

Comparative Study of Chemosensitivity Tests for Bone and Soft Tissue Sarcomas Using Cultivated TCA and Nude Mice

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/2297/8035

骨軟部悪性腫瘍に対する cultivated tumor clonogenic assay およびヌードマウス抗癌剤感受性試験の比較研究

金沢大学医学部整形外科科学講座 (主任: 野村 進教授)

沼 田 仁 成

(昭和63年3月22日受付)

骨軟部悪性腫瘍に対する化学療法において、精度の高い抗癌剤感受性試験は欠くべからざるものである。In vitro の感受性試験の一つとして横川, 下崎は、癌腫において臨床効果との相関性が高いとされる tumor clonogenic assay (TCA) を改良して、骨軟部悪性腫瘍に応用した (cultivated TCA)。しかし、この cultivated TCA の精度については、いまだ厳密な評価はなされていない。本研究はこの cultivated TCA が臨床における抗癌剤の効果をどれだけ予測しうるかを in vivo の感受性試験として信頼度の高いヌードマウスを用いる方法で検討した。対象は、ヒト骨肉腫由来培養株 OST 細胞、マウス肉腫由来培養株 S-180 およびヌードマウスに移植継代化された osteosarcoma, synovial sarcoma, また過去3年間に得られた手術材料28例 (osteosarcoma 9例, chondrosarcoma 6例, malignant fibrous histiocytoma 4例, liposarcoma 3例, synovial sarcoma 2例など) である。方法は、得られた腫瘍について cultivated TCA を行なうと同時に、臨床での抗癌剤感受性を忠実に示すとされているヌードマウス抗癌剤感受性試験を行なって両者の成績を比較検討した。その結果、まず継代株においては両感受性試験とも全例感受性判定可能であり、cultivated TCA の結果からヌードマウス抗癌剤感受性試験の結果を予測すると、true positive rate 84.6%, true negative rate 85.1% となり、全体の予測率は 85.0% と両感受性試験に高い相関性が認められた ($p < 0.01$)。また手術材料においては、cultivated TCA で感受性判定可能なものは28検体中15検体 (53.6%) であったのに対し、ヌードマウス抗癌剤感受性試験の感受性判定可能例は28検体中10検体 (35.7%) であった。両者ともに感受性判定可能な例は10検体であり、この10検体について両感受性試験の相関性を検討すると、true positive rate 78.6%, true negative rate 83.9% となり、全体の予測率は 82.2% と高い相関性が認められた ($p < 0.01$)。以上、本研究により cultivated TCA を正確かつ prospective (前向き研究) に評価し、cultivated TCA が高い臨床予言性をもつ抗癌剤感受性試験であることを実証した。

Key words bone and soft tissue sarcoma, human tumor clonogenic assay, chemosensitivity test, nude mouse, tumor xenograft

悪性腫瘍の治療において、抗癌剤の選択は従来の臨床成績をふまえ、腫瘍の発生臓器や組織型などを考慮して実施されているが、抗癌剤感受性は、同一臓器、同一病理組織像を示す腫瘍であってもそれぞれ異なることは数多くの報告よりよく知られている¹⁾²⁾。従って個々の症例に対し抗癌剤感受性試験をおこない有効な薬剤を選択するのが理想的であり、この点をふまえて

in vitro および in vivo 抗癌剤感受性試験が数多く試行されてきた。In vitro では Hamburger ら³⁾ が二重寒天培地を用いた human tumor clonogenic assay (HTCA) を確立し、その感受性試験の結果と対象とする症例の臨床反応との間に高い相関性がみられることを明らかにした。しかし骨軟部肉腫においては癌種系に比して、HTCA のコロニー形成能が著しく低い

Abbreviations: ACD, actinomycin D; ADM, adriamycin; CDDP, cis-platinum; CMRL-1066, Connaught Medical Research Laboratory Media-1066; 4OH-CPA, 4-hydroperoxy cyclophosphamide; C×T, concentration-time product; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid;

め⁴¹⁻⁶¹, HTCA は抗癌剤感受性試験としては十分に用されていない。そこで当教室横川⁷⁾, 下崎⁸⁾は, コロニー形成能を高めるため腫瘍採取材料を一旦単層培養系に移行した上で tumor clonogenic assay (TCA) を試みたところ (cultivated TCA), Salmon ら⁹⁾の原法と高い相関性が認められた。また Tomita¹⁰⁾は retrospective (後向き研究) ではあるが HTCA と臨床効果との間に高い相関性が得られたと報告している。しかしこの抗癌剤感受性試験を厳密に評価するためには prospective (前向き研究) な効果判定が必要である。ところが実際の臨床では手術により腫瘍を摘

出してしまいうために薬剤の prospective な効果判定は不可能となるので, 本試験法の厳密な評価はなされていない。一方, in vivo 法としてのヌードマウス抗癌剤感受性試験¹¹⁾は移植率が低く判定迄に長期間を要するなどの欠点があるが, 移植腫瘍は原腫瘍をかなり忠実に再現するので, 臨床での抗癌剤効果を高い確率で予測しうる方法であることが知られている。そこで著者は4種類の継代株および各種の手術材料を用いて cultivated TCA を行なうと同時に, ニードマウスにも移植して腫瘍を再現させヌードマウス抗癌剤感受性試験を行ない, 両抗癌剤感受性試験の結果を比較検討

Table 1. The details of bone and soft tissue sarcomas examined in this study

Case	Age/Sex ^a	Type of tumor	Site of primary tumor	Source of specimen ^b	Surgical procedure
1	7/f	Osteosarcoma	tibia	S	Amputation
2	12/f	Osteosarcoma	femur	S	Wide Resection
3	40/m	Osteosarcoma	pelvis	S	Wide Resection
4	67/m	Osteosarcoma	humerus	S	Amputation
5	8/m	Osteosarcoma	tibia	S	Amputation
6	11/m	Osteosarcoma	femur	S	Amputation
7	26/m	Osteosarcoma	tibia	S	Wide Resection
8	38/m	Osteosarcoma	sacrum	S	Wide Resection
9	24/m	Osteosarcoma	Femur	M	Resection
10	20/m	Chondrosarcoma	Fibula	S	Wide Resection
11	35/m	Chondrosarcoma	Femur	S	Wide Resection
12	30/f	Chondrosarcoma	Femur	S	Wide Resection
13	19/f	Chondrosarcoma	Ulna	S	Wide Resection
14	55/m	Chondrosarcoma	Tibia	S	Wide Resection
15	42/f	Chondrosarcoma	Hand	M	Resection
16	45/f	MFH ^c	Poples	S	Wide Resection
17	63/m	MFH	Thigh	S	Wide Resection
18	64/f	MFH	Leg	S	Wide Resection
19	75/m	MFH	Thigh	S	Resection
20	51/m	Liposarcoma	Buttock	S	Wide Resection
21	47/m	Liposarcoma	Thigh	S	Wide Resection
22	56/f	Liposarcoma	Thigh	S	Wide Resection
23	54/m	Synovial sarcoma	Thigh	S	Amputation
24	56/m	Synovial sarcoma	Thigh	S	Wide Resection
25	33/m	Rhabdomyosarcoma	Upper arm	S	Wide Resection
26	16/m	Ewing's sarcoma	Femur	B	(-)
27	77/f	Leiomyosarcoma	Buttock	S	Wide Resection
28	73/f	Lymphangiosarcoma	Upper arm	S	Wide Resection

a, m, male; f, female; b, S, surgical material; B, biopsy material; M, metastatic material from lung; c, MFH, malignant fibrous histiocytoma

FCS, fetal calf serum; HTCA, human tumor clonogenic assay; MFH, malignant fibrous histiocytoma; MTD, maximum tolerated dose; MTX, methotrexate; OST strain, osteogenic sarcoma Takase strain; PE, plating efficiency; RPMI-1640, Roswell Park Memorial

し, cultivated TCA の評価を試みた。

材料および方法

I. 材料

基礎実験に用いた材料は, 継代株としてはヒト骨肉腫由来培養株 OST 細胞, マウス肉腫由来培養株 S-180, ヌードマウスに移植継代化されたものとしては osteosarcoma, synovial sarcoma である。また臨床材料としては過去 3 年間に当教室で生検または手術により得られた骨軟部悪性腫瘍: osteosarcoma 9 例, chondrosarcoma 6 例, malignant fibrous histiocytoma (MFH) 4 例, liposarcoma 3 例, synovial sarcoma 2 例, rhabdomyosarcoma 1 例, Ewing's sarcoma 1 例, leiomyosarcoma 1 例, lymphangiosarcoma 1 例であった (表 1)。

II. 抗癌剤

抗癌剤としては adriamycin (ADM), cyclophosphamide (CPA), cis-platinum (CDDP), vincristine (VCR), methotrexate (MTX) の 5 剤を用いた。なお CPA は *in vitro* では不活性であるため, *in vitro* 試験に際しては 4-hydroperoxy cyclophosphamide (4OH-CPA) を用いた (表 2)。

III. Cultivated TCA 抗癌剤感受性試験

Cultivated TCA 抗癌剤感受性試験は当教室横川の方法⁵⁾によった。新鮮腫瘍材料を培養液内で無菌的に細切し, 材料をろ過して単離細胞浮遊液を作成した。得られた腫瘍細胞を単層培養し, 培養細胞がシート状

になった時点で, 再び単離細胞浮遊液を作成した。その単離細胞浮遊液に, 抗癌剤を加えて 1 時間振盪接触させた。次にフィーダー層上に, 抗癌剤または対照液と 1 時間接触させた群を 1 ディッシュあたり 5×10^5 個の細胞数となるようにした Top layer (培養層) を重層させて, 各抗癌剤または対照液ごとに各々 3 ディッシュずつの二重寒天培地を作成した。この二重寒天培地を 2~3 週間培養したのちコロニーの算定と同定を行った (図 1)。なお使用した抗癌剤濃度は, 臨床的に通常投与された時の最高血中濃度および血中濃度と時間の積 (concentration-time product, $C \times T$) の約 10% の低濃度を用いた (表 2)。この濃度は, 腫瘍内濃度にほぼ一致するといわれている⁵⁾¹²⁾。また, 抗癌剤との接触時間は 1 時間としたが⁵⁾¹²⁾, 代謝拮抗剤である MTX は持続接触とした。コロニー形成の評価については, 対照群において 1 ディッシュ当たり 5 個以上のコロニー形成がみられたものを『コロニー形成能あり』とし, 30 個以上のコロニー形成がみられたものを『感受性判定可能』とした。また抗癌剤感受性については対照群の 70% 以上のコロニー抑制をきたした場合を感受性 (++)、50% 以上のコロニー抑制をきたした場合を感受性 (+) とした。

IV. ヌードマウス抗癌剤感受性試験

1. 実験動物

実験動物には, 体重が約 20 g (5~7 週令) の BALB/C ヌードマウス (nu/nu) の雌を用いた。

2. 方法

Table 2. Antitumor agents and their concentrations and doses used cultivated TCA (*in vitro*) and nude mice system (*in vivo*)

Agent	in vitro		in vivo	
	Concentration ($\mu\text{g/ml}$) ^a	Dose (mg/kg) ^b	Dose (mg/kg) ^b	Route ^c
Adriamycin	0.04	15		iv
Cis-platinum	0.20	10		ip
Cyclophosphamide ^d	3.00	220		ip
Vincristine	0.01	1.6		ip
Methotrexate ^e	20.00	250		ip

a, Drug concentration was used as approximately 10% of the peak plasma concentration.; b, The dose of drug was used as maximum tolerated dose.; c, iv, intra-venous; ip, intra-peritoneal; d, 4-Hydroperoxy cyclophosphamide in stead of cyclophosphamide *in vivo* was used for *in vitro* study.; e, This drug was used as high dose chemotherapy.

Institute Media-1640; RW, relative mean tumor weight; S-180, Sarcoma-180; SRC, subrenal capsular assay; TCA, tumor clonogenic assay; T_{RW}/C_{RW} , (RW of treated tumor/RW of control tumor) $\times 100(\%)$; VCR, vincristine.

In vivo 抗癌剤感受性試験は、ヌードマウス移植癌細胞による抗癌剤スクリーニングのためのプロトコール Battelle Columbus Laboratories Protocol¹³⁾¹⁴⁾に従い実施した。摘出されたヌードマウス移植腫瘍および臨床手術材料を細切後トロカール針にてヌードマウス背部皮下に移植し、腫瘍を移植後、週3回腫瘍長径 (L) と短径 (W) を mm 単位で測定した。各測定時にプロトコール¹³⁾¹⁴⁾に示されている計算式 $L \times W^2 / 2$ により推定腫瘍重量を算出した。感受性試験は推定腫瘍重量が 100 mg ~ 300 mg に達した時期に開始した。この時点で 100 mg に達しなかったもの、あるいは 300 mg をこえたものは増殖不良または異常増殖例と判定し、対象より除外した。BALB/C ヌードマウスにおいて、各

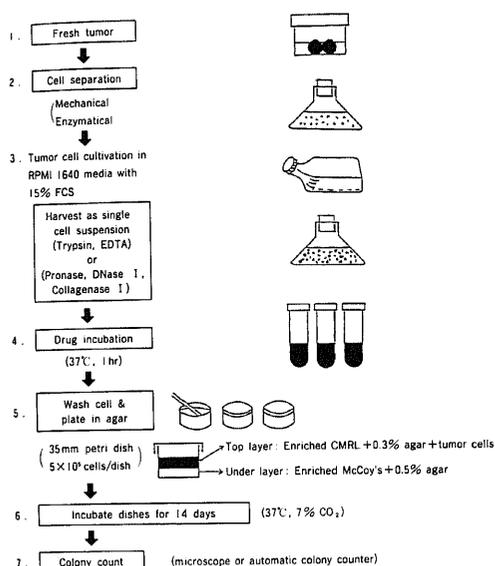


Fig. 1. Method for the cultivated TCA of bone and soft tissue sarcomas.

(1) Fresh tumor specimens were obtained from nude mice, clinical biopsy, or surgery. (2) A single cell suspension was prepared by mechanical and enzymatical disruption. (3) The tumor cells were cultured in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum (FCS) until a cell sheet formed in the bottle. The cells were harvested as a refined single cell suspension by trypsin and EDTA or an enzyme cocktail. (4) The tumor cells were incubated in test tubes with drugs or control medium at 37°C for 1 hour. (5) The tumor cells were washed and plated in soft agar in 35 mm Petri dish. (6) The dishes were incubated at 37°C in 7-7.5% CO₂-humidified air for 14 days. (7) The number of colonies in each dish was counted under a microscope or with an automatic particle counter, and the percent colony inhibition was calculated.

薬剤のそれぞれの投与形式で副作用が少なく最も効果が期待できる量、すなわち最大耐量 (maximum tolerated dose, MTD¹⁵⁾: 担癌体の体重減少が 20% 以内で死亡が認められない最大量) を至適投与量と定め、この量の抗癌剤を投与した。すなわち ADM 15 mg/kg, CPA 220 mg/kg, CDDP 10 mg/kg, VCR 1.6 mg/kg, MTX については 250 mg/kg を 1 回量として、いずれも 0.2 ml の生理食塩水に溶解して 1 回投与した (表 2)。投与経路は腹腔内投与を原則としたが、ADM は腹腔内投与では、吸収が不良で全身投与としての効果が期待できないため静脈内に投与した。なお対照群には生理食塩水 0.2 ml を腹腔内投与した。感受性試験開始後には各測定時推定腫瘍重量 (mean tumor weight at any given time, w_i) と感受性試験開始時推定腫瘍重量 (mean tumor weight at the initial treatment, w_0) の比 (相対平均腫瘍重量, relative mean tumor weight, $RW = w_i/w_0$) を対照群および各抗癌剤投与群につき各々 3 回ずつ算出した。効果判定は相対平均腫瘍重量を用いて行った。抗癌剤投与群における相対平均腫瘍重量が試験期間中に 1.0 未満となった場合、すなわち腫瘍退縮効果を認めた場合を (+), 抗癌剤投与群と対照群における相対平均腫瘍重量の比 [(RW of treated tumor/ RW of control tumor) $\times 100$ (%), (T_{RW}/C_{RW}) $\times 100$ (%)] が試験期間中に 42% 以下となった場合すなわち腫瘍増殖抑制効果を認めた場合を (+), それ以外を (-) と判定した。なお腫瘍増殖抑制効果の判定基準として採用した 42% は、抗癌剤投与群における腫瘍各群が対照群における各径の 75% になった場合の推定腫瘍重量、 $(0.75 L) \times (0.75 W)^2 / 2 = (0.75)^3 \times L \times W^2 / 2 = 0.42 \times$ (対照群推定腫瘍重量) より導かれた数値である¹³⁾¹⁴⁾。

V. 継代株のヌードマウス移植腫瘍に対する cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験の相関性に関する実験

ヌードマウス抗癌剤感受性試験と cultivated TCA の相関性および cultivated TCA における抗癌剤効果の cut-off point を決定するために以下の予備実験を行った。すなわちヒト骨肉腫由来培養株 OST 細胞、マウス肉腫由来培養株 S-180 および継代化されたヌードマウス可移植性腫瘍 osteosarcoma 1 例, synovial sarcoma 1 例をヌードマウス背部皮下に移植した。移植に際して培養株では trypsin 処理後細胞浮遊液とし注射針にて、またヌードマウス可移植腫瘍では眼科用ハサミにて細切後トロカール針にて行った。そのヌードマウス移植腫瘍について cultivated TCA およびヌードマウス抗癌剤感受性試験を繰り返し 3 回行った (図 2)。

VI. 臨床手術材料に対する cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験の相関性に関する実験

前述した臨床手術材料について cultivated TCA を行うと同時にヌードマウスに腫瘍を移植し *in vivo* 抗癌剤感受性試験を行った (図3)。

VII. 統計学的検定法

Cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験との相関性の検討については χ^2 検定を、また2群のコロニー形成率の比較には変数変換 (\sqrt{x}) のち *t* 検定を行ない、 $p < 0.05$ を有意とした。

成績

I. 継代株のヌードマウス移植腫瘍に対する cultivated TCA およびヌードマウス抗癌剤感受性試験の検討

1. Cultivated TCA のコロニー形成能

Cultivated TCA におけるコロニー形成能は、3回とも4検体中4検体 (100%) にみられた。感受性判定

可能例も3回とも4検体中4検体 (100%) であった。

2. Cultivated TCA 抗癌剤感受性試験の結果

薬剤別 efficacy rate は、70%抑制の条件でみると4OH-CPA では33.3%, ADM, CDDP, VCR および MTX では0%であり、50%抑制の条件でみると4OH-CPA で58.3%, CDDP で41.7%と高値を示し、VCR では8.3%, ADM および MTX では0%であった。また腫瘍別の efficacy rate は70%抑制の条件では osteosarcoma および synovial sarcoma では13.3%, S-180 および OST では0%であり、全体では6.7%であった。50%抑制の条件での efficacy rate は osteosarcoma で40%, synovial sarcoma で26.7%, S-180 で13.3%, OST で6.7%であり、全体では21.7%であった (表3)。

3. ヌードマウス抗癌剤感受性試験の結果

薬剤別では、efficacy rate は CPA で58.3%, CDDP で58.3%, ADM で33.3%, VCR と MTX で0%であり、CPA, CDDP において有効率が高かった。また腫瘍別の efficacy rate は osteosarcoma で60%,

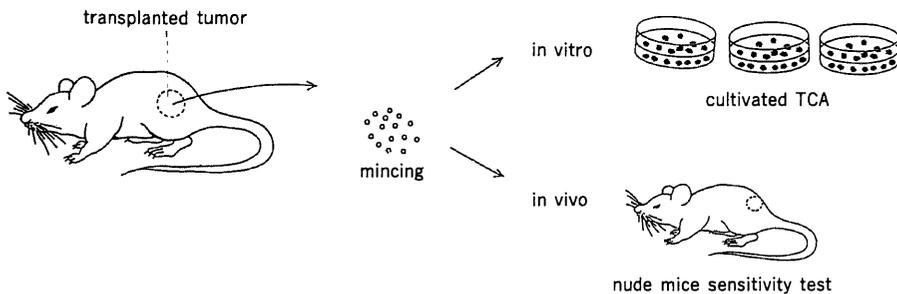


Fig. 2. *In vitro* and *in vivo* chemosensitivity test for the tumors transplanted into nude mice.

OST cells, sarcoma-180 cells, osteosarcoma and synovial sarcoma transplanted into nude mice were resected and minced, and followed by the cultivated TCA as *in vitro* method or by the nude mice chemosensitivity test as *in vivo*.

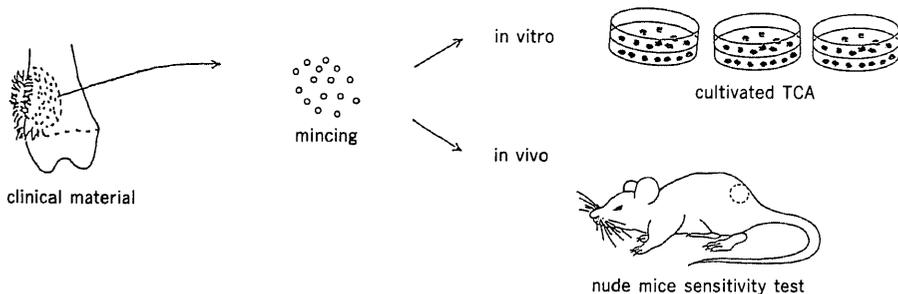


Fig. 3. *In vitro* and *in vivo* chemosensitivity test for clinical specimens.

The sarcomas obtained by surgery were minced, and single cell suspensions were prepared. This specimens were followed by the cultivated TCA as *in vitro* method or by the nude mice chemosensitivity test as *in vivo*.

Table 3. Effect of the agents on nude mice tumors *in vitro* (cultivated TCA)^a

Type of tumor	Agent					Efficacy rate ^b
	ADM	CDDP	4OH-CPA	VCR	MTX	
Osteosarcoma						
Exp. 1	-(28.9)	+(53.7)	‡(73.7)	-(45.3)	-(27.7)	2/5
2	-(38.6)	-(40.2)	‡(83.6)	+(67.3)	-(38.6)	2/5
3	-(19.2)	+(51.8)	+(62.5)	-(30.2)	-(10.2)	2/5
Synovial Sarcoma						
Exp. 1	-(27.5)	-(34.2)	‡(70.5)	-(32.5)	-(0.0)	1/5
2	-(28.6)	+(50.8)	+(62.5)	-(10.8)	-(10.8)	2/5
3	-(8.2)	-(20.7)	‡(68.2)	-(23.6)	-(2.3)	1/5
S-180						
Exp. 1	-(4.7)	+(61.5)	-(28.5)	-(16.7)	-(39.6)	1/5
2	-(10.6)	+(50.8)	-(8.2)	-(2.2)	-(10.2)	1/5
3	-(23.8)	-(42.6)	-(10.8)	-(8.5)	-(11.8)	0/5
OST						
Exp. 1	-(42.4)	-(19.8)	+(51.8)	-(6.2)	-(17.6)	1/5
2	-(3.2)	-(20.8)	-(30.5)	-(30.8)	-(28.3)	0/5
3	-(2.1)	-(10.2)	-(10.2)	-(2.2)	-(8.2)	0/5
Efficacy rate	0/12	5/12	7/12	1/12	0/12	21.7%(13/60)

a, Figures in parentheses are percentage colony inhibition; -, effect less than 50% inhibition; +, effect more than 50% inhibition; ‡, effect more than 70% inhibition; b, Efficacy rate was shown in more than 50% inhibition.

Table 4. Effect of the agents on nude mice tumors *in vivo* (nude mice system)^a

Type of tumor	Agent					Efficacy rate ^b
	ADM	CDDP	CPA	VCR	MTX	
Osteosarcoma						
Exp. 1	+(89.1)	+(74.9)	+(73.6)	-(25.5)	-(4.9)	3/5
2	+(70.8)	+(92.3)	+(73.9)	-(30.8)	-(8.9)	3/5
3	+(75.7)	+(80.2)	+(60.2)	-(23.3)	-(13.2)	3/5
Synovial Sarcoma						
Exp. 1	-(22.2)	-(37.5)	+(69.5)	-(10.8)	-(1.9)	1/5
2	-(21.6)	+(60.2)	+(70.2)	-(20.2)	-(3.8)	2/5
3	+(62.8)	-(38.6)	-(40.2)	-(9.2)	-(2.9)	1/5
S-180						
Exp. 1	-(56.5)	+(91.5)	-(30.8)	-(3.0)	-(1.9)	1/5
2	-(14.3)	+(80.3)	-(40.2)	-(2.6)	-(3.2)	1/5
3	-(20.3)	+(72.1)	-(20.8)	-(10.8)	-(1.9)	1/5
OST						
Exp. 1	-(3.8)	-(10.8)	+(59.8)	-(8.0)	-(1.9)	1/5
2	-(8.2)	-(20.3)	+(70.2)	-(20.8)	-(1.2)	1/5
3	-(1.2)	-(18.2)	-(54.3)	-(10.2)	-(10.8)	0/5
Efficacy rate	4/12	7/12	7/12	0/12	0/12	30.0%(18/60)

a, Figures in parentheses are the tumor inhibition ratio (%) which was calculated by the formula of $(I-T/C) \times 100$, where C is the average tumor weight of the control group and T is that of the treated group +, effect more than 58% inhibition, -, effect less than 58% inhibition; b, Efficacy rate was shown in more than 58% inhibition.

Table 5. Predictability of antitumor effect of the agents from cultivated TCA (*in vitro*) to nude mice system (*in vivo*)

<i>in vivo</i>	70% inhibition ^a			<i>in vivo</i>	50% inhibition ^b		
	<i>in vitro</i>				<i>in vitro</i>		
	positive	negative	total		positive	negative	total
positive	3	15	18	positive	11	7	18
negative	1	41	42	negative	2	40	42
total	4	56	60	total	13	47	60

a, Cut-off point on 70% inhibition, true positive rate 75%(3/4), true negative rate 73.2%(41/56), predictable rate 73.3%(44/60); b, Cut-off point on 50% inhibition, true positive rate 84.6%(11/13), true negative rate 85.1%(40/47), predictable rate 85.0%(51/60). Association between *in vitro* and *in vivo* test was significant ($p < 0.01$).

Table 6. Growth of colonies and nude mice sensitivity test

Case	Type of tumor	Cultivated TCA		Nude mice sensitivity test
		No. of colonies/dish(mean) ^a	PE(%) ^b	
1	Osteosarcoma	20.3	0.0041	possible
2	Osteosarcoma	51.2	0.0102	possible
3	Osteosarcoma	107.0	0.0214	possible
4	Osteosarcoma	80.6	0.0161	possible
5	Osteosarcoma	15.2	0.0030	impossible
6	Osteosarcoma	32.0	0.0064	impossible
7	Osteosarcoma	no growth	—	impossible
8	Osteosarcoma	12.6	0.0025	impossible
9	Osteosarcoma	11.0	0.0022	impossible
10	Chondrosarcoma	88.8	0.0178	possible
11	Chondrosarcoma	119.0	0.0238	possible
12	Chondrosarcoma	101.0	0.0202	possible
13	Chondrosarcoma	no growth	—	impossible
14	Chondrosarcoma	no growth	—	impossible
15	Chondrosarcoma	31.0	0.0062	impossible
16	MFH ^c	84.0	0.0062	possible
17	MFH	no growth	—	impossible
18	MFH	100.0	0.0220	possible
19	MFH	no growth	—	impossible
20	Liposarcoma	115.0	0.0230	impossible
21	Liposarcoma	no growth	—	impossible
22	Liposarcoma	no growth	—	impossible
23	Synovial sarcoma	67.7	0.0135	impossible
24	Synovial sarcoma	111.7	0.0223	possible
25	Rhabdomyosarcoma	115.0	0.0230	impossible
26	Ewing's sarcoma	no growth	—	impossible
27	Leiomyosarcoma	120.0	0.0240	impossible
28	Lymphangiosarcoma	no growth	—	impossible
Mean±SD		72.79±40.38	0.0141±0.0085	

a, 5×10^5 cells plated per dish; b, plating efficiency, number of colonies/number of nucleated cells plated $\times 100\%$; c, MFH, malignant fibrous histiocytoma.

synovial sarcoma で 26.7%, S-180 で 20%, OST で 13.3%であり, 全体では 30.0%であった. なお腫瘍退縮効果を認めた例はなかった (表 4).

4. Cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験の相関性

ヌードマウス感受性試験では T_{RW}/C_{RW} 42%以下の効果を (+) とし, cultivated TCA では 70%以上の抑制 (++) を有効とした場合と, 50%以上の抑制 (+) を有効とした場合において, cultivated TCA によるヌードマウス感受性試験への予測率を比較した. 70%抑制 (++) の場合 true positive rate は 75%, true negative rate は 73.2%であり, 全体の予測率は 73.3%であった. これに対して 50%抑制で予測すると true positive rate は 84.6%, true negative rate は 85.1%となり, 全体の予測率は 85.0%と両者に有意な相関性 ($p < 0.01$) が認められた (表 5).

II. 臨床手術材料に対する cultivated TCA およびヌードマウス抗癌剤感受性試験の検討

1. Cultivated TCA のコロニー形成能および形成率

Cultivated TCA におけるコロニー形成能は, 28 検体中 19 検体 (67.9%) にみられた. 感受性判定可能であったものは, 28 検体中 15 検体 (53.6%) であった. また, コロニー形成率 (plating efficiency, PE) は $0.0141 \pm 0.0085\%$ であった (表 6).

2. Cultivated TCA 抗癌剤感受性試験の結果

薬剤別 efficacy rate は 70%抑制の条件でみると MTX で 30%, ADM, 4OH-CPA および VCR では

10%, CDDP では 0%であり, 50%抑制の条件では 4OH-CPA, MTX で 40%, CDDP で 30%, ADM で 20%, VCR で 10%であった. また腫瘍別の efficacy rate は 70%抑制の条件では MFH (case 16) で 40%, osteosarcoma (case 1), osteosarcoma (case 2), osteosarcoma (case 3) および chondrosarcoma (case 10) では 20%, それら以外で 0%であり, 全体では 12%であった. 50%抑制の条件での efficacy rate は osteosarcoma (case 2) では 60%, osteosarcoma (case 1), osteosarcoma (case 3) および MFH (case 16) で 40%, osteosarcoma (case 4), chondrosarcoma (case 10), chondrosarcoma (case 12), MFH (case 18) および synovial sarcoma (case 24) では各々 20%, chondrosarcoma (case 11) では 0%であり, 全体では 28.0%であった (表 7).

3. ヌードマウス抗癌剤感受性試験の結果

感受性判定可能例は 28 検体中 10 検体 (35.7%) であり内訳は osteosarcoma 9 例中 4 例, chondrosarcoma 6 例中 3 例, MFH 4 例中 2 例, synovial sarcoma 2 例中 1 例であった. liposarcoma, rhabdomyosarcoma, Ewing's sarcoma, leiomyosarcoma, lymphangiosarcoma では感受性判定可能例はなかった. 薬剤別の efficacy rate は CPA で 66.7%, CDDP で 44.4%, MTX で 30%, ADM で 22.2%, VCR で 12.5%であり, 全体で 35.6%であった (表 8).

4. Cultivated TCA のコロニー形成率とヌードマウス抗癌剤感受性試験可能例との関連性

Osteosarcoma 9 例中 *in vivo* 抗癌剤感受性試験可

Table 7. Effect of the agents on human tumors *in vitro* (cultivated TCA)^a

Case	Type of tumor	Agent					Efficacy rate ^b
		ADM	CDDP	4OH-CPA	VCR	MTX	
1	Osteosarcoma	-(31.5)	+(57.4)	+(74.8)	-(49.9)	-(29.7)	2/5
2	Osteosarcoma	+(54.8)	-(4.8)	-(19.9)	+(84.8)	+(52.8)	3/5
3	Osteosarcoma	-(41.0)	-(46.0)	+(67.9)	-(4.0)	+(93.7)	2/5
4	Osteosarcoma	-(19.0)	-(39.8)	+(58.8)	-(42.0)	-(37.7)	1/5
10	Chondrosarcoma	-(46.3)	-(48.4)	-(46.3)	-(0.2)	+(74.4)	1/5
11	Chondrosarcoma	-(19.9)	-(44.8)	-(29.0)	-(44.5)	-(2.4)	0/5
12	Chondrosarcoma	-(2.2)	-(39.5)	+(54.8)	-(37.7)	-(0.2)	1/5
16	MFH ^c	+(83.2)	-(2.0)	-(48.0)	-(34.0)	+(91.8)	2/5
18	MFH	-(19.8)	+(63.5)	-(29.8)	-(28.7)	-(44.8)	1/5
24	Synovial sarcoma	-(3.8)	+(66.5)	-(24.5)	-(10.8)	-(34.5)	1/5
Efficacy rate		2/10	3/10	4/10	1/10	4/10	28.0% (14/50)

a, Figures in parentheses are percentage colony inhibition. -, effect less than 50% inhibition; +, effect more than 50% inhibition; ++, effect more than 70% inhibition; b, Efficacy rate was shown in more than 50% inhibition; c, MFH, malignant fibrous histiocytoma.

能例 4 例の cultivated TCA における PE は $0.0130 \pm 0.0075\%$ 、非可能例 5 例の PE は $0.0028 \pm 0.0023\%$ であり、ヌードマウス抗癌剤感受性試験における判定可能例のほうが非可能例より cultivated TCA における PE が高かった ($p < 0.05$)。同様に chondrosarcoma 6 例中判定可能例 3 例の PE は $0.0206 \pm 0.0030\%$ 、非可能例 3 例の PE は $0.0021 \pm 0.0036\%$ であった。また、MFH 4 例中判定可能例 2 例の PE は $0.0141 \pm 0.0112\%$ であり、非可能例 2 例の PE は 0% であった。synovial sarcoma の 2 例中判定可能例の PE は 0.0223% であり、非可能例のそれは 0.0135% であった。以上臨床手術材料 28 例中 *in vivo* 抗癌剤感受性試験可能例 10 例の PE は $0.0164 \pm 0.0071\%$ であるのに対して非可能例 9 例の PE は $0.0115 \pm 0.0095\%$ であり、抗癌剤感受性試験可能例の PE が有意に高値 ($p <$

0.05) を示した (表 6)。

5. Cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験の相関性

上記二つの感受性試験を同時に行い得た 10 例 5 剤について検討した。50%コロニー抑制の条件で *in vitro* から *in vivo* の結果を予測すると、true positive rate 78.6%, true negative rate 83.9% となり、全体の予測率は 82.2% と両者に有意な相関性 ($p < 0.01$) が認められた (表 9)。

考 察

骨悪性腫瘍とくに骨肉腫の化学療法では、MTX, ADM, CDDP の登場により、これらの薬剤の有効性¹⁶⁾¹⁷⁾が報告されるようになった。しかし、いまだどのような骨肉腫に、どの薬剤を使用するのが最も良いか

Table 8. Effect of the agents on human tumors *in vivo* (nude mice system)^a

Case	Type of tumor	Agent					Efficacy rate ^b
		ADM	CDDP	CPA	VCR	MTX	
1	Osteosarcoma	+(89.1)	+(74.9)	+(73.6)	-(25.5)	-(4.9)	3/5
2	Osteosarcoma	-(39.8)	-(49.5)	+(74.5)	+(89.8)	-(37.2)	2/5
3	Osteosarcoma	-(19.5)	-(27.4)	+(59.9)	-(49.7)	+(67.4)	2/5
4	Osteosarcoma	-(39.8)	+(91.8)	+(88.9)	-(19.8)	-(5.7)	2/5
10	Chondrosarcoma	-(36.2)	-(25.5)	-(2.1)	-(8.0)	+(74.5)	1/5
11	Chondrosarcoma	-(26.6)	-(49.8)	-(53.2)	-(56.2)	-(50.8)	0/5
12	Chondrosarcoma	-(49.4)	+(71.9)	+(67.5)	-(39.8)	-(51.4)	2/5
16	MFH ^c	+(74.8)		-(19.8)		+(89.7)	2/3
18	MFH	-(54.7)	+(92.8)		-(4.8)	-(1.9)	1/4
24	Synovial sarcoma		-(37.5)	+(69.5)		-(1.9)	1/3
Efficacy rate		2/9	4/9	6/9	1/8	3/10	35.6% (16/45)

a, Figures in parentheses are the tumor inhibition ratios (%) which was calculated by the formula of $(1-T/C) \times 100$, where C is the average tumor weight of the control group and T is that of the treated group. +, effect more than 58% inhibition, -, effect less than 58% inhibition; b, Efficacy rate was shown in more than 58% inhibition; c, MFH, malignant fibrous histiocytoma.

Table 9. Predictability of antitumor effect of the agents from cultivated TCA (*in vitro*) to nude mice system (*in vivo*) by the cut-off point on 50% inhibition

<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		Total
	Positive	Negative	
Positive	11	5	16
Negative	3	26	29
Total	14	31	45

true positive rate 78.6% (11/14), true negative rate 83.9% (26/31) predictable rate 82.2% (37/45) Association between *in vitro* and *in vivo* test was significant ($p < 0.01$).

確立されていない。またその他の骨悪性腫瘍においても抗癌剤の有効性は明確ではない。一方、軟部悪性腫瘍においても VAC (VCR+ACD+CPA) 療法¹⁸⁾、CYVADIC (CPA+VCR+ADM+dimethyl triazeno imidazole carboxamide) 療法¹⁹⁾などが試みられているが、これらとて各種の腫瘍の組織像、悪性度、発育態度が多岐にわたるため化学療法剤の使用法に関する定見は得られていない。このため副作用が強く出現し、治療効果が認められない場合も多い。そこで各々の腫瘍について抗癌剤感受性試験を行い有効な抗癌剤を決定することが抗癌剤の理想的選択法であろう。

抗癌剤感受性試験には大別して *in vitro* assay と *in vivo* assay があるが、理想的な抗癌剤感受性試験としての条件を満している方法は皆無であり、それぞれの方法が長所と短所を合わせて持っている。そこで最終的には臨床効果と最も相関が高い方法を確立することが第一義的目的となるが、このためには同一検体に対して各種感受性試験を同時に施行して比較検討することが不可欠であると佐々木²⁰⁾は述べている。しかし臨床材料を用いて *in vivo*, *in vitro* 二種の感受性試験を行い両者を比較した実験は現在のところほとんどみられず、subrenal capsular assay (SRC) の提唱者である Bogden ら²¹⁾が SRC および TCA の両 assay を比較検討し、両法の結果が相互によく相関し、また両法とも臨床成績ともよく相関したと述べているにすぎない。また Von Hoff ら²²⁾が指摘するように多剤併用療法を行っている場合 retrospective の評価では true positive 例においては必ずしも *in vitro* で「感受性あり」と判定された抗癌剤の効果を示しているとは限らない。そこで cultivated TCA における薬剤各々の抗癌剤感受性効果をより正確に評価するためには prospective の評価が必要となる。Von Hoff ら²²⁾は 246 例の各種悪性腫瘍を対象に prospective clinical trial を行い、true positive rate 60%、true negative rate 85% で全体的な予測率は 80.5% として prospective clinical trial においても HTCA の精度が高いことを報告した。しかし、整形外科領域においては、切断および広範囲切除などの手術により腫瘍を余すことなくすべて切除するため、さらにまた感受性判明までの期間化学療法を行わずに待機することは不可能であり、臨床的に prospective の効果判定はほとんど不可能に近いのが現状である。そこで本研究では臨床材料をヌードマウスに移植して腫瘍を再現させ、これを用いて cultivated TCA およびヌードマウス抗癌剤感受性試験を同時に行ない両者を比較検討した。

ヌードマウスを用いた *in vivo* 抗癌剤感受性試験は

Rygaard ら¹¹⁾がヒト結腸癌のヌードマウスへの移植に成功以後、多くの悪性腫瘍で試みられた。現在ではヌードマウスに生着した腫瘍では原腫瘍の病理組織学的所見や機能的側面がそのまま保持されており、抗癌剤に対する感受性についても同様であると考えられている²³⁾。またヌードマウスを用いた実験化学療法法の判定結果と臨床効果との間には高い相関性があり、ヌードマウス-腫瘍系はヒト悪性腫瘍化学療法法の良効なモデルとされている²⁴⁾²⁵⁾。しかし実際には、この理想的と思われた *in vivo* 抗癌剤感受性試験にも短所がある。そのひとつに初代移植成功率が期待した程高くないことがあげられる。実際に臨床材料を用いた生着率は 30%~40% であると報告があり²⁶⁾、本実験においても 28 例中 10 例 (35.7%) と低率であった。また安定した増殖を示すまでに長期間を要し、個々の癌患者の治療にヌードマウスを用いた抗癌剤感受性試験の成績を応用することは極めて困難である。従ってヌードマウス抗癌剤感受性試験は実践的臨床応用には無理であるが、原腫瘍を再現するという意味において非常に有効な手段と思われる。

ヌードマウス移植腫瘍の特性として原腫瘍より TCA におけるコロニー形成率が高くなると Tveit ら²⁷⁾は述べ、Selby ら²⁸⁾も同様に移植腫瘍のコロニー形成率は著明に高く、継代によりさらに上昇したと報告している。これは、細胞が選択された結果 clonogenic cell の比率が増加するためであると Selby ら²⁸⁾は推論し、また原腫瘍は生体内で定常増殖期にあり非増殖細胞が多いのに対し^{29)~31)}ヌードマウス移植腫瘍は対数増殖期にあり増殖細胞の比率が高いためと水野らは報告している³²⁾。これらの事実は、本実験で 4 種のヌードマウス移植腫瘍について cultivated TCA におけるコロニー形成率が 100% であった結果と一致している。

次にヌードマウス移植腫瘍の感受性試験における特性として抗癌剤感受性の亢進が知られている³²⁾。これは S 期の細胞の比率の増加によるものと考えられる³³⁾³⁴⁾。この場合、感受性スペクトラムは、ほとんど変化しないとされる³²⁾³⁵⁾³⁶⁾。このようにヌードマウス移植腫瘍は、抗癌剤に対する感受性の亢進が認められるが、感受性スペクトラムは良好に保持しているため、ヌードマウス移植腫瘍を用いた実験化学療法は、その効果判定基準を誤らなければ、悪性腫瘍化学療法法の有用な実験モデルと思われる。

花谷³⁵⁾はヌードマウス可移植性ヒト固形癌につき TCA およびヌードマウス抗癌剤感受性試験をおこない、薬剤によっては *in vivo* と *in vitro* の成績間に統計学的に有意の相関を認め、*in vitro* 抗癌剤感受性試験の成績から *in vivo* における効果を予測することが

可能であると述べている。また久保田³⁶⁾も同様にヌードマウス可移植性ヒト癌株をもちいて TCA とヌードマウス抗癌剤感受性を比較し、TCA における有効抑制率の設定について検討した。その結果、ヌードマウス系の予測には TCA において 50%コロニー形成抑制率を効果あり (+) とした基準を用いると高い予測率が示されると述べている³⁶⁾。そこで本研究においても骨軟部悪性腫瘍において両感受性試験の相関性およびその効果判定基準を定めるために 4 種のヌードマウス移植腫瘍において、cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験とを行い比較検討した。cultivated TCA においては 50%コロニー形成抑制の条件で 4OH-CPA, CDDP は高い抗腫瘍効果を示したが、ADR, VCR, MTX は抗腫瘍効果を示さなかった。また腫瘍別では OST, S-180 に比べて osteosarcoma, synovial sarcoma において感受性薬剤が多く認められた。またヌードマウス抗癌剤感受性試験においても CPA, CDDP に高い抗腫瘍効果を認め、腫瘍別でも osteosarcoma において感受性薬剤が多く認められた。

Cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験の比較では、70%コロニー形成抑制の条件下では予測率が 73.3%であり、50%コロニー形成抑制の条件下では予測率は 85.0%と高率を示し、統計学的に両感受性試験に有意の相関が認められた。従来、臨床手術材料を用いた colony assay による臨床抗腫瘍効果の予測率は、70%以上のコロニー形成抑制という条件において、true positive rate 60%, true negative rate 90%と報告されている³⁷⁾。今回の実験で 50%コロニー形成抑制という条件を用いた場合において両感受性試験により高い相関が認められたのは、ヌードマウス系における薬剤の投与量が最大耐量であり、ヒトの臨床投与量よりかなり多いことや、ヌードマウス移植腫瘍の薬剤感受性の上昇のため³³⁾³⁴⁾、臨床における薬剤の有効率よりヌードマウス系における有効率が高くなるためと予測される。実際、コロニー形成抑制率が 70%で false negative であった 8 例がコロニー形成抑制率 50%では true positive になった。以上より、現在まだヌードマウスへの至適薬剤投与量、およびヌードマウス系の判定基準、つまり T_{RW}/C_{RW} 比值 42%以下の腫瘍抑制効果と colony assay の 50%コロニー形成抑制との関係は明らかでないが、cultivated TCA は 50%コロニー形成抑制の条件において in vivo における抗癌剤効果を十分予測しうる方法であると考えられた。

臨床手術材料に対する cultivated TCA とヌードマウス抗癌剤感受性試験の比較では、cultivated TCA において感受性判定可能なものは 28 検体中 15 検体

(53.6%)であったのに対して、ヌードマウス抗癌剤感受性試験において感受性判定可能例は 28 検体中 10 検体 (35.7%) と低率であり試験期間も 3 ヶ月~6 ヶ月を要した。

Cultivated TCA の結果を薬剤別にみると MTX, 4OH-CPA > CDDP > ADM > VCR の順に有効であり、また腫瘍別にみると osteosarcoma では 40%, MFH では 30%の有効薬剤があるのに対して chondrosarcoma では 13.3%の有効率しか認められなかった。この結果は実際臨床的に osteosarcoma においては、ADM, MTX, CDDP の有効性が認められる一方で、chondrosarcoma に対してはあまり有効な薬剤が認められていない事実と一致している。ヌードマウス抗癌剤感受性試験においては薬剤別では CPA > CDDP > MTX > ADM > VCR の順に有効であり、腫瘍別では cultivated TCA と同様に osteosarcoma において 45%の有効薬剤が示されたのに対して chondrosarcoma では 20.0%の有効率しか認められなかった。

またヌードマウス抗癌剤感受性試験可能例の 10 例について検討すると、おのおの非可能例に比して cultivated TCA の PE が高く、逆に cultivated TCA で感受性判定不可能でヌードマウス抗癌剤感受性試験が可能であった例はなかった。これは、cultivated TCA の対象となる腫瘍の増殖および転移と密接に関連する clonogenic cell = self renewal potential cell が多いほど、腫瘍細胞がヌードマウスに生着する率が高いためであると考えられる。

次に両感受性試験を行い得た 10 例、5 剤について比較検討すると 50%コロニー形成抑制の条件で true positive rate 78.6%, true negative rate 83.9%, predictable rate 82.2%と高い相関 ($p < 0.01$) が認められ、cultivated TCA は各々単剤に関する感受性試験として信頼性が高いことが示された。以上より cultivated TCA は単離細胞浮遊液を用いるため正常の細胞間相互作用が失われるが、臨床における抗癌剤効果を十分に予測しうる感受性試験であると思われた。

結 論

Cultivated TCA による in vitro の抗癌剤感受性試験が臨床における抗癌剤の効果をどれだけ予測しうるか検討する目的で、4 種類の継代株および手術材料 28 例を用いて cultivated TCA を行なうと同時に、臨床での抗癌剤感受性を忠実に示すとされるヌードマウス抗癌剤感受性試験を行ない、以下の結論を得た。

1. 継代株においては、両感受性試験とも 100%感受性判定可能であった。cultivated TCA において

50%コロニー抑制の条件で感受性ありと判定した場合、ヌードマウス抗癌剤感受性試験との相関性は true positive rate 84.6%, true negative rate 85.1%となり、全体の予測率は 85.0%と有意な相関性 ($p < 0.01$) が得られた。よって cultivated TCA において、50% という cut-off point を用いれば in vivo における抗癌剤効果を高率に予測しうると思われた。

2. 手術材料にてヌードマウス抗癌剤感受性試験が可能であった 10 例すべてにおいて、cultivated TCA による感受性判定が可能であった。また cultivated TCA の plating efficiency は、ヌードマウス抗癌剤感受性試験非可能群 (PE: $0.0115 \pm 0.0095\%$) よりも可能群 (PE: $0.0164 \pm 0.0071\%$) において有意に高値 ($p < 0.05$) を示した。

3. 手術材料において感受性判定可能なものは cultivated TCA で 28 検体中 15 検体 (53.6%) であったのに対し、ヌードマウス抗癌剤感受性試験では 28 検体中 10 検体 (35.7%) であった。

両感受性試験ともに判定可能であった 10 例について相関性を検討してみると、true positive rate 78.6%, true negative rate 83.9%, 全体として予測率 82.2%と有意な相関性 ($p < 0.01$) が得られた。よって cultivated TCA が prospective に高い信頼性をもって評価され、臨床効果を十分に予見しうる方法であることが実証された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授、ならびに金沢大学がん研究所佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導御教示を戴きました富田勝郎助教授に心から感謝いたします。併せて本研究遂行に際し御協力をいただいた横川、下崎両先生の他、整形外科腫瘍班の先生方に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第 65 回、66 回中部日本整形外科災害外科学会において発表された。

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 cancer in term of therapeutic responses. *Cancer Res.*, **16**, 684-697 (1956).
- 3) Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 4) Salmon, S. E.: Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. *Cancer Trest. Rep.*,

68, 117-125 (1984).

- 5) Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. & Makuch, R.: Association between human tumor colony forming assay result and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, **70**, 1027-1032 (1981).
- 6) Tomita, K. & Yokogawa, A.: Chemosensitivity testing with tumor colony-forming assay for human osteosarcoma. *J. Antibiot.*, **36**, 1228-1233 (1986).
- 7) 横川明男: Tumor colony forming assay の改良による骨肉腫のコロニー形成の研究. *十全医会誌*, **94**, 744-757 (1985).
- 8) 下崎英二: 軟部悪性腫瘍における human tumor clonogenic assay の研究. *十全医会誌*, **95**, 698-714 (1986).
- 9) Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehlen, B. G. M., Alberts, D. S. & Moon, T. E.: Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1321-1327 (1978).
- 10) Tomita, K., Yokogawa, A. & Nomura, S.: Human tumor clonogenic assay in osteosarcoma for evaluation of clinical efficacy of anti-cancer drugs. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **18**, 133-136 (1986).
- 11) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: Heterotransplantation of a human malignant tumors to "Nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **77**, 758-760 (1969).
- 12) Alberts, D. S., Chen, H. S. G. & Salmon, S. E.: In vitro drug assay. Pharmacologic considerations. In S. E. Salmon (ed.), *Cloning of Human Tumor Stem Cells*, p197-207, Alan R. Liss, Inc, New York, 1980.
- 13) Ovejera, A. A., Houchens, D. P. & Barker, A. D.: Sensitivity of a human tumor xenograft in nude mice to various clinically-active drugs. In T. Nomura, N. Ohsawa, N. Tamaoki, & K. Fujiwara (eds.), *In Proceedings of the Second International Workshop on Nude Mice*, p451-460, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
- 14) Ovejera, A. A., Houchens, D. P. & Barker, A. D.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **8**, 50-56 (1978).
- 15) 田代田鶴子, 藤本修一, 小林知雄, 稲葉 実: 人

癌/ヌードマウス系による制癌剤効果の評価に関する基礎的検討。癌と化学療法, 10, 973-980 (1983).

16) 阿部光俊: 悪性骨軟部腫瘍の制癌剤治療。日整会誌, 55, 1729-1741 (1971).

17) Rosen, G., Caparros, B., Huvos, A. G., Kosloff, C., Nirenberg, A., Cacavio, A., Marcove, R. C., Lane, J. M., Mehta, B. & 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).

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

19) 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. Rep.*, 6, 271-282 (1975).

20) 佐々木康綱: In vitro, in vivo 感受性テストの臨床的意義, 図説臨床[癌]シリーズ No.1 化学療法の進歩 (末外恵一, 西条長宏編), 第一版, 38-46 頁, メジカルビュー社, 東京, 1986.

21) Bogden, A. E. & Von Hoff, D. D.: Comparison of tumor cloning and subrenal capsule assay. *Cancer Res.*, 44, 1087-1090 (1984).

22) 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. & Sandbach, J. F.: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. *Cancer Res.*, 43, 1926-1931 (1983).

23) Povlsen, C. O., & Jacobsen, G. K.: Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Res.*, 35, 2790-2796 (1975).

24) 久保田哲朗: ヌードマウス可移植性人癌を用いた実験的化学療法。日外会誌, 78, 1069-1080 (1977).

25) Kubota, T., Shimosato, Y. & Nagai, K.:

Experimental chemotherapy of carcinoma of the human stomach and colon serially transplanted in nude mice. *Gann*, 69, 299-309 (1978).

26) Shimosato, Y., Kameya, T., & Nagai, K.: Transplantation of human tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 56, 1251-1260 (1976).

27) Tveit, K. M., Endresen, L., Rugstad, H. E., Fodstad, O., & Pihl, A.: Comparison of two soft-agar methods for assaying chemosensitivity of human tumors in vitro: Malignant melanomas. *Br. J. Cancer*, 44, 539-544 (1981).

28) Selby, P. J., Courtenay, V. D., McElwain, T. J., Peckham, M. J., & Steel, G. G.: Colony growth and clonogenic cell survival in human melanoma xenografts treated with Chemotherapy. *Br. J. Cancer*, 42, 438-447 (1980).

29) Straus, M. J. & Moran, R. E.: Cell cycle parameters in human solid tumors. *Cancer*, 40, 1453-1461 (1977).

30) Terz, J. J., Curutchet, H. P. & Lawrence, W.: Analysis of the cell kinetics of human solid tumors. *Cancer*, 28, 1100-1110 (1971).

31) Terz, J. J., Lawrence, W., & Cox, B.: Analysis of the cycling and non cycling cell population of human solid tumors. *Cancer*, 40, 1462-1470 (1977).

32) 水野恵文, 里村紀作, 田中紘一, 橋村孝幸, 谷川允彦: ヌードマウス移植腫瘍の制癌剤感受性に関する特性。J. Jpn. Soc. Cancer Ther., 20, 735-743 (1985).

33) Shackney, S. E., McCormack, G. W., & Cuchural, G. J.: Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy. *Ann. Intern. Med.*, 89, 107-121 (1978).

34) Volm, M., Krieg, L., Mattern, J. & Wayss, K.: Effect of synchronization on chemotherapy of solid transplanted tumors. *Europ. J. Cancer*, 13, 1099-1108 (1977).

35) 花谷勇治: ヌードマウス可移植性ヒトがん株を用いた in vivo および in vitro 制癌剤感受性試験。日外会誌, 83, 415-424 (1982).

36) 久保田哲朗, 石引久弥, 阿部令彦: Stem cell assay の基礎。制癌剤感受性の決定 (近藤達平編), 第1版, 144-154 頁, 金原出版, 東京, 1985.

Comparative Study of Chemosensitivity Tests for Bone and Soft Tissue Sarcomas Using Cultivated TCA and Nude Mice Jinsei Numata, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **97**, 496—509 (1988)

Key words : bone and soft tissue sarcoma, human tumor clonogenic assay, chemosensitivity test, nude mouse, tumor xenograft

Abstract

In chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas, an accurate chemosensitivity test has been greatly desired. Yokogawa and Shimozaki modified the original method of the human tumor clonogenic assay (HTCA) which has been regarded as a useful chemosensitivity test for carcinomas, and used this modified method of HTCA (cultivated TCA) in a chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas. The accuracy of the cultivated TCA, however, has not been completely elucidated. The present study demonstrates the ability of the cultivated TCA to predict the effects of antitumor agents *in vivo* in bone and soft tissue sarcomas. This cultivated TCA was compared with the nude mice chemosensitivity test, using the same sarcoma cells, which were human osteosarcoma cell line (OST), mouse sarcoma cell line (S-180), osteosarcoma and synovial sarcoma strains serially transplanted into nude mice, and 28 specimens of osteosarcoma, chondrosarcoma, malignant fibrous histiocytoma (MFH), liposarcoma, synovial sarcoma obtained by surgery in the past three years. In these cell lines, the success rate for the chemosensitivity test was 100% in both methods. The cultivated TCA highly correlated with the nude mice chemosensitivity test. The true positive and the true negative rates were 84.6% and 85.1%, respectively, and the all predictive rate was 85.0%. The association between the results of both chemosensitivity tests was significant ($p < 0.01$). In the sarcomas obtained by surgery, on the other hand, the success rate for the cultivated TCA and the nude mice chemosensitivity test was 64.3% and 35.7%, respectively. Ten specimens were evaluable in both chemosensitivity tests, and the true positive and the true negative rates were 78.6% and 83.9%, respectively. The all predictive rate was 82.2%. The association between the results of these two tests was significant ($p < 0.01$) as well. These results show that cultivated TCA can predict the effects of antitumor agents *in vivo* with a high accuracy. Therefore, cultivated TCA would be a useful chemosensitivity test in the field of bone and soft tissue sarcomas.