

In Vitro Colony Assay による婦人科悪性腫瘍に対する 制癌剤感受性試験の基礎と臨床応用について

名古屋大学医学部産科婦人科学教室

加納 武夫 西田 裕一 榊原 克巳
太田 正博 友田 豊

Chemosensitivity Test for Gynecologic Malignancies by In Vitro Colony Assay

Takeo KANO, Yuichi NISHIDA, Katsumi SAKAKIBARA,
Masahiro OHTA and Yutaka TOMODA

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya

概要 悪性卵巣腫瘍を中心に婦人科腫瘍57検体について Salmon et al.による In Vitro Colony Assay を施行し、以下の成績を得た。

1) 腫瘍別の培養成功率(対照群のコロニー数が30個以上)は、悪性卵巣腫瘍65% (26/40), 子宮体癌33.3% (3/9), 絨毛癌100% (4/4), その他25% (1/4)であつた。また全検体の成功率は59.6% (34/57)であつた。

2) 悪性卵巣腫瘍において10種類の制癌剤に対する I.V.C.A.の制癌剤感受性(50%以上のコロニー抑制で判定)を検討した結果、Cis-platinum (CDDP), Adriamycin (ADR), 5-FU および Bleomycin (BLM) で感受性例が高率であつた。

3) ノードマウス移植婦人科腫瘍5株を用いて I.V.C.A.とノードマウス実験を行い、延べ24薬剤の感受性を測定し両者の相関性を検討した結果、true positive rate 75%および true negative rate 87.5%であつた。

4) I.V.C.A.と臨床効果との相関性は true positive rate 71.4% (5/7), true negative rate 75% (6/8)であつた。

5) I.V.C.A.における適正薬剤濃度および接触時間を検討するため、臨床投与時の CDDP (15mg/body), ADR (30mg/body), BLM (30mg/body) の最高血中濃度と卵巣腫瘍内濃度を測定した結果、CDDP は0.68 μ g/ml, 0.48 μ g/g, ADR は1.50 μ g/ml, 1.05 μ g/g, BLM は4.00 μ g/ml, 1.45 μ g/gであり、各薬剤が腫瘍組織内への高い移行性を示した。これは従来 I.V.C.A.で使用されている濃度に比べ2.4~10倍に相当する値であつた。

6) 濃度依存性薬剤である ADR と時間依存性薬剤である 5-FU, BLM および VP-16について、1時間接触と持続的接触におけるコロニー形成抑制率を検討した結果、時間依存性薬剤では持続的接触を行うことで、より正確な感受性が得られることが証明された。

Synopsis In Vitro Colony Assay was carried out to examine chemosensitivity in 57 specimens from gynecologic malignancies, and following results were obtained.

1) Total of 34 (59.6%) formed adequate colonies for sensitive assay.

2) Among ten anticancer drugs that were tested, Cis-platinum, Adriamycin, 5-FU and Bleomycin were relatively effective for ovarian malignancies.

3) In vivo chemosensitive tests were also performed using five xenograft systems of human gynecologic tumor. These in vivo results were compared with in vitro data, and a 75% true positive and an 87.5% true negative rate were observed.

4) Retrospective correlations between in vitro chemosensitive data and patient responses to chemotherapy were analyzed from 15 evaluable patients, then a 71.5% true positive and a 75% true negative rate were observed.

5) To obtain pharmacokinetic data on anticancer drugs, we measured concentrations of plasma and tumor tissue for Cis-platinum, Adriamycin and Bleomycin in operated patients and xenografts. The in vivo

tissue concentrations were higher than the in vitro drug concentrations usually employed in colony assay.

6) By comparing the inhibitory effects on tumor colony growth of 1-hr and continuous drug exposures in colony assay, in vitro continuous exposure schedules were made available for cell cycle specific anticancer drugs.

Key words: Colony-forming units assay • Chemosensitivity • Genital neoplasmas female

緒 言

悪性腫瘍に対する化学療法は、種々の優れた制癌剤の開発により近年目覚ましい進歩を遂げている。しかし制癌剤は抗腫瘍作用を持つ一方で、患者に種々の副作用を及ぼす欠点があること、同じ臓器で同じ組織形を有しながら個々の症例では制癌剤に対する感受性が異なること、治療継続中に感受性が変化する場合があることなどより、臨床での制癌剤選択に際しては最も効果が期待される薬剤を事前にスクリーニングすることが望ましい。人癌に対する制癌剤の感受性試験は古くから種々の方法が試みられているが、Hamburger および Salmon によつて開発された軟寒天培地による In Vitro Colony Assay (I.V.C.A.) 法は、臨床効果をよく反映する感受性試験として現在広く普及しつつある。今回我々は悪性卵巣腫瘍を中心に婦人科腫瘍57例に対してI.V.C.A.を行い、コロニー形成や種々の制癌剤に対する感受性を検討し、同時に行つた5株のヌードマウス移植腫瘍系の感受性試験および臨床効果との相関性を検討し

た。またI.V.C.A.の感受性精度上の問題点とされている薬剤濃度、接触時間についても検討を行つた。

方 法

1) In Vitro Colony Assay 法

I.V.C.A.の対象とした実験材料は、婦人科悪性腫瘍患者の手術あるいは生検で得られた腫瘍組織29例、腹水14例、ヌードマウス移植腫瘍7株および継代培養細胞7株の計57検体である。腫瘍別のうちわけは、悪性卵巣腫瘍40例、子宮体癌9例、絨毛癌4例、その他として子宮頸癌3例および卵管癌1例である。I.V.C.A.の方法は図1の如くHamburger および Salmon の方法^{11)~13)18)19)}に準じて行い、詳細な手技は癌研方式^{1)3)~5)}を踏襲した。即ち固形腫瘍材料は培養液(McCoy 5A Wash=McCoy 5A+10% CS+PC+SM)中に保存し、可及的速やかに以下の処理を行う。滅菌ハサミで細切された組織片を酵素カクテル(HBSS+collagenase, DNase I, pronase)中で37°C、30分間 incubation し、酵素液洗浄後培養液

図1 Procedure of In Vitro Colony Assay

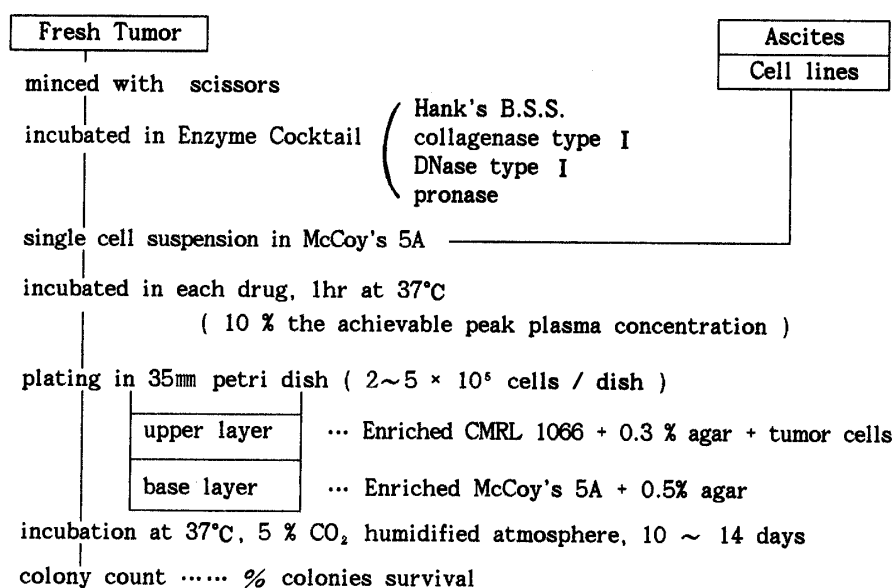


表1 Drug concentrations in I.V.C.A.

drugs	$\mu\text{g/ml}$	drugs	$\mu\text{g/ml}$
Cis-platinum(CDDP)	0.20	Methotrexate(MTX)	0.10
Adriamycin(ADR)	0.10	MCNU*	2.00
Vincristine(VCR)	0.01	Mitomycin C(MMC)	0.20
5-Fluorouracil(5-FU)	1.00	Vinblastine(VBL)	0.10
Bleomycin(BLM)	0.20	Etoposide(VP-16)	10.00
Actinomycin D(ACD)	0.01	Vumon(VM-26)	10.00

*1-(2-Chloroethyl)-3-(methyl α -D-glucopyranos-6-yl)-1-nitrosourea

(McCoy 5A Wash) に再浮遊させ、ステンレス・メッシュ (Collector, EC Apparatus Corp.) で濾過した後25Gage 注射筒内に吸引し単離浮遊細胞液を作製する。腹水は浮遊細胞の凝集を防ぐためヘパリンを少量添加し、遠沈後培養液に浮遊させた。このようにして得られた単離腫瘍細胞は、0.5%トリパンプルー液にて生細胞比を算定し、1プレート当り $2 \sim 5 \times 10^5$ 個になるよう調節した後、37°C、恒温槽内にて各濃度 (表1) の制癌剤と1時間接触させる。使用された制癌剤の濃度は臨床的に得られる最高血中濃度の1/10に相当する量とした¹⁹⁾。incubation 後の細胞は培養液にて洗浄し、15%馬血清(H.I.)を加えた double Enriched CMRL1066の培養液と最終濃度が0.3% Bactoagar (1ml) となるよう調整し、予めペトリ皿に準備した0.5% agar の Enriched McCoy 5A (1ml) による Base layer の上に重層させる。1薬剤当り duplicate にて作製されたペトリ皿は37°C、5%炭酸ガス培養器内で10~14日間静置培養した後、倒立顕微鏡下でコロニー数を算定する。制癌剤感受性の有無の判定基準は以下の如くである。

- ① 30個以上の細胞集塊をコロニーとする。
- ② 対照群のコロニー数が30個以上の場合を感受性判定可能例とする。
- ③ コロニー形成阻止率 (100% - 薬剤処理群のコロニー数 / 対照群のコロニー数 $\times 100\%$) が50%以上である場合を感受性ありとした。

上記の方法で assay された婦人科腫瘍57検体の腫瘍別、材料別の培養成功率 (①, ②の条件を満たすもの) と plating efficiency および悪性卵巣腫瘍における薬剤別感受性成績を検討した。

2) ノードマウス移植腫瘍系の感受性試験

I.V.C.A.を行つた腫瘍のうち、BALB/c 系ノードマウスに3代以上継代移植が可能であつた5株 (卵巣単純性原発癌2株, Embryonal Ca. 1株, 子宮体癌1株, 卵管癌1株) について, Battelle Columbus Laboratories Protocol²⁾¹⁶⁾に従つて各種制癌剤の感受性試験を行つた。薬剤の投与量は各々マウスでのほぼ最大耐容量を用い、4日毎に3回を腹腔内に投与した。1薬剤について3~4匹のマウスを用い、薬効判定は実験終了時の治療群(T)と対照群(C)の平均腫瘍体積から $(1-T/C) \times 100 (\%)$ の式より増殖抑制率 (I.R.) を求め、I.R.が58%以上の時を薬剤感受性 (有効性) ありとした。

以上の実験で得られたノードマウスによる in vivo の感受性と同一腫瘍、同一薬剤の I.V.C.A. の in vitro の感受性成績を直接対比した。

3) I.V.C.A.と臨床効果との相関性の検討

I.V.C.A.を施行した婦人科腫瘍のうち固形癌化学療法効果判定基準により治療効果の判定が可能であつた15例について I.V.C.A.の感受性結果との相関を検討した。また実際に臨床で使用された薬剤の I.V.C.A.における感受性結果と予後との関連を生存率にて検討した (Kaplan-Meier 法)。

4) 薬剤濃度の検討

我々が婦人科腫瘍症例に日常良く使用する Cis-platinum (CDDP), adriamycin (ADR), bleomycin (BLM) の三つの薬剤について、通常臨床で用いられる量を投与された時の最高血中 (血清中) 濃度、悪性卵巣腫瘍例の卵巣 (腫瘍部分) と子宮筋の組織内濃度およびノードマウス実験系における移植腫瘍内濃度を測定し、I.V.C.A.で従来使用されている濃度と比較した。尚 CDDP の測定は Pt を marker とする原子吸光分析法⁷⁾, ADR は高速液体クロマトグラフィー¹⁴⁾, BLM は *Bacillus subtilis* PCI 219を検定菌とした濾紙ディスク法による生物検定法によつた。

5) 薬剤接触時間の検討

HEC50B (human endometrial cancer) の細胞株を用いて、濃度依存性薬剤である ADR, 時間依存性薬剤である 5-Fluorouracil (5-FU),

表2 Materials of In Vitro Colony Assay and colony formation

tumor	no. of tested	no. of evaluable (%)	no. of colonies/plate mean (range)	*plating efficiency mean (range)
Ovarian Ca.	40	26 (65.0)	168 (23~1,020)	0.03 (0.004~0.20)
Corpus Ca.	9	3 (33.3)	286 (17~ 800)	0.06 (0.003~0.16)
Chorioca.	4	4 (100.0)	705 (70~1,520)	0.69 (0.042~1.52)
others	4	1 (25.0)	735	0.15
specimens				
Fresh tumor	29	17 (58.6)	169 (17~1,020)	0.03 (0.003~0.20)
Ascites	14	7 (50.0)	82 (20~ 158)	0.02 (0.004~0.03)
Xenograft	7	3 (42.8)	308 (42~ 735)	0.06 (0.008~0.15)
Cell line	7	6 (85.7)	649 (70~1,520)	0.58 (0.042~1.52)
Total	57	34 (59.6)		

*plating efficiency=no. of colonies/no. of plated cells×100%

Etoposide (VP-16), BLM について I.V.C.A.を行い、薬剤濃度別および検討薬剤の1時間接触と持続的接触の間のコロニー形成抑制効果の比較を行った。尚、HEC50B 細胞株は北里大学蔵本博行博士より供与されたものである。

成 績

1) 腫瘍別・材料別コロニー形成の検討 (表2)

悪性卵巣腫瘍40検体中、対照群のコロニー数が30個以上で感受性試験として評価可能であったものは65.0% (26/40) であった。子宮体癌及び頸癌の培養成功率 (30個以上のコロニー) は低かったが、絨毛癌では全て継代培養細胞株を用いたため良好なコロニー形成が得られた。材料別では、新鮮組織、腹水、ヌードマウス移植株、継代培養細胞株での培養成功率は、58.6%, 50.0%, 42.8%, 85.7%であり、継代培養細胞株が最も良好であった。また全検体の培養成功率は59.6% (34/57) であった。

2) 薬剤別および組織別感受性の検討

悪性卵巣腫瘍で感受性評価可能であったものについて、臨床で日常使用される薬剤を中心に個々の感受性を検討した (表3)。50%以上のコロニー形成阻止率で感受性の検討を行うとCDDP (8/24, 33.3%), ADR (8/23, 34.8%), 5-FU (6/16, 37.5%), BLM (6/19, 31.6%) がin vitroでの感受性例が高率であった。悪性卵巣腫瘍の半数以上を占めていた漿液性癌では同様にCDDP (6/15, 40.0%), ADR (7/14, 50.0%), 5-FU (3/10, 30.0%), BLM (5/14, 35.7%) が高感受性薬剤で

表3 Frequency of drug sensitivity test of tumor colony forming units from ovarian malignancies

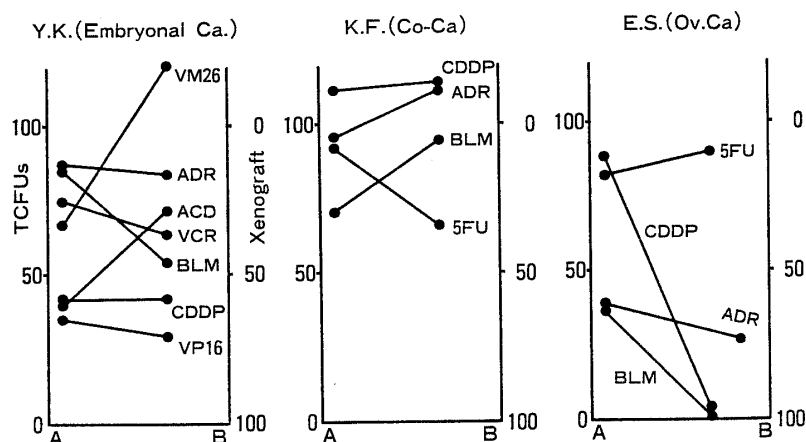
drugs	Ovarian malignancies	Serous Ca. of ovary
	no. of ≥50% inhibition /evaluable tests (%)	no. of ≥50% inhibition /evaluable tests (%)
CDDP	8/24 (33.3)	6/15 (40.0)
ADR	8/23 (34.8)	7/14 (50.0)
VCR	3/15 (20.0)	2/ 8 (25.0)
5-FU	6/16 (37.5)	3/10 (30.0)
BLM	6/19 (31.6)	5/14 (35.7)
ACD	4/18 (22.2)	1/ 9 (11.1)
MTX	2/13 (15.4)	1/ 8 (12.5)
MCNU	1/15 (6.7)	1/ 8 (12.5)
VBL	3/13 (23.1)	2/ 7 (28.6)
MMC	3/15 (20.0)	2/10 (20.0)

であった。しかし同じ漿液性癌でありながらこれらの薬剤には感受性を認めず、他の薬剤で感受性が得られる症例もあり、個別に制癌剤を選択することが重要であると考えられた。また症例数は少なかつたものの Embryonal Ca. (桶口・加藤) ではACD (2/3), 子宮体癌では5-FU (2/3), 絨毛癌ではMTX (3/4) および VP-16 (3/3) において感受性例が多かつた。

3) 同一腫瘍による I.V.C.A.と移植ヌードマウスにおける制癌剤感受性の直接対比

当科で樹立した婦人科腫瘍のうち Embryonal Ca. (Y.K.) 株, 子宮体癌 (K.F.) 株, 卵巣単純性原発癌 (E.S.) 株の3株についてコロニーの survival rate とヌードマウスでの増殖抑制率を一薬剤ごとに比較し、図2に示した。双方概良好な相関性を示しているものの、一部でヌードマウス側のやや過剰な増殖抑制効果を示す傾向にあった。

図2 Correlation of in vitro and in vivo sensitivity of gynecologic malignancies to anticancer drugs (In Vitro Colony Assay vs. Xenograft)



* A : % Survival of TCFUs B : Inhibition Rate = $(1 - T/C) \times 100\%$

* TCFUs = Tumor Colony Forming Units

表4 Relationship between in vitro sensitivity and clinical outcome in patients with ovarian malignancies receiving cis-platinum and adriamycin

patients	response to cisplatin	response to adriamycin	chemotherapy	clinical outcome	correlation
R. M.	S	S	CAP×6	PR	Y
T. A.	R	S	CAP×8	PR	Y
M. M.	R	S	CAP×6	CR	Y
J. S.	R	S	CAP×5	PR	Y
S. E.	S	S	CAP×4	PD	N
K. F.	S	R	CAP×4	PR	Y
F. T.	S	R	CAP×8	NC	N
M. O.	R	R	CAP×5	PR	N
M. S.	R	R	CAP×3	PD	Y
S. I.	R	R	CAP×4	PD	Y

S = sensitive; R = resistant; CAP = cyclophosphamide, adriamycin, cisplatin;

CR = complete response; PR = partial response; NC = no change;

PD = progressive disease; Y = yes; N = no

ヌードマウス移植腫瘍5株で使用された延べ24薬剤についてのI.V.C.A.とin vivoのヌードマウス実験の薬剤感受性成績の相関を整理すると(表5上段), I.V.C.A.で感受性があったものでヌードマウス系でも感受性があったもの(true positive rate)は75.0% (6/8)であり, 逆にI.V.C.A.で感受性が低い(50%以下)ものでヌードマウス系でも感受性のなかったもの(true negative rate)は87.5% (14/16)であった。

4) I.V.C.A.と臨床効果との相関性の検討

はじめに悪性卵巣腫瘍10例についてI.V.C.A.におけるCDDPおよびADRに対する感受性結果とCAP(CDDP, ADR, CPM)療法施行後の臨床

効果を比較した(表4)。I.V.C.A.においてCDDPあるいはADRのいずれかに感受性のあった7例のうち5例(71.5%)が臨床的にも有効であった。他の症例も含めて化学療法の臨床効果が判定できた婦人科腫瘍15例のretrospectiveな相関性の検討では(表5下段), I.V.C.A.で感受性ありとされ, 臨床的にもPartial Response(50%以上の腫瘍縮小が4週以上の持続)以上の効果が得られたものは71.5%(5/7)で, 逆にI.V.C.A.で感受性がなく, 臨床的にも無効であったものは75%(6/8)であった。また図3はCAP療法とVAC(VCR, ACD, CPM)療法を中心に現在当教室において悪性卵巣腫瘍に用いられている薬剤のI.V.C.A.における感

受性結果と予後との関連を生存率にて検討したものである。実際の症例に用いられた薬剤 (CDDP, ADR, ACD, 5-FU etc.) のいずれか一つが I.V.C.A. で感受性があつた場合を sensitive group (10例) とし, 臨床に用いられた薬剤のすべてが I.V.C.A. で感受性がなかつたものを resistant group (11例) とした。症例が少ないため有意差は得られなかつたが, 前者が良好な生存成績を示し, I.V.C.A. の結果を臨床応用することで治療成績の向上

が得られるものと推察された。

5) 薬剤濃度の検討

臨床症例およびヌードマウス実験系での薬剤濃度を各々 4～7 検体測定し, I.V.C.A. で従来使用されている濃度と比較した。表 6 は CDDP, ADR および BLM の三つの薬剤について, 臨床投与時の最高血中 (血清中) 濃度, 悪性卵巣腫瘍症例の卵巣と子宮筋層の組織内濃度, およびヌードマウス実験系における移植腫瘍内濃度の平均値を表わしたものである。一般的に I.V.C.A. では臨床投与時の最高血中濃度の 5～10% で感受性の判定が行われるのが通例であるが, 我々の成績では臨床投与時の卵巣腫瘍組織内濃度と最高血中濃度の比 (組織内濃度/最高血中濃度) は CDDP=0.71, ADR=0.70, BLM=0.41 であつた。一方ヌードマウス実験系では一般に臨床投与量の 5～10 倍 (体重当り) がヌードマウスに投与されているため, かなり高い組織内濃度となつてることが判明した。ADR は腹腔からの吸収が不良なため, 低い組織内濃度となつた。

6) 薬剤接触時間の検討

濃度依存性薬剤である ADR では, 薬剤との接触時間に関係なく高濃度になるに従いコロニー形成が抑制された。一方時間依存性薬剤である 5-FU, BLM では 1 時間接触では薬剤濃度を高くしてもコロニー形成は抑制されず, むしろ従来 1 時間接触で採用されている濃度よりさらに低い条件でも持続的に薬剤と接触させることでコロニー形成が抑制された。しかし時間依存性薬剤のすべてがこのような性質をもっているのではなく濃度依存性にコロニー形成が抑制される場合もあつた

図 3 In vitro chemosensitivity and survival in 21 patients with gynecologic malignancies

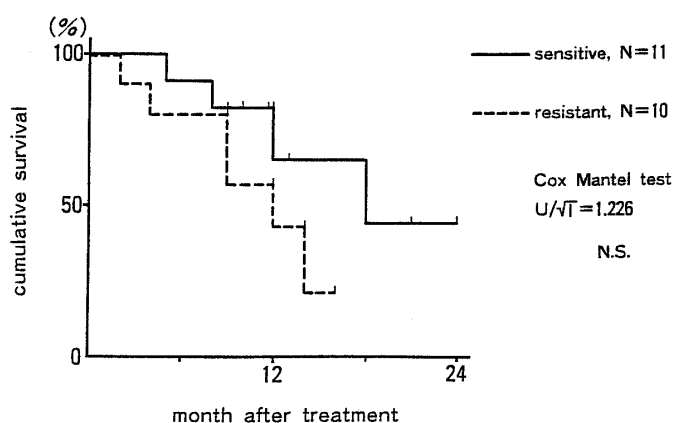


表 5 Correlations of in vitro and in vivo sensitivity of gynecologic malignancies to anti-cancer drugs

in vitro/in vivo	S/S	S/R	R/S	R/R
Xenograft	6	2	2	14
Clinical response	5	2	2	6

* S=sensitive R=resistant

* true positive rate=(S/S)/[(S/S)+(S/R)]×100%

Xenograft: 6/8=75.0%, Clinical: 5/7=71.5%

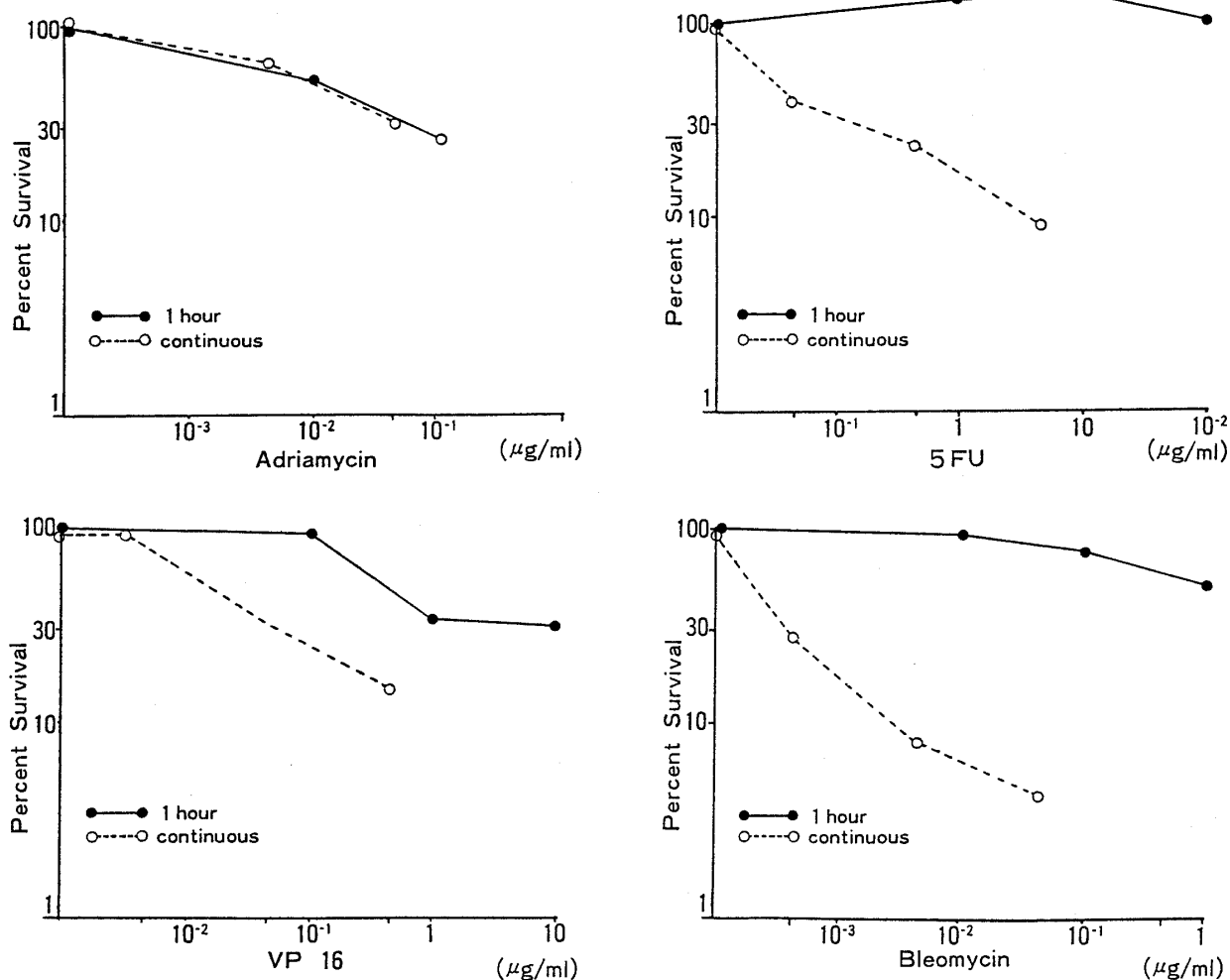
* true negative rate=(R/R)/[(R/S)+(R/R)]×100%

Xenograft: 14/16=87.5%, Clinical: 6/8=75.0%

表 6 In vitro and in vivo pharmacokinetic correlations

	CDDP mean±S.E. (N)	ADR mean±S.E. (N)	BLM mean±S.E. (N)
clinical			
Route and Dosage	15 mg/body, D.I.	30 mg/body, I.V.	30 mg/body, I.V.
Peak Plasma Concentration(μg/ml)	0.68±0.03(6)	1.50±0.32(5)	4.00±0.62(6)
Tissue Concentration(μg/g)			
Ovarian Tumor	0.48±0.07(6)	1.05±0.29(5)	1.65±0.37(6)
Uterus	0.59±0.20(4)	1.10±0.29(5)	1.08±0.10(4)
Xenograft			
Route and Dosage	0.1 mg/body, I.P.	0.1 mg/body, I.P.	0.2 mg/body, I.P.
Tumor Concentration(μg/g)	1.28±0.26(6)	1.01±0.45(7)	2.09±0.24(5)
in vitro dosage(μg/ml)	0.20	0.10	0.20

図4 Dose-survival curves for human TCFUs following 1-h and continuous exposure (HEC-50B)



(図4).

考 案

制癌剤感受性試験として現在研究されている主なものは、細胞の形態学的変化でみる方法、細胞の代謝や酵素活性による方法、放射性前駆物質の細胞内摂取による方法、コロニー形成による方法、異種動物移植による方法などがある。これらのものが広く臨床に応用されうる条件としては、

- 1) 実験の成功率が高いこと
- 2) 手技が簡便かつ安価で、短期間に感受性の判定ができるもの
- 3) 少ない材料で実験が可能であるもの
- 4) 臨床効果との相関性が高いこと

などがあげられる。

Hambarger と Salmon により1977年に報告さ

れたI.V.C.A.法¹¹⁾¹²⁾は、実験開始後2週間程で結果が得られ、培養成功率は諸家の報告では¹⁰⁾¹⁷⁾²²⁾²⁶⁾、悪性腫瘍全体で32~68%、卵巣腫瘍では43~83%と従来の初代培養による感受性試験の中では最も高いとされている。我々の成績でも婦人科腫瘍全体で59.6%、悪性卵巣腫瘍で65.0%と良好な培養成功率であつた。

我々が悪性卵巣腫瘍について制癌剤感受性を検討した薬剤の中ではCDDP, ADR, 5-FU, BLMが30%以上の感受性例を得たもので、これらは実際の臨床においても悪性卵巣腫瘍に有効性の高い薬剤である。しかし同一の組織型でも個々の感受性結果には若干のバラツキがあり、症例ごとに制癌剤を選択する必要があると考えられた。

本法の最大の利点とするところは臨床効果との

相関性が高いことである。他の報告⁹⁾²²⁾²⁴⁾²⁵⁾によれば, true positive rate は60~80%, true negative rate は80~95%であり, また臨床効果との相関性のなかつた false positive および false negative rate が少ないことも特徴とされている。我々の成績では retrospective な検討ではあるが, true positive rate は71.5%, true negative rate は75.0%であつた。

我々は I.V.C.A.法とヌードマウス実験系により, in vitro と in vivo の制癌剤感受性の相関を検討した。同一腫瘍, 同一薬剤におけるコロニー形成抑制率と腫瘍増殖抑制率は必ずしも近似していたとはいえないが, 50%以上のコロニー形成抑制および58%以上の腫瘍増殖抑制をもつて感受性ありとして両者の相関性をみると, true positive rate は75.0%, true negative rate は87.5%であつた。

本 assay による in vitro の制癌剤感受性と臨床効果との相関性を他の成績も含めて総括すると, retrospective clinical trial では概良好な相関性が得られているが, 感受性試験としての精度を厳密に評価するために prospective clinical trial を行つた成績では若干 false positive および false negative case の割合が多くなっている。

我々はこうした感受性試験としての精度を左右すると考えられる I.V.C.A.の設定条件, すなわち薬剤濃度, 接触時間, 感受性判定のためのコロニー抑制率について検討を行つた。従来 I.V.C.A.による感受性の判定は¹⁹⁾²⁰⁾, 最高血中濃度の1/10, 1時間薬剤接触, 70%以上のコロニー抑制という条件で行われている。しかし70%以上のコロニー抑制という条件下では感受性例の割合が少なくなりすぎることと, in vitro で無効でも in vivo では有効である false negative 例が増加しやすくなること (Von Hoff et al.²⁵⁾の報告では, false negative の大部分は50~69%のコロニー抑制であつた)より, 70%抑制では条件が厳しすぎるものと考えられるようになった。そこで現在では50%抑制で感受性の判定がされることが多い⁵⁾¹⁰⁾²²⁾²³⁾。我々の成績は50%抑制で判定されているが, 臨床成績およびヌードマウスとの相関性はほぼ満足のいくもので

あつた。in vitro resistance の薬剤の取扱いについては, 効果の乏しい薬剤を投与して患者に無駄な副作用を及ぼすことを防ぐため, コロニー抑制率の高い薬剤から順に選択をすることが得策であると考ええる。

薬剤濃度についてはヒトにおける各種制癌剤の体内動態の研究により, 薬剤の組織内濃度は多くの場合 one shot 静注時の投与直後の急峻な distribution phase からゆるやかな elimination phase への変曲点, すなわち β -phase 起始部における濃度 (血中濃度の約1/10) にほぼ一致すると考えられている⁶⁾。従つて I.V.C.A.では, 最高血中濃度の1/10の薬剤濃度で1時間接触により感受性試験が行われている。しかし我々が実際に手術症例で卵巣腫瘍の組織内濃度を測定した結果では制癌剤の腫瘍組織内への移行性は予想以上に高く, 最高血中濃度の41~71%にもなり, これは従来我々が I.V.C.A.で採用していた濃度の2.4~10倍に相当していた。

つぎに薬剤濃度と接触時間との関係である。制癌剤の cell kill kinetics には2種の様式があり, 制癌性抗生物質やアルキル化剤は濃度依存性の殺細胞作用を表わし, 多くのものは臨床的にも one shot 静注か短期間の点滴静注で投与される。一方代謝拮抗剤等の細胞発育阻止物質は時間依存性に抗腫瘍作用を発揮する。これらは比較的低濃度でも作用時間 (接触時間) を長くすることで効果が増強するといわれている⁸⁾¹⁵⁾²¹⁾。そこで I.V.C.A.では濃度依存性薬剤は薬剤との接触時間を一定 (1時間) にして, 時間依存性薬剤では agar に薬剤を混和した状態で持続的に薬剤と接触させ感受性を判定するのがより臨床の条件に近く, 合理的である。我々の実験成績では HEC50B 株における 5-FU および BLM によるコロニー形成抑制で示されたように, 1時間接触においては薬剤濃度を高くしても感受性が認められなかつたにもかかわらず, 持続的接触では低い薬剤濃度で高い感受性が表れることがあり, 時間依存性薬剤の感受性を判定するに際しては薬剤濃度と接触時間 (1時間か持続的接触か) を再検討する必要があると思われた。すなわち in vitro での薬剤感受性を指標とし

て、臨床における制癌剤の有効性をより正確に推測するためには、投与された薬剤の pharmacokinetics の特徴を十分に把握する意味で、実際の臨床例で薬剤の血中濃度や病巣の組織内濃度がどの程度で何時間ぐらい維持されているのかを調査し、また薬剤の cell kill kinetics の特性を知つたうえで出来る限り臨床の条件に近似した in vitro の感受性試験を設定することが必要と考えられた。

以上 I.V.C.A. は初代組織培養による制癌剤感受性試験として、培養成功率が高く、臨床効果との相関性が良好であることが確認された。しかし今回我々が指摘した薬剤濃度と接触時間のほかに、コロニー形成率および細胞回収率の改善等の問題を残している。今後この方面の研究がさらに進められ、I.V.C.A. の信頼性がますます向上することを期待する。

稿を終えるに臨み、colony assay 法について直接御教示をいただいた癌研・化学療法部の井上雄弘博士に深甚なる謝意を表します。

本論文の要旨は第22回日本癌治療学会および第37回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。

文 献

1. 荒川昌亨, 井上雄弘, 宮本宏明, 小川一誠: 癌性胸・腹水の in vitro colony assay (human tumor stem cell assay) によるコロニー形成。癌と化学療法, 10: 113, 1983.
2. 花谷勇治, 久保田哲朗, 山田好則, 露木 建, 中田宗彦, 松本純夫, 熊井浩一郎, 吉野肇一, 石引久弥, 阿部令彦: ヌードマウス可移植性ヒト胃, 結腸癌 5 株を用いた実験的化学療法—Battelle Columbus Laboratories Protocol の評価を中心に—. 日癌治誌, 15: 1114, 1980.
3. 井上雄弘, 宮本宏明, 小川一誠: Human tumor stem cell assay. 癌と化学療法, 9: 599, 1982.
4. 井上雄弘: In Vitro Colony Assay による悪性腫瘍のコロニー形成に関する研究。日癌治誌, 19: 32, 1984.
5. 井上雄弘, 荒川昌亨, 宮本宏明, 小川一誠, 稲垣治郎, 堀越 昇, 池田幸市, 薄井紀子, 仲田浩之, 安達興一, 向山雅人: 卵巣癌の in vitro colony assay と臨床効果。癌の臨床, 30: 1146, 1984.
6. 木村郁郎, 平木俊吉: Tumor stem cell assay による制癌剤感受性, 制癌剤感受性の決定。155, 金原出版, 東京, 1985.
7. 増池健年, 大嶽純一, 小波蔵政弘, 野田忠晴, 武

本宜教: 高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中のアドリアマイシンとその代謝物の定量 (第2報) 抽出法による組織の分析。薬学雑誌, 104: 620, 1984.

8. 下山正徳: 薬剤感受性の基礎, 制癌剤感受性の決定。24, 金原出版, 東京, 1985.
9. Alberts, D.S., Salmon, S.E., George Chen, H.S., Surwit, E.A., Soehnlen, B. and Young, L.: In-vitro clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer to chemotherapy. Lancet, 11: 340, 1980.
10. Bertelsen, C.A., Sondak, V.K., Mann, B.D., Korn, E.L. and Kern, D.H.: Chemosensitivity testing of human solid tumors: A review of 1582 assays with 258 clinical correlation. Cancer, 53: 1240, 1984.
11. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science, 197: 461, 1977.
12. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human melanoma stem cells. J. Clin. Invest., 60: 846, 1977.
13. Hamburger, A.W. and Salmon, S.E., Kim, M. B., Trent, J.M., Soehnlen, B.J., Alberts, D.S. and Jack Schmidt, H.: Direct cloning of human ovarian carcinoma cell in agar. Cancer Res., 38: 3438, 1978.
14. LeLoy, A.F., Wehling, M.L., Sponseller, H.L., Friauf, W.S., Solomon, R.E. and Dedrick, R. L.: Analysis of platinum in biological materials by flameless absorption spectrophotometry. Biochem. Med., 18: 184, 1977.
15. Ludwig, R., Alberts, D.S., Miller, T.P. and Salmon, S.E.: Evaluation of anticancer drug schedule dependency using an in vitro human tumor clonogenic assay. Cancer Chemother. Pharmacol., 12: 135, 1984.
16. Ovejera, A.A., Houchens, D.P. and Barker, A. D.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. Annu. Clin. Lab. Sci., 8: 50, 1978.
17. Parker, R.L., Welandar, C.E., Homesley, H.D., Jobson, V.W. and Kawamoto, E.H.: Use of human tumor stem cell assay to study chemotherapy sensitivity in cancer of cervix. Obstet. Gynecol., 64: 412, 1984.
18. Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Soehnlen, B.J., Durie, B.G.M., Alberts, D.S. and Moon, T.E.: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drug. N. Engl. J. Med., 298: 1321, 1978.
19. Salmon, S.E. (ed.): Cloning of human tumor

- stem cells. New York, N.Y., Alan Liss and Inc., 1980.
20. *Salmon, S.E., Meyskens, F.L., Alberts, D.S., Soehnlen, B. and Young, L.* : New drugs in ovarian cancer and malignant melanoma : In vitro phase II screening with the human tumor stem cell assay. *Cancer Treat. Rep.*, 65 : 1, 1981.
21. *Salmon, S.E.* : Human tumor colony assay and chemosensitivity test. *Cancer Treat. Rep.*, 68 : 117, 1984.
22. *Simmonds, A.P. and McDonald, E.C.* : Ovarian carcinoma cells in culture : Assessment of drug sensitivity by clonogenic assay. *Br. J. Cancer*, 50 : 317, 1984.
23. *Surwit, E.A., Alberts, D.S., Crisp, W., Jackson, R.A., Grozea, P.N. and Leigh, S.* : Multiagent chemotherapy in relapsing ovarian cancer. *Obstet. Gynecol.*, 146 : 613, 1983.
24. *Von Hoff, D.D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. and Makuch, R.* : Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, 70 : 1027, 1981.
25. *Von Hoff, D.D., Clark, G.M., Stogdill, B.J., Sarosdy, M.F., O'Brien, M.T., Casper, J.T., Mattox, D.E., Page, C.P., Cruz, A.B. and Sandbach, J.F.* : Prospective clinical trial of human tumor cloning system. *Cancer Res.*, 43 : 1926, 1983.
26. *Williams, T.J., Lieber, M.M., Podratz, K.C. and Malkasian, G.D.* : Soft agar colony formation assay for in vitro testing sensitivity to chemotherapy of gynecologic malignancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 145 : 940, 1983.
- (特別掲載 No. 5833 昭60・9・26受付)