

子宮内膜癌培養樹立細胞固型化腫瘍を用いた腎皮膜下 移植法による抗癌ホルモン剤の検討

京都府立医科大学産婦人科学教室

石崎 壽光 伊藤 良治 山本 宝 岡田 弘二

Estimation of Medroxyprogesterone Acetate against a Human Endometrial Tumor Constituted from the Established Ishikawa Cancer Cells by a Subrenal Capsule Assay

Toshihiro ISHIZAKI, Ryoji ITOH, Takara YAMAMOTO and Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

概要 抗癌ホルモン剤の感受性試験として我々はヌードマウスへの内膜癌培養細胞 (Ishikawa 株) の固型化腫瘍の移植による長期間の Subrenal capsule assay (以下 SRC 法) を施行, 一つの系として提唱した。抗癌ホルモン剤は DNA 障害性の薬剤と異なり, cytotoxic な効果よりも cytostatic な効果を示すため, 抗腫瘍効果をみるには短期間のアッセイでは不十分と考えられる。我々の試みたこの方法は, 時間がかかり, 手技的にやや難しく, 改良すべき問題点は残るものの, 腫瘍の生着率が90%以上と非常に高く, ヌードマウス皮下移植法に比べ, 個体差が少ないため, 実験精度の向上が期待できる。一方抗癌ホルモン剤の効果を判定するには長期間を要するが, 本法はヌードマウス皮下移植法のように腫瘍の生着を確認するまで待つ必要がなく, 28日間という比較的短期間で評価可能であり, 非常に有用な方法と考えられた。また28日の経口投与期間は組織学的な変化を生じるための最低必要期間といわれており, 本法は組織学的にも評価しうると考えられる。同一条件下で cytostatic な作用を示す薬剤の抗腫瘍効果を比較検討することが可能であり, 今後, 抗癌ホルモン剤や類似の癌化学療法剤の開発に対し, 一定の評価のできるアッセイ系として有用と考えられた。今回の結果より MPA は投与量とともに投与期間の重要なことが示唆された。

Synopsis In order to establish a sensitivity test system for the evaluation of anti-cancer hormonal agents, we tried a long-term subrenal capsule (SRC) assay, using nude mice with a transplanted solid tumor of endometrial cancer cells (Ishikawa's line). Unlike DNA-affecting agents, anti-cancer hormonal agents exert cytostatic effects rather than cytotoxic effects, and their evaluation in a short period is considered to be inaccurate. Our test system is somewhat difficult in terms of technique, but it is useful since it can (1) evaluate the agents in the relatively short period of 28 days and (2) compare the cytostatic anti-tumor efficacy of two or more agents under the same conditions. The rate of successful tumor transplantation in nude mice in our system is very high, i.e., more than 90%. Although there are some points which need improvement, our system is considered to be useful as an assay system for the development of anti-cancer hormonal agents and other similar chemotherapeutic agents for cancers. When medroxyprogesterone acetate (MPA) was evaluated by means of this system, the administration period, as well as the dosage, was found to be important.

Key words: Sensitivity test system • Medroxyprogesterone acetate (MPA) • Subrenal capsule assay • Nude mouse • Endometrial cancer cell

緒 言

現在, 子宮体 (内膜) 癌は術後, 主としてブラチナ誘導体やアントラサイクリン系薬剤を中心とした多剤併用による寛解導入療法施行の後, 癌組織型あるいは性ステロイド受容体の有無を考慮し

て Medroxyprogesterone acetate (以下 MPA) 等の抗癌ホルモン剤, 又はフッ化ピリミジン等のいわゆる化学療法剤が維持療法として選択使用されている。しかし投与量, 投与期間の設定は難しく, 進行内膜癌に対していずれの治療法を選択し,

どのように施行するかは患者の症状の程度や癌組織の生物学的特徴を多面的に考えながら行われることが重要である⁹⁾。

ところで、近年癌治療に占める化学療法の重要性がますます認識され、適正抗癌剤を選択する方法の早急な確立が望まれている。このような観点に立つて、抗癌化学療法剤の感受性試験もいくつか提唱され、臨床との相関性を示す成績も報告されている⁴⁾。しかしながら抗癌ホルモン剤については、その作用機序より cytotoxic な効果よりも cytostatic な効果がより優位であると考えられ、一般には他の化学療法剤に比べ長期間投与される必要があると報告されている⁶⁾。更に抗癌ホルモン剤は生体内で代謝され、活性要素も加わる可能性も高く、単に癌組織内への薬剤到達濃度だけでは評価は困難である。また投与の結果生ずる細胞増殖過程への作用も抗癌化学療法剤とは異なり、抗腫瘍効果に影響すると推察されている⁵⁾。このようなことを考慮に入れると、これまで報告されている抗癌剤感受性試験では十分に検討できない面が多いと思われる。

抗癌剤感受性試験はその条件として、a) 臨床効果との相関が高いこと、b) 腫瘍細胞に限定した抗癌剤の効果がみられること、c) 簡単であり、評価可能率が高いこと、d) 短期間で結果がわかること、e) 定量的かつ客観的評価が行えること、などがあげられている。現時点でこれらの条件に近い感受性試験として、Human tumor clonogenic assay (HTCA 法)、Succinic dehydrogenase inhibition (SDI 法)、Subrenal capsule assay (SRC 法) 等があげられている。当教室においては、これまで HTCA を用いて抗癌ホルモン剤の子宮内膜癌に対する評価を行ってきたが¹⁾²⁾、HTCA 法では評価可能率も固形癌では 30~60% と低く¹⁰⁾、実験期間も 21 日間以上は評価困難であつた。またホルモン剤の作用発現機序から、より生体内に近い状態で評価することが望ましいと考え、in vivo 試験であり、腫瘍の変化を組織学的に検討することも可能で、しかも評価可能率の高い SRC 法を応用した感受性試験を雌のヌードマウスを使用して試みた。なお、抗癌ホル

モン剤による一定の評価を得るため、子宮内膜癌培養樹立細胞 (Ishikawa 株) を固型化しその腫瘍塊を細切、ヌードマウス腎皮膜下に移植した。また抗癌ホルモン剤として MPA を選び、この種の薬剤を比較的長期間投与する必要性を考慮して、4 週間連日薬剤投与とし、それによつて得られたデータをもとに投与量及びその抗腫瘍効果を評価検討した。

研究材料並びに方法

1. ヌードマウス

specific pathogen free の条件下にて飼育された 6~8 週齢の雌性 BALB/c nu/nu ヌードマウス (日本クレア (株)) を使用した。実験(1)では各群 10 匹 (計 20 匹)、実験(2)では各群 4~5 匹、対照群 (薬剤非投与群) は 4~10 匹を用いて検討した。マウスは比較的短期間で屠殺するため、一般マウス用の飼育器内で落下細菌予防のためのエアフィルターをかぶせたケージで飼育し得た。また飼料、チップも新しいものを特に滅菌操作等を行ない状態で使用、水は水道水を流水の状態にして滅菌された給水瓶に汲み、連日新しいものと交換した。この飼育条件で実験中に感染徴候を示したマウスはなかつた。

2. 子宮内膜癌組織

評価対象として、均一と考えられる実験系にできる限り近づけるため、移植腫瘍にはエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体を有するヒト分化型子宮内膜癌培養樹立細胞 (Ishikawa 株; 筑波大学西田正人博士より供与) を純系ヌードマウス皮下に移植し、固型化した腫瘍を用いた。

3. 抗癌ホルモン剤

抗癌ホルモン剤には内膜癌に対し、臨床的に広く使用されている MPA (協和発酵 (株) より提供) の原末を使用した。

4. 研究方法

ヌードマウス皮下に移植した内膜癌細胞より発育した固型化腫瘍を無菌的に摘出し、ただちに McCoy's 5A medium (Flow Laboratories, North Ryde, N.S.W., Australia) (1% ペニシリン・ストレプトマイシン添加) の入ったシャーレに移し、無菌操作下にこの腫瘍塊より均一な腫瘍細胞に富

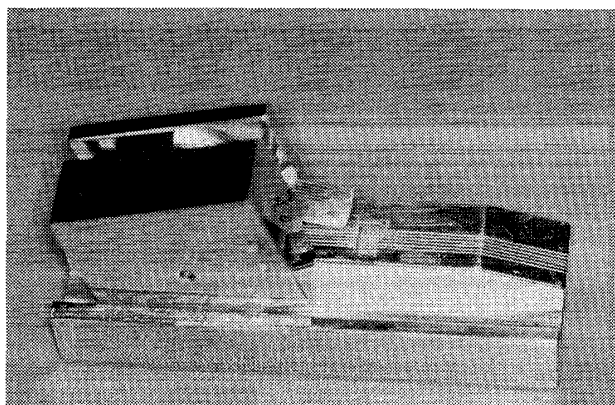


写真1 腫瘍細切器(株)貝印工業製造

んだ充実部を切り出して以下の実験を行った。

実験(1)

腫瘍サンプルを2本のメスにて2mm角の立方体として、ヌードマウスの腋窩皮下に移植した。移植後、経過観察を続けて腫瘍の大きさが $\phi 3\text{mm}$ 程度となった時点(生着が確認できた時点)でMPA投与群とMPA非投与群(対照群)に分け、薬剤投与を開始した。MPAは0.3%Hydroxypropylcellulosum(以下HPC)に懸濁後、ゾンデを用いて0.1ml/回/日(MPA 25mg/kg/day), 8週間連日マウス前胃へ強制経口投与した。腫瘍は1週間ごとにスライドキャリパーにてその長径・短径を計測し、それより腫瘍重量を近似計算して対照群と比較検討した。

実験(2)

腫瘍サンプルを写真1に示した細切器(東海中央病院立松 輝博士より供与)を用いて1mm径になるように細切した。無菌的にエーテル麻酔下でヌードマウスの左側腹部に眼科用小クーパーにて切開を加えて左腎を露出、メスにて皮膜に小切開を加えた。細切した腫瘍片をピンセットにてその部分から皮膜下に挿入移植し、実体顕微鏡にてその長径・短径を計測した。術後の癒着をできる限り小さくするため筋膜は吸収糸にて縫合、皮膚は金属クリップ(キーファー縫合器®)にて縫合閉鎖した。手術翌日をDay 1として、表1に示す濃度に調節したMPA懸濁液0.1ml/回/日をゾンデを用いてマウス前胃へ強制経口投与した。また対照群にはHPC生理食塩水のみを0.1ml/回/日投

与した。短期間投与群ではDay 7に、長期間投与群ではDay 28にマウスを頸椎脱臼法にて屠殺、その後左腎を摘出し、再度実体顕微鏡下にて腫瘍の長径・短径を計測した。

5. 評価方法

米国立癌研究所の Battelle Columbus Laboratories Protocol (BCLP 1978)¹⁴⁾に準じ、個々の腫瘍ごとにその長径(a; mm), 短径(b; mm)を計測し、腫瘍重量($w \div \text{mg}$)を $w = (a \times b^2) / 2$ の計算式を用い算出した。実験(1)ではその変化の様子を毎週、実験(2)では屠殺後、移植腫瘍の相対的平均腫瘍増殖率RW(W_n / W_0)を求め(W_n ; 実験終了時平均腫瘍重量, W_0 ; 実験開始時平均腫瘍重量)また腫瘍増殖抑制率(TGIR; tumor growth inhibition rate; $(1 - \text{投与群 RW} / \text{対照群 RW}) \times 100$)により抗腫瘍効果を評価した。また腫瘍径の増大のみられなかったもの、あるいは縮小したものは非生着例として除外した。

研究成績

実験(1)の成績を図1に示した。MPA投与群と非投与群との間に腫瘍増殖にほとんど差がみられず、MPA 25mg/kg/day投与の結果では皮下移植内膜癌腫瘍に対して増殖抑制効果は観察されなかった(総MPA投与量1,400mg/kg/8週間)。

そこで実験(2)としてSRC法を用い検討した。まずMPAの投与量を100mg/kg/dayとして、7日間投与群(系3)と28日間投与群(系2), 並びに7日間投与後21日間MPA非投与とした群(系4)を設定した。またその他400mg/kg/day 7日間投与群, 及び25mg/kg/day 28日間投与群(系5)を設定し比較検討した。

その結果を表1に示す。

系1: 400mg/kg/day 7日間連日投与, 合計2,800mg/kg (56mg/20grマウス)ではRWは0.89, IRは22.3であつた。

系2: 100mg/kg/day 28日間連日投与, 合計2,800mg/kg (56mg/20grマウス)ではRWは2.79, IRは46.4であつた。

系3: 100mg/kg/day 7日間連日投与, 合計700mg/kg (14mg/20grマウス)ではRWは0.77, IRは36.3であつた。

系4：100mg/kg/day 7日間連日投与，合計700mg/kg (14mg/20gr マウス) その後3週間HPCのみ投与して29日目に判定したものではRWは8.75，IRは13.6であつた。

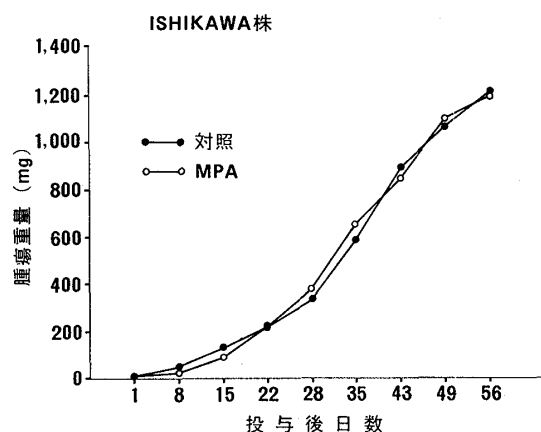


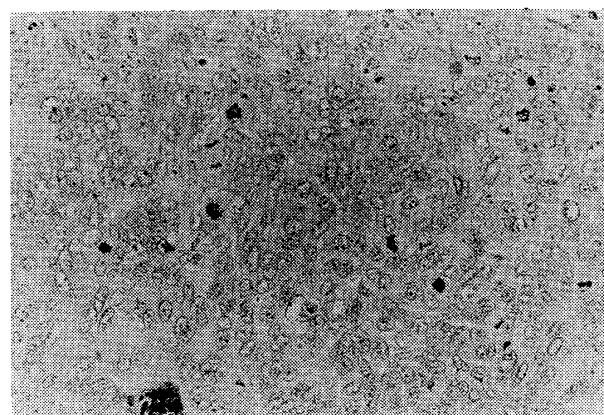
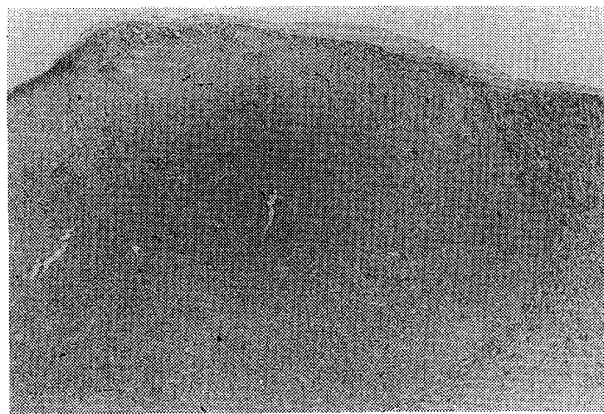
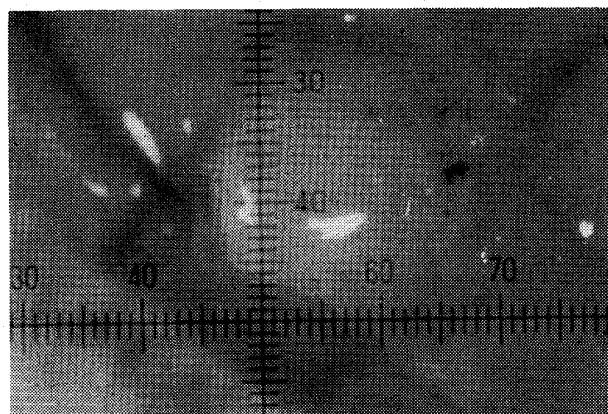
図1 MPA投与後のヌードマウス皮下腫瘍 (Ishikawa株)の腫瘍成長曲線。縦軸に腫瘍重量，横軸に投与開始後日数を示す (実験1)。

系5：25mg/kg/day 28日間連日投与，合計700mg/kg (14mg/20gr マウス)ではRWは1.19，IRは26.6であつた。

また腎皮膜下への固型化腫瘍の生着率は90%以上で，一つの系で2匹以上の除外例はなかつた (写真2に腎皮膜下に生着した移植片を示す)。

表1 種々のMPA投与体系におけるRW，IR値について (実験2)

	1日投与量 (mg/kg)	投与期間 (日)	観察期間 (日)	総投与量 (mg/kg)	結 果
系1	400	7	7	2,800	RW : 0.89 IR : 22.3
系2	100	28	28	2,800	RW : 2.79 IR : 46.4
系3	100	7	7	700	RW : 0.77 IR : 36.3
系4	100	7	28	700	RW : 8.75 IR : 13.6
系5	25	28	28	700	RW : 1.19 IR : 26.6



a | b
—+—
c

写真2 aに移植後28日目の摘出後腫瘍像 (7メモリ; 1mm)，b, cに組織像を示す。弱拡 (b)では低分化型腫瘍の構築をとる内膜腺癌で周囲へ膨張性の成長を示し，強拡 (c)では多数の核分裂像が見られ，腫瘍の増殖を示す (H-E染色，原版各2.5×4，2.5×40) (実験2)。

考 案

元来 SRC 法は1978年 Bogden et al. によりそれまでのヌードマウス皮下移植法に対して、ヌードマウスの腎皮膜下という血流豊富な部位を腫瘍生着の場として選び、高い評価可能率と11日間という比較的短期間での判定を可能とした新しい抗癌剤感受性試験として報告されたものである¹¹⁾。その後通常マウスを用いた SRC 6 日間法として確立されたこの方法¹²⁾は、薬剤投与法も効果の観察法も臨床投与例とほとんど同じであり、一般に理解しやすく、また多くの研究者から臨床奏効率との高い相関率が報告され、現在 in vivo 試験として最も有用なものと考えられている。その腫瘍組織生着率は非常に高く、Griffin et al.¹³⁾の1,000例の SRC 法を施行した報告によると、薬剤感受性の評価可能率は86%にのぼっている。しかし一般に行われている通常マウスの SRC 6 日間法では、常に宿主による免疫反応を念頭におく必要がある。藤田の報告³⁾(1987年)によると通常マウスの腎皮膜下に移植された腫瘍細胞は6日目にはほとんど残存しなかつたが、ヌードマウスを用いた場合には15日目でも順調な細胞増殖が観察されたという。そこで我々は純系のヌードマウスを使用し、MPA の長期間投与による実験を行い、短期間投与のそれと比較検討した。

ヒトの常用量投薬時に近似させた実験(1)及び実験(2)の系5から、1日あたりのマウスへの MPA 投与量25mg/kg/day では抗腫瘍効果は観察されなかつた。

MPA には他の抗癌化学療法剤とは異なり、それ自身毒性は少なく、LD50値は明記されていない。実際に今回のいずれの実験系においても投与期間中にはマウスの体重減少や下痢等はなく、また死亡例もなかつた。

MPA の総投与量を2,800mg/kg とあらかじめ等しく設定した系1と系2の結果からは、1日あたりの MPA の投与量は少なくとも長期間投与した方が抗腫瘍効果が高くなり、投与可能量における cytocidal な効果が優位な一般抗癌化学療法剤との違いが現われたと考えられた。

1日の MPA 投与量を100mg/kg と設定した実

験(2)の系2と系3を比較してみると、長期間投与の方がやはり抗腫瘍効果はすぐれ、特に7日目投与を終了した系4でみられるように短期間で薬剤投与を中止した場合、投与終了後の増殖抑制は得られず、かえつてリバウンド的に腫瘍増殖が高められる可能性が示唆された。このことは系3と系4を比較しても納得のいくものである。

MPA の総投与量を700mg/kg に設定した実験(2)の系3と系5の比較では短期間(7日間)投与で成績が良くなっている。また実験(1)でもこの量での有効性が否定されている。MPA は大量療法の必要性が強調されており⁶⁾、その dose-dependent な性格から、実験(2)の系2の条件で最大の IR が得られていることを考えあわせると、BALB/c ヌードマウスにおいて、MPA の投与量は Bioavailability の違いにより、MPA の至適投与量はヒトの臨床投与量とはかなり異なり、100mg/kg/day 近辺にあるのではないかと推察される。また長期間投与においても RW は1以下にはならず、また IR 値も一般的な抗癌化学療法剤で報告されている値と比較すると低く、やはり MPA 単独では残存腫瘍塊が存在している場合、癌の増殖を十分に抑えるには非力であることが推察された。

稿を終えるに際し、本研究に関し多大の御協力を賜りました雪印生物科学研究所吉浜 誠博士、並びに貴重な意見を賜りました名古屋大学近藤達平名誉教授に深謝いたします。

なお、本研究の一部は文部省科学研究費補助金(No. 02670752)によつてなされた。

文 献

1. 藤本次良：子宮内膜癌の薬剤感受性に関する研究—colony forming assay 法を用いて—。産婦の進歩, 38: 715, 1986.
2. 藤田宏行, 藤本次良, 山本 宝, 岡田弘二：子宮内膜癌細胞に対する progestogen の抗腫瘍効果発現機序に関する検討—clonogenic assay 法を用いて—。産婦の進歩, 42: 585, 1990.
3. 藤田昌英：In vivo 抗癌剤感受性テスト, ヌードマウス法と SRC 法を中心に。医学のあゆみ, 141: 528, 1987.
4. 近藤達平 編：抗癌剤感受性の決定。金原出版, 東京, 1985.
5. 松井義明, 澤田益臣, 奥平吉雄：ヌードマウス継

- 代移植ヒト子宮内膜腺癌と長期大量性ステロイドホルモン投与に対する反応性. 日産婦誌, 37: 1177, 1985.
6. 岡田弘二, 中田好則, 藤本次良, 藤田宏行: 子宮体癌治療法の現況と展望 B. ホルモン療法・化学療法のあり方. 産婦の実際, 37: 889, 1988.
 7. 岡田弘二, 中田好則, 藤本次良, 藤田宏行: MPA大量療法による子宮内膜癌の治療. 臨婦産, 42: 241, 1988.
 8. 岡田弘二, 中田好則, 山本 宝: 癌ホルモン療法の効果と問題点. 産と婦, 58: 409, 1991.
 9. 岡田弘二, 山本 宝: 進行体癌の治療. 癌と化療, 17: 1848, 1990.
 10. 高見澤裕吉: 化学療法の感受性試験. *Oncology & Chemotherapy*, 7: 108, 1991.
 11. *Bogden, A.E., Kelton, D.E., Cobb, W.R. and Esber, H.J.*: A rapid screening method for testing chemotherapeutic agent against human tumor Xenografts. In Symposium on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research, 231. Fischer, New York, 1978.
 12. *Bogden, A.E., Haskell, P.M., LePage, D.J., Kelton, D.E., Cobb, W.R. and Esber, H.J.*: Growth of human xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. *Expl. Cell Biol.*, 47: 281, 1980.
 13. *Griffin, T.W., Bogden, A.E., Reich, S.D., Antonelli, D., Hunter, R.E., Ward, A., Yu, D. T., Greene, H.L. and Constanza, M.E.*: Initial clinical trials of the subrenal cupsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. *Cancer*, 52: 2185, 1983.
 14. *Ovejera, A.A. and Houchns, D.P.*: Selection of potential anticancer agents using human tumor xenografts in nude mice. (Contact NO1-CM-67099-NCL) Battelle Columbus Laboratories, Ohio, 1 1978.

(No. 7068 平3・9・9受付)