	3	40×30	2
8	77	M	15	99	20	50	50	2	1	40×20	1 b
9	68	M	27	91	20	75	0	2	1	25×20	1 b
10	71	M	0	45	30	70	30	2	3	35×15	1 b
11	59	M	52	67	50	100	50	2	2	30×25	3
12	75	M	0	0	50	50	30	3	2	40×30	1 b
13	56	M	79	76	50	50	50	3	3	40×30	1 b
14	83	M	51	68	50	50	50	3	3	30×30	2
15	77	M	83	48	30	75	30	2	2	20×15	2

た7例のうち6例86%までがgrade 1b以下であり、1例(14%)のみがgrade 2であった。ADMおよびCDDP 2剤に対してともに感受性を示す腫瘍は、少なくとも1剤に耐性を示す腫瘍に比し、推計学的に有意の差で($p=0.0101$)化学療法に対して組織学的に優れた効果を示した。

また、ADMに対する感受性の有無とCDDPの投与量との独立性をみるために以下の検討を行った。CDDP 70mg以上投与群と70mg未満投与群との間で組織学的効果との関連性をFisherの直接確立計算法で検討したところ、CDDP 70mg以上投与群における効果は9例中7例(78%)とCDDP 70mg未満投与群の6例中1例(17%)にくらべ有意に高かったため($p=0.035$)、ADM感受性群、耐性群のそれぞれにおけるCDDP 70mg以上投与例と70mg未満投与例の頻度を検討したがその頻度に有意差は認められず($p=0.1189$)、両群間にCDDP投与量に関して偏りはないと判断した。したがって、ADMに対する感受性の有無とCDDPの投与量とは独立して評価を検討することが可能であると考えられた。

考 察

膀胱癌、とくに筋層を越えた浸潤を示す進行膀胱癌に対する治療効果は、最近の化学療法の進歩に伴い向上してきた。Sternbergら⁴⁾によって紹介された、MTX, ADM, Vinblastine, CDDPの併用療法(M-VAC)は最近では膀胱癌のadjuvant chemotherapyとして最も有効な治療法のひとつとされている⁵⁾。動注療法は腫瘍支配動脈に選択的に高濃度の薬剤を注入できるため、抗癌剤の抗腫瘍効果の向上のみならず全身投与に比べその副作用が少ないなどの点より、癌治療の中核的治療となってきた。膀胱癌に対する動注療法は、腫瘍組織ばかりでなく所属リンパ節に高濃度の抗癌剤を暴露でき⁶⁾、さらに静注治療と同様の全身療法としての効果が期待でき、有効なneoadjuvant治療とされている⁷⁾。当教室では、進行膀胱癌に対して腫瘍のdown stage, 膀胱温存, 予後の改善を目的として、手術前にMTX, ADM, CDDPの動注を行ってきた。しかし症例によっては内腸骨動脈より効率よく薬剤を投与出来たにも拘らず、十分な臨床効果が得られない場合も少なくない。化学療法前にその効果の予測が可能であれば臨床上意義のあることと思われる。そこで、治療前に腫瘍のin vitroにおける抗癌剤に対する感受性をATP法⁸⁾を用いて測定し、その結果から動注化学療法の効果の予測が可能かどうかについて検討

した。今回の検討では、ATP法の化学療法の効果の予測における有用性を検討することを目的としたため、動注化学療法の薬剤および投与方法は統一し、ATP法の結果による薬剤の変更は行わなかった。化学療法の効果は主に画像診断により判定されるが、化学療法後の腫瘍部の浮腫、出血、肉芽形成などにより過小評価される可能性があり、今回の検討では臨床経過および感受性の結果を関知しない病理診断医に組織学的検討を依頼し、客観的な化学療法の効果の判定を行った。前報¹⁾でも報告したが、MTXは濃度・時間依存性薬剤であり、ATP法による検討では過小評価される可能性があるため今回の検討からは除外した。

ADMに対する感受性と化学療法が奏功したと考えられるgrade 2以上の組織学的効果との間に有意の相関を認め、その一致率は14/15, 93%であった。一方、CDDPに対する感受性と組織学的効果の間には有意の相関は認めなかったものの全体での一致率は9/15, 60%であった。ADMとCDDPともに感受性を示す症例と1剤以上に耐性の症例とでは、化学療法の組織学的効果の間に有意の差が認められた。また、Spearmanの順位相関係数とその有意確率での検討でADMに対する感受性とCDDPの投与量が動注の組織学的効果と有意の相関を認めたが、この両者間には有意の関連を認めず、Fisherの直接確立計算法ではADMに対する感受性のみが組織学的効果に有意の相関を示したことより、今回の検討ではADMに対する感受性が動注療法の効果と最も関連性が強いと考えられた。

また、膀胱腫瘍のgradeと組織学的効果とは、Spearmanの順位相関係数 $rs=0.2195$ とその有意確率 $p=0.432$, stageと組織学的効果とは $rs=-0.1064$, $p=0.706$ と有意な相関を認めず、今回の検討においては動注の効果予測因子とはならなかった。

以上より治療前にATP法による感受性試験を行い、その感受性結果より動注化学療法の効果の予測が可能であることが示された。

しかしながら今回のATP法による検討では、化学療法の効果はADMの感受性をよく反映したが、CDDPの感受性との間には有意の相関は認められず、また同時に用いたMTXについての感受性の評価が不能であった。感受性試験における薬剤の濃度、今回有効と判定するのにコントロールに対する抑制率を50%としたが、より臨床効果に反映するための各薬剤についてのcut-off pointの設定、時間依存性薬剤の評

価法などいくつかの課題を残している。これらを解決することにより、膀胱腫瘍における *in vitro* 抗癌剤感受性試験は化学療法の効果の予測のみならず、無効な薬剤の排除および有効薬剤の選択に有用となり、より副作用の少ない効果的な化学療法が可能となるものと思われる。今後さらに症例を増やし、臨床効果、組織学的効果からより実証的な ATP 法を確立して行きたい。

文 献

- 1) 山田伸一郎, 出口 隆, 根笹信一, 玉木正義, 江厚英俊, 岡野 学, 河田幸道: 細胞内 ATP 量を指標とした尿路性器腫瘍の抗癌剤感受性試験の検討。日泌尿会誌, **83**, 2022—2028, 1992.
- 2) Ogata, J., Migita, N. and Nakamura, T.: Treatment of carcinoma of the bladder by infusion of the anticancer agent (mitomycin C) via the internal iliac artery. *J. Urol.*, **110**, 667—670, 1973.
- 3) 日本泌尿器科学会, 日本病理学会編: 泌尿器科癌の治療効果判定基準。日泌尿会誌, **83**, 447—472, 1992.
- 4) Sternberg, C.N., Yagoda, A., Scher, H.I., Watson, R.C., Ahmed, T., Weiselberg, L.R., Geller, N., Hollander, P.S., Herr, H.W., Sogani, P.C., Morse, M.J. and Whitmore, W.F.: Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J. Urol.*, **133**, 403—407, 1985.
- 5) Scher, H.I., Yagoda, A., Herr, H.W., Sternberg, C.N., Bosi, G., Morse, M.J., Sogani, P.C., Watson, R.C., Dershow D.D., Reuter, V., Geller, N., Hollander, P.S., Vaughan, E.D., Jr., Whitmore, W.F., Jr. and Fair, W.R.: Neoadjuvant M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) effect on the primary bladder lesion. *J. Urol.*, **139**, 470—474, 1988.
- 6) 加納勝利: 膀胱癌の集学的治療。日泌尿会誌, **76**, 1926—1928, 1985.
- 7) 比嘉 功, 早川正道, 穴戸清一郎, 小倉秀章, 謝花政秀, 小山雄三, 秦野 直, 大沢 炯: 動注療法の理論的根拠と臨床効果。西日泌尿, **52**, 425—430, 1990.
- 8) Garewell, H.S., Ahmann, F.R., Schiffman, R.B. and Celniker, A.: ATP-ajjay: Ability to distinguish cytostatic from cytotoxic anticancer drug effects. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 1039—1054, 1986.

(1994年1月24日受付, 6月16日受理)