

# 造血器腫瘍における抗腫瘍剤感受性試験の臨床応用に関する研究

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9227">http://hdl.handle.net/2297/9227</a>

## 造血器腫瘍における抗腫瘍剤感受性試験の 臨床応用に関する研究

金沢大学医学部医学科内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

彼 谷 裕 康

これまでヒトの悪性腫瘍について抗腫瘍剤に対する種々の感受性試験が試みられてきているが、正常細胞の混入などの技術的問題、あるいは臨床的に使用された際の抗腫瘍剤の血中動態と、感受性試験での薬剤量との関係について検討されていないこと、などの問題のために未だ確立された方法はない。本研究では比較的簡便な感受性試験である 3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ドフェニルテトラゾリウムブロミド (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-dophenyl tetrazolium bromide, MTT) アッセイを用いて臨床応用のための基礎的実験とともに、造血器腫瘍患者より得た臨床検体についての試験を行い、有用性を検討した。基礎的検討の結果、分離した腫瘍細胞が80%以上になる検体で、培養期間はリンパ系細胞では2日間、骨髄系細胞では4日間とし、阻害率70%を感受性の有無の閾値と設定して、臨床検体での検討を行った。未治療の成人急性非リンパ性白血病 (acute nonlymphoblastic leukemia, ANLL) においては、真陽性率が92%、真陰性率が50%、予測率が87%、未治療の成人非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) については真陽性率が100%、真陰性率が0%、予測率が50%であった。難治療例、再発例の NHL においては真陽性率が100%、予測率が100%であり、MTT アッセイの結果と臨床の結果とが相関することが証明された。しかし、難治療例、再発例の ANLL では偽陽性が多かった。このため未治療例の検討ではあるが、多剤耐性 (multidrug resistance, MDR) との関連を検討したところ、MDR 発現が偽陽性例で多いということはなく、また、生体外でアントラサイクリン系抗腫瘍剤に対する感受性と MDR 発現について検討したが、有意な関連はなかった。この原因については、長時間薬剤と接触させることにより MDR の機構を越えて薬剤が細胞内に入る可能性と、別の耐性機序が存在する可能性とが考えられた。なお、造血器腫瘍において、感受性試験と MDR 発現の検索の両者を同時に行うことで、予後を推測できる可能性が生存率の成績から示唆された。

**Key words** chemosensitivity test, MTT assay, hematologic malignancy, multidrug resistance

これまでヒトの悪性腫瘍に対して抗腫瘍剤による種々の感受性試験が試みられてきており、固形腫瘍については二重寒天法 (human tumor clonogenic assay, HTCA)<sup>1)</sup>、3-(4,5-ジメチルチアゾル-2-イル)-2,5-ドフェニルテトラゾリウムブロミド (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-dophenyl tetrazolium bromide, MTT) アッセイ<sup>2)</sup>などが開発されてきた。しかし、検体中の正常細胞の混入などの技術的な問題、あるいは使用された際の抗腫瘍剤の血中動態と感受性試験での薬剤量との関係についての検討が困難であるなどの問題のために未だ確立された方法はない<sup>3)</sup>。白血病細胞は固形癌と比べて検体採取が容易で、また頻回に採取でき、感受性試験の検討には都合がよい。Hongo ら<sup>4)</sup>は小児の白血病において MTT アッセイを行い、予測率が70%を超え精度の高い有益な方法であると報告している。一方、下山ら<sup>5)</sup>は、従来の感受性試験では、薬剤を作用させた後もわずかに生き残りしかも増殖能を有するような細胞を測定することは困難であり、再増殖試験により検討すべきだと述べている。しかし、この方法では手技が極めて煩雑になり、判定までに時

間を要するという欠点がある。本研究では簡便にしかも迅速に結果を得ることができる感受性試験である MTT アッセイを選び、株化白血病細胞を用いて基礎的検討を行うとともに、得られた結果を基にして、急性白血病および非ホジキンリンパ腫 (non-Hodgkin's lymphoma, NHL) 患者より得た腫瘍細胞を用いて本法の臨床応用への可能性を検討した。さらに、抗腫瘍剤に対する薬剤耐性の発現は治療を困難にしている大きな要因の一つであり、近年多剤耐性 (multidrug resistance, MDR) 機序<sup>6)</sup>の関与が注目されていることから、本研究では同時に MDR の発現の有無を調べるとともに、MTT アッセイの結果ならびに臨床効果との関係を検討した。

### 対象および方法

#### 1. 材料および対象

##### 1. 細胞株

基礎実験用の細胞株は慢性骨髄性白血病の急性転化細胞株である K562 (理化学研究所細胞開発銀行, 和光, から供与) およ

平成8年5月16日受付, 平成8年7月12日受理

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; ANLL, acute nonlymphoblastic leukemia; AMixL, acute mixed lineage leukemia; APAAP, alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase; BSA, bovine serum albumin; CR, complete remission; DMSO, dimethyl sulfoxide; FAB, French-American-British; FBS,

びその doxorubicin 耐性株である K562/A (癌研究会癌化学療法センター, 東京, 鶴尾隆博士より供与) を 4 日に 1 度 20% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO, Gaithersburg, USA) 加 RPMI1640 (GIBCO) で  $1 \times 10^5$  個/ml に希釈し, 継代培養した. 実験には培養 4 日目で対数増殖期にある細胞を用い, 20%FBS 加 RPMI1640 に浮遊させ, 実験に供した.

## 2. 臨床検体

1992年12月から1995年3月までに金沢大学医学部第三内科およびその関連病院を受診した未治療急性白血病患者22例 (32検体), および未治療悪性リンパ腫患者8例 (9検体), ならびにそれぞれの再発・難治療例5例 (6検体) および3例 (3検体) について検討した. その内訳は急性非リンパ性白血病 (acute nonlymphoblastic leukemia, ANLL) でフランス-アメリカイギリス (French-American-British, FAB) 分類<sup>9)</sup> の M0 が 2 例, M1, 2 例, M2, 11 例, M3, 1 例, M4, 3 例, M6, 1 例および混合性白血病 (acute mixed lineage leukemia, AMiL) が 2 例であった. 急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL) では L2 が 3 例であった. 悪性リンパ腫では全例が NHL であった. このうち未治療例の ANLL の 17 例と AMiL の 2 例については, 同時に MDR の検討も行った.

### 1) 骨髄液, 末梢血

臨床検体ではリンフォプレップ (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway) にて単核球だけに分離し, 20%FBS 加 RPMI1640 に浮遊させ, 実験に供した.

### 2) リンパ節

生検リンパ節は半切したものをを用い, 20%FBS 加 RPMI 1640 の中で無菌的にハサミで細切した. その後 150 $\mu$ m のステンレスメッシュに通し, さらにリンフォプレップを用いて単核球を分離し, 実験に供した.

## II. 方法

### 1. MTT アッセイ

Mosmann<sup>9)</sup>, および Hongo ら<sup>9)</sup> の方法に準じ, 以下の検討を行った.

#### 1) 基礎実験

ドキソルビシンが最終的に 0.05 $\mu$ g/ml, 0.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml になるように 20%FBS 加 RPMI1640 で調整され各ウエル 150 $\mu$ l ずつ分注してある 96 ウエルマイクロプレート (96 well cell culture cluster 3596) (Costar, Corning, USA) に, 上記の細胞株浮遊液を 50 $\mu$ l ずつ分注した. 次に分注した細胞を 5%CO<sub>2</sub> の存在下で, 37 $^{\circ}$ C で 1 時間, 2 日間および 4 日間培養した. この後, リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH7.6) で希釈した 5mg/ml の MTT 試薬を 25 $\mu$ l ずつ添加し, 37 $^{\circ}$ C でさらに 3 時間培養した. その後, 2000回転で10分間遠心し, MTT フォルマザンを吸引しないように注意しながら上清を除去した. さらにジメチルスルフォキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (和光純薬, 大阪) 200 $\mu$ l を加えて攪拌し, マイクロフォトメーター (EAR340) (SLT, Vienna, Austria) で, 測定波長 550nm, 対照 630nm の条件下で測定した. なお, コントロールとして抗腫瘍剤の代わりに 20%FBS 加 RPMI1640

を 150 $\mu$ l 入れたものを用いた. 抗腫瘍剤非添加細胞ウエルと添加細胞ウエルとの吸光度の差の抗腫瘍剤非添加細胞ウエルの吸光度に対する割合, すなわち, コントロールに対する死滅細胞の割合を求め, これを阻害率 (inhibition index, I I) とした.

#### 2) 臨床検体

抗腫瘍剤が最終的に理論的最高血中濃度, およびその 1/10, 1/100 になるように 20%FBS 加 RPMI1640 で調整し各ウエルに 150 $\mu$ l ずつ分注してある 96 ウエルマイクロプレートに, 上記のように処理した検体を 50 $\mu$ l ずつ分注した. なお, 抗腫瘍剤の最高濃度は本郷ら<sup>9)</sup> の報告のように常用量を静脈内投与し均等に拡散したと仮定したときの血中濃度を原則としたが, 着色性のアントラサイクリン系薬剤では, 吸光度に影響を与えないように更に 1/2-1/10 に希釈して用いた. 表 1 に試験薬剤とその濃度を示した. 次に分注した細胞を 5%CO<sub>2</sub> の存在下で, 37 $^{\circ}$ C で培養した. この後, PBS で希釈した 5mg/ml の MTT 試薬を 25 $\mu$ l ずつ添加し, 37 $^{\circ}$ C でさらに 3 時間培養した. その後, 2000回転で, 10分間遠心し, MTT フォルマザンを吸引しないように上清を除去した. さらに DMSO 200 $\mu$ l を加えて攪拌し, EAR340 で, 測定波長 550nm, 対照 630nm の条件下で測定した. なお, 効果は基礎実験同様, 阻害率で判定した.

## 2. 細胞株を用いた基礎的検討

### 1) 細胞数と吸光度との関係

吸光度は, 細胞数あるいは細胞の大きさ, 細胞の種類などによって異なり, 細胞株と臨床検体では異なることが予想される. 本実験では, 細胞数と吸光度との関係を検討するために, K562/A の細胞数を 2,000 個/ウエル, 10,000 個/ウエル, 20,000 個/ウエル, 100,000 個/ウエル, 200,000 個/ウエル, 500,000 個/ウエルおよび 750,000 個/ウエルの 7 種類となるように調整し, それぞれ MTT 試薬と 3 時間反応させ, MTT アッセイによる感受性試験を行った. なお, この実験より得られた結果から, 臨床検体の感受性試験においての細胞数を調整した.

### 2) 細胞増殖曲線

96 ウエルマイクロプレートに  $1 \times 10^5$  個/ml に調整した K562/A を 50 $\mu$ l ずつ分注し 1, 2, 3, 4, 5, 6 および 7 日間培養

Table 1. Concentrations of anticancer drugs

Anticancer drugs	Concentration tested ( $\mu$ g/ml)		
	Low	Intermediate	High
Doxorubicin	0.05	0.5	5
Mitoxantrone	0.05	0.5	5
Daunorubicin	0.1	1	10
Methotrexate	1	10	100
Etoposide	3	30	300
Cytarabine	4	40	400
Cisplatin	0.5	5	50
Vincristine	0.004	0.04	0.4

fetal bovine serum; HTCA, humantumor clonogenic assay; JALSG, Japan Adult Leukemia Study Group; MDR, multidrugresistance; MDS, myelodysplastic syndrome; MTT, (3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-dophenyl tetrazolium bromide; NHL, non-Hodgkin's lymphoma; NR, no response; PBS, phosphate-buffered saline; P-gp, P-glycoprotein; PR, partial remission

し、各細胞濃度および MTT アッセイによる吸光度をプロットし、細胞増殖曲線を得た。

### 3) 培養時間と感受性の検討

ドキソルビシンが最終的に 0.05 $\mu$ g/ml, 0.5 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml になるように 20%FBS 加 RPMI1640 で調整され各ウェル 150 $\mu$ l ずつ分注してある 96 ウェルマイクロプレートに、20%FBS 加 RPMI1640 で 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/ml に調整された K562 と K562/A をそれぞれ 50 $\mu$ l ずつ分注し、培養時間を 1 時間、2 日間および 4 日間の三種類の実験系を作った。培養後、MTT アッセイを行いそれぞれドキソルビシン濃度が 0.05 $\mu$ g/ml, 5 $\mu$ g/ml における阻害率を求め、感受性の違いについて検討した。

### 4) 検体中の腫瘍細胞の占める割合と MTT アッセイに及ぼ

す影響

可及的に腫瘍細胞の占める割合の多い検体を用いたが、分離した細胞中に線維芽細胞、正常リンパ球、正常単球、正常幼若顆粒球の混入は避けられない。正常細胞が多いと正確に腫瘍細胞の感受性を判定できず偽陽性、偽陰性が多くなる恐れがある。そこで、検体中に腫瘍細胞が何%以上占めれば、偽陽性、偽陰性を最小限に止めることができるかについて検討した。ドキソルビシン感受性の K562 と耐性の K562/A を各 5 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/ml の濃度とし、それぞれ 5:5, 3:7, 2:8, 0:10 の割合で混ぜた後、50 $\mu$ l を上記と同様に三種類の濃度のドキソルビシンの入った 96 ウェルマイクロプレートに分注し、4 日間培養して MTT アッセイを行い、阻害率を求めた。

### 3. 臨床検体による MTT アッセイと臨床結果との相関

Table 2. Chemotherapy protocols

Chemotherapy regimen	Anticancer drug	Administration		
		Dose (mg/m <sup>2</sup> )	Duration (day)	
JALSG-AML-92 A)	Behenoyl cytosine arabinoside	200	1-10	
	Daunorubicin	40	1-4, 8-9	
	6MP	70	1-10	
	B)	Behenoyl cytosine arabinoside	200	1-7
		Etoposide	100	1-5
		Daunorubicin	40	1-4
		6MP	70	1-7
		When patients do not obtain CR,		
		Mitoxantrone	7	1-3
	Cytosine arabinoside	200	1-5	
Strong ACOP	Doxorubicin	30	1, 8	
	Cyclophosphamide	500	1, 8	
	Vincristine	1.4	1, 8	
	Prednisolone	40	1-7	
	DBEP	Daunorubicin	35	1-3
	Behenoyl cytosine arabinoside	200	1-7	
	Etoposide	70	1-5	
	Prednisolone	20	1-7	
	JALSG-ALL-93	Vincristine	1.3	1, 8, 15, 22
	Doxorubicin	30	1-3, 8	
	Prednisolone	40	1-10	
	L-asparaginase	6,000	29-35	
	Cyclophosphamide	600	29	
	CHOP	Doxorubicin	50	1
	Cyclophosphamide	750	1	
	Vincristine	1.4	1	
	Prednisolone	40	1-5	
	MMIPE	Mitoxantrone	15	1
		Methotrexate	400	1
Ifosfamide		2000	1	
Prednisolone		20	1-5	
Etoposide		70	1-5	
MMEP		Mitoxantrone	15	1
	Methotrexate	400	1	
	Etoposide	70	1-5	
	ICE	Prednisolone	20	1-5
		Ifosfamide	1000	1-2
		Etoposide	150	1-2, twice a day
Carboplatin		200	1-2	

JALSG, Japan adult leukemia study group; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia

急性白血病患者および悪性リンパ腫患者、ならびにそれぞれの再発・難治療例より得た腫瘍細胞について MTT アッセイを行い、理論的最高血中濃度(本実験系では高濃度)における阻害率を求め、臨床効果との比較検討を行った。

#### 1) 化学療法

ANLL に対しては日本成人白血病治療グループ (Japan adult leukemia study group, JALSG) のプロトコールに従ったものが18例で、強化 (strong) ACOP 療法を行ったものが1例、DBEP 療法を行ったものが1例であった。ANLL 難治療例に対しては上記の化学療法のうちそれまで最も効果があったと思われるものか、あるいはその組み合わせで行った。1例で少量シタラビン (low-dose araC) 療法<sup>11)</sup>を行った。ALL に対してはすべて JALSG のプロトコールに従った。NHL に対しては CHOP 療法を行ったものが8例で MMIPE 療法を行ったものが1例であった。NHL 難治療例、再発例に対しては MMEP 療法が2例、ICE 療法が1例であった。表2に各々の化学療法の内容を示した。

#### 2) 臨床効果判定基準

効果判定は以下のように本郷ら<sup>10)</sup>の判定に準じて行った。

完全寛解 (complete remission, CR), ANLL および ALL においては、1コース後の骨髄穿刺で白血病細胞が5%以下となり、全身状態の改善とともに血液学的所見の正常化がみられ、しかもこの状態が1か月以上持続した場合を CR とした。NHL においては2コースの化学療法で臨牀的、画像診断上病変が検出されなくなった場合を CR とした。

部分寛解 (partial remission, PR), ANLL および ALL においては、1コース後の骨髄穿刺で白血病細胞は減少したものの、5%から15%残存している場合を PR とした。NHL においては2コースの化学療法で評価可能病変が50%以上縮小し、B症

状の消失が認められた場合に PR とした。

非寛解 (no response, NR), ANLL および ALL においては、1コース後の骨髄穿刺で白血病細胞が一旦は減少するものの最終的には寛解とならない場合、NHL においては2コースの化学療法で寛解に入らなかった場合を NR とした。

#### 3) 総合評価

感受性試験と臨床効果とを合わせて検討し、以下の基準で総合評価を試みた。真陽性は感受性ありと判断された薬剤1剤以上を使用し、CR あるいは PR に達したもの、偽陽性は感受性ありと判断された薬剤1剤以上を使用したが、NR であったもの、偽陰性は感受性なしと判断された薬剤のみを使用したもの、CR あるいは PR となったもの、真陰性は感受性なしと判断された薬剤のみを使用し、NR であったものとした。以上の評価から、真陽性率、真陰性率、予測率を算定した。真陽性率、真陰性率、予測率の計算方法は Clark ら<sup>12)</sup>の方法に従った。真陽性率 = 真陽性 / (真陽性 + 偽陽性)、真陰性率 = 真陰性 / (偽陰性 + 真陰性)、予測率 = (真陽性 + 真陰性) / (真陽性 + 偽陽性 + 偽陰性 + 真陰性)。

#### 4. 多剤耐性現象と臨床との相関

##### 1) 多剤耐性P糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp) の検出

採取した末梢血あるいは骨髄血からリンフォブレップを用いて単核球を分離した。次に、20%FBS 加 RPMI1640 に浮遊させ、 $1 \times 10^6$  個/ml の濃度に調整し、サイトスピン (Cytospin 2) (Shandon Southern Products Ltd., Cheshire, England) を用い、800回転10分にてスライドガラスに塗抹し乾燥させた。この標本は  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結し、染色時まで凍結保存した。染色は APAAP KIT システム (DAKO, Carpinteria, USA) を用いた。染色時標本を室温に置き、ゆっくりと  $20^{\circ}\text{C}$  まで戻した後、 $4^{\circ}\text{C}$  のアセトンで20分間固定した。固定後、標本を十分に風乾し以

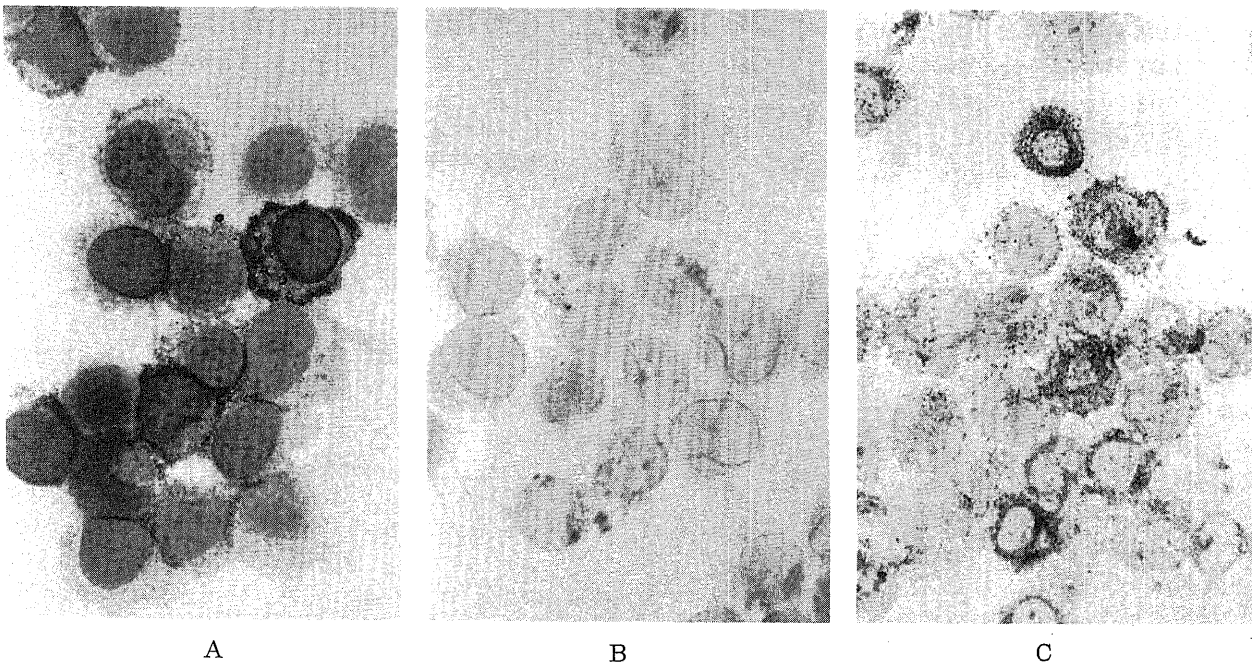


Fig. 1. Immunostain of positive control, negative control and MDR expression of a case S. M. (A) MDR-positive cell line K562/A was stained as positive control. (B) As negative control, MDR-positive cell line K562/A was stained using mouse IgG2a instead of C219 monoclonal antibody. (C) 69.9% of leukemic cells obtained from a case S. M. were positive. Cytoplasm was stained with many red granules. Original magnification,  $\times 1,000$ .

下の処理を行った。P-gp の細胞質側ドメインを認識するモノクローナル抗体である C219 抗体 (Centcor Diagnostics, Malvern, USA) を 10%FBS 加 0.5M Tris バッファーにて 10 $\mu$ g/ml に調整し、その 50 $\mu$ l を標本にのせ、室温で 1 時間反応させた。その後、0.1% ウシ胎児血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma Chemical, St. Louis, USA)-0.05M Tris バッファーで 3 回洗浄し、余分な液体を拭い、二次抗体 (ポリクローナル抗マウスイムノグロブリン・ウサギ抗体) をのせて室温で 30 分間反応させた。0.1% BSA-0.05M Tris バッファーで 2 回洗浄した後、アルカリフォスファターゼ・抗アルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase anti-alkaline phosphatase, APAAP) 抗体 (マウス) 複合体をのせ、室温で 30 分間反応させた。次にナフトール AS-MX リン酸塩およびファストレッド TR を混合した錠剤を 0.5M Tris バッファーで溶解し、標本にのせ、室温で 20 分間発色させた後、蒸留水で洗浄した。さらにマイヤー・ヘマトキシリンで 1 分間後染色を施し、流水で 15 分間洗浄の後、乾燥させ、鏡検した。

## 2) P-gp 陽性細胞の算定

顕微鏡下で対物レンズ 100 倍 (油浸) を用いて白血病細胞を順に 1,000 個観察し、明らかに赤く染まっているものを陽性細胞として、その割合 (陽性率) を求めた。

## 3) コントロール

陽性コントロールには、細胞株 K562/A で上記のように染色したものを用いた。陰性コントロールには、C219 抗体の代わりにマウス IgG2a を用いて染色したものを使用した (図 1)。

## 5. アントラサイクリン系薬剤における MTT アッセイと MDR 発現との関係の検討

ANLL 患者 17 人および混合性白血病の 2 人についてアントラサイクリン系薬剤に対する感受性と P-gp 発現の有無について検討した。さらに感受性と P-gp 発現の有無により、これらの症例を MDR 陽性 MTT 感受性 (+), MDR 陽性 MTT 感受性 (-), MDR 陰性 MTT 感受性 (+), MDR 陰性 MTT 感受性 (-) の 4 群に分けて Kaplan-Meier 法による生存曲線を求めた。

## 成 績

### 1. 基礎実験

#### 1. 細胞数と吸光度との関係

図 2 のように MTT アッセイにおいては吸光度 0.1 から 1.3 の範囲で細胞数との間に正の相関が認められ、臨床検体でもこの範囲内であれば吸光度から生細胞数の予測が可能であると考えられた。したがって、実験開始時に蒔く細胞数は、細胞株では急激に増殖することを考慮し、図 2 の検討可能な最小吸光度である 0.1 に対応する細胞数、すなわち 25,000 個/ウェルとし、一方臨床検体では、増殖よりも死滅していく細胞が多いために、検討可能な最大吸光度である 1.3 に対応する細胞数、すなわち 500,000 個/ウェルとした。

#### 2. 細胞増殖曲線

図 3 のように MTT アッセイにおける吸光度および細胞数と培養時間の関係を見ると、吸光度は 5 日で 1.4 に達して以降上昇傾向が止った。一方、細胞数は 3 日目までは急激に増加するが、以降は平衡を保ち、5 日目には減少し始めた。したがって K562 および K562/A に関しては、至適培養期間は 5 日までと考えられた。

### 3. 培養時間と感受性の検討

図 4 のように 1 時間ではかなりばらつきがあるもののドキシソルビン感受性の K562 と耐性の K562/A の平均阻害率は、低濃度 (理論的最高血中濃度の 1/100) 1 時間の曝露でそれぞれ 15.6%, -1.6%, 2 日間で -6.5%, -3.5%, 4 日間で 31.6%, -1.67%, 高濃度 (理論的最高血中濃度) 1 時間で 2.3%, 7.0%, 2 日間で 61.0%, 26.0%, 4 日間で 93.3%, 39.0% であった。4 日間の培養で K562 と K562/A の阻害率に最も差が認められた ( $p=0.0269$ , Welch's *t* test)。また、臨床検体で感受性の有無を決定する際の閾値について様々な報告<sup>57)8)</sup>はあるが、本実験において、それぞれの薬剤に対する阻害率を上記 ANLL31 検体で検討すると、それぞれの中央値が 60% から 93% の間であったこと、また、高濃度のドキシソルビン曝露下 4 日間培養の K562 と K562/A のそれぞれの阻害率の差の midpoint が 27.2% であり、両者のどちらにも片寄らないように中間値をとると 66.2% になること、さらに、閾値の設定を低くすると効果的な薬剤をスクリーニングするという目的にはそぐわなくなることから、阻害率 70% を閾値とした。

### 4. 分離した白血病細胞の割合の検討

K562 と K562/A を種々の割合に混合して MTT アッセイを

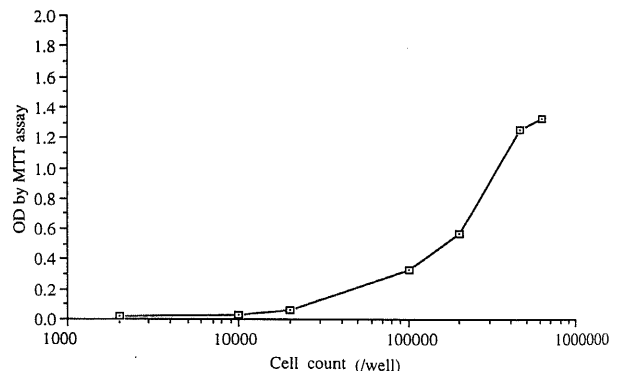


Fig. 2. Relationship between OD by MTT assay and cell counts in K562/A cell line. There was a linear correlation with absorption and cell counts between 0.1 and 1.3 in OD.

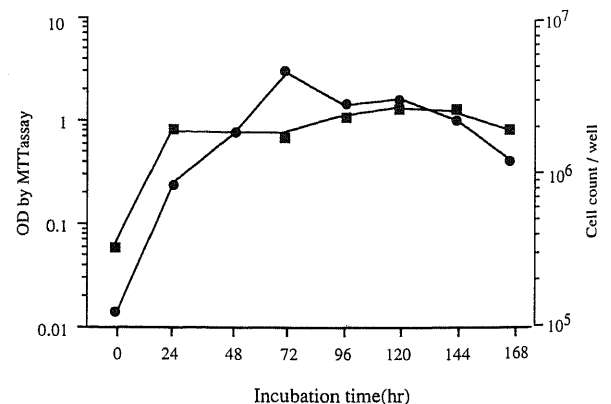


Fig. 3. Proliferation curves of K562/A cell line according to OD by MTT assay and cell counts. ■, OD; ●, cell count.

行くと、高濃度のドキソルビンでは K562/A の割合が50%なら阻害率が74%、70%ならば66%、80%ならば65%、100%ならば50%となり、標準偏差も含めると、ドキソルビン耐性細胞が80%以上であれば阻害率が70%以下となり、MTT アッセイにより耐性と判定可能であった(図5)。したがって、腫瘍細胞が全単核球の80%以上あれば偽陽性を少なくすることができると考えられた。

本実験で用いた抗腫瘍剤の中にはシタラビンのように時間依存性に抗腫瘍効果を発揮するものも含まれることから、臨床検体では培養時間を4日間とし、阻害率の閾値は70%に設定し判定した。ただし、リンパ系腫瘍細胞については、3日間以上培養すると対照の細胞もほとんど死滅してしまうので、2日間の短期の培養で判定した。なお、分離した単核球のうち、腫瘍細胞が80%以上を占めているもののみについて検討した。

II. 臨床検体による MTT アッセイと臨床効果との相関

1. 総合評価

表3に示すように高濃度(理論的最高血中濃度)における感受性試験の結果と、化学療法の臨床効果とを比較検討した。未治療のANLLでは、真陽性率が92%、真陰性率が50%、予測率

が87%であった。難治療例では、真陽性率が17%、予測率が17%であった。未治療のALLでは、真陽性率が0%、真陰性率が50%、予測率が33%であった。NHLでは、真陽性率が100%、真陰性率が0%、予測率が56%であった。難治療例および再発例のNHLでは、真陽性率が100%、真陰性率が0%、予測率が100%であった。

2. 末梢血と骨髄液による判定の差異

ANLLの5例において末梢血と骨髄液で感受性を比較すると、図6に示すように、高濃度のドキソルビンと高濃度のダウノマイシンでそれぞれ1例、低濃度のシタラビンで3例において両者の間に感受性の判定に差異の認められるものがあった。しかし、低濃度のドキソルビン、ダウノマイシン、低濃度および高濃度のエトポシド、高濃度のシタラビンでは、末梢血と骨髄液との間に差はみられなかった。したがって、アントラサイクリン系の薬剤およびエトポシドにおいては、末梢血と骨髄液による差異は認められず、容易に検体の得られる末梢血でも十分検討できるものと考えられた。

3. 感受性試験の臨床応用

ANLL-M4 難治療例 N.M. の感受性試験の結果をみると、図

Table 3. Relationship of chemosensitivity between in vitro and in vivo

Type of diseases	No. of cases examined	No. of cases				TP rate <sup>a)</sup>	TN rate <sup>b)</sup>	Predictive accuracy (%)
		TP	FP	FN	TN			
Untreated ANLL	30	24	2	2	2	24/26	2/4	87
Refractory ANLL	6	1	5	0	0	1/6	0/0	17
Untreated ALL	3	0	1	1	1	0/1	1/2	33
Untreated NHL	9	5	0	4	0	5/5	0/4	56
Refractory or relapse NHL	3	3	0	0	0	3/3	0/0	100

TP, true positive ; FP, false positive ; FN, false negative ; TN, true negative.

a) No. of true positive cases/ (No. of true positive cases+No. of false positive cases).

b) No. of true negative cases/ (No. of true negative cases+No. of false negative cases).

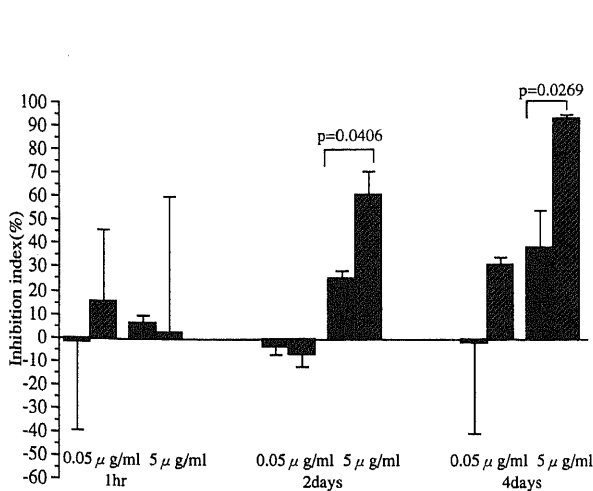


Fig. 4. Change in chemosensitivity according to the incubation time. There was a significant difference between inhibition indexes of K562 and K562/A cells in the incubation for 4 days. Therefore the incubation time was decided as 4 days. ■, K562 cells; ▨, K562/A cells.

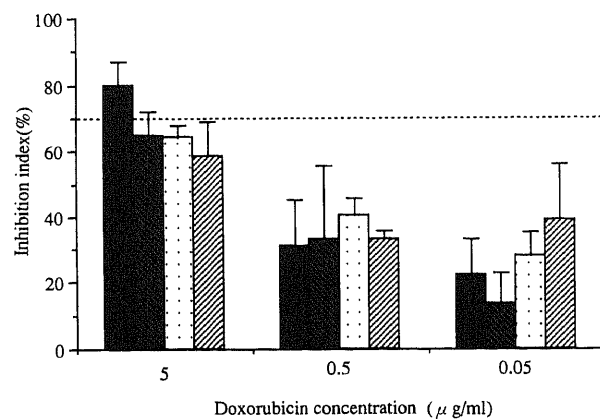


Fig. 5. MTT assay by combination with K562 and K562/A in various proportions. Sample was judged as resistant in the MTT assay when resistant cells were more than 80% of all sample cells. Therefore malignant cells were needed more than 80% of all mononuclear cells population when 70% was defined as cut off level of an inhibition index. ----, cut off level. Percentage of K562/A cells: ■, 50%; ▨, 70%; □, 80%; ▩, 100%.

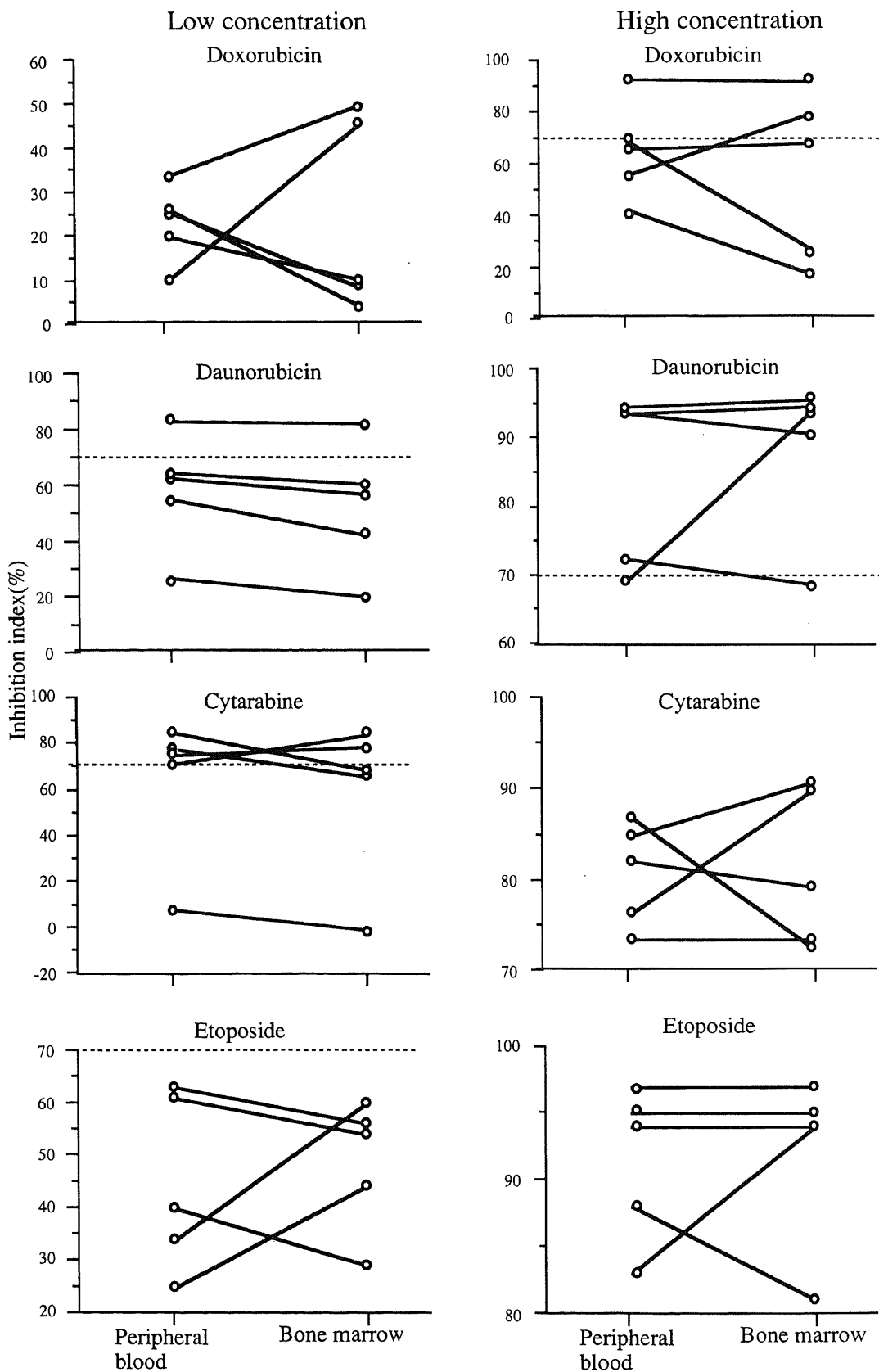


Fig. 6. Comparison of inhibition index between peripheral blood cells and bone marrow cells. There was no divergence between the inhibition indexes of leukemic cells in peripheral blood and those in bone marrow except for one patient showing different inhibition indexes at high concentration of doxorubicin and daunorubicin when the cut off level was decided as 70%. -----, cut off level.



7のようにシタラビンにおいては低濃度でも感受性が高かったために、その結果を参考にして少量シタラビンを長期間投与したところ寛解に達した。

Ⅲ. 多剤耐性現象と臨床との相関

1. 多剤耐性現象と FAB 分類および臨床効果との関係

MDR 発現と FAB 分類との関係では、図 8 に示すように M4 で高頻度に発現がみられ、その陽性度も高かった。また、寛解率との間には相関は認められず、再発率との間にも明らかな相関はみられなかった(表 4)。

2. アントラサイクリン系抗腫瘍剤に対する感受性と MDR 発現

表 5 のように 19 例中 8 例で MDR 陽性にもかかわらず、MTT アッセイ上アントラサイクリン系抗腫瘍剤に対する感受

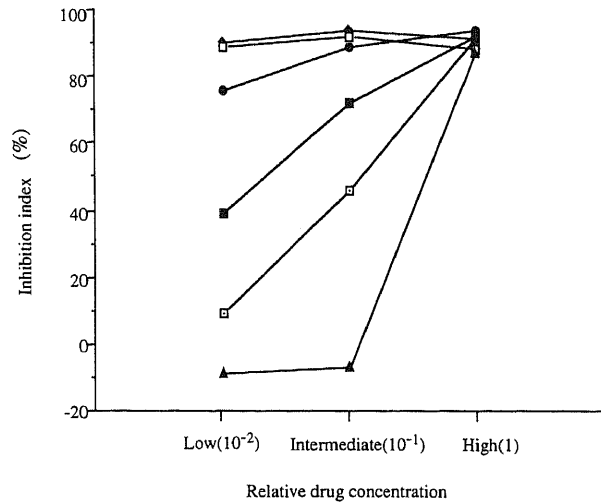


Fig. 7. Chemosensitivity test of the leukemic cells obtained from a refractory M4 patient by MTT assay. The inhibition indexes of doxorubicin, daunorubicin, and mitoxantrone at high concentration was more than 90%. the inhibition index of cytarabine at low concentration was also more than 90%. Therefore low dose therapy of cytarabine was chosen in this patient, resulting in complete remission. □, doxorubicin; ◆, daunorubicin; ●, mitoxantrone; ■, etoposide; □, cytarabine; ▲, cisplatin.

Table 4. Relationship between MDR expression and clinical outcomes

MDR expression	No. of cases		No. of CR or PR cases	No. of NR cases
	Relapse			
	+	-		
Positive	3	6	8	2
Negative	2	8	7	2

MDR, multidrug resistance ; CR, complete remission ; PR, partial remission ; NR, no response.  
There was no significant correlation between MDR expression and relapse.  
There was no significant correlation between MDR expression and clinical outcomes.

Table 5. MDR expression and MTT assay

Group	Name of patient	FAB classification	Outcome	MDR expression (%) <sup>a)</sup>	Result of MTT assay <sup>b)</sup>	Date (year, month, day) of			
						Diagnosis	Relapse	Death	
MDR-, MTT. R	I.K.	M2	NR	0.00	R	94.06.16		94.08.14	
MDR+, MTT. R	I.T.	M0	NR	4.80	R	94.03.28		94.05.27	
MDR- MTT. S	S.T.	M0	CR	0.00	S	93.10.26	94.09.04	Alive	
	N.H.	M1	CR	0.00	S	94.09.02		Alive	
	A.S.	M1	PR	0.00	S	93.10.15		93.12.15	
	I.S.	M2	NR	0.00	S	94.07.05		95.03.14	
	O.M.	M2	CR	0.00	S	94.05.30	95.06.01	Alive	
	S.T.	M2	CR	0.00	S	94.07.06		Alive	
	N.H.	M2	CR	0.00	S	93.11.04	94.05.26	Alive	
	O.A.	M6	CR	0.00	S	94.07.19		Alive	
	H.Y.	M2	CR	0.80	S	93.10.26	94.06.07	95.01.14	
	MDR+, MTT. S	Y.S.	M3	CR	1.00	S	93.08.15		Alive
		T.K.	M2	CR	3.90	S	94.02.04		Alive
N.T.		M2	PR	4.90	S	93.08.16		95.05.05	
M.M.		M4	CR	8.00	S	94.02.28	94.11.01	95.03.19	
M.M.		A Mix L	NR	9.10	S	93.07.29		94.06.06	
F.J.		A Mix L	CR	19.60	S	94.04.27	94.12.01	94.12.31	
K.Y.		M4	CR	31.00	S	94.04.19		Alive	
S.M.		M4	CR	69.90	S	94.01.20	94.07.05	94.10.30	

FAB, French-American-British ; MDR, multidrug resistance ; MTT, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide ; CR, complete remission ; PR, partial remission ; NR, no response ; A Mix L, acute mixed lineage leukemia. MDR-, MTT. R, MDR-negative and in vitro resistant ; MDR+, MTT. R, MDR-positive and in vitro resistant ; MDR-, MTT. S, MDR-positive and in vitro sensitive ; MDR+, MTT. S, MDR-positive and in vitro sensitive ; S, sensitive ; R, resistant.

a) MDR (C219) positive rate.

b) In vitro chemosensitivity in anthracyclines by MTT assay.

Table 6. Relationship in anthracyclines between MDR expression and MTT assay

MDR expression	No. of cases showing MTT assay	
	Sensitive	Resistant
Negative	9	1
Positive	8	1

MDR, multidrug resistance; MTT, 3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-dophenyl tetrazolium bromide.

There was no significant correlation in anthracyclines between MDR expression and in vitro chemosensitivity.

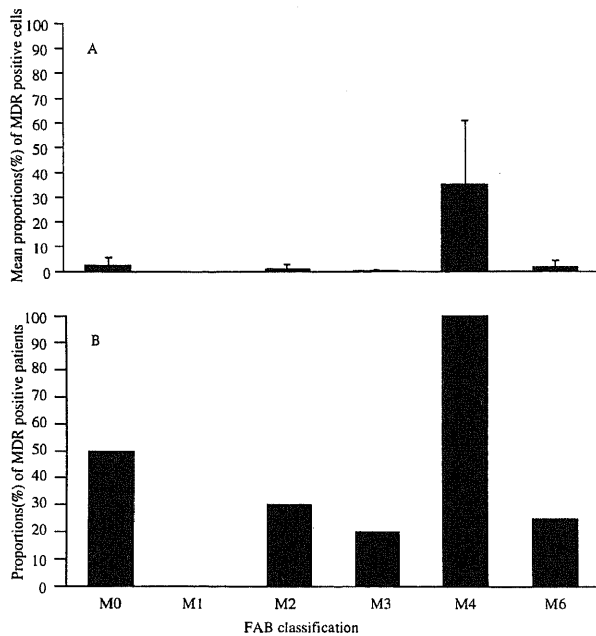


Fig. 8. MDR expression according to FAB classification. M4 showed the highest proportions of MDR expression in MDR-positive leukemic cells (A) and MDR-positive patients (B). Bars, SD.

性が認められた。また、1例 (I. K.) で MDR 陰性にもかかわらず、MTT アッセイでは耐性であった。さらに、未治療例の ANLL のうち MTT アッセイ上感受性があり臨床の結果が NR の偽陽性例で MDR の発現頻度が高いということもなかった。アントラサイクリン系抗腫瘍剤に対する感受性と MDR 発現の間にも  $\chi^2$  検定で有意な関連はなかった (表 6)。

### 3. アントラサイクリン系抗腫瘍剤における感受性試験と MDR 発現との組み合わせと予後の関係

ANLL および AMixL の 19 例を MDR 陽性 MTT 感受性 (+), MDR 陽性 MTT 感受性 (-), MDR 陰性 MTT 感受性 (+), MDR 陰性 MTT 感受性 (-) の 4 群に分けると、死亡率はそれぞれ 63%, 100%, 33%, 100% となり、4 群の Kaplan-Meier 法による生存曲線は図 9 のようになった。50% 生存率はそれぞれ 384 日, 60 日, 算定不能, 59 日であった。しかし、一般化 Wilcoxon 検定で、MDR 陰性 MTT 感受性 (+) と MDR 陰性 MTT 感受性 (-) および MDR 陽性 MTT (-) の間では有意な差は認められなかったが、MDR 陰性で MTT による感受

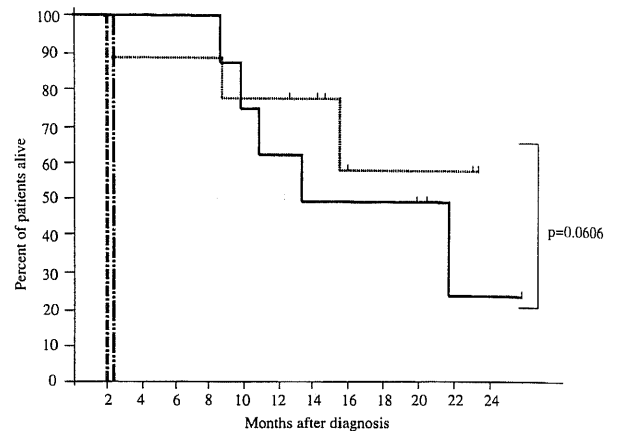


Fig. 9. Survival curves in 4 groups according to combination of MDR and MTT assay. The survival duration at 50% in MDR+, MTT.S group was 384 days, MDR-, MTT.R group 59 days, and MDR+, MTT.R group 60 days, respectively. Vertical lines indicate patients who are alive. —, MDR+, MTT.S; ·····, MDR-, MTT.S; - - - - , MDR+, MTT.R; - - - - , MDR-, MTT.R.

性のあるほうが予後がよい傾向が認められた ( $p=0.06$ ).

## 考 察

これまでヒトの悪性腫瘍に対して種々の抗腫瘍剤感受性試験が試みられてきているが、未だ確立はしていない。Hongo ら<sup>5</sup> は小児の白血病細胞を用いて MTT アッセイを行い、その結果から本法は抗腫瘍剤に対する感受性を検討するには極めて有用な方法であると報告している。本研究では、抗腫瘍剤感受性試験として MTT アッセイを用いることとし、まず、MTT アッセイを臨床応用するための基礎的検討をし、検体の選択基準の設定、培養および測定条件の確立ならびに感受性判定閾値の決定を行った。これらの検討は、感受性試験を普遍化するうえで極めて重要である。まず、吸光度について検討した。吸光度が極端に低いと値にばらつきが認められ、極端に高いとフォルマザンが飽和状態になっており正確な値を反映しないなどの理由から、吸光度は 0.1 から 1.3 の範囲内で検討することとした。次に培養日数についてみると、本郷ら<sup>19</sup> は 2 日間かあるいは 4 日間で、Campling ら<sup>10</sup> は 2~5 日間で、その他の報告では 4 日間で検討されている<sup>15-20</sup>。今回の細胞株を使った基礎的検討では、ドキソルビン耐性である K562/A 細胞のドキソルビンによる阻害率と、ドキソルビンに感受性のある K562 細胞の阻害率との差が 4 日間培養で最も大きく、シタラビンなどの時間依存性薬剤も同時に検討することを考慮すると 4 日間が適当と考えられた。しかし、リンパ系の細胞においては 2 日間の培養でも死滅するものが多いとされており<sup>19</sup>、本実験でも同様の結果であったために、時間依存性薬剤に関しては阻害率が低く判定される危険性はあるものの、2 日間の培養とした。次に各ウェルに蒔く細胞数に関して検討した。細胞株は急激に増殖するために検討可能な最小吸光度である 0.1 に対応する細胞数である 25,000 個/ウェルでよく、一方、臨床検体では、細胞の増殖はほとんどみられず、むしろ死滅して減少するものが多いことを考慮して、検討可能な最大吸光度である 1.3 に対応する細胞数の 500,000 個/ウェルを蒔くこととした。感受性の有無の判定については、K562 と K562/A の阻害率の差の最も大きく

なる4日間培養でのK562, K562/Aそれぞれの阻害率の中間値が約70%であり、また、各種抗腫瘍剤に対するANLL31検体の阻害率の中央値が60%から93%であったことから、本実験では、閾値を70%に設定した。本試験を臨床に応用する場合には、分離調整した検体中に占める腫瘍細胞の割合が判定に影響を与えることが予想される。このことを検討するために上記のような条件を設定した上で、K562とK562/Aとを一定の比率で混合して影響を調べた。その結果、耐性の細胞が80%以上あれば耐性として判定でき、偽陽性も少なくなると考えられることから、腫瘍細胞が80%以上を占めるものについてのみ検討することとした。したがって、臨床検体で検討する場合は、分離した細胞のうち腫瘍細胞が80%以上を占めるのもののみを用い、細胞数を500,000個/ウェルで蒔き、2日間(リンパ系)あるいは4日間(骨髄系)培養し、感受性の有無の閾値を70%として判定した。

未治療のANLLについては80%を超える高い予測率が得られたが、ALLについては30%台の低値に止った。小児の白血病において報告<sup>9)</sup>されているように、成人の未治療のANLLにおいても臨床の効果と相関することが明らかになった。また、難治療例、再発例についてみると、ANLLでは予測率が低かったがNHLにおいては100%と高く、NHLにおいては再度リンパ節生検を行い本法を用いることにより、かなり高い精度で抗腫瘍剤の効果を予測可能であることが明らかとなった。しかし、難治療例、再発例のANLLについては偽陽性が多く、予測率は17%と低値に止った。この原因の一つとして、武本<sup>9)</sup>が述べているように、感受性試験での薬剤濃度と生体内での薬剤動態に差異のあることが考えられる。実際の症例でみると、N.M.例のように臨床使用時の薬剤濃度に近い値で効果判定するとより高い精度で効果を予測できることが示唆された。

化学療法回数を重ねると薬剤に対して耐性を獲得することが知られており<sup>7)</sup>、臨床上也このような例をしばしば経験し、治療に難渋する。耐性の獲得には何らかの薬剤耐性機序の存在が考えられている。近年化学療法の強力化により急性白血病の治療成績は向上してきたものの依然として15~40%の症例が寛解に到らず治療抵抗性を示す。その原因の一つとしてアントラサイクリン系抗腫瘍剤、植物アルカロイドなどの薬剤に共通して薬剤耐性を生ずるMDRの存在が明らかになってきた<sup>7)</sup>。MDRは、細胞膜に発現したP糖蛋白が薬剤を外に排出するポンプの役割をなし、このために細胞内に一旦取り込まれた抗腫瘍剤がそのまま排出されてしまい効果を発揮できなくなり、耐性を生ずるのではないかと考えられている<sup>22,23)</sup>。1986年にはP糖蛋白をコードするmdr1遺伝子が単離された<sup>24)</sup>。Maら<sup>25)</sup>はP糖蛋白の細胞質側ドメインを認識するC219モノクローナル抗体を用いて免疫染色法を行い、治療後にP糖蛋白の発現が認められたと報告している。Goasguenら<sup>26)</sup>はC219モノクローナル抗体を用いて免疫染色法によりALLの59例についてMDRの発現状態を検討し、MDR発現と寛解率および再発率との間にそれぞれ有意な相関があったと報告している。Inoら<sup>27)</sup>はP糖蛋白の細胞膜外側エピトープを認識するMRK16モノクローナル抗体を用いて、ANLLの患者についてMDR発現状態をフローサイトメトリー法で検討し、MDR発現と寛解率および再発率との間には相関がなかったと報告している。Marieら<sup>28)</sup>は急性白血病についてスロットプロット法でmdr1遺伝子のmRNAを検出し検討したところ、mRNAの発現は寛解率と相

関し、また、感受性試験においてドキソルビシン耐性のものでmdr1遺伝子のmRNAの発現を認める傾向にあったと報告している。このようにMDRに関しては現在までに種々の方法を用いて検討がなされ、様々な結果が報告されている。本研究では、MDR発現と急性白血病のFAB分類との関係をC219抗体を使用して検討した。その結果、M4で高頻度に陽性となり、それぞれの陽性度も高い傾向にあった。しかし、寛解率との間には相関は認められず、再発率でも相関は認められなかった。しかし、骨髄移植後の再発率がM4, M5で高いという報告<sup>29)</sup>があり、長期間観察した場合、単球系で再発率が高くなる可能性もあり、今後の検討が必要であろう。

本研究では、難治療例や再発例でMTTアッセイでの偽陽性例が多かったことから、その原因として上記のようにMDRの発現の関与が考えられた。しかし、難治療例や再発例では検討できなかったが、未治療例のみでは偽陽性例にMDRの発現頻度が高いという結果は得られず、MTTアッセイの結果とMDR発現との間にも有意な関連はみられなかった。このことは、抗腫瘍剤に対する耐性の発現には、MDRのみならず他の耐性機序の関与の可能性を示唆しているものと考えられる<sup>30)</sup>。また、今回の基礎実験から推定されるように、抗腫瘍剤に長時間曝露させるとMDR陽性細胞でも感受性が増強する可能性もある。臨床検体のMTTアッセイにおいても症例N.M.のようにMDR陽性であるにもかかわらず、4日間の培養によってMDRに関連したダウノルビシンおよびミトサントロンなどに対しては感受性が認められた。これらのことから、MDRが発現していても長期間持続的に薬剤と接触させることによって細胞内に蓄積される薬剤の量が、MDR機序により排出される量よりも多くなるために、MTTアッセイの結果とMDR発現の間に相関がみられなかった可能性も考えられる。このように、MDR発現は白血病細胞の抗腫瘍剤に対する性質を表す一つの因子ではあるが、临床上必ずしも薬剤耐性を示す有力な指標とはなっていない。この理由として、生体外と生体内との薬剤動態の違いあるいは薬剤接触時間との関係などが複雑に関連しているためと考えられるが、今後の検討課題である。

本研究では、白血病細胞についてMTTアッセイの結果とMDR発現状態とを組み合わせ、予後の推定を試みてみた。両者の成績を組み合わせ、4群に分け、寛解率および生存率を比較すると、有意な差はないもののMTTアッセイで感受性がありMDRが発現していない群で生存率が最も高い傾向があり、理論と一致する結果が得られた。このことから、両者の組み合わせは有力な予後推定因子となり得ることが示唆された。また、MDRが発現している例では、MDRによる耐性を解除するとされているシクロスポリンやベラパミルなどの薬剤をあらかじめ投与することにより、治療効果の増強を図る試みもなされており<sup>31,32)</sup>、今後、MDRの発現の有無を参考にした治療方法の開発が期待される。

まだ解決すべき点はあるが、MTTアッセイおよびこれにMDR発現の有無を組み合わせる方法は、簡便で正確かつ迅速な予後判定法の一つと考えられ、造血器腫瘍をはじめとするがん化学療法の効果の向上に役立つものと考えられる。

## 結 論

造血器腫瘍についてMTTアッセイを利用した抗腫瘍剤感受

性試験を導入する目的で、基礎的ならびに臨床的検討を行った。また、多剤耐性因子の発現との関係についても検討し、以下の結果を得た。

1. MTT アッセイについての基礎的検討では、分離した単核球のうち腫瘍細胞が80%以上を占める検体が試験に適し、培養期間はリンパ系細胞では2日間、骨髄系細胞では4日間、感受性の有無の閾値は阻害率70%とするのが最も適当と考えられた。

2. 成人 ANLL の未治療例、成人 NHL の難治療例および再発例において、MTT アッセイの結果と臨床効果が良く関連した。

3. ANLL の難治療例および再発例で MTT アッセイでの偽陽性例が多く、MDR の関与も考えられたが、今回の未治療例での検討では偽陽性例に MDR 発現が多いということはなかった。

4. MDR の発現と寛解率および生存率との間には有意な相関は認められなかった。また、生体外でアントラサイクリン系抗腫瘍剤に対する感受性の有無と MDR 発現との関係について検討したところ、同様に有意な関連は認められなかった。この原因の一つとして、抗腫瘍剤と長時間接触させることにより MDR の機構を超えて薬剤が細胞内に入る可能性、あるいは、別の耐性機序が存在する可能性が考えられた。

5. 臨床的検討から、MTT アッセイと MDR 発現の両者を組み合わせることにより生存率に差がみられ、予後を推定する良い指標となることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師松田保教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接御指導を賜りました内科学第三講座中村忍助教授、大竹茂樹講師に心から感謝いたします。さらに御協力と御援助をいただいた第三内科第三研究室の諸先生方および研究協力員の皆様に深謝致します。

なお、本論文の要旨は第56回日本血液学会総会(1994年、新潟)、第36回臨床血液学会総会(1994年、東京)、第57回日本血液学会総会(1995年、名古屋)、第12回国際臨床細胞学会(1995年、Madrid)において発表された。

## 文 献

- 1) Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197; 461-463 1977
- 2) Salmon SE, Von Hoff DD. In vitro evaluation of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. *Seminars in oncology* 8: 377-385 1981
- 3) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63 1983
- 4) 武本俊彦. 薬剤量からみた AUC 依存性薬剤に対する各種抗癌剤感受性試験の比較検討. *日医大誌* 60: 156-162 1993
- 5) Hongo T, Fujii Y, Igarashi Y. An in vitro chemosensitivity test for the screening of anticancer drugs in childhood leukemia. *Cancer* 65: 1263-1272 1990
- 6) 下山正徳, 田中和彦, 木村禮代二. 人がん細胞培養株の薬剤感受性度-再増殖試験(regrowth assay)による薬剤感受性度測定とその意義-. *癌の臨床* 25: 75-83 1979
- 7) 麻生範雄, 西川浩司, 鈴島 仁, 高月 清. 急性白血病の

治療抵抗性と多剤耐性遺伝子 mdrl. *日本臨床* 50: 224-230 1992

8) Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann Int Med* 103: 620-625 1985

9) 本郷輝明, 水野義仁, 原口惣一, 吉田孝人. マイクロプレート培養・生存細胞染色法による簡便な制癌剤感受性試験の開発. *癌と化学療法* 13: 247-254 1986

10) 本郷輝明, 藤井裕治, 水野義仁, 原口惣一, 吉田孝人. マイクロプレート短期培養・MTT dye 還元法による制癌剤感受性試験. *癌と化学療法* 14: 472-478 1987

11) Baccarani M, Tura S. Differentiation of myeloid leukemic cells, new possibilities for therapy. *Br J Haematol* 42: 485-490 1979

12) Clark GM, Von Hoff DD. Statistical considerations for in vitro/in vivo correlations using a cloning system. *In* P. P. Dendy & B. T. Hill (eds.), *Human Tumor Drug Sensitivity Testing in Vitro*, 1st ed., p225-233, Academic Press, London, 1983

13) 本郷輝明, 藤井裕治, 水野義仁, 五十嵐良雄. 急性白血病・悪性リンパ腫15例における制癌剤感受性試験と臨床成績. *癌と化学療法* 14: 416-420 1987

14) Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SPC. Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. *Leuk Res* 12: 823-831 1988

15) Park JG, Kramer BS, Steinberg SM, Carmichael J, Collins JM, Minne JD, Gazdar AF. Chemosensitivity testing of human colorectal carcinoma cell lines using a tetrazolium based colorimetric assay. *Cancer Res* 47: 5875-5879 1987

16) 高橋幸男. 卵巣悪性腫瘍細胞株に対する MTT assay を用いた抗癌剤感受性試験. *慈恵医大誌* 108: 461-470 1993

17) Pieters R, Loonen AH, Huisman DR, Broekema GJ, Dirven MWJ, Heyenbrok MW, Hahlen K, Veerman AJP. In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood* 76: 2327-2336 1990

18) Twentyman PR, Fox NE, Rees JKH. Chemosensitivity testing of fresh leukemia cells using the MTT colorimetric assay. *Br J Haematol* 71: 19-24 1989

19) Kirkpatrick DL, Duke M, Goh TS. Chemosensitivity testing of fresh human leukemia cells using both a dye exclusion assay and a tetrazolium dye (MTT) assay. *Leuk Res* 14: 459-466 1990

20) Finlay GJ, Wilson WR, Baguley BC. Comparison of in vitro activity of cytotoxic drugs towards human carcinoma and leukemia cell lines. *Eur J Cancer Clin Oncol* 22: 655-662 1986

21) 浅井 透. ヒト胃未分化癌細胞株(KKLS細胞)の樹立と性状および新しい抗癌剤感受性試験-上層培養液 MTT 法(liquid top layer-MTT assay, LMA)-の試み. *十全医会誌* 100: 425-444 1991

22) Pastan I, Gottesman M. Multiple drug resistance in human cancer. *N Engl J Med* 316: 1388-1393 1987

- 23) Endicott J, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem* 58: 137-171 1989
- 24) Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene from multidrug resistant human cells. *Cell* 47: 381-389 1986
- 25) Ma DDF, Davey RA, Harman DH, Isbister JP, Scurr RD, Mackertich SM, Dowden G, Bell DR. Detection of a multidrug resistant phenotype in acute non-lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1: 135-137 1987
- 26) Goasguen JE, Dossot JM, Fardel O, Mee FL, Gall EL, Leblay R, LePrice PY, Chaperon J, Fauchet R. Expression of the multidrug resistance-associated P-glycoprotein (P170) in 59 cases of de novo acute lymphoblastic leukemia. Prognostic implications. *Blood* 81: 2394-2398 1993
- 27) Ino T, Miyazaki H, Isogai M, Nomura T, Tsuzuki M, Tsuruo T, Ezaki K, Hirano M. Expression of P-glycoprotein in de novo acute myelogenous leukemia at initial diagnosis. Result of molecular and functional assays, and correlation with treatment outcome. *Leukemia* 8: 1492-1497 1994
- 28) Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood* 78: 586-592 1991
- 29) McGlave PB, Haake RJ, Bostrom BC, Brunning R, Hurd DD, Kim TH, Nesbit ME, Vercellotti GM, Weisdorf D, Wood WG, Ramsay NKC, Kersey JH. Allogeneic bone marrow transplantation for acute nonlymphocytic leukemia in first remission. *Blood* 72: 1512-1517 1988
- 30) Cornelissen JJ, Sonneveld P, Schoester M, Raaijmakers HGP, Nieuwenhuis HK, Dekker AW, Lokhorst HM. MDR-1 expression and response to vincristine, doxorubicin, and dexamethasone chemotherapy in multiple myeloma refractory to alkylating agents. *J Clin Oncol* 12: 115-119 1994
- 31) Sonneveld P, Durie BGM, Lokhorst HM, Frutiger Y, Schoester M, Vela EE. Analysis of multidrug-resistance (MDR-1) glycoprotein and CD56 expression to separate monoclonal gammopathy from multiple myeloma. *Br J Haematol* 83: 63-67 1993
- 32) Yuen AR, Sikic BI. Multidrug resistance in lymphomas. *J Clin Oncol* 12: 2453-2459 1994

**Chemosensitivity Test Using MTT Assay for Hematologic Malignancy** Hiroyasu Kaya, Department of Internal Medicine(III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med Soc., **105**, 506—517 (1996)

**Key words** chemosensitivity test, MTT assay, hematologic malignancy, multidrug resistance

#### Abstract

These have been attempts to develop a reliable chemosensitivity test for anti-cancer drugs in various human malignant tumors, but this has not yet been accomplished because of contamination of normal cells in samples and/or different concentrations of anti-cancer drugs between in vivo and in vitro. In the present study, in order to introduce the (3-(4, 5-dimethyl thiazol-2-yl)-2, 5-dophenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, which is a simple method of detecting chemosensitivity, to the treatment of malignant tumors, basic investigations were performed. Furthermore, the clinical usefulness of the assay was examined using the samples obtained from patients with hematologic malignancies. From the basic investigations, conditions for analyzing clinical samples were established as follows: samples containing 80% or more of tumor cells in the separated mononuclear cells were analyzed; lymphoid tumor cells were incubated for 2 days and myeloid ones for 4 days; a threshold for determining chemosensitivity was defined as 70% or more of an inhibition index. In the cases of untreated acute nonlymphocytic leukemia (ANLL), the true positive rate was 92%, the true negative rate 50%, and the predictive accuracy 87%. The cases of untreated non-Hodgkin's lymphoma (NHL) showed 100% of true positive rate, 0% of true negative rate, and 50% of predictive accuracy, respectively. In the cases of refractory or relapsing NHL, the true positive rate was 100% and predictive accuracy 100%. From these results, it was indicated that the chemosensitivity by the MTT assay correlated with the clinical outcomes. However, the cases of refractory or relapsing ANLL had high false positive rates. Therefore, the expression of multidrug resistance (MDR) was examined in the cases of untreated ANLL. In those false positive cases, the proportions of MDR were not so high. Furthermore, in the in vitro experiments of anthracyclines, there was no relation between the proportions of expression of MDR and the chemosensitivity. These results might be caused by overcoming the mechanisms of MDR by long-term incubation with anti-cancer drugs, or by existing the mechanisms of chemoresistance other than MDR. In hematologic malignancies, the MTT assay combined with an analysis of MDR expression may be a useful tool for predicting the prognosis.