Chemosensitivity Test for Human Bone and Soft Tissue Tumors by Embryonated Chick Assay

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8072

金沢大学十全医学会雑誌　第97巻　第5号　1032－1043（1988）

受精鶏卵漿尿膜法を用いた骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法の研究

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：野村　進教授）
杉　原　　信
（昭和63年10月31日受付）

骨軟部悪性腫瘍の治療で化学療法の果たす役割は大きく，個々の患者に最も適切な化学療法を選択できれば，治療成績に大いに貢献することは明らかである．今までも，個々の症例に対して有効な抗癌剤を選択すべく，数多くの *in vivo* および *in vitro* の抗癌剤感受性試験が試行されてきた．しかしそれらの既存の方法は，再現性，迅速性，簡便さ，費用，さらには治療効果の正確な予測などに関して問題がある．本研究は，それらの問題点を解決するような臨床応用可能な抗癌剤感受性試験法の確立を意図し，Murphy（1912年）の受精鶏卵漿尿膜上にヒト腫瘍の移植が可能であるという報告に注目し，それを応用した受精鶏卵漿尿膜法を検討した．骨軟部腫瘍領域で汎用されている各種抗癌剤を用いて，鶏卵漿尿膜上に移植した培養細胞（murine B16-F10 melanoma cell line，B16-F10）の生着を観察し，それに対する抗腫瘍効果から本法における適切な投与経路（卵黄内もしくは血管内）を検討した．その結果，投与経路としては血管内投与が適切な方法であることが明らかになった．また生体内で活性化され効力を発揮する潜在活性型薬剤（pro-drug）もそのままの形で投与し，効果判定できることが判明した．次いで臨床材料を用い，本法における多剤併用療法の効果について前向き研究（prospective study）および後向き研究（retrospective study）を行った．過去2年間に生検または手術で得られた31検体〔骨肉腫14検体（10症例），軟骨肉腫2検体（2症例），ユーイング肉腫1検体（1症例），神経肉腫4検体（3症例），悪性繊維性組織球腫3検体（3症例），脂肪肉腫2検体（2症例），類上皮肉腫2検体（1症例），横紋筋肉腫，平滑筋肉腫，滑膜肉腫各々1検体（1症例）〕を受精鶏卵漿尿膜に移植した．材料が汚染されていた場合と得られた材料が 0.5g 以下で極めて少なく単層培養系の培養が成功しなかった場合を除く，29検体が生着し，感受性試験が実施可能であった．そのうちの20検体〔骨肉腫12検体（8症例），軟骨肉腫1検体（1症例），神経肉腫3検体（2症例），悪性繊維性組織球腫2検体（2症例），横紋筋肉腫，脂肪肉腫各々1検体（1症例）〕では，臨床効果の検討が可能であった．この20検体について鶏卵漿尿膜法による感受性試験の結果と臨床効果の関連性を検討すると，真陽性率（true positive rate）が100％，真陰性率（true negative rate）が93％，全体的な予測率は95％と高い関連性が認められた（$p<0.01$）．以上，本研究により受精鶏卵漿尿膜を用いた抗癌剤感受性試験法は，骨軟部悪性腫瘍に対する多剤併用化学療法の臨床効果の予測に充分な期待が持てるものと考えられた．

Key words chemosensitivity test, chorioallantoic membrane, chick embryo, B16-F10 melanoma, bone and soft tissue tumor

Abbreviations: ACD, actinomycin D; ADM, adriamycin; ANOVA, analysis of variance; BLM, bleomycin; B16-F10, murine B16-F10 melanoma cell line; CAM, chorioallantoic membrane; CDDP, cis-platinum; CPA, cyclophosphamide; DMSO, dimethyl sulfoxide; DTIC, dimethyl triazeno imidazolecarboxamide; FBS, fetal bovine

骨軟部悪性腫瘍に対する治療手段として化学療法は不可欠となってきている．腫瘍が同一組織像，同一個体のものでも，原発巣と再発巣あるいは転移巣の違いによって，抗癌剤の感受性が異なることは多くの報告によっても明らかである[1)2)]．このように，癌細胞はそれぞれに個性があり，抗癌剤に対する反応も異なるから，個々の細胞に感受性のある抗癌剤を投与することが望ましい．一般的に化学療法のプロトコールは，従来の臨床成績をふまえ，経験的または文献的に有効と考えられるものを用いているが，結果的に感受性のない抗癌剤を投与された患者にとっては抗癌剤の副作用のみを被ることとなる．さらに，既に化学療法が施行されていて薬剤耐性が生じている場合，次の化学療法剤の選択に難渋する．とくに骨軟部悪性腫瘍領域においては強力かつ有効な化学療法の支援がその治療成績の向上に大きく貢献しているので，抗癌剤が有効であるのか無効であるのかを患者に投与する前に知ることができれば治療に大いに貢献することは明らかである．細菌に対する感受性試験が普遍化している現在，癌細胞に対しても感受性試験を確立しようとする志向は必然的であり，数多くの *in vitro* および *in vivo* 抗癌剤感受性試験の研究が今までも積み重ねられてきた．

現在，抗癌剤感受性試験法として human tumor clonogenic assay (HTCA)[3)]，ヌードマウス法[4)5)]，subrenal capsule assay (SRC)[6)]などの研究がなされている．しかしこれらの方法は，臨床の多剤併用療法の効果を単剤ごとの感受性に基づいて評価していたり，腫瘍の生着率が悪かったり，試験期間が長かったり，試験結果の評価法が定まっていないという問題点がある．とくに多剤併用療法の臨床効果を簡便で迅速かつ確実に反映する感受性試験法として，臨床応用されるまでに至ったものは未だない．

そこでこれらの問題点を解決すべく，成功率や信頼性が高くかつ迅速に判定でき，臨床応用が可能である簡便な抗癌剤感受性試験の開発が切望されている．そ

Table 1. Clinical characteristics of bone and soft tissue tumors

Number of specimens	Case	Name	Age / sex	Type of tumor / patho. grade	Site of primary tumor	Surgical procedure	Source of specimen	Chemotherapy protocol	Histological effect	Prognosis
1	1	S.Y.	20／f	Osteo.[a)]／1	humerus	wide	biopsy	T12	NC[k)]	alive, NED[m)]
2	2-1	J.M.	21／m	Osteo.／3	fibula	wide	biopsy	T12	NC	alive, NED
3	2-2						surgery	T12	NC	
4	3-1	A.N.	17／m	Osteo.／3	femur	wide	biopsy	T12	NC	alive
5	3-2						surgery	T12	NC	
6	4-1	K.H.	14／m	Osteo.／3	femur	wide	biopsy	T12	NC	alive, NED
7	4-2						biopsy	T12	NC	
8	4-3						surgery	T12	NC	
9	5	S.K.	12／m	Osteo.／3	tibia	wide	biopsy	AP	NC	alive, NED
10	6	K.S.	19／f	Osteo.／3	femur	wide	biopsy	AP	NC	alive
11	7	M.S.	12／f	Osteo.／3	tibia	wide	surgery	AP	NC	died
12	8	K.T.	20／m	Osteo.／3	fibula	wide	surgery	BCD	NC	died
13	9	Y.M.	14／f	Osteo.／3	femur	wide	biopsy	T12	—	alive, NED
14	10	A.I.	40／m	Osteo.／3	ilium	marginal	surgery	ADM	—	died
15	11	H.K.	2／f	Chondro.[b)]／3	tibia	amputation	biopsy	T11	PR[l)]	alive, NED
16	12	S.K.	70／f	Chondro.／3	sacrum	marginal	surgery	—	—	died
17	13	Z.S.	17／m	Ewing.[c)]／3	ilium	wide	surgery	T11	—	alive
18	14	H.K.	19／f	Neuro.[d)]／3	trunk	wide	biopsy	CYVADIC	PR	alive, NED
19	15-1	A.H.	54／m	Neuro.／3	thigh	marginal	biopsy	CAP	PR	alive
20	15-2						biopsy	CYVADIC	PR	
21	16	S.M.	71／f	Neuro.／3	thigh	marginal	surgery	—	—	alive
22	17	S.S.	56／m	M.F.H.[e)]／3	thigh	wide	biopsy	CAP	PR	alive, NED
23	18	T.S.	48／f	M.F.H.／3	thigh	wide	biopsy	CAP	PR	alive, NED
24	19	B.Y.	65／m	M.F.H.／3	shoulder	marginal	biopsy	ADM	—	died
25	20	Y.I.	42／m	Lipo.[f)]／3	trunk	wide	biopsy	CYVADIC	PR	alive, NED
26	21	J.T.	41／f	Lipo.／3	thigh	wide	surgery	CYVADIC	—	alive
27	22-1	K.O.	43／m	Epithe.[g)]／3	thigh	marginal	surgery	—	—	alive
28	22-2						surgery	—	—	
29	23	T.M.	39／m	Rhabdo.[h)]／3	trunk	marginal	biopsy	VAC	NC	alive
30	24	S.T.	65／m	Leio.[i)]／3	neck	marginal	surgery	—	—	alive
31	25	K.N.	60／f	Synov.[j)]／3	thigh	marginal	surgery	—	—	alive

a) Osteogenic sarcoma, b) Chondrosarcoma, c) Ewing's sarcoma, d) Neurogenic sarcoma, e) Malignant fibrous histiocytoma, f) Liposarcoma, g) Epithelioid sarcoma, h) Rhabdomyosarcoma, i) Leiomyosarcoma, j) Synovial sarcoma, k) no change, l) partial response, m) no evidence of disease.

serum ; HTCA, human tumor clonogenic assay ; MTX, methotrexate ; PS, penicillin-streptomycin ; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640 ; SRC, subrenal capsule assay ; VCR, vincristine.

こで著者は受精鶏卵漿尿膜にヒト腫瘍が移植可能であるという Murphy[7]の報告に注目してその応用を試みた．即ち，臨床上多用されている多剤併用化学療法の効果を予測すべく，受精鶏卵漿尿膜を用いる方法を骨軟部悪性腫瘍の抗癌剤感受性試験として確立することを意図し，検討を行った．

材料および方法

I．材　料

実験に使用した材料は，培養細胞として，鑑別が容易で増殖が早いマウス悪性黒色腫由来細胞株（murine B16-F10 melanoma cell line, B16-F10)[8]を用いた．B16-F10 細胞は（財）癌研究会癌化学療法センター基礎部鶴尾隆部長より恵与された．臨床材料は過去2年間に骨軟部悪性腫瘍の原発巣，再発巣または転移巣に対し生検または手術を行って得られた31検体（25症例）を用いた（表1）．その内訳は，骨原発性腫瘍では骨肉腫14検体（10症例），軟骨肉腫2検体（2症例），ユーイング肉腫1検体（1症例）であり，軟部腫瘍では神経肉腫4検体（3症例），悪性繊維性組織球腫3検体（3症例），脂肪肉腫2検体（2症例），類上皮肉腫2検体（1症例），横紋筋肉腫，平滑筋肉腫，滑膜肉腫各々1検体（1症例）であった．各腫瘍の組織学的悪性度，治療法，予後などについては表1に示した．これらの臨床材料は採取後直ちに感受性試験を行うか，または凍結保存した．凍結保存する場合は，組織培養液〔(Roswell Park Memorial Institute Media-1640, RPMI-1640)＋(penicillin-streptomycin, PS)＋(fetal bovine serum, FBS), Gibco, Grand Island, New York〕に，ジメチルスルフォキシド（dimethyl sulfoxide, DMSO）（Sigma, St. Louis, Missouri）を10%加えて作成した凍結保存液中に材料を小指頭大にして浸し，−80°Cで保存した．しかし得られた材料が 0.5g 以下の極めて少ない場合は一旦単層培養系に移し細胞が十分増えてから移植した．組織培養液（RPMI-1640＋PS＋FBS）は，培地 RPMI-1640 10.4g を蒸留水 850ml に溶解し，炭酸水素ナトリウム 1.2g を加え濾過滅菌した溶液に，ペニシリン 10,000U/ml とストレプトマイシン 10,000 μg/ml を含むペニシリン—ストレプトマイシン溶液（PS, Gibco）10ml と，56°Cで30分間加温し非働化した牛胎児血清（FBS, Gibco）150ml を加えて作成した．

II．受精鶏卵漿尿膜への腫瘍の移植

受精鶏卵（プリマスロック×ホワイトレグホン）は後藤孵卵場（岐阜）より購入後，加湿した孵卵器中37°Cで孵卵した．孵卵11日目の鶏卵をキャンドリング（candling）し，漿尿膜上の血管の発達した所に回転式のヤスリを用いて卵殻に約1cm 四方の傷を付け，ピンセットで卵殻を除去した．卵殻膜直下にある漿尿膜に傷を付けないように注意して，露出した卵殻膜に小さな傷を付けた．あらかじめ気室中央の卵殻に穴を開けておき，その小孔より気室内の空気を弱く吸引することで卵殻膜と漿尿膜を剝離し，卵殻膜を除去して人工気室を作った．この露出した漿尿膜上の血管の発達したところに腫瘍細胞を移植した．この状態での受精鶏卵の模式図を図1に示した．新鮮材料の場合は直ちに，凍結保存材料の場合は37°Cで解凍後，鋏で細切してペースト状にし，組織培養液（RPMI-1640＋PS＋FBS）で2回洗浄後，50μl ずつ漿尿膜上に腫瘍を移植した．一方，培養細胞の場合は移植位置の保持と細胞の拡散を防ぐ目的で直径8mm のテフロンリングを漿尿膜上に置き，一定の細胞数を 20μl の細胞浮遊液としてリングのなかに移植した．このリングは移植後3日目に漿尿膜上から除去した．移植後3日目に腫瘍の周囲に血管新生が起きていることで腫瘍の生着を確認し，抗癌剤投与群と対照群で腫瘍の大きさが均等になるように各群に鶏卵を振り分けた．

III．抗癌剤の投与手技

孵卵11日目の鶏卵漿尿膜上へ腫瘍移植後3日目に腫瘍血管新生を確認し，抗癌剤を投与した．投与方法は B16-F10 細胞では卵黄内投与と血管内投与を施行し，その結果に基づき臨床材料では血管内投与を行った．卵黄内投与の場合は人工気室より卵黄嚢を直視し，23ゲージ針の付いた注射器を用いて鶏卵胎児を傷付けないように注意して，0.1ml の抗癌剤を卵黄内に投与した．血管内投与の場合は受精卵をキャンドリングし，血管の位置を定め，約5mm×10mm の長方形の傷を付け，卵殻のみを除去して卵殻膜を露出した．露出し

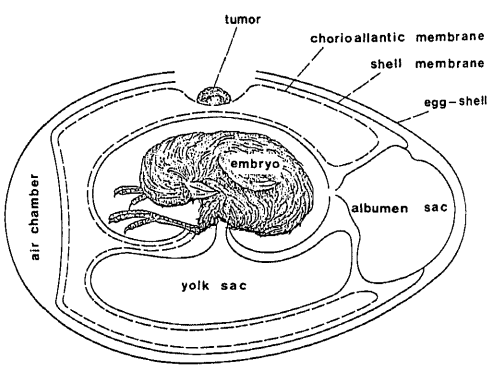

Fig. 1. Illustration of the fertilized egg.

た卵殻膜に流動パラフィン（Merck，Darmstadt）を塗布して血管を見やすくし，30ゲージ針の付いた注射器を用いて 0.1ml の抗癌剤を漿尿膜上の血管内に投与した．多剤で投与する場合は抗癌剤の混合後直ちに投与し，投与総量が 0.1ml となるように濃度を調整した．対照群の鶏卵には，生理食塩水 0.1ml を同様に投与した．

IV．抗癌剤と多剤併用療法の組み合わせと投与量

骨軟部悪性腫瘍領域で用いられているプロトコールに従って投与薬剤を決定した．抗癌剤は，アドリアマ

Table 2. Applied doses in therapeutic treatment

Protocol	Combination	Clinical dose (mg/m²)	Dose for embryonated chick assay (μg/egg)
T11	ADM	30.0×2	10.00
	CPA	600.0	100.00
	MTX	18.0×2	0.10
	VCR	1.5	0.26
T12	ACD	0.6	0.10
	BLM	20.0	3.40
	CPA	600.0	100.00
	MTX	12000.0	0.10
	VCR	1.5	0.26
AP	ADM	90.0	15.00
	CDDP	100.0	17.00
BCD	BLM	20.0	3.40
	CPA	600.0	100.00
	ACD	0.6	0.10
CAP	CPA	350.0	60.00
	ADM	35.0	6.00
	CDDP	35.0	6.00
CYVADIC	CPA	500.0	85.00
	VCR	1.5	0.26
	ADM	50.0	8.50
	DTIC	200.0×5	170.00
VAC	VCR	1.5	0.26
	ACD	0.3×3	0.15
	CPA	600.0	100.00

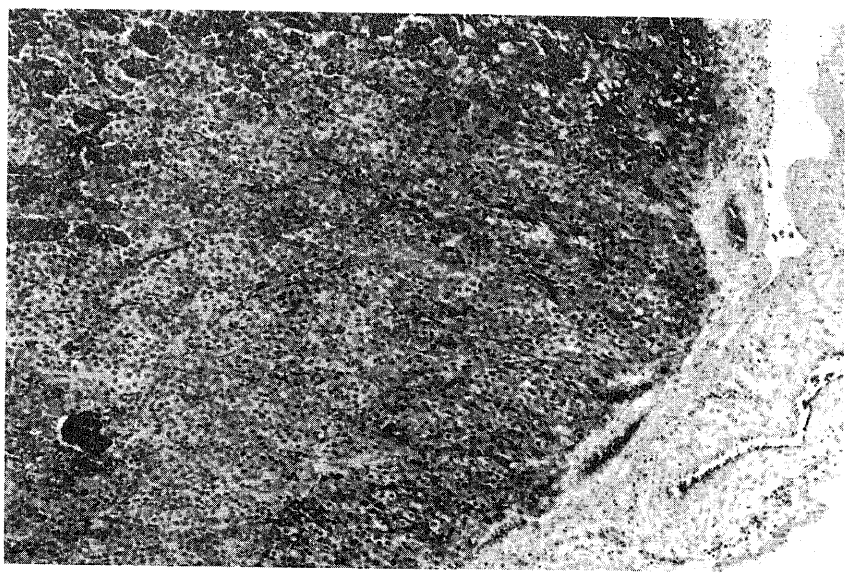

Fig. 2. murine B16-F10 melanoma cells (2×10^4 cells) were implanted onto the chorioallantoic membrane (CAM) of 11-day-old chick embryo. A grown tumor on CAM was observed seven days later. hematoxylin--eosin stain, ×64.

イシン（adriamycin, ADM），シスプラチン（cisplatinum, CDDP），サイクロフォスファミド（cyclophosphamide, CPA），ダカルバジン（dimethyl triazeno imidazolecarboxamide, DTIC），メソトレキセート（methotrexate, MTX），ビンクリスチン（vincristine, VCR）を用いた．多剤併用療法としては，Rosen のT11[9]，T12[10]プロトコールや，VAC[11]，AP[12]，CAP[13]，CYVADIC[14]を参考にした．併用療法の組み合わせと投与量は，表2に示した．併用療法での単剤ごとの投与量は，投与日の鶏卵胎児平均体重に換算した量とした．換算式は以下に示した．

$$X = Y \times 0.17$$

X，抗癌剤の試験投与量（μg/egg）；Y，抗癌剤の臨床投与量（mg/m²）；0.17，換算係数（身長160cm，体重60kg の成人のヒト体表面積は 1.6m² で，これをヒトのモデルとして仮想し，孵卵14日目の鶏卵胎児平均体重が 6.5g であることより換算係数を算出した．）

これにより単剤ごとの投与量を決めた．但し，MTX は鶏卵胎児に対する毒性が強いため，その投与

Table 3. Effects of drugs on growth of B16-F10 melanoma applied onto CAM by yolk sac injection[a)]

Drug	Dose (μg/egg)	Tumor weight (mean±SD, mg) treated/control	Inhibition ratio (%)
CPA	40.0	72.8± 44.0/157.4±86.0[b)]	53.7
	200.0	44.7± 18.7/157.4±86.0[b)]	71.6
	1000.0	19.3± 8.1/157.4±86.0[b)]	87.7
DTIC	500.0	109.6± 35.9/209.2±45.9[c)]	47.6
MTX	10.0	71.2± 85.6/110.4±92.4	35.5
ADM	400.0	215.0±114.1/190.5±87.4	−13.2
VCR	10.0	86.5± 31.3/110.3±32.3	21.6
	50.0	85.9± 85.0/110.4±92.4	22.2
CDDP	200.0	131.5± 80.8/110.3±32.2	−19.3

a) B16-F10 melanoma cells (2×10^4) were applied onto the CAM of 11-day-old chick embryos. Drugs were injected into the yolk sack 3 days after tumor inoculation. Four days later, the tumors were excised from the CAM and weighed.
b) $P<0.01$ compared with control by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.
c) $P<0.05$ compared with control by Student's t-test.

Table 4. Effects of drugs on growth of B16-F10 melanoma applied onto CAM by injection into the blood vessel in CAM[a)]

Drug	Dose (μg/egg)	Tumor weight (mean±SD, mg) treated/control	Inhibition ratio (%)
CPA	40.0	63.8± 23.7/109.7± 64.5[b)]	41.8
	200.0	59.8± 54.0/199.9± 91.4[c)]	70.1
	1000.0	24.5± 14.0/196.8±111.1[c)]	87.6
DTIC	250.0	129.8± 59.6/148.0± 45.2	12.3
	500.0	83.1± 22.6/148.0± 45.2[d)]	43.9
MTX	0.5	138.7±114.6/136.2± 51.8	− 1.8
	2.5	Toxic	
ADM	40.0	59.8± 47.0/157.4± 86.0[c)]	62.0
	100.0	Toxic	
VCR	0.5	113.6±107.5/136.2± 51.8	16.6
	1.0	Toxic	
CDDP	10.0	140.5± 77.0/177.4± 96.4	20.8
	30.0	41.4± 24.7/177.4± 96.4[e)]	76.7
	100.0	Toxic	

a) B16-F10 melanoma cells (2×10^4) were applied onto the CAM of 11-day-old chick embryos. Drugs were injected into the blood vessel in CAM 3 days after tumor inoculation. Four days later, the tumors were excised from the CAM and weighed.
b) $P<0.05$ compared with control by Student's t-test.
c) $P<0.01$ compared with control by Student's t-test.
d) $P<0.05$ compared with control by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.
e) $P<0.01$ compared with control by ANOVA followed by Scheffe's multiple comparison.

量を一律に 0.1μg/egg とした．

V．抗腫瘍効果の評価と判定法

1．抗癌剤感受性試験の判定

抗癌剤投与後4日目即ち腫瘍移植後7日目に漿尿膜上で生育した腫瘍を切り出し，その重量を測定した．対照群の平均腫瘍重量と比較して，腫瘍増殖阻止率を算出し評価した．腫瘍増殖阻止率の計算式を以下に示した．

$$\text{腫瘍増殖阻止率（\%）} = \left(1 - \frac{W_T}{W_C}\right) \times 100$$

W_C，対照群の平均腫瘍重量（mg）；W_T，抗癌剤投与群の平均腫瘍重量（mg）

腫瘍増殖阻止率が30%以上の場合，または腫瘍増殖阻止率が30%未満であっても化学療法群の腫瘍平均重量が対照群に対して，統計学的検定で5%以下の危険率で有意となった場合は，その化学療法に対して腫瘍が『感受性あり』と判定し，それ以外の場合は『感受性なし』と判定した．

2．臨床効果の判定

化学療法の臨床効果は，手術時摘出標本の最大割面における腫瘍壊死率で評価した．壊死率が90%以上の場合は臨床で実施された化学療法は『有効』であると判定し，90%未満の場合は『無効』であると判定した[15]．抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果との関連性について統計学的検定を行った．

VI．統計学的検定法

二群または多群の平均値の差の検定には，Student's t-test または一元配置分散分析後 Scheffe の多重比較を用いた．抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果との関連性の検定には，Fisher の直接確率計算法を用いた．$p<0.05$を有意とした．

成　　績

I．マウス悪性黒色腫培養細胞株 B16-F10 の鶏卵漿尿膜上での生着

図2は孵卵11日目に漿尿膜上へ B16-F10 細胞を 2×10^4個移植して，18日目に摘出した腫瘍の組織標本である．漿尿膜組織内に，胞体にメラニン色素を有する未分化な腫瘍細胞の増殖を認めた．

II．マウス悪性黒色腫培養細胞株 B16-F10 に対する各種抗癌剤の単剤治療

孵卵11日目に漿尿膜上へ B16-F10 細胞を 2×10^4個移植し，抗癌剤は CPA，DTIC，MTX，ADM，VCR，CDDP を用い，それぞれの効果を検討した．卵黄内投与では，CPA は高い抗腫瘍効果を，DTIC は中程度の効果を，MTX と VCR は低い効果を示した．しかし ADM と CDDP はこの投与量では抗腫瘍効果は認められなかった（表3）．血管内投与では，CPA，

Table 5. Embryonated chick assay and clinical response in bone and soft tissue tumors

Pt. Daig.		Assay (inhibition ratio %)							Clinical		Correlation
		T12	AP	BCD	CAP	T11	CYVADIC	VAC	Therapy	Effect	
〔Bone tumor〕											
S.Y.	OS	2.2		− 5.5					T12	NC	TN
J.M. 1[a]	OS	13.6			34.9				T12	NC	TN
J.M. 2	OS	− 4.6	−10.9						T12	NC	TN
A.N. 1	OS	− 0.2	−68.8		−76.8				T12	NC	TN
A.N. 2[a]	OS	6.4							T12	NC	TN
K.H. 1	OS	−88.1							T12	NC	TN
K.H. 2[a]	OS	0.0							T12	NC	TN
K.H. 3	OS	−51.5							T12	NC	TN
S.K.	OS	−25.6	−38.8						AP	NC	TN
K.S.	OS		−12.2		−14.4				AP	NC	TN
M.S.	OS		− 9.8		17.7				AP	NC	TN
K.T.	OS			− 2.7					BCD	NC	TN
H.K.	CS					49.0			T11	PR	TP
〔Soft tissue tumor〕											
H.K.	NS				4.3		27.6[b]		CYVADIC	PR	TP
A.H. 1	NS				30.7				CAP	PR	TP
A.H. 2	NS				9.7		31.3		CYVADIC	PR	TP
S.S.	MFH				11.9				CAP	PR	FN
T.S.	MFH				38.9		16.8		CAP	PR	TP
T.M.	RS						−11.0	− 8.0	VAC	NC	TN
Y.I.	LS		18.3				39.7		CYVADIC	PR	TP

OS, Osteogenic sarcoma; CS, Chondrosarcoma; NS, Nurogenic sarcoma; MFH, Malignant fibrous histiocytoma; RS, Rhabdomyosarcoma; LS, Liposarcoma; PR, partial response; NC, no change; TP, true positive; TN, true negative; FN, false negative.

a) Cultured material.

b) $P<0.05$ compared with control by Student's t-test.

ADM，CDDP は高い抗腫瘍効果を，DTIC は中程度の効果を，VCR は低い効果を示した．MTX では毒性が強く抗腫瘍効果は得られなかった（表4）．

全般的に血管内投与の方が卵黄内投与に比べ少ない投与量で高い抗腫瘍効果を示した．また卵黄内投与で鶏卵胎児に致死的毒性を示さなかった投与量でも，血管内投与では MTX，ADM，VCR，CDDP が毒性を示した．しかし致死的毒性が発現された投与量は MTX 以外は臨床相当量を遙かに上回る投与量であった．また卵黄内投与でも血管内投与でも潜在活性型薬剤である CPA と DTIC も抗腫瘍活性を示した（表3，表4）．

Ⅲ．臨床材料を用いた抗癌剤感受性試験

1．抗癌剤感受性試験

生検または手術により得られた31検体（25症例）に受精鶏卵漿尿膜法を行い，29検体（23症例）94％に抗癌剤感受性判定が可能であった．抗癌剤感受性試験が不成功で感受性判定が不能であった2検体（2症例）は，骨肉腫の症例10とユーイング肉腫の症例13のみであった（表1）．この原因は症例10では，材料が汚染されていたためであり，症例13では得られた材料が 0.5 g 以下と少なくしかも単層培養系での培養にも成功しなかったためであった．これ以外の全例に感受性試験が行えた．

2．抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果との関連性

感受性判定可能であったもののうちで，臨床効果との関連性について検討可能であったものは20検体（15症例）であった（表5）．その内訳は，骨腫瘍が13検体（9症例）で軟部腫瘍は7検体（6症例）であった．骨腫瘍では，後向き研究が多く（10検体，77％），また既に化学療法を受けていた検体も多かった（9検体，69％）．その結果，臨床効果も有効であったのは1検体（14％）のみであった．一方，軟部腫瘍では前向き研究が多く（5検体，72％），また既に化学療法を受けていた検体は1検体（14％）のみであった．その結果，臨床効果も有効であったものが極めて多かった（6検体，86％）（表5）．

骨腫瘍，軟部腫瘍を通じ，初回化学療法について感受性試験を行えたものは10検体（10症例）で，臨床効果が『有効』であったものは5検体（50％）であった．このうち，前向き研究として感受性試験を行い，その結果から『感受性あり』と判定された多剤併用化学療法を実施できたものは，4検体（4症例）あり，臨床効果は全例『有効』であった．次に，既に化学療法が行われていた検体は10検体（7症例）あり，このうち前向き研究として感受性試験が行えたものは2検体（2症例，20％）あった．その結果から『感受性あり』と判定された多剤併用化学療法を実施できたのは1検体あった．その臨床効果は『有効』であり，しかも既に化学療法が行われていた検体のうちで，唯一臨床効果が『有効』となった症例である．

以上をまとめると，20検体のうち本法にて『感受性あり』と判定され，臨床的にも『有効』と判定されたもの（S／S，true positive）は6検体で，逆に本法にて『感受性なし』と判定され，臨床的にも『無効』と判定されたもの（R／R，true negative）は13検体であった．また本法にて『感受性なし』と判定されたが，臨床的には『有効』と判定されたもの（R／S，false negative）は1検体で，さらに本法にて『感受性あり』と判定されたが，臨床的には『無効』と判定されたもの（S／R，false positive）は一検体もなかった．以上より本法の臨床的な感受性に対する予測率（true positive rate）は100％で，耐性に対する予測率（true negative rate）は93％であった．また全体としての予測率は95％と高いものであり，Fisher の直接確率計算法を用いた検定にても有意な臨床効果の予言性

Table 6. Relationship between the results of embryonated chick assay and the response of clinical chemotherapy[a)]

	Embryonated chick assay／Clinical effect[b)]			
Result	S[c)]／S	S／R[d)]	R／S	R／R
Number of specimens	6	0	1	13

a) P<0.01 by Fisher's exact probability test.
b) (S／S)／[(S／S)＋(S／R)]＝True positive rate 6／6 (100%)
(R／R)／[(R／R)＋(R／S)]＝True negative rate 13／14 (93%)
[(S／S)＋(R／R)]／(The whole sum)＝Overall correlation rate 19／20 (95%)
c) S, sensitive.
d) R, resistant.

が認められた（表6）.

考　　察

近年数多くの抗癌剤が開発され，臨床の場で常用可能な抗癌剤の種類は30を越える．各種抗癌剤の効果は，腫瘍の発生臓器により一定の傾向を示すことがこれまでの第二相試験を中心とする臨床集計から知られている．しかし効果の予測可能な腫瘍の組織型は限定されているとともに，大多数の腫瘍に対する抗癌剤および併用化学療法の有効率は低い[16]．一方，臨床医の経験に基づいて薬剤を選択した治療では奏効率が14%であったが，実際に抗癌剤感受性試験の結果に従って薬剤を選択した場合は有効率が25%まで高まったという報告もある[17]．従って有効および無効な抗癌剤や併用療法を投与前に明確にすることは臨床上極めて重要である．この目的のために，HTCA，ヌードマウスへのヒト癌の移植，あるいは SRC などが抗癌剤感受性試験法として研究されてきている．しかし抗生物質の細菌に対する感受性試験のように個々の患者に有効な薬剤選択のための実用的な検査として，広く臨床応用されるまでには至っていない[16]．

それぞれの方法の問題点を概観すると，Hamburger と Salmon[3] が開発した二層軟寒天培地による HTCA は，95%以上の割合で無効な抗癌剤を選択できるなど，従来の抗癌剤感受性試験の中では精度の高い方法である．しかしコロニー形成率が低く多量の細胞を必要とすること，抗癌剤の添加条件の問題，判定法，潜在活性型薬剤の取り扱い方などの問題がある．Tomita ら[18]の開発した改良法の cultivated HTCA はその成功率を，肉腫系で20%から70%まで向上させたが，コロニーを形成する細胞は分裂の盛んな細胞のみで，分裂をしない固形癌細胞を代表していないことと，同一腫瘍組織内に異質性（heterogeneity）をもつ細胞集団があることから，真の感受性を反映しないであろうという HTCA の根本的な問題は未解決である．

ヌードマウスへのヒト癌の移植は，初代移植では10日前後で腫瘤を形成するものから，3カ月以上経過してから増殖をし始めるものまでばらつきがある．またヒト腫瘍のヌードマウスへの初代移植成功率が30～40%と低く，かつ生着しても初代における増殖は一般に緩慢なので，患者が生存中にその癌の抗癌剤感受性を検討することは不可能に近く，実用的な感受性試験法とは言えない[19][20]．

In vivo 感受性試験は前述のヌードマウスの皮下移植法が一般的であるが，生着率が低いことや判定まで日数がかかりすぎる欠点がある．Bogden ら[6]はこれらの欠点を補う目的で血流が豊富で腫瘍移植片の観察が容易な SRC を開発した．本法の評価可能率は，90%前後の高率であり，臨床効果との関連性も高く，現在注目されている試験法である．しかし移植する腫瘍片の大きさや組織特性を一定に保てるのかという疑問や，評価判定基準が不明確であるという問題があり，さらに血行の豊富な腎皮膜下での移植は，宿主免疫の関与や術者の高度かつ安定した技術が要求される[16][21]などの欠点が指摘されている．

臨床における抗癌剤感受性試験の目的は，実施しようとしている化学療法が個々の患者に『有効』なのかどうかを，的確にかつ速やかに予測することであり，しかもその方法が臨床応用されるには比較的簡便な技術で安価に行えることが望まれる．これらの条件を充分に満たす感受性試験法は未だ確立されてはいない．

佐々木はヒト腫瘍を受精鶏卵の漿尿膜へ移植する方法[7]に注目し，これを癌の悪性度の判定法や抗癌剤のスクリーニング法，抗癌剤感受性試験法などに応用できる可能性について報告した[16]．そこで著者は，この新しい方法に着目し，この方法を骨軟部悪性腫瘍領域における従来の方法の欠点を補える抗癌剤感受性試験法として確立すべく検討を行った．

受精鶏卵は古くから生物学や医学の分野で，主にウイルスやリケッチアやバクテリアの移植に使われてきた．しかし悪性腫瘍の宿主として果たしてきた役割はヌードマウスに比べ小さなものであった．ヒト腫瘍が漿尿膜上に移植された場合は，ヌードマウスに移植された場合[20]と同様に鶏卵という代替の宿主にあっても本来の宿主での腫瘍形態を保っている．たとえば扁平上皮癌ではケラチンの蜂巣が観察され，腺癌では分泌物に満たされた腺組織が観察されたと報告されている[22]．従って組織学的形態だけでなく，機能の面，とくに抗癌剤に対する感受性の面でも，もとのヒト腫瘍の性質を保っていると考えられる．

孵卵開始後まだ鶏卵胎児が幼弱な時には，移植操作によって鶏卵胎児が死亡しやすく，移植腫瘍の生存に適した脈管や間質も未発達であるために，孵卵8日目以前に漿尿膜上に腫瘍を移植しても生着しないものが多い[22]．また受精鶏卵は免疫学的に未発達な状態にあり，わずかに免疫学的な特徴を示すものとしては母体由来の7Sグロブリン[23]と，孵卵15日目より外来の細胞を認知できるリンパ球が出現するに過ぎない[22]．孵卵17日目から18日目においては腫瘍組織へのリンパ球の浸潤はあるものの，健常な状態で腫瘍は摘出できる[22]．これらの理由から，著者は鶏卵漿尿膜を用いる

感受性試験のスケジュールとして孵卵11日目の鶏卵漿尿膜上に腫瘍を移植し，その一週間後の18日目に腫瘍を摘出する方法を設定した．このスケジュールで，漿尿膜上に培養細胞を移植し，生着を確認した（図2）．また抗癌剤投与の時期としては薬剤の腫瘍組織への移行を考慮に入れて，腫瘍移植後3日目の腫瘍血管が充分に発達した時期，つまり孵卵14日目を選んだ．

次に，骨軟部悪性腫瘍領域で汎用されている各種抗癌剤を用いて，抗癌剤の投与経路について検討した．*In vivo* での腫瘍移植には *in vitro* の実験に比べ大量の腫瘍細胞が必要であるため，鑑別が容易で増殖能の高い B16-F10 細胞を用い，卵黄内投与と血管内投与での投与経路による抗腫瘍効果について比較検討した（表3，4）．

全般的に，血管内投与の方が卵黄内投与に比べ低投与量で高い抗腫瘍効果を示した．とくに生体内の組織もしくは高分子性のものと結合すると言われている ADM や CDDP は卵黄内投与では効果を示さず，血管内投与で初めて抗腫瘍効果を示した．このことは ADM や CDDP が卵黄内の組織または物質と結合することにより，腫瘍の部位に到達できないことや活性が低下することなどによるものと考えられた．また生体内で活性化されて薬効を示すいわゆる潜在活性型薬剤である CPA と DTIC も抗腫瘍活性を示し，そのままの形で本法で効果判定できることが確認された．

卵黄内投与で毒性を示さなかった投与量でも，血管内投与では MTX，ADM，VCR，CDDP が毒性を示した．しかし MTX 以外は臨床相当量で毒性を示すものはなかった．従って，鶏卵漿尿膜法における抗癌剤の投与には血管内投与が適切であり，広範な薬剤が臨床相当量で投与できることが示唆された．即ち，本法は臨床に近い投与経路と薬剤量が使用でき，さらにヌードマウスを用いる方法に比べ一週間という短期間に行なえる長所があり，有用な *in vivo* の実験系であると考えられた．

臨床における抗癌剤単独使用の有効率はおよそ20～30%程度のものが多いため[24]，抗癌スペクトラムの拡大や相乗効果さらには副作用の分散を目的として，実際の臨床では作用機序の異なった抗癌剤を組み合わせる多剤併用化学療法が一般に行われている．従って，臨床材料の場合には多剤を用いた抗癌剤感受性試験の鶏卵法における結果と臨床効果について後向き研究，または前向き研究を行った．

佐々木は[16]，受精鶏卵の漿尿膜に腫瘍を移植したところ，癌腫肉腫を問わず全例生着したと報告している．著者の場合も，材料が汚染されている場合や，得られた材料が 0.5g 以下と少なく単層培養系での培養にも成功しなかった場合以外は，全例生着し感受性試験が実施できた．

感受性判定可能であったもののうちで，臨床効果との関連性が検討可能であったものは20検体（15症例）であり，骨腫瘍が13検体（9症例）で軟部腫瘍は7検体（6症例）であった．近年骨腫瘍では，Rosen のプロトコールが目覚ましい成果をあげていて，本研究開始時期にこのプロトコールを採用し始めていたためと，再発症例が多く取り扱われたために軟部腫瘍に比べて後向き研究が多く（77%），また既に化学療法を受けていた検体も多かった（69%）．その結果，臨床効果も有効であったのは1検体（14%）のみであった．一方，軟部腫瘍では術前化学療法の重要性が認識し始められた頃であり，しかも軟部腫瘍は多様な上，決定的なプロトコールがなかったため前向き研究が多く（72%），また既に化学療法を受けていた検体は1検体（14%）のみであった．その結果，臨床効果も有効であったものが極めて多かった（86%）．

骨腫瘍，軟部腫瘍を通じ，初回化学療法について，その臨床効果が『有効』であったものは5検体（50%）あった．このうち，前向き研究として感受性試験を行いその結果から『感受性あり』と判定された多剤併用化学療法を実施できたのは4検体あり，臨床効果は全例『有効』であった．この結果は感受性試験の重要性を示している．即ち，抗癌剤感受性試験を行い有効と思われる化学療法を選択することにより，無作為に化学療法が実施された場合に比べ，治療成績をさらに向上させうることが示唆された．

また既に化学療法が行われていた検体は10検体あり，このうち前向き研究として感受性試験を行い，その結果から『感受性あり』と判定された多剤併用化学療法を実施できたのは1検体あった．その臨床効果は『有効』であり，しかも既に化学療法が行われていた検体のうちで，唯一臨床効果が『有効』となった症例であった．既に化学療法が行われている場合にも，感受性試験は次の化学療法を決定する有力な根拠を与えてくれることが示唆された．

本研究の結果より，骨軟部悪性腫瘍に対する感受性試験法として，受精鶏卵漿尿膜法は真陽性率（true positive rate）100%，真陰性率（true negative rate）93%，全体的な臨床効果の予測率が95%と，高い臨床効果との関連性を有することが確認された（表6）．

さらに本法には，短時間にしかも安価に効果判定ができる利点がある．また凍結保存した材料を使用する

こともでき，その材料を用い随時繰り返して感受性試験を行え，より有効と思われる化学療法を検討することも可能である．*in vitro* の感受性試験では，いわゆる潜在活性型薬剤である CPA や DTIC は評価できないが，本法ではそのままの形でも評価可能であった．結論として，本法は臨床に近いモデルとして抗癌剤の多剤併用療法を反映できる実験系であると考えられた．

欠点としては，現在のところ人工気室の作成にある程度の手技的習熟が要求される点や，効果判定を腫瘍重量で行っているため腫瘍増殖の遅いものは，効果判定が不正確になる恐れがあること，また MTX を大量に使用できないことが挙げられる．

しかしこれらの欠点はあるものの，受精鶏卵の漿尿膜を利用した抗癌剤感受性試験は，成功率の高い信頼できる方法であり，実用的な臨床応用が可能な方法になるものと考えられた．

結　　論

骨軟部悪性腫瘍に対する新しい抗癌剤感受性試験法として，受精鶏卵漿尿膜法を検討した．その結果，以下の結論を得た．

1．継代株 B16-F10 を用い，鶏卵漿尿膜法による感受性試験のスケジュールを検討した．その結果，孵卵11日目に漿尿膜上に腫瘍細胞（2×10^4個）を移植し，抗癌剤投与は腫瘍血管が発達した孵卵14日目に行い，孵卵18日目に腫瘍を摘出し，抗癌剤投与群と対照群の腫瘍重量を比較した．

2．この実験系で骨軟部悪性腫瘍領域で汎用されている各種抗癌剤の卵黄内投与と静脈内投与を比較し，投与経路の検討を行った．その結果，静脈内投与が抗癌剤の投与経路として優れており，鶏卵胎児に比較的毒性が強く現れる MTX を除けば，広範な薬剤が臨床相当量で投与できることがわかった．また生体内で活性化され効力を発揮する薬剤である潜在活性型薬剤もそのまま効果判定できる利点もあることが明らかになった．さらに一週間という短期間に効果判定が行える長所があり，その高い再現性と簡便で安価に行えることからも，有用な *in vivo* の実験系であることが示唆された．

3．臨床材料を用いた鶏卵漿尿膜法による感受性試験は，骨軟部悪性腫瘍31検体を用いて行った．材料が汚染もしくは極端に少量でしかも培養にも成功しなかった2検体を除く，29検体（94%）全例が鶏卵漿尿膜上に生着し，抗癌剤感受性試験の判定が可能であった．本法は新鮮材料のみならず，凍結保存材料も使用できるという利点がある．また生着率と試験成功率が高いことも本法の特徴である．

4．このうちの20検体（15症例）は臨床効果の検討が可能であった．種々の多剤併用化学療法を用いて，鶏卵漿尿膜法による感受性試験の結果と臨床における効果を，前向き研究および後向き研究を行った．その結果，真陽性率（true positive rate）は100%，真陰性率（true negative rate）は93%，全体としての予測率は95%であり，高い臨床効果との関連性が得られた（$p<0.01$）．

このように，鶏卵漿尿膜を用いる感受性試験は，従来法と比べて臨床予言性にも遜色がない．とくに HTCA 法ではコロニー形成能が低いため評価が困難であった骨軟部悪性腫瘍に対して，極めて高い予言性が得られたことから，多剤併用化学療法の骨軟部悪性腫瘍に対する臨床効果の予測に，受精鶏卵漿尿膜法は信頼性が高く有用な方法であることが示唆された．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導と御校閲を賜りました恩師野村進教授および，直接御指導御助言を賜りましたがん研究所化学療法部佐々木琢磨教授，御助言を賜りました衛生学橋本和夫教授に深謝いたします．終始御指導御教示を賜りました富田勝郎助教授に心から感謝の意を捧げます．本研究に関し，貴重な研究材料を御恵与下さった国立がんセンター病院整形外科福間久俊，中馬広一両先生さらに，癌研究会癌化学療法センター鶴尾隆先生に感謝申しあげます．本研究遂行に際し御援助いただいた，がん研究所化学療法部田中基裕，遠藤良夫両先生，また御協力いただいた金沢大学中央検査部病理寺畑信太郎先生，第一病理上田善道先生，ならびに整形外科腫瘍班の先生方に感謝いたします．

なお，本論文の要旨の一部は，第25回日本癌治療学会において発表した．

文　　献

1) **Kondo, T., Imamura, T. & Ichihashi, H.:** *In vitro* test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. Gann., **57,** 113-121 (1966).

2) **Karnofsky, D. A.:** Differences between cancers in terms of therapeutic responses. Cancer Res., **16,** 684-697 (1956).

3) **Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.:** Primary bioassay of human tumor stem cells. Sience, **197,** 461-463 (1977).

4) **Rygaard, J. & Povlsen, C. O.:** Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. Acta Path. Microbiol. Scand., **77,** 758-760 (1969).

5) **Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K.,**

Hirohashi, S., Koide, T., Hayashi, H. & Nomura, T.: Transplantation of human tumors in nude mice. J. Natl. Cancer Inst., **56,** 1251-1260 (1976).

6) Bogden, A. E., Kelton, D. E., Cobb, W. R. & Esber, H.: A rapid screening method for testing chemotherapy against human tumor xenografts. In Houchens, D. P. & Ovejera, A. A. (eds.), Proceedings of the Symposium on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research, 1st ed., p231-250, Fischer, Inc., New York. 1978.

7) Murphy, J. B.: Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. J. Am. Med. Assoc., **59,** 874-875 (1912).

8) Nicolson, G. L., Brunson, K. M. & Fidler, I. J.: Specificity of arrest, survival and growth of selective metastatic variant cell lines. Cancer Res., **38,** 4105-4111 (1978).

9) Rosen, G.: Role of chemotherapy in the management of malignant bone tumors, In Clinical Trends in Orthopaedics, p152-163, Thieme-Stratton Inc., New York, 1982.

10) Rosen, G. & Nirenberg, A.: Neoadjuvant Chemotherapy for Osteogenic Sarcoma: A Five Year Follow-up (T10) and Preliminary Report of New Studies (T-12). In Primary Chemotherapy in Cancer Medicine, p39-51, Liss Inc., New York, 1985.

11) Jacobs, E. M.: Combination chemotherapy of metastatic testicular germinal cell tumors and soft part sarcomas. Cancer, **25,** 324-332 (1970).

12) Ettinger, L. J., Douglass, Jr. H. O., Higby, D. J., Mindell, E. R., Ghoorah, J. & Freeman, A. I.: Adjuvant adriamycin and cis-diaminedichloroplatinum (Cis-platinum) in primary osteosarcoma. Cancer, **47,** 248-254 (1981).

13) Ehrlich, C. E., Einhorn, L., Stehman, F. B. & Blessing, J.: Treatment of advanced epithelial ovarian cancer using cisplatin, adriamycin and cytoxan. Clinic. Obstet. & Gynecol., **10,** 325-335 (1983).

14) Gottlieb, J. A., Baker, L. H., O'Bryan, R. M., Sinkovics, J. G., Hoogstraten, B., Quagliana, J. M., Rivkin, S. E., Bodey, G. P., Rodriguez, V. T., Blumenschein, G. R., Saiki, J. H., Coltman, C., Burgess, M. A., Sullivan, P., Thigpen, T., Bottomley, R., Balcerzak, S. & Moon, T. E.: Adriamycin (NSC-123127) used alone and in combination for soft tissue and bone sarcomas. Cancer Chemother. Reports, **6,** 271-282 (1975).

15) Rosen, G., Caparros, B., Huvos, A. G., Kosloff, C., Nirenberg, A., Cacavio, A., Marcove, R. C., Lane, J. M., Mehta, B. M. & Urban, C.: Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: Selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. Cancer, **49,** 1221-1230 (1982).

16) 佐々木琢磨: 鶏卵法による癌悪性度の判定と薬剤感受性試験．ファルマシア，**23,** 58-62 (1987).

17) 星 昭夫: In vitro 薬剤感受性テストの開発と改良．癌化学療法の進歩（山村雄一，杉村 隆編），第一版，21-29頁，メヂカルビュー社，東京，1986.

18) Tomita, K., Yokogawa, A. & Nomura, S.: Human tumor clonogenic assay in osteosarcoma for evaluation of clinical efficacy of anti-cancer drugs. Cancer Chemoter. Phamacol., **18,** 133-136 (1986).

19) 下里幸雄: ヌードマウス，その癌研究への応用．がん（山村雄一，杉村 隆編），第1版，313-326頁，共立出版，東京，1978.

20) 北原武志: ヌードマウスを用いた抗がん剤感受性テスト．癌化学療法の進歩（山村雄一，杉村 隆編），第一版，31-37頁，メヂカルビュー社，東京，1986.

21) 佐々木康綱: In vitro, in vivo 感受性テストの臨床的意義．癌化学療法の進歩（山村雄一，杉村 隆編），第一版，38-46頁，メヂカルビュー社，東京，1986.

22) Leighton, J.: The Spread of Cancer, 1st ed., p115-191, Academic Press, New York, 1967.

23) Green, H. & Lorincz, A. L.: The role of a natural antibody in the rejection of mouse tumor cells by the chick embryo. J. Exp. Med., **106,** 111-129 (1957).

24) 古江 尚，大田和雄，田口鉄男，藤田 浩，塚越 茂: 癌化学療法の基礎と臨床．第1版，212-236頁，蟹書房，東京，1977.

Chemosensitivity Test for Human Bone and Soft Tissue Tumors by Embryonated Chick Assay

Makoto Sugihara, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

—J. Juzen Med. Soc., 97, 1032—1043 (1988)

Key words: chemosensitivity test, chorioallantoic membrane, chick embryo, B16-F10 melanoma, bone and soft tissue tumor

Abstract

Chemotherapy plays an important role in the treatment of patients suffering from a bone and soft tissue sarcoma. Selection of suitable drugs for an individual patient obviously improves the clinical results of chemotherapy. Although many chemosensitivity tests *in vitro* or *in vivo* have been performed to ascertain prognoses, their reproducibility, rapidity, convenience, cost and prediction for clinical response are still not satisfactory. In 1912, Murphy successfully transplanted human tumor cells to fertilized chick eggs. This report is of particular relevance to the present study. Using chicken chorioallantoic membrane (CAM), author examined the prediction of the drug sensitivity. The effect of anticancer drugs widely used for bone and soft tissue sarcomas was tested in murine B16-F10 melanoma by injection into the blood vessel in CAM or into the yolk sac. The administration into the blood vessel was more effective than that into the yolk sac. This method had another big advantage to estimate the effect of pro-drugs. Thirty one specimens of human bone and soft tissue tumors (14 osteogenic sarcomas, 2 chondrosarcomas, Ewing's sarcoma, 4 neurogenic sarcomas, 3 malignant fibrous histiocytomas, 2 liposarcomas, 2 epitherioid sarcomas, rhabdomyosarcoma, leiomyosarcoma and synovial sarcoma) were obtained by radical surgery or biopsy over the past two years, and these tumors were prospectively or retrospectively tested by chick embryo assay. Twenty out of 31 specimens (12 osteogenic sarcomas, chondrosarcoma, 3 neurogenic sarcomas, 2 malignant fibrous histiocytomas, rhabdomyosarcoma and liposarcoma) were clinically evaluated. The relationship between this assay and clinical response was 6 true positives, 13 true negatives, and 1 false negative. Overall predictive accuracy was 95%. These results reveal that this assay system using chick CAM is a very promising method to predict clinical response in the treatment of bone and soft tissue sarcomas.