尿路性器悪性腫瘍に対する組織培養法 (collagen gel matrix assay) を用いた制癌剤感受性試験の有用性

福島県立医科大学泌尿器科学教室 (主任: 白岩康夫教授)

荻原 雅彦 相川 健 石橋 啓

入澤 千晴 白岩 康夫

米沢市立病院泌尿器科 (部長: 小関清夫)

小 関 清 夫

太田綜合病院泌尿器科 (部長: 石渡久善)

石 渡 久 善

EFFICACY OF THE CHEMOSENSITIVITY TEST USING COLLAGEN GEL MATRIX-SUPPORTED CULTURE SYSTEM FOR UROGENITAL TUMORS

Masahiko Ogihara, Ken Aikawa, Kei Ishibashi, Chiharu Irisawa
and Yasuo Shiraiwa

Department of Urology, Fukuishima Medical College
(Director: Yasuo Shiraiwa)

Kiyoo Koseki
Department of Urology, Yonezawa City Hospital
(Director: Kiyoo Koseki)

Hisayoshi Ishiwata
Department of Urology, Ohta General Hospital
(Director: Hisayoshi Ishiwata)

(Back ground) We evaluated the usefulness of in vitro tumor culture system using a specialized collagen gel matrix (CGM assay) as a chemosensitivity test.

(Patients and Methods) Chemosensitivity results of CGM assay were compared with other in vivo and in vitro assays on an implantable murine bladder tumor cell line (MBT-2). In addition we investigated the possibility of the clinical use of CGM assay using clinical specimens obtained from urogenital malignant tumor patients by comparing the result with that of the other chemosensitivity test, SDI test using single cells (conventional SDI test).

Methods of CGM assay were as follows. Tumor tissues on the collagen gel matrices were incubated under the existence of anticancer drugs following 4 days preculture. Drug sensitivities were evaluated by counting the number of viable cells adjusted to the tumor weight.

(Results) Inhibition rates in MBT-2 were high in the order of mitomycin C, cis-diamminedichloroplatinum (II), (2''R)-4'-0-tetrahydropyranyl adriamycin. Four of 6 anticancer drugs were decided as chemosensitive drugs. These results corresponded to the results of the antitumor effects on subcutaneously transplanted MBT-2 in vivo, moreover was correlated well with those of the conventional SDI test. Twenty of 22 cases, including 11 of 13 bladder cancer cases, 1 of 3 renal cancer cases, 2 of 3 testicular cancer cases and 1 of 1 adrenal cortical cancer cases, were evaluable in the clinical study of the CGM assay. Corresponding rates between the results of the CGM assay and those of the conventional SDI test performed simultaneously in 12 cases were excellent for each anticancer drug.

(Conclusion) This CGM assay can serve as an effective tool for chemosensitivity testing because of its convenience and high evaluable rate.

Key words: chemosensitivity test, collagen gel matrix assay, urogenital malignant tumors

要旨: (背景と目的) コラーゲンゲルマトリックスを用いた組織培養法による制癌剤感受性試験 (CGM assay) の有用性を検討した。

(対象と方法) マウス同系可移植膀胱癌株 (MBT-2) を用い, CGM assay の結果と他の感受性試験の結果 (in vivo 及び in vitro) を比較した。加えて, 22例の泌尿器系癌患者から得られた臨床材料を用いて CGM assay を施行し, その臨床応用の可能性も検討した。CGM assay は, 以下の方法にて行った。24穴培養プレート内で, 培養液を浸透させた1cm 角のゲル上に腫瘍組織片を静置し, 4 日間の前培養後に制癌剤処理した。生細胞数を SDI test により測定し, 制癌剤非添加時における腫瘍重量一吸光度の帰直線を求めた後, これに重量補正を加え, inhibition rate (IR) を算出した。

(結果) MBT-2における IR は, mitomycin C, cis-diamminedichloroplatinum (II), (2''R) -4'-0-tetrahydropyranyl adriamycin の順に高値を示し感受性陽性と判定された。この結果は, in vivo 及び単離細胞による従来の SDI test (conventional SDI test) の結果ともよく一致していた。臨床例においては, 20/22例で感受性評価が可能で, 膀胱癌11/13例, 腎癌1/3例, 精巣腫瘍3/3例, 副腎癌1/1例で感受性陽性薬剤を選択し得た。conventional SDI test の感受性結果との比較では, いずれの薬剤においても高い感受性一致率を示した。

(結論) 本法は簡便かつ評価率も高く, 制癌剤感受性試験として有用であると思われた。

キーワード: 制癌剤感受性試験, コラーゲンゲルマトリックス, 尿路性器悪性腫瘍

緒 言

癌の化学療法を施行する際, その薬剤の選択にあたっては, これまでのところ疾患ごとの治療成績に基づき経験的に行われてきたのが現状である。しかし, 組織学的に同一像を呈する腫瘍でも, 制癌剤に対する感受性が様々であることは周知の事実であり, また薬剤が無効であった場合にはむしろ腫瘍の増大, いわゆる adverse effect を来す可能性も報告されている¹⁾。近年, 泌尿器科領域においても適正な制癌剤の選択方法として, 各種の制癌剤感受性試験が報告されているが^{2)~6)}, 現在までのところ必ずしも臨床への応用がなされていない。

collagen gel matrix (Spongostan, Health Design Industries, Rochester, NY, USA: CGM) を用いた組織培養法は, Freeman ら⁷⁾により報告されたブタ皮膚由来のコラーゲンを培地とし, 腫瘍の三次元的な増殖及び細胞構築を維持したままで増殖可能な組織培養法である。本法においては, in vivo に類似した腫瘍組織の増殖形態が得られることから, 近年制癌剤感受性試験への応用が期待されている^{8)~11)}。殊に, Ohyama ら¹⁰⁾¹¹⁾は本法における感受性の評価法に SDI test を用い, collagen gel matrix assay (CGM assay) として報告し, in vivo 制癌剤感受性試験である nude

mouse 法との一致性を確認している。

そこで, 本研究ではマウス膀胱癌を対象に, CGM assay の制癌剤感受性試験としての有用性に関し, in vivo 及び in vitro の両者で系統的な検討を行った。加えて, 尿路性器悪性腫瘍における CGM assay の臨床応用の可能性に関し, 臨床材料を用い検討するとともに, 感受性結果を客観的に評価するため他の感受性試験との比較も行った。

材料および方法

1. 実験動物および腫瘍細胞株

実験動物は6~8 週齢雌性 C3H/He マウス (日本クレーア) を用いた。腫瘍細胞株として, マウス皮下に継代移植されている FANFT (N-4-5-Nitro-2-Furyl-Thiazolyl Formamide) で化学発癌させた未分化膀胱癌 (MBT-2)¹²⁾を用い, 培養液には10% fetal calf serum (Gibco: FCS) 加 RPMI 1640溶液 (Sigma) を用いた。

2. CGM assay の方法

CGM assay は以下の如く行った。すなわち, 培養プレート (Falcon, 24 wells) の各 well 内にあらかじめ1cm 角に細切した CGM を10% FCS 加 RPMI 1640溶液で浸透させておき, その上に重量測定した2~3mm 角の腫瘍組織片を静置した。37°C, 5 % CO₂の条件下

で4日間培養した後、制癌剤処理を行った。制癌剤は、cis-diamminedichloroplatinum (II) (CDDP), (2''R)-4'-0-tetrahydropyranlyl adriamycin (THP-ADM), mitomycin C (MMC), vinblastine (VBL), bleomycin (BLM) 及び VP-16 の6種類を用い、ヒトの通常臨床使用量における最高血中濃度 (peak plasma cocentration: PPC) の10倍濃度¹³⁾にて72時間持続接触させた。ちなみに、THP-ADM の濃度設定は ADM に準じて行った。なお、CDDP, THP-ADM, BLM, VP-16 は日本化薬(株)より、MMC は協和醗酵(株)より、VBL はシオノギ製薬(株)より供与を受けた。

感受性の判定は、3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (Sigma: MTT) を用いた SDI test¹⁰⁾により行った。すなわち、制癌剤溶液を遠心除去後、各 well に0.4% MTT 溶液0.2ml, 10^{-1} M succinate sodium 0.2ml, phosphate buffered saline (PBS) 1.6ml を添加し4時間培養した。続いて、1% collagenase (Sigma) により CGM を溶解させた後、3,000rpm, 10分間の遠心で得られた沈渣 (formazan) を、2ml の DMSO にて抽出した。各 well の吸光度 (optical density: OD) は、Double Beam Spectrophotometer (日本分光工業株式会社製, UVIDEC-340) を用い、540nm の波長にて測定した。培養開始時の腫瘍重量と、生細胞数の指標である OD 値は正の相関直線を示すことより¹⁰⁾、まず制癌剤非添加時における腫瘍重量—OD 値の回帰直線を求めた後、これによる重量補正を行い、以下の式から inhibition rate (IR) を算出した。

$$IR (\%) = (1 - a/b) \times 100$$

a: 制癌剤処理群における OD 値

b: 制癌剤非添加時における同腫瘍重量あたりの OD 値

制癌剤感受性の判定は、Ohyama ら¹⁰⁾¹¹⁾の報告に準じ、IR 40%以上を有効、それ未満を無効とした。なお、測定は triplicate にて行い、その平均値を判定に用いた。

3. MBT-2に対する CGM assay の基礎的検討

MBT-2における CGM assay の感受性結果を、in vivo における各種制癌剤の抗腫瘍効果、及び in vitro 制癌剤感受性試験としてその有用性が報告されている単離細胞を用いた従来の SDI test¹⁴⁾¹⁵⁾ (conventional SDI test) の結果と比較検討した。

(1) 単離細胞浮遊液の作成

あらかじめハサミで細切した腫瘍細片を、0.04%

DNase, 0.1% pronase, 0.04% collagenase (各 Sigma) を含む RPMI 1640溶液で37°C, 30分間酵素処理した後、mesh screen を通し10% FCS 加 RPMI 1640溶液に浮遊させて各種濃度に調整した。

(2) in vivo における各種制癌剤の抗腫瘍効果

マウス皮下移植 MBT-2腫瘍に対する各種制癌剤の抗腫瘍効果を検討した。単離細胞浮遊液を得た後、 1×10^6 個の細胞をマウス右下腿皮下に移植し、推定腫瘍重量が500mg 前後に達する移植8日目に制癌剤を投与した。制癌剤の投与量は、マウスにおける最大耐用量とされる LD₅₀の1/3¹³⁾のさらにその半量とし、CDDP 4.5mg/kg, THP-ADM 5.9mg/kg, MMC 1.4mg/kg, BLM 50.5mg/kg を単回腹腔内投与した。ちなみに、THP-ADM に関しては ADM の投与量に準じた。また、対照群においては生理食塩水を投与した。腫瘍の測定は隔日ごとに行い、推定腫瘍重量を (長径 $\times$ 短径²)/2で算出し¹⁶⁾、腫瘍増殖曲線を描いた。抗腫瘍効果の判定は、制癌剤投与前の推定腫瘍重量に対する各時期における推定腫瘍重量の比より腫瘍増殖率 (tumor growth rate: TGR) を求め行った。マウス是一群につき5匹とし、その平均値 $\pm$ 標準偏差を算出して評価した。

(3) CGM assay と conventional SDI test の比較

MBT-2に対する CGM assay の感受性結果を、conventional SDI test の感受性結果と比較した。conventional SDI test の方法は、前原らの報告¹⁴⁾¹⁵⁾に準じて行った。すなわち、 5×10^5 個/ml に調整した単離細胞浮遊液を96穴マイクロプレート (Falcon) の各 well 内に100 μ l ずつ分注し、これに100 μ l の各種制癌剤溶液を加えて、37°C, 5% CO₂の条件で72時間培養した。なお、制癌剤の処理濃度は10PPC にて行った。続いて、PBS にて洗浄遠心後 10^{-1} M succinate sodium 10 μ l, 0.4% MTT 溶液10 μ l を加え、37°Cで3時間培養した。形成された formazan を DMSO 150 μ l で抽出後、540 nm の波長で各 well の吸光度を測定し、CGM assay と同様に IR を求め薬剤の効果判定を行った。ちなみに、本 assay においては IR 50%以上をもって感受性陽性と判定される¹⁴⁾¹⁵⁾。

4. 臨床例における検討

CGM assay の臨床応用の可能性に関し、手術または生検より得られた泌尿器系癌の臨床検体を用いて検討した。

臨床材料として、1991年から1993年の間に当教室および関連施設において得られた22検体 (膀胱移行上皮

Fig. 1 left : Growth of MBT-2 on the collagen gel matrix, right : Relationship between tumor weight and optical density of the formazan product
OD : optical density

Table 1 Comparison of chemosensitivity tests using MBT-2

Methods	Inhibition rate (%)					
	CDDP*	THP-ADM*	MMC*	VBL*	VP-16*	BLM*
CGM assay	<u>77.4</u> ⁺	<u>50.1</u>	<u>69.7</u>	30.2	<u>41.5</u>	5.7
conventional SDI test	<u>74.7</u>	<u>64.3</u>	<u>90.5</u>	25.3	37.5	16.5

*Tested concentrations of anticancer drugs were 24.9 $\mu\text{g/ml}$ of CDDP, 6.0 $\mu\text{g/ml}$ of THP-ADM, 15.0 $\mu\text{g/ml}$ of MMC, 7.8 $\mu\text{g/ml}$ of VBL, 341.8 $\mu\text{g/ml}$ of VP-16 and 30.0 $\mu\text{g/ml}$ of BLM, respectively.

*Underline indicates positive sensitivity.

癌13例, 腎細胞癌 5 例, 精巣腫瘍 3 例, 副腎皮質癌 1 例) を用いた。

加えて, うち12例については conventional SDI test を同時に施行し, これらの感受性の一致性を検討した。

5. 統計学的検定

統計学的解析は, in vivo における TGR の比較に関しては ANOVA (分散分析), CGM assay と conventional SDI test の感受性結果の比較に関しては Spearman 順位相関係数を用いて行い, 危険率 5 % 以下を有意差ありと判定した。

結 果

1. MBT-2における CGM assay の基礎的検討

(1) CGM 上に移植した MBT-2の増殖形態

CGM 上に移植した腫瘍組織は, 培養とともに中心部の細胞群で核濃縮や空胞変性像が認められるようになるものの, 辺縁部では viable な細胞群が存在し, また CGM 内部へも細胞群の浸潤増殖像がみられた。

CGM 内への腫瘍細胞の増殖は培養 4 日目頃より認められ(移植腫瘍の生着), 原腫瘍の増殖形態が良好に維持されていた。生細胞数の指標である OD 値の経時的な推移は, 培養開始時から 2 ~ 3 日目までは OD 値が低下するものの, 4 日目以降は培養日数を経るにしたがって徐々に OD 値が増加し, CGM への腫瘍の生着及び増殖が明らかとなった (Fig. 1 left)。その一方で, 培養 7 日目に形成された formazan 量 (OD 値) と培養開始時の腫瘍重量は, Ohyama の報告¹⁰⁾同様に良好な有意の正の相関直線を示した (Fig. 1 right)。

(2) CGM assay による制癌剤感受性試験

Table 1 上に CGM assay における制癌剤感受性結果を示した。6 薬剤中 4 剤が感受性陽性と判定され, これらの薬剤の IR は MMC, CDDP, THP-ADM の順に高値であった。

一方, マウス皮下移植 MBT-2腫瘍に対する各制癌剤の抗腫瘍効果を検討したところ, TGR は MMC,

Fig. 2 Tumor growth curve
TGR : tumor growth rate

Table 2 Chemosensitivity results of 20 urogenital cancer patients in CGM assay

Case No.	Pathology ¹⁾	Inhibition rate (%)					
		CDDP	THP-ADM	MMC	VBL	VP-16	BLM
1.	bladder ca.	<u>80.5</u> ²⁾	<u>52.4</u>	N.E. ³⁾	30.3	37.6	8.7
2.	bladder ca.	38.7	32.5	37.4	26.5	N.E.	N.E.
3.	bladder ca.	<u>74.8</u>	<u>64.3</u>	<u>68.3</u>	<u>59.4</u>	<u>63.8</u>	<u>56.3</u>
4.	bladder ca.	<u>72.3</u>	39.8	29.5	N.E.	8.6	N.E.
5.	bladder ca.	<u>62.9</u>	29.7	18.6	13.7	N.E.	N.E.
6.	bladder ca.	<u>84.5</u>	<u>72.5</u>	<u>59.6</u>	36.9	<u>70.9</u>	N.E.
7.	bladder ca.	<u>76.8</u>	39.6	-3.5	N.E.	N.E.	30.8
8.	bladder ca.	<u>71.4</u>	<u>59.6</u>	<u>60.8</u>	N.E.	N.E.	14.7
9.	bladder ca.	36.8	67.6	<u>50.6</u>	5.3	14.9	-7.8
10.	bladder ca.	<u>59.1</u>	<u>53.7</u>	20.4	<u>52.4</u>	N.E.	N.E.
11.	bladder ca.	37.8	N.E.	27.9	12.6	-6.3	N.E.
12.	bladder ca.	<u>70.6</u>	<u>74.2</u>	N.E.	14.8	20.4	25.7
13.	bladder ca.	N.E.	<u>68.6</u>	<u>53.8</u>	N.E.	N.E.	9.4
14.	RCC	-5.9	10.3	<u>64.2</u>	<u>54.2</u>	39.7	10.5
15.	RCC	9.5	14.1	-0.5	6.3	N.E.	N.E.
16.	RCC	17.3	26.4	15.7	7.9	8.4	-8.5
17.	GCT	<u>87.4</u>	N.E.	N.E.	<u>67.4</u>	<u>80.9</u>	<u>50.5</u>
18.	GCT	<u>60.5</u>	N.E.	N.E.	31.5	30.9	N.E.
19.	GCT	<u>90.3</u>	<u>56.9</u>	10.1	<u>62.5</u>	<u>74.5</u>	<u>67.3</u>
20.	adrenal ca.	16.5	-5.9	<u>57.6</u>	10.3	<u>60.8</u>	5.4

1) bladder ca. : bladder cancer, RCC : renal cell carcinoma, GCT : germ cell tumor, adrenal ca. : adrenal cortical cancer

2) Underline indicates positive sensitivity

3) N.E. : not examined

Table 3 Chemosensitivity results of 12 urogenital cancer patients in conventional SDI test

Case No.	Pathology ¹⁾	Inhibition rate (%)					
		CDDP	THP-ADM	MMC	VBL	VP-16	BLM
1.	bladder ca.	<u>85.5</u> ²⁾	<u>57.4</u>	N.E. ³⁾	40.2	41.5	20.4
2.	bladder ca.	40.3	<u>54.3</u>	<u>51.7</u>	30.5	N.E.	N.E.
3.	bladder ca.	<u>80.6</u>	<u>70.2</u>	<u>80.4</u>	50.3	80.5	58.7
5.	bladder ca.	42.9	30.1	19.9	20.5	N.E.	N.E.
6.	bladder ca.	<u>74.3</u>	10.3	47.4	38.2	<u>69.2</u>	N.E.
8.	bladder ca.	<u>79.8</u>	<u>72.7</u>	46.3	N.E.	N.E.	15.5
9.	bladder ca.	47.4	<u>69.8</u>	<u>58.7</u>	20.3	18.7	5.2
10.	bladder ca.	<u>70.3</u>	<u>52.5</u>	30.6	38.2	N.E.	N.E.
14.	RCC	0.5	9.6	<u>59.8</u>	<u>60.4</u>	46.4	30.4
15.	RCC	10.3	13.7	3.6	20.5	N.E.	N.E.
17.	GCT	<u>80.4</u>	N.E.	N.E.	47.5	<u>85.3</u>	<u>60.8</u>
19.	GCT	<u>91.8</u>	<u>57.5</u>	20.3	<u>70.5</u>	<u>80.5</u>	<u>80.9</u>

- 1) bladder ca. : bladder cancer, RCC : renal cell carcinoma, GCT : germ cell tumor, adrenal ca. : adrenal cortical cancer
2) Underline indicates positive sensitivity
3) N.E. : not examined

CDDP, THP-ADM において対照群に比し有意に低下していたが、BLM においては有意差がみられなかった (Fig. 2)。なお、各処置群における担癌マウスの体重減少率はいずれも20%以下であり、また経過観察中に副作用による死亡は認められなかった。結局、4 薬剤すべてで CGM assay の感受性結果と in vivo の抗腫瘍効果は一致していた。

続いて、conventional SDI test における制癌剤感受性結果を示した (Table 1 下)。CGM assay との間の感受性一致率は83.3% (5/6薬剤) と良好であり、また両感受性試験の IR の比較でも、全体に CGM assay の IR が低値を示したものの、有意な正の一次相関を認めた ($p<0.01$, $r^2=0.862$)。

以上の結果より、CGM assay が in vitro 制癌剤感受性試験として有用であることが示唆された。

2. 臨床例における検討

臨床例における CGM assay の結果を Table 2 に示した。感受性の評価は、22例中20例 (90.9%) で可能であった。判定不可能であった2例はともに腎癌症例であり、うち1例は細菌感染、他の1例はCGM への腫瘍の生着不良といずれも壊死組織による contamination と考えられた。感受性結果は個々の症例により大きく異なっており、結局膀胱移行上皮癌13例中11例 (84.6%)、腎細胞癌3例中1例 (33.3%)、精巣腫瘍3例中3例 (100%) 及び副腎皮質癌1例中1例 (100%)

Table 4 Correlation of the chemosensitivity results between CGM assay and conventional SDI test

	S/S*	S/R	R/S	R/R	S/S+R/R
CDDP	7	1	0	4	11/12(91.7%)
THP-ADM	6	1	1	3	9/11(81.8%)
MMC	3	2	1	4	7/10(70.0%)
VBL	3	2	0	6	9/11(81.8%)
VP-16	4	0	1	1	5/6 (83.3%)
BLM	3	0	0	4	7/7 (100%)

*Numerator is sensitive (S) or resistant (R) in CGM assay, and denominator is S or R in conventional SDI test.

で1種類以上の感受性陽性薬剤が選択可能であった。

臨床例のうちの14例 (膀胱移行上皮癌9例、腎細胞癌3例、精巣腫瘍2例) に関しては、併せて conventional SDI test を施行した。感受性の評価は、膀胱移行上皮癌1例、腎細胞癌1例を除く12例で可能であり (Table 3)、両感受性試験における感受性一致率は、CDDP で11/12薬剤 (91.7%)、THP-ADM で9/11薬剤 (81.8%)、MMC で7/10薬剤 (70%)、VBL で9/11薬剤 (83.3%)、VP-16で5/6薬剤 (83.3%)、BLM で7/7薬剤 (100%) といずれの薬剤においても良好な結果であった (Table 4)。

考 案

癌化学療法は近年急激な進歩を遂げ、尿路悪性腫瘍においても新規制癌剤の登場や多剤併用療法の工夫などにより、一定の治療成績を上げることが可能となってきた。しかし、化学療法施行時の治療効果は個体差が大きく、加えて化学療法が及ぼす生体侵襲も考慮する必要がある。したがって、その薬剤選択にあたり、あらかじめ有効あるいは無効な制癌剤が選択しうるものであれば、臨床的に極めて有用な情報が得られることになる。現在用いられている各種の *in vitro* 制癌剤感受性試験の臨床効果との一致性をみると、sensitive の予知能力は60~69%, resistant の予知能力は91~97%と報告されており¹⁷⁾¹⁸⁾, ある制癌剤が腫瘍に対して無効であることはおおむね予知可能であるが、有効であることの予見性は必ずしも優れた結果が得られていない。その要因として、現状の制癌剤自身の奏功率が未だ十分でないことの他に、*in vitro* 感受性試験における癌細胞と制癌剤の接触条件、すなわち腫瘍の増殖環境や制癌剤の薬理動態などが臨床と大きく異なっていることがあげられる。

理想的な制癌剤感受性試験の条件として、①簡便でかつ安価であること、②特異性が高いこと、③臨床効果との一致率が高いこと、そして、④迅速に判定可能であること等があげられる。CGM assay では細切した腫瘍組織片を用いて行うことから、細胞単離といった操作が不要であるばかりでなく、腫瘍の heterogeneity 及び三次元的組織構築が保持されたままでも検討が可能である。CGM 上で培養中の細胞群の cell cycle につき flow cytometry で検討した結果でも、本法が *in vivo* の増殖形態に極めて類似していることから、細胞間の interaction といった点でも制癌剤感受性の判定に際し有利であると考えられる¹⁹⁾。本稿では、MBT-2を用いた検討で CGM assay の結果が *in vivo* における制癌剤の抗腫瘍効果の結果と一致していたばかりでなく、conventional SDI test の結果とも有意な相関関係をみた。加えて、臨床検体においても極めて高率で感受性評価が可能で、またその結果が同時に施行した conventional SDI test による感受性結果とよく一致していた。ちなみに、単離細胞を用いて行う conventional SDI test は、細胞における TCA 回路の一酵素である succinate dehydrogenase (SD) 量を細胞の viability の指標として評価するものであり、感受性結果と臨床効果との良好な一致性、優れた再現性や迅速性などより制癌剤感受性試験の1つとして確固た

る位置が築かれている¹⁵⁾²⁰⁾²¹⁾。以上より、CGM assay は比較的簡便かつ少量の組織より施行でき、またその感受性評価率が高いとともに、感受性結果も conventional SDI test とほぼ同等であることから、尿路性器悪性腫瘍に対する新しい制癌剤感受性試験として有望であると考えられた。なお筆者らは、局所浸潤性膀胱癌の治療における薬剤選択法として本法を応用し、生検組織を用いて行った感受性結果に基づく術前動脈内注入療法の優れた臨床効果を報告している²²⁾。

本法の問題点として、培養中の正常細胞混入による薬剤感受性の影響、癌細胞の heterogeneity、制癌剤処理時の接触条件などがあげられる。培養組織中の正常細胞の混入に関し鴻江ら¹⁵⁾は、同一細胞数あたりの SD 活性は癌組織の方が正常組織の2~3倍高く、制癌剤に対する感受性も癌組織の方が高かったと報告している。さらに、CGM assay においては培養中正常間質系の細胞増殖は非常に少ないとされており、結局癌組織に少量の非癌細胞が混入しても感受性試験結果に大きな影響は与えないものと考えられる。続いて制癌剤の接触条件に関しては、Ohyama ら¹⁰⁾が nude mouse 法との一致性より10PPC、72時間持続接触として検討しており、筆者らもこれに準じた。しかし、多くの制癌剤が AUC (area under plasma concentration-time curve) 依存性であり、また5-FUなどの時間依存性薬剤の存在も考慮した場合には、これら一定の条件下での感受性判定には疑問がもたれる。すなわち、各種制癌剤の薬理動態を加味しながら個々の接触条件を定める必要があると考えられ、今後の検討課題であると思われた。

結 語

CGM を用いた組織培養法による制癌剤感受性試験である CGM assay の有用性に関し、マウス膀胱癌及び臨床材料を対象に検討を行った。

1) CGM 上に移植した MBT-2は、組織学的に培養4日目より腫瘍細胞の浸潤・増殖が確認され、かつ原腫瘍の増殖形態が良好に維持されていた。

2) MBT-2における CGM assay の制癌剤感受性結果では、6薬剤中4剤が感受性陽性と判定され、これらの薬剤の IR は、MMC, CDDP, THP-ADM, VP-16の順に高値であった。この結果は、*in vivo* における抗腫瘍効果及び conventional SDI test の結果とほぼ一致していた。

3) 臨床例における検討では、22例中20例で感受性の評価が可能であり、膀胱移行上皮癌13例中11例、腎細

胞癌 3 例中 1 例, 精巣腫瘍 3 例中 3 例及び副腎皮質癌 1 例中 1 例で 1 種類以上の感受性陽性薬剤の選択が可能であった。CGM assay と同時に conventional SDI test が施行しえた 12 例における両感受性試験の感受性結果は, いずれの薬剤においてもよく一致していた。

4) CGM assay は簡便かつ高率に評価可能な制癌剤感受性試験として, 尿路性器悪性腫瘍に対しても有用であることが示唆された。

なお本論文の要旨は, 第 29 回及び第 30 回日本癌治療学会総会において報告した。

文 献

- Kondo, T. and Tsukui, K.: Effects of nitrogen mustard N-oxide, X-ray and cortisone on Yoshida sarcoma metastasis development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **102**, 384—386, 1959.
- Sanfilippo, O., Silvestrini, R., Zaffaroni, N., Piva, L. and Pizzocaro, G.: Application an in vitro antimetabolic assay to human germ cell tumors for the preclinical evaluation of drug sensitivity. *Cancer*, **58**, 1441—1447, 1986.
- 打林忠雄, 久住治男, 浅利豊紀, 小橋一功, 天野俊康, 内藤克輔: 尿路悪性腫瘍における human tumor clonogenic assay を用いた抗癌剤感受性試験の検討. *泌尿紀要*, **33**, 1575—1580, 1987.
- 打林忠雄, 江川雅之, 浅利豊紀, 中嶋和喜, 久住治男, 遠藤良夫, 田中基裕, 佐々木琢磨: 鶏卵法による温熱と抗癌剤併用効果の検討. *日泌尿会誌*, **80**, 17—21, 1989.
- 長谷川潤, 山中吉郎, 堀内和孝, 秋元成太: 尿路悪性腫瘍に対するヌードマウス腎被膜移植法 (Subrenal capsule assay) による制癌剤感受性試験. *日泌尿会誌*, **80**, 856—860, 1989.
- 澤村正之, 小田島邦男, 長倉和彦, 中村 宏: MTT-assay を用いたヒト膀胱癌株の制癌剤感受性試験. *日泌尿会誌*, **80**, 1195—1202, 1989.
- Freeman, A.E. and Hoffman, R.M.: In vivo-like growth of human tumors in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2694—2698, 1986.
- Vescio, R.A., Redfern, C.H., Nelson, T.J., Ugorletz, S., Stern, P.H. and Hoffman, R.M.: In vivo-like drug responses of human tumors growing in three-dimensional gel-supported primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5029—2033, 1987.
- Hoffman, R.M., Connors, K.M., Meerson-Monosov, A.Z., Herrera, H. and Price, J.H.: A general native-state method for determination of proliferation capacity of human normal and tumor tissues in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 2013—2017, 1989.
- Ohyama, S., Tanaka, M., Yonemura, Y., Kinoshita, K., Miyazaki, I. and Sasaki, T.: In vitro chemosensitivity test of human gastric carcinoma using collagen gel matrix. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 607—612, 1991.
- 大山繁和, 田中基裕, 木下一夫, 二宮 致, 米村豊, 宮崎逸夫, 遠藤良夫, 佐々木琢磨: コラーゲンゲルマトリックスを用いた器官培養法によるヒト胃癌に対する抗癌剤感受性試験. *癌と化学療法*, **18**, 239—243, 1991.
- Soloway, M.S.: Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer. *Cancer Res.*, **37**, 2918—2929, 1977.
- Scheithauer, W., Clark, G.M., Salmon, S.E., Dorda, W., Shoemaker, R.H. and Von Hoff, D.D.: Model for estimation of clinically achievable plasma concentrations for investigational anticancer drugs in man. *Cancer Treat. Rep.*, **70**, 1379—13382, 1986.
- Maehara, Y., Anai, H., Kusumoto, H. and Sugimachi, K.: Poorly differentiated human gastric carcinoma is more sensitive to antitumor drugs than is well differentiated carcinoma. *Eur. J. Surg. Oncol.*, **13**, 203—206, 1987.
- 鴻江俊治, 杉町主蔵: SDI test による制癌剤感受性試験の意義と問題点. 制癌剤適応決定の基礎と臨床, 初版, p. 31—48, 癌と化学療法社, 東京, 1991.
- 岩田尚士, 平井敏弘, 山下芳典, 向田秀則, 佐伯修二, 平林直樹, 峠 哲哉: ATP assay を利用した腫瘍温熱感受性試験の検討. *Oncologia*, **25**, 330—336, 1992.
- Weisenthal, L.M. and Lippman, M.E.: Clonogenic assay and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treat. Rep.*, **69**, 615—632, 1985.
- 近藤達平: 抗癌剤感受性の問題点. *癌と化学療法*, **22**, 592—598, 1995.
- Miller, B.E., Miller, F.R. and Heppner, G.H.: Factors affecting growth and drug sensitivity of mouse mammary tumor lines in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 2694—2698, 1986.
- Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55—63, 1983.
- Carmichael, J., deGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Michell, J.B.: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay; Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**, 937—942, 1987.
- 荻原雅彦, 小関清夫: 制癌剤感受性試験に基づく術前動注化学療法が奏効した深部浸潤性膀胱癌の 2 例. *米沢市病医誌*, **12**, 57—61, 1992.

(1995年7月17日受付, 1996年1月19日受理, 特別掲載)