

(B. 最近の知見)

## 2. 抗癌剤の薬剤感受性試験

千葉大学医学部  
産科婦人科教授  
関谷 宗英

座長：岩手医科大学  
産科婦人科教授  
西谷 巖

### はじめに

同じ臓器, 同じ組織型の癌患者に化学療法を行うと, 個々の患者間で有効性に著しい不均質性がみられる。また癌化学療法の経過中同一患者でも有効な抗癌剤が変化する。したがって, 患者一人一人に癌細胞の抗癌剤に対する薬剤感受性試験を繰り返し行って, もっとも有効な抗癌剤が随時選択できれば, 患者を無効な抗癌剤の副作用から解放できる。

すでに薬剤感受性試験が試みられてから30年が経過するが, 抗生物質に対するテスト感受性試験やホルモン反応性癌に対するホルモン受容体分析のように, 実地臨床でルーチンに応用できる抗癌剤の薬剤感受性試験は現在皆無と云ってよい。その理由として, 1)新鮮な癌組織が材料である, 2)多数の抗癌剤の中からもっとも有効な薬剤を選択する, 3)ほとんどの固形癌が薬剤抵抗性である, など癌化学療法固有の問題とともに, 1)結果が迅速, 手技が簡単, 定量的かつ客観的, 2)癌細胞のみの選択能力, 殺細胞効果の判定能力, 3)高い予知率, 4)安いコスト, などの多岐にわたる臨床応用の必要条件を満たさねばならないからである。

### 感受性癌と抵抗性癌

絨毛癌は化学療法のみで70%以上治癒し, 極めて抗癌剤に感受性の癌として興味ある癌であるが, その特徴は, 1)極めて血管に富んでいる, 2)均質な癌細胞から構成されている, 3)癌細胞の倍加時間が極めて短い, 4)半同種移植片的性格を持つ, などである<sup>1)</sup>。

抗癌剤抵抗性には患者, 癌塊レベルにおける見かけ上の耐性と癌細胞, 遺伝子レベルにおける真の耐性がある<sup>2)</sup>。見かけ上の耐性は癌細胞が抗癌剤に感受性であっても, 薬理動態や癌塊の環境(一般に癌塊の表層では血液と酸素が十分供給され, 細胞分裂サイクルにある癌細胞は活発に増殖し抗癌剤に通常感受性で, 中間層では低酸素状態の分裂できない癌細胞は抗癌剤に抵抗性であり, 中心部では癌細胞は自然に壊死に陥る)により殺細胞効果を発揮できない。In vitro における薬剤感受性試験の限界は生体(in vivo)における見かけ上の耐性により結果が修飾されることが第一の限界である。さらに同一癌塊でも異質の癌細胞の集団から構成されており, 癌の進行や化学療法により細胞集団が変化する。

真の耐性は癌細胞自身がもともと抗癌剤に感受性が無いか低い場合(内因性の耐性)と, 本来感受性の癌細胞が化学療法により耐性を獲得する場合(獲得性の耐性)がある。真の耐性のメカニズムとして薬剤の, 1)取り込み, 2)汲みだし, 3)活性化, 4)解毒, 5)標的分子, 6)生化学的バイパス, 7)アポトーシス, などが考えられ, 通常複数のメカニズムが関与している。一方, 多剤耐性は臨床でよく経験する事実で, ヒト多剤耐性遺伝子(MDR 1)による膜のP糖たんぱく発現が増強し, 薬剤の汲みだしが促進されるのが一因と考えられている。

## 従来の薬剤感受性試験

In vitro (培養)による方法と in vivo (移植)による方法とがある<sup>3)</sup>。癌細胞のヌードマウスや腎被膜下異種移植による in vivo の方法は、生体の影響と組織構成を反映し予知率も高い利点があるが、たとえばヌードマウス法では移植成功率が低く、生着しても初代の増殖は緩慢で、ヒトと異なり免疫不全状態にあり、薬物動態も異なる。また臨床応用には迅速に結果が得られず、動物も多数使うので労力とコストも高かつくので無理がある。したがって、生体内で活性化される抗癌剤 (masked compound) を除けば、in vitro の方法が薬剤感受性試験の条件を満たしている。

In vitro における判定法の指標には、培養癌細胞の形態の変化 (核形法など)、増殖の抑制、細胞代謝の阻害 (MTT 法など)、放射性同位元素を標識した核酸、たんぱく前駆物質取り込みの阻害 (チミジン取り込み法など)、軟寒天培地におけるクローン原性コロニーの形成阻害 (HTCA 法)、などが報告されており、それぞれ利点と欠点がある。形態、増殖、生体染色の方法では定量、客観性に、代謝、酵素活性あるいはアイソトープの方法では癌細胞の選択や殺細胞の判定に、クローン原性の方法では迅速と手技に短所がある。総じて癌塊の大部分を占めている非分裂細胞への効果判定が反映されないのが in vitro による方法の第二の限界である。

In vitro における薬剤感受性試験と臨床効果の一致率は、症例数はせいぜい100例前後の報告であるが、いずれの方法でも陰性適中度は90%前後と高く、陽性適中度は60%前後である。

## 最近試みられている in vitro の薬剤感受性試験

### 〔I. MTT 法と変法〕

酵素活性の阻害を指標とする方法で、MTT すなわち 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide は黄色テトラゾリウム塩で、生細胞中の活動性ミトコンドリア内膜に存在する呼吸鎖のユビキノンやチトクローム C がコハク酸 MTT 還元酵素を活性化し、コハク酸 MTT 還元酵素が MTT を開裂し紫色のホルマザンを生成する。このホルマザンの生成量は生細胞数と比例するので、DMSO などで溶解し一定波長下で比色定量する。変法として 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[ (phenylamino) carbo ] -2 H-tetrazolium hydroxide (XTT) 法がある。結果は迅速で手技は簡単であり、客観的に判定できる利点があるが、癌細胞の選択や生死の判定ができず、最近非分裂細胞におけるミトコンドリアの増加と活性の上昇による偽陰性が問題となっている<sup>4)</sup>。

### 〔II. SRB (sulforhodamine B) 法〕

たんぱく合成の阻害を指標とする新しく開発された方法で、主として新薬のスクリーニングに現在米国 NCI で用いられている<sup>5)~7)</sup>。三塩化酢酸で細胞を固定後色素 SRB で染色し、たんぱくに結合した色素を比色定量する方法で、生細胞数およびたんぱく量と正の相関がみられる<sup>5)</sup>。本法の利点は迅速、簡便、客観的で MTT 法の結果とよく一致する<sup>6)7)</sup>。

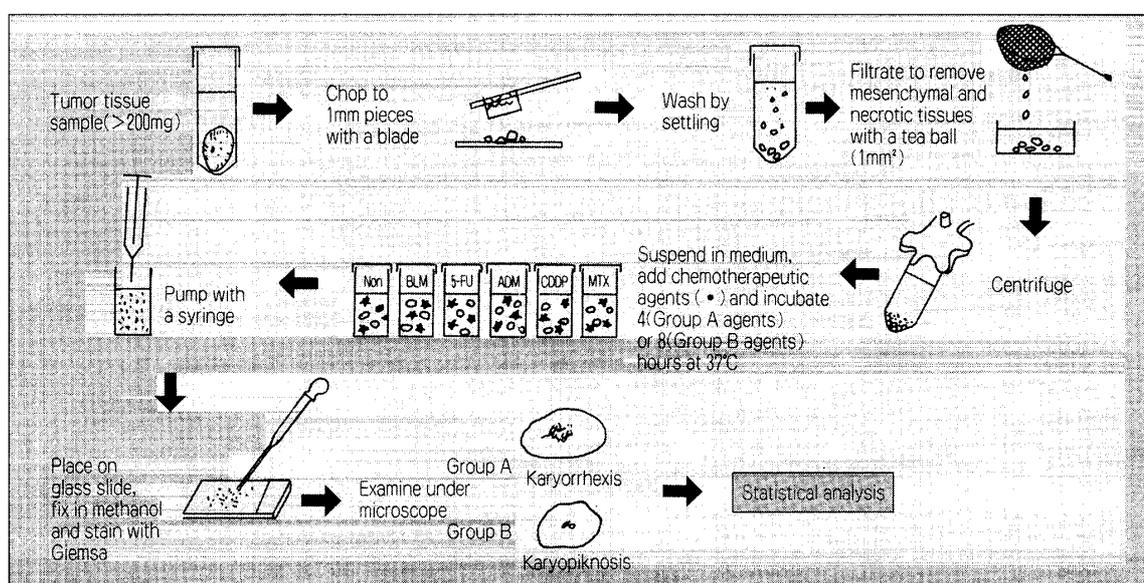
### 〔III. HTCA 法 (human tumor clonogenic assay) と変法〕

癌はそのサブポピュレーションである活発な細胞分裂サイクルを営む幹細胞 (stem cell) の自己再生により増殖し、幹細胞のみ軟寒天培地でコロニーを形成する。本法は近年もっとも普及した方法であり、2,300例の成績では陽性適中度は69%、陰性適中度は91%である<sup>8)</sup>。欠点は、1)成功率が低い(30%前後)、2)組織型で成功率がばらつく(卵巣

癌では50%前後), 3)手技が煩雑である(たとえば細胞塊が混じり偽陽性となるなど), 4)判定まで日数がかかる(少なくとも2週間), 5)分裂, 増殖していない細胞に対する効果は判定できない, などが挙げられる<sup>9)</sup>. 一方, コロニー形成以外の指標(チミジン取り込み, 軟寒天拡散チャムバー, 毛細管フローニングシステム, 細胞接着基質など)を用いた種々の変法も報告されている<sup>9)</sup>.

#### (Ⅳ. 著者らの開発した核形法(図1))

細胞核の形態変化(断裂崩壊, 濃縮など)を指標とした *in vitro* 薬剤感受性試験で<sup>9)~11)</sup>, 少量の材料(癌組織0.2g以上, 腹水あるいは胸水300ml以上)で24時間以内に20種以上の抗癌剤の結果が判る. 基礎実験で *in vitro-in vivo* (ヌードマウス法)の相関性を感度, 特異度で検討すると, 核形法(50%, 94%)の方がMTT法(25%, 100%)よりよい成績が得られた<sup>9)</sup>. 本法の臨床応用で現在まで80例以上の成功率はほぼ100%で, 陽性適中度は50%弱, 陰性適中度は90%以上である<sup>10)11)</sup>. 試験の各ステップおよび判定の自動化が今後改良すべき課題である.



(図1) 核形法の手技(文献11)

### 無作為試験

果たして *in vitro* 薬剤感受性試験の方が臨床医の経験による化学療法より奏効率が高いのであろうか?, Von Hoff et al.<sup>12)</sup>は癌患者133例を無作為(臨床医65例, 毛細管フローニング試験68例)に分け, 単剤で比較したところ, 奏効率は臨床医3%, 試験21%で有意に試験の成績がよいことを報告している.

### 終わりに

現在抗癌剤に対する薬剤感受性試験の臨床応用は実用化されていない. 個別化化学療法よりはむしろ新しく開発された抗癌剤のスクリーニング法として応用されている. しかしながら, 無作為試験の結果が示すように, 臨床医の経験よりは科学的裏付けのある薬剤感受性試験で選択された化学療法への期待は大きい. さらに従来の方法の改良と新しい方法の開発により, 近い将来ルーチンに個々の患者に薬剤感受性試験を行いたいと願うものである.

## 《参考文献》

- 1) 関谷宗英, 大崎達也, 高見沢裕吉. 絨毛癌の細胞生物学. 産婦人科 MOOK 38 絨毛性疾患 東京: 金原出版, 1987; 38-49
- 2) 関谷宗英. 抗癌剤耐性. 日産婦誌 1995; 47: 872-884
- 3) 関谷宗英, 高見沢裕吉. 制癌剤の感受性試験. 産婦人科 MOOK 28 卵巣腫瘍 東京: 金原出版, 1984; 212-225
- 4) Hanauske A-R. In vitro assays for antitumour activity: more pitfalls to come. Eur J Cancer 1993; 29 A: 1502-1503
- 5) Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren J T, Bocksch H, Kenney S, Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1107-1112
- 6) Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P, Scudiero DA, Monks A, Boyd MR. Comparison of in vitro anticancer-drug screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 1113-1118
- 7) Perez RP, Godwin AK, Handel LM, Hamilton TC. A comparison of clonogenic, microtetrazolium and sulforhodamine B assays for detection of cisplatin cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines. Eur J Cancer 1993; 29 A: 395-399
- 8) Von Hoff DD. He's not going to talk about in vitro predictive assays again, is he? J Natl Cancer Inst 1990; 82: 96-101
- 9) 飯島信博, 関谷宗英, 時田尚志, 高見沢裕吉. In vitro 抗癌剤感受性試験に関する基礎的研究—われわれの開発した核形法との比較—. 日産婦誌 1991; 43: 191-196
- 10) 飯島信博, 関谷宗英, 時田尚志, 大崎達也, 高見沢裕吉. 新しく開発した in vitro 抗癌剤感受性試験 (核形法) による卵巣癌の個別化化学療法成績. 日産婦誌 1991; 43: 1323-1328
- 11) Sekiya S, Iijima N, Oosaki T, Takamizawa H, Tokita H. A newly developed in vitro chemosensitivity test (nuclear damage assay): application to ovarian cancer. Gynecol Oncol 1991; 40: 138-143
- 12) Von Hoff DD, Sandbach JF, Clark GM, Turner JN, Forseth BF, Piccart MJ, Colombo N, Muggia FM. Selection of cancer chemotherapy for a patient by an in vitro assay versus a clinician. J Natl Cancer Inst 1990; 82: 110-116