コラーゲンゲルマトリクスを用いた泌尿器悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法に関する研究

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: 江川, 雅之
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8414

金沢大学十全医学会雑誌　第102巻　第1号　2－9（1993）

コラーゲンゲルマトリクスを用いた泌尿器悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法に関する研究

金沢大学医学部泌尿器科学講座（主任：久住治男教授）
江　川　雅　之

（平成5年1月4日受付）

簡便で実用的な抗癌剤感受性試験の開発を目的として，コラーゲンゲルマトリクスを用いた器官培養法に，3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) を用いた生細胞率評価法を応用し，その抗癌剤感受性試験としての臨床応用の可能性を検討した．コラーゲンゲルマトリクスを用いた培養法は，移植腫瘍塊の三次元的組織構築を長期間保持可能であり，従来の器官培養法にはない特徴を持った方法である．すでに ^{3}H-thymidine を用いた生細胞率評価法を応用した抗癌剤感受性試験が報告され，試験管外 (*in vivo*) 感受性試験との高い相関性が示されている．しかし放射性核種を使用するため，施行できる施設が限られることや手技が煩雑になることなどの問題がある．MTT を用いた生細胞率評価法は，生細胞率判定までの過程に細胞洗浄などの煩雑な操作を必要とせず，簡便性，迅速性，さらに定量性に優れた方法である．これら二つの方法の特徴を生かして，腫瘍細胞を4日間前培養し，ひき続き3日間の抗癌剤持続接触をマトリクス上で行ない，8日目にMTT を用いて感受性結果が得られる新しい抗癌剤感受性試験法（コラーゲン－MTT 法）を確立した．ヒト膀胱癌由来KK-47 細胞株をヌードマウスに移植して得られた腫瘍塊を用いた検討では，^{3}H-thymidine を用いたコラーゲンゲルマトリクス法による抗癌剤感受性試験と同様の感受性結果が得られ，本法の臨床適用の可能性を示唆した．さらに臨床材料40検体を用いた検討では，85％（34症例）と高率に感受性試験の施行が可能であった．腎細胞癌14症例の感受性は，移行上皮癌15症例と比べ明らかに低い結果を示した．臨床的にも，腎細胞癌に対する抗癌剤の効果は非常に低く，本法の抗癌剤感受性試験法としての高い臨床予言性を示唆するものと考えられた．現在臨床効果との相関につき追跡検討中であるが，本法を用いた新しい抗癌剤感受性試験は，簡便で迅速に結果が得られ，どの施設でも実施可能な実用的な方法として期待できると考えられた．

Key words chemosensitivity test, collagen gel matrix, human genitourinary tumor, KK-47 human transitional cell carcinoma, 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide

個々の患者の腫瘍に対し有効な抗癌剤を選択する目的で，これまでに種々の試験管外 (*in vivo*) または試験管内 (*in vitro*) の抗癌剤感受性試験が開発されてきた．

試験管外試験法は，試験結果と臨床効果との高い相関性が認められるものの，手技が煩雑であることや，試験結果が得られるまでに長期間を要することなどが問題となっている[1)2)]．またヌードマウスなどの実験動物を多数使用するため，費用や動物愛護などの観点から，それに代わる方法が求められている．

一方試験管内試験法は，手技が簡便で迅速に結果が得られるという利点を持つが，臨床的に有効な薬剤を選択する方法にはいまだ至っていないのが現状である[3)4)]．その一因として，ほとんどの試験管内試験法が，機械的にまたは酵素により細胞単離を行い得られた細胞を培養に用いるため，腫瘍の組織学的構築が著しく破壊されることが考えられる．

最近，Hoffman らによりコラーゲンゲルマトリクスを用いた器官培養法（以下コラーゲン法）が報告され，本法が移植腫瘍片の三次元的組織構築を長期間保持できる培養法であることが示された[5)]．また本法を用いた抗癌剤感受性試験は，試験管内の試験法でありながら，試験管外試験法との高い相関性を持ち，しかも短期間に試験結果が得られるという利点を有する[6)7)]．しかし，本法は腫瘍細胞の生細胞率の評価に ^{3}H-thymidine によるオートラジオグラフィー法を用いているので，手技が煩雑であることや，放射性核種を用いているため施行できる施設が限られるという問題がある．

今回筆者は，試験管外試験法の持つ利点を有するコラーゲン法に，3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) を用いた生細胞率の評価法を応用し，簡便で短期間に試験結果が得られる実用的な抗癌剤感受性試験として，コラーゲン－MTT 法を確立したので報告する．

材料および方法

Ⅰ．培養材料

当教室にて樹立継代しているヒト膀胱癌由来培養細胞株KK-47 細胞[8)]を，10％ (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (Gibco,

Abbreviations: ACT-D, actinomycin D; ADR, adriamycin; CDDP, cisplatin; DMSO, dimethylsulfoxide; H-E, hematoxylin-eosin; MMC, mitomycin C; MTT, 3-[4,5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide; MTX, methotrexate; NCS, nuclear-chicago solubilizer; OD_{540}, optical density at 540 nm; PBS,

Grand Island, USA) およびペニシリンG 100U/ml, ストレプトマイシン 100μg/ml 含有 RPMI 1640培地 (日水製薬, 東京) に浮遊させ, 5×10^7/ml の濃度に調整した. このうちの0.2ml を22G注射針にて生後6～8週齢の BALB/c, nu/nu 雌性マウス (三協ラボサービス, 東京) の背部皮下に移植して得られた腫瘍塊 (以下 KK-47 腫瘍) を基礎的検討に用いた.

また臨床材料として, 1989年9月から1991年3月までに金沢大学医学部附属病院泌尿器科およびその関連病院泌尿器科にて, 手術または生検により得られた40検体 (移行上皮癌18症例, 腎細胞癌17症例, 転移を有する褐色細胞腫2症例, 前立腺および尿膜管腺癌それぞれ1症例, 後腹膜横紋筋肉腫1症例)を用い, コラーゲンーMTT 法を施行した.

Ⅱ. 抗癌剤

用いた抗癌剤は, アクチノマイシンD (actinomycin D, ACT-D), アドリアマイシン (adriamycin, ADR), シスプラチン (cisplatin, CDDP), エトポシド (etoposide, VP-16), マイトマイシンC (mitomycin C, MMC), メソトレキセート (methotrexate, MTX), およびビンブラスチン (vinblastine, VLB) の7剤である. 腫瘍細胞との接触濃度は, 各抗癌剤の臨床投与時における血中最高濃度 (peak plasma concentration, PPC) を基準にして, その10倍, 1倍および1/10倍の3点とした. ACT-D, ADR, CDDP, VP-16, MMC, MTX, および VLB の PPC は, それぞれ0.08, 0.6, 2.49, 34.18, 1.5, 2.75, および0.78μg/ml を用いた[9].

Ⅲ. MTT による生細胞率評価法を用いたコラーゲン法による抗癌剤感受性試験 (コラーゲンー MTT 法)

腫瘍片の培養は, Hoffman らの方法に準じて行なった[5]. 図1に実験方法を示す. 24穴プレート (Costar, Cambridge, USA) の各穴内に, 10mm 角のブタ真皮由来コラーゲンゲルマトリクス (Health Design Industries, Rochester, USA) (以下マトリクス) を一個ずつ静置後, マトリクス全体を充分な培養液で浸した. 各穴中の培養液をいったん除去後, 新しい培養液をマトリクスの上面まで添加した (約 2ml). 次いで細切した腫瘍片を重量測定後, 各マトリクス上に一個づつ静置し, CO_2 濃度5%, 37℃で培養を開始した. 培養液は, 週に2回の割合で新しい培養液と交換した.

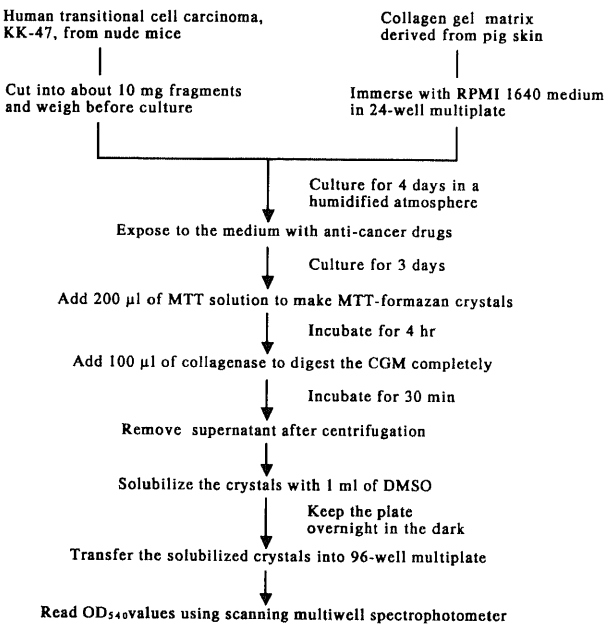

Fig. 1. Procedure for chemosensitivity test using CGM assay with evaluation of cell viability using MTT (CGM-MTT assay).

培養後, リン酸緩衝液 (phosphate buffered saline, PBS) (和光純薬, 大阪) にて 2mg/ml に溶解した MTT (Sigma, St. Louis, USA) 溶液 200μl を, 各穴にそれぞれ添加し (最終 MTT 濃度 200μg/ml) 4時間接触させ, MTT-フォルマザンを生成させた. 次いで, 0.5%コラゲナーゼ (collagenase type 1, 比活性 138U/ml) (Worthington Biochemical Co., Freehold, USA) 100μl を添加し30分間接触後, マトリクスを完全に溶解した. 3000rpm で10分間遠心し, 上清を吸引除去した. 沈渣にジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (和光純薬) を 1ml 添加し, 暗所で室温下に一晩静置後, 生成した MTT-フォルマザンを溶解した. 各穴から DMSO にて溶解した MTT-フォルマザン溶液 200μl を, 96穴プレート (Costar) の各穴に移し, 波長 540nm における吸光度 (optical density at 540nm, OD_{540}) を測定した. OD_{540} 値は scanning multiwell spectrophotometer (ImmunoReader NJ-2000, 日本インターメッド, 東京) を用いて測定し, この値を腫瘍細胞の生細胞率の指標とした.

抗癌剤感受性試験は, 成績の項で述べる基礎的検討の結果に基づき下記のごとくに施行した. 重量約 10mg になるよう細切した腫瘍片を重量測定後, 4日間培養した後, 各穴内の培養液を各種抗癌剤を含む培養液と交換した. さらに3日間培養後, 上述の MTT を用いた腫瘍細胞の生細胞率評価法にて, 各種抗癌剤の抗腫瘍効果を評価した. 抗腫瘍効果は, 抗癌剤非処理群に対する抗癌剤処理群の腫瘍細胞残存率 (% of Control) にて表し, 次式にて算出した. 腫瘍細胞残存率＝T/C×100 : T, 抗癌剤処理群の腫瘍片 10mg あたりの平均 OD_{540} 値 ; C, 抗癌剤非処理群の腫瘍片 10mg あたりの平均 OD_{540} 値. 抗癌剤非処理群および抗癌剤処理群とも一群6穴ずつを培養に用いた.

Ⅳ. ^{3}H-thymidine による生細胞率評価法を用いたコラーゲン法による抗癌剤感受性試験 (コラーゲン－^{3}H-thymidine 法)

Ⅲ. で述べた方法と同様に, 腫瘍片の培養および抗癌剤処理を施行後, 下記のごとくに生細胞率を評価し感受性試験を施行した[10]. 培養後, 0.2μCi/ml に溶解した ^{3}H-thymidine (比活性 24.8μCi/ml) (Amersham, Greenwhich, USA) を含む新しい培養液と交換し, CO_2 濃度5%, 37℃でさらに24時間培養した. 培養後の各穴を, PBS にて3回洗浄後, 1.5ml の10%トリクロロ酢酸 (trichloroacetic acid, TCA) (Sigma) を添加した. 4℃で2時間静置後, 腫瘍片とマトリクスを液シンバイアル (Biovial, Beckman, Fullerton, USA) に移し, 再度10% TCA を添加した. 4℃で一晩静置後, 10% TCA 3ml で2回洗浄後, 可溶化剤 (nuclear-chicago solubilizer, NCS) (Amersham) を 1ml 添加し, 60℃の温浴中で腫瘍片およびマトリクスを溶解した. 各バ

phosphate buffered saline ; PPC, peak plasma concentration ; TCA, trichloroacetic acid ; TUR, transurethral resection ; VLB, vinblastine

イアルにシンチレーター (ACS Ⅱ, Amersham) を 4ml 添加後，暗所にて室温下に一晩静置した．液体シンチレーションカウンター (Model SC-31，アロカ，東京) にて各バイアル中の放射活性 (cpm) を測定し，この値を腫瘍細胞の生細胞率の指標とした．

抗腫瘍効果は，抗癌剤非処理群に対する抗癌剤処理群の腫瘍細胞残存率にて表し，次式にて算出した．腫瘍細胞残存率＝$T^1/C^1 \times 100$：T^1，抗癌剤処理群の腫瘍片 10mg あたりの平均 cpm 値；C^1，抗癌剤非処理群の腫瘍片 10mg あたりの平均 cpm 値．抗癌剤非処理群および抗癌剤処理群とも一群 6 穴ずつを培養に用いた．

Ⅴ．組織学的検討

培養後，マトリクス上の腫瘍片を10%ホルマリン液にて固定後，ヘマトキシリンとエオジンによる染色標本 (hematoxylin-eosin, H-E 標本) を作成した．光学顕微鏡にて観察し，腫瘍細胞の生細胞率を定性的に評価した．

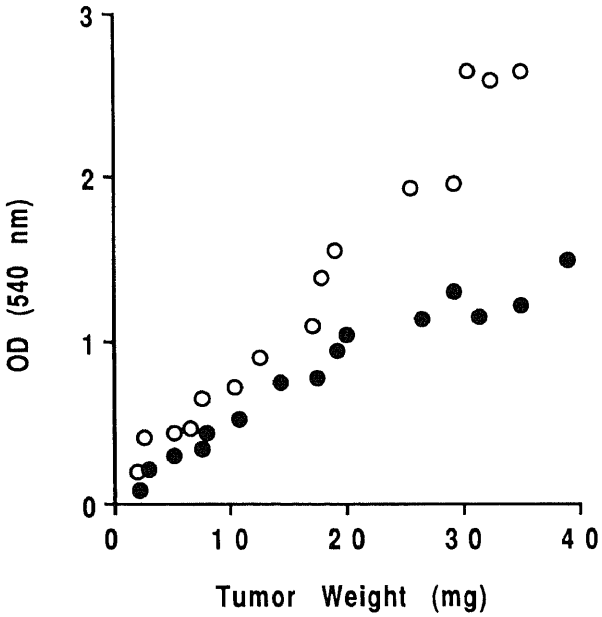

Fig. 2. Correlation between OD_{540} values and weight of KK-47 tumor fragments on day 0 (○) and day 7 (●).

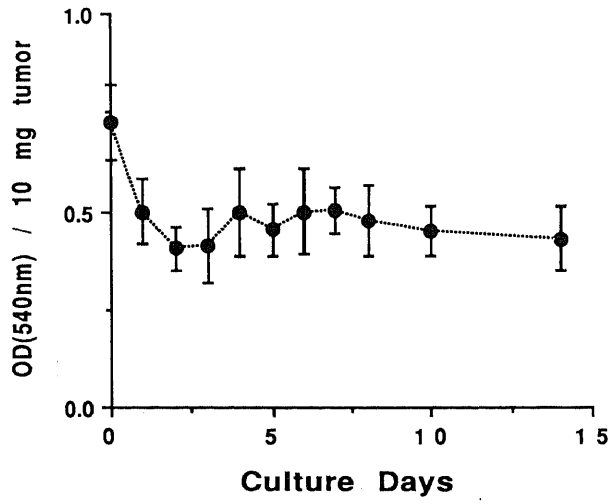

Fig. 3. Kinetics of cell viabilities in KK-47 tumor fragments after culture on CGM. Each plot represents the mean OD_{540} value±SD (n=6).

成　　績

Ⅰ．培養に用いる至適腫瘍片重量

培養開始時の KK-47 腫瘍片の重量と，OD_{540} 値の関係を検討した (図 2)．腫瘍塊細切直後では，腫瘍片重量の増加に比例して OD_{540} 値も増加した (相関係数 r＝0.985)．一方培養後 7 日目では，腫瘍片重量約 15mg 以下の時，腫瘍塊細切直後と比べ約 70%以上の OD_{540} 値が認められたが，それ以上の重量の時 OD_{540} 値の増加は緩徐であった．この結果に基づき，以下の培養および感受性試験においては，培養開始時の腫瘍片重量が約 10mg になるように細切し，重量測定を行なってから培養を開始した．

Ⅱ．抗癌剤接触期間

KK-47 腫瘍片の OD_{540} 値を，経時的に測定し検討した (図 3)．得られた OD_{540} 値は，それぞれ培養開始時の腫瘍片重量 10mg あたりの OD_{540} 値に補正した．OD_{540} 値は，培養後 3 日目までに急激に低下したが，培養後 4 日目以降は回復し培養後 7 日目でも培養直後と比べ約70%の OD_{540} 値が認められた．この結果に基づき，抗癌剤感受性試験は 4 日間の前培養後，3 日間の抗癌剤持続接触にて行なった．

Ⅲ．KK-47 腫瘍片の組織像

マウスから腫瘍塊を切除後ただちに作成した H-E 染色標本

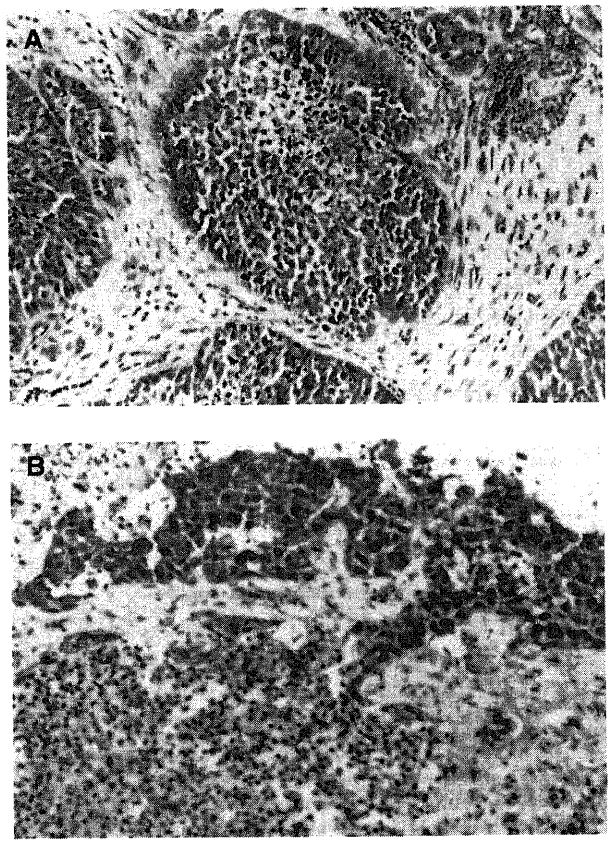

Fig. 4. Human transitional cell carcinoma, KK-47, from nude mice stained with H-E. Comparing with *in vivo* control (A), the tumor fragment on CGM for 7 days after culture shows necrotic change especially in the center (B) (A；×200 B；×200).

では，腫瘍片は充実性で，腫瘍細胞は密に集合する傾向にあり，その周囲には血管腔を含む間質組織が介在していた（図4A）．培養後7日目では，腫瘍片中心部は広範に壊死に陥っていた（図4B）．

一方腫瘍片辺縁部，特にマトリクスとの接触面に生細胞が多く認められ（図5A），一部ではマトリクスへの浸潤性増殖と考えられる像が認められた（図5B）．

Ⅳ．コラーゲン－MTT 法とコラーゲン－^{3}H-thymidine 法の比較

KK-47 腫瘍片に対する各種抗癌剤の抗腫瘍効果を，コラーゲン－MTT 法とコラーゲン－^{3}H-thymidine 法それぞれを用いて検討した（図6）．検討した ADR, CDDP, VP-16, MTX，および VLB の5剤では，いずれの方法を用いた場合でも，抗腫瘍効果はほぼ一致していた．また，コラーゲン－^{3}H-thymidine 法を用いた MTX の抗腫瘍効果を除き，すべての抗癌剤にて濃度依存性に抗腫瘍効果の増大が認められた．

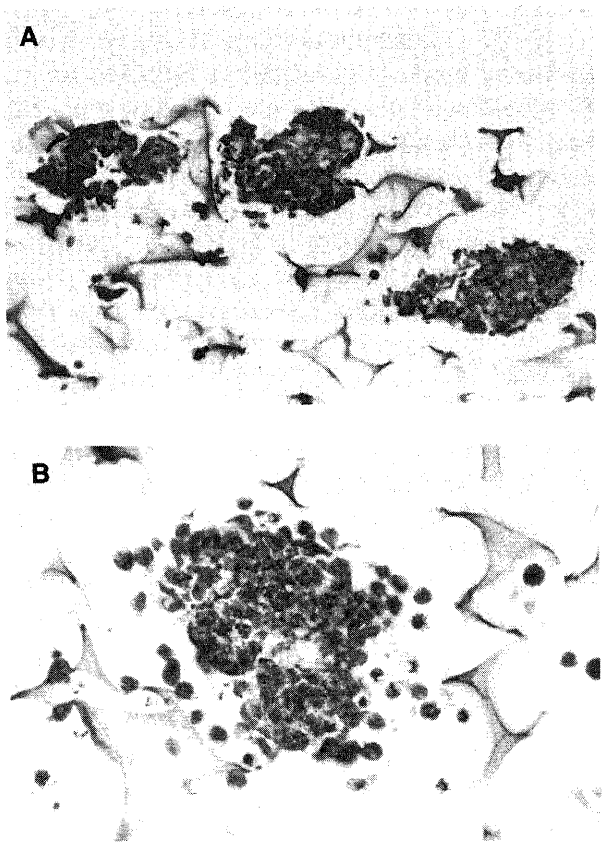

Fig. 5. KK-47 tumor cells on CGM. Many viable cells are located between the CGM and tumor fragment (A). A number of cells show invasive growth in the CGM at high power magnification (B) (A ; ×200 B ; ×400).

Ⅴ．臨床材料に対する抗癌剤感受性試験の成績

1．培養成功率（表1）

抗癌剤感受性試験に用いた腫瘍の培養成功率は，85％（34/40症例）と高率であったが，培養不成功であった移行上皮癌3症例，腎細胞癌3症例の計6症例はいずれも培養中の細菌感染によるものであった．なお，培養後7日目の腫瘍片の組織学的検討により，生細胞が光顕上観察された症例を培養成功症例と判定した．培養成功症例の抗癌剤非処理群の平均 OD_{540} 値は，0.2から1.0であった．

移行上皮癌18症例の内訳は，原発性膀胱腫瘍12症例，膀胱または尿管腫瘍のリンパ節転移巣4症例，原発性の尿管および腎盂腫瘍がそれぞれ1症例であった．腎細胞癌17症例の内訳は，原発性腎細胞癌15症例，原発性腎細胞癌のリンパ節転移巣2症例であった．原発性膀胱腫瘍12症例中4症例は，経尿道的切除術（transurethral resection, TUR）にて得られた検体を用いて感受性試験を施行したが，4症例中3症例が培養成功症例であった．

2．移行上皮癌症例の感受性結果（表2）

ADR, CDDP, MMC, MTX，および VLB の5剤について，10×および1×PPC の2濃度における抗腫瘍効果を検討した．

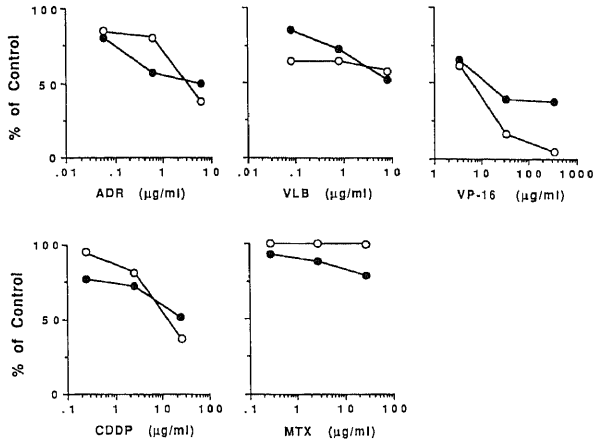

Fig. 6. Comparison of the chemosensitivity tests between the CGM-MTT (●) and CGM-^{3}H-thymidine (○) assays. Three points of concentrations consisting of 10×PPC, 1×PPC and 1/10×PPC in each drug were used. Effect of different concentration in each drug was expressed as a percent of control, and calculated by the following formula ; T/C×100, where T was the mean OD_{540} value of the treated group and C was that of the control group.

Table 1. Success rate in collagen-MTT assay

Type of tumor	No. of specimens	success rate of assay
Transitional cell carcinoma	18	15 (83.3%)
Renal cell carcinoma	17	14 (70.0%)
Pheochromocytoma	2	2 (100%)
Adenocarcinoma (prostate, urachus)	2	2 (100%)
Rhabdomyosarcoma (retroperitoneum)	1	1 (100%)
Total	40	34 (85.0%)

腫瘍抑制率が50%以上のとき，感受性ありと判定した．すべての抗癌剤について，10×PPC における抗腫瘍効果は，1×PPC における抗腫瘍効果を上まわっていたので，濃度依存的な抗腫瘍効果があると考えられた．CDDP が最も高い抗腫瘍効果を示し，次いで MMC が50%の抗腫瘍効果を示した．この2剤のそれぞれ 10×PPC 濃度以外は，すべて50%未満の抗腫瘍効果を示した．

3．腎細胞癌症例の感受性結果（表3）

腎細胞癌症例についても，移行上皮癌症例と同様の抗癌剤および濃度を用いて検討した．いずれの抗癌剤についても，濃度依存的な抗腫瘍効果があると考えられた．しかし移行上皮癌症例の結果と比べ，抗腫瘍効果はすべての抗癌剤について明らかに低かった．さらに特記すべきは，14症例中10症例（71.4%）において有効な抗癌剤が一剤も認められなかったことである．

4．その他の症例の感受性結果

褐色細胞腫2症例については，試験した ADR, CDDP, MMC, MTX，および VLB の5剤に感受性は認められなかった．前立腺および尿膜管腺癌それぞれ1症例は，CDDP の 10×PPC 濃度にのみ感受性が認められた．後腹膜横紋筋肉腫1症例は ACT-D および MMC の10×および 1×PPC 濃度それぞれに感受性が認められた．

考　　察

理想的な抗癌剤感受性試験とは，抗菌剤の細菌に対する感受性試験のごとく，簡便で短期間に結果が得られ，さらに臨床効果の予言性に優れたものであることは明らかである[11]．これまで行われてきた抗癌剤感受性試験を大別すると，おもに採取した腫瘍塊から作製した細胞に対する殺細胞効果を指標とする試験管内感受性試験法と，採取した腫瘍塊を固形のまま実験動物に移植し，その抗腫瘍効果を指標とする試験管外感受性試験法に分けられる．それぞれ一長一短があり，冒頭に述べたごとくいまだ理想的な抗癌剤感受性試験として確立された方法はないのが現状である[12]．今回筆者は，試験管内感受性試験法としてその有用性がすでに報告されているコラーゲン法に，簡便かつ迅速に生細胞量の定量可能な MTT を用いた感受性判定法を応用し，簡便で実用的な新しい抗癌剤感受性試験の開発を試みた．

コラーゲン法は試験管内における器官培養法の一つである．器官培養法の歴史は古く，今世紀初頭にすでに試みた人もいたが，本格的には1950年代に行われた時計皿法や，金網台法などが開発されてから普及した[13]．しかしいずれの方法も移植腫瘍の生細胞率の長期維持にはほど遠く，わずかにホルモン依存性

Table 2. Cytotoxic activities of drugs for 15 transitinal cell carcinoma specimens

Drug	Concentration (μg/ml)	Viable carcinoma on CGM		Cytotoxic activity (%)
		Original	Sensitive[1)]	
CDDP	25.0	14	8	57.1
MMC	15.0	8	4	50.0
VLB	7.8	9	4	44.4
MTX	27.5	9	2	22.2
MMC	1.5	6	1	16.7
ADR	6.0	13	2	15.4
VLB	0.78	8	1	12.5
MTX	2.75	9	1	11.1
ADR	0.6	11	0	0
CDDP	2.5	11	0	0

1) Sensitive, 50% inhibition of growth by the drug.

Table 3. Cytotoxic activities of drugs for 14 renal cell carcinoma specimens

Drug	Concentration (μg/ml)	Viable carcinoma on CGM		Cytotoxic activity (%)
		Original	Sensitive[1)]	
MMC	15.0	6	2	33.3
MMC	1.5	4	1	25.0
CDDP	25.0	14	3	21.4
ADR	6.0	12	2	16.7
VLB	7.8	13	2	15.4
MTX	27.5	7	1	14.3
VLB	0.78	10	1	10.0
ADR	0.6	8	0	0
CDDP	2.5	10	0	0
MTX	2.75	5	0	0

1) Sensitive, 50% inhibition of growth by the drug.

の器官や腫瘍の，ホルモン存在下における長期培養が可能であったのみである[14]．その後器官培養法は，おもに内分泌器官や腫瘍に対するホルモン作用の研究に用いられてきた．

しかし，近年 Hoffman らにより開発されたコラーゲン法が，移植腫瘍片の三次元的組織構築を長期間保持できる培養法であることが示された[5]．コラーゲンは細胞間マトリクスとして細胞を結び付け，組織構築に重要な役割を果たしていることが知られている．さらに組織構築の支持や保護という物理化学的な役割のみでなく，細胞の生理活性を制御していることも知られている[15]．今回用いたブタ真皮由来のコラーゲンが，どのように移植腫瘍の長期維持に貢献しているのかは明らかではないが，上述したコラーゲンの持つ特徴が移植腫瘍の長期維持に何らかの形で関与しているものと思われる．筆者の得た結果からも，2週間以上の長期にわたり移植腫瘍の高い生細胞率が認められており，特殊な技術を必要としない本法は器官培養法として有用であり，抗癌剤感受性試験に適する培養法と考えられた．

MTT は，生細胞の特にミトコンドリア内に存在する種々の脱水素酵素の活性によって，そのテトラゾリウム環が開裂し青紫色に呈色する MTT-フォルマザンを生成する．その反応は，生細胞内でのみ認められることがすでに確かめられており，死細胞では認められない．さらに生成した MTT-フォルマザンは，DMSO などの溶媒によって短時間に均一な溶液となり，その吸光度を測定することで，容易に生細胞数を推定できる[16,17]．MTT を用いた場合の最も大きな利点は，吸光度を測定するまでの過程に細胞の洗浄操作を必要としないことである．従って，既存の方法と比べ操作が容易であり，短時間に結果が得られるため，生細胞数の評価法としては非常に有用と考えられた．また，安価で特殊な装置を必要とせず，どの施設でも実施可能な方法であることから，簡便で実用的な抗癌剤感受性試験を開発する上で有用であると考えられた．

上述のごとく，筆者は移植腫瘍の長期維持可能な試験管内培養法であるコラーゲン法に，迅速な生細胞率の評価可能な MTT を用いた判定法を応用し，その抗癌剤感受性試験としての可能性を検討した．

一般に器官培養系においては単層培養系に比べ，腫瘍細胞の G_0-G_1 期に占める割合が大きいことが知られている[18]．MTT は，生細胞すべてに反応するため，どの細胞周期にある細胞でも一律に生細胞として評価される．一方 ^{3}H-thymidine は，S期にある細胞のみに取り込まれるためそれぞれを用いた感受性試験の結果は異なることが当初予想された．しかし，コラーゲン－MTT 法とコラーゲン－^{3}H-thymidine 法の比較検討では，両者はほぼ一致した感受性結果を示した．その一因として，Ohyama らが報告したごとく，マトリクス上で培養された腫瘍塊中のS期細胞の占める割合が，培養期間の延長とともに増加することが考えられた[19]．コラーゲン－^{3}H-thymidine 法は，試験管外感受性試験法との有意の相関が認められていることから[20]，その結果とほぼ一致したコラーゲン－MTT 法も，試験管外感受性試験法の結果と高い相関性を有するものと考えられた．この相関性に関しては，その後の検討で泌尿器腫瘍だけでなく消化器腫瘍や脳腫瘍などでも，コラーゲン－MTT 法は受精鶏卵奨尿膜法やヌードマウス皮下移植法を用いた試験管外感受性試験法と有意の相関が認められており[19]，抗癌剤感受性試験として適用可能と考えられた．

筆者は当初，マトリクス上に移植した腫瘍塊のみを対象に抗癌剤感受性を判定していた．すなわち培養後の腫瘍塊をマトリクス上から摘出し，その腫瘍塊のみを MTT と反応させていた．しかしマトリクス上で培養した移植腫瘍塊の組織学的検討にて，腫瘍細胞の増殖は，マトリクスとの接触面で活発に行われることが示され，また一部の腫瘍細胞は，マトリクス内への浸潤と考えられる増殖像を示したので，これら細胞群の感受性も同時に判定する必要があると考えられた．そこで筆者は，培養後の各穴内に直接 MTT を添加し，移植腫瘍塊だけでなくマトリクス内の細胞群にも MTT-フォルマザンを生成させた後コラゲナーゼを加え，マトリクスのみを完全に溶解した．その後 DMSO にて生成した MTT-フォルマザンを溶解し，移植腫瘍塊だけでなくマトリクス内の細胞群の生細胞率も同時に測定した．この測定も，細胞の洗浄など煩雑な操作は一切必要とせず，コラーゲン－MTT 法の簡便性，迅速性を損なうことなく施行可能であった．組織学的に浸潤と考えられるマトリクス内の細胞群の意義は明らかではないが，このような現象は正常組織の培養では全く認められないので[6]，今後癌の悪性度を知る上で一つの指標となる可能性も考えられる．

筆者はさらに，臨床材料40検体に対し，コラーゲン－MTT 法を用いた抗癌剤感受性試験を施行した．一般に移植腫瘍塊の抗腫瘍効果を判定する試験管外感受性試験では，その感受性試験成功の判定は，移植腫瘍塊中の生細胞の存在を組織学的に証明することで行われる[21]．今回その判定法をコラーゲン－MTT 法に適用すると，臨床材料40検体の感受性試験成功率は85％と高率であった．さらに感受性試験不成功の原因は，すべて培養中の細菌感染であり，今後感受性試験成功率はさらに改善可能と考えられた．また TUR により得られた検体も4例中3例（75％）が感受性試験が可能であり，比較的容易に生検可能な膀胱腫瘍では，本法による感受性試験の適応はさらに拡大するものと考えられる．

腎細胞癌14症例に対する各種抗癌剤の感受性試験結果は，移行上皮癌15症例に対するそれと比較し，明らかに低い感受性を示した．この結果は，臨床的に各種抗癌剤に抵抗性を示すことの多い腎細胞癌の特徴を裏づけるものと考えられた[22]．個々の症例についての臨床効果との相関は現在検索中であり，今後の課題として残されているが，コラーゲン－MTT 法は簡便で迅速に結果が得られ，臨床材料にも容易に適応可能であり，今後どの施設でも実施可能な実用的な抗癌剤感受性試験として期待される．

結　　論

コラーゲンゲルマトリクスを用いた器官培養法に，MTT を用いた生細胞率評価法を応用して新しい抗癌剤感受性試験法を検討し，以下の結論を得た．

1．ヒト膀胱癌由来 KK-47 細胞株をヌードマウスに移植して得られた腫瘍塊を用いて，腫瘍片をコラーゲンゲルマトリクス上で培養し，抗癌剤接触をマトリクス上で行なう新しい抗癌剤感受性試験法を確立した（コラーゲン－MTT 法）．

2．コラーゲン－MTT 法と ^{3}H-thymidine の取り込みを指標とした方法（コラーゲン－^{3}H-thymidine 法）を比較検討した結果，高い相関が得られた．

3．コラーゲン－MTT 法を用いて，臨床材料40検体に対し感受性試験を施行した結果，高い試験成功率（85％）が得られ

た．また腎細胞癌症例の各種抗癌剤に対する低感受性が示され，臨床的に多剤耐性を示すことの多い腎細胞癌の特徴を裏づけるものと考えられた．

以上より，コラーゲン－MTT 法は臨床効果を反映しうる新しい抗癌剤感受性試験であることが示された．さらに本法は，簡便で迅速に結果が得られ，どの施設でも実施可能と考えられるので，今後実用的な抗癌剤感受性試験として期待できるものと考えられる．

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久住治男教授，ならびに本学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します．また本研究の遂行に当たり，直接御指導御助言を頂いた当教室打林忠雄講師，およびがん研究所化学療法部田中基裕助教授に深謝致します．さらに，本研究に御協力頂きました当教室員，ならびに化学療法部の各位に感謝するとともに，土田貴夫技官，田中耕一技官の技術協力に感謝致します．

なお，本論文の一部は第49回日本癌学会総会，第79回日本泌尿器科学会総会，および第15回国際癌学会において発表した．

文　献

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

2） **Bogden, A. E., Haskell, P. M., LePage, D. J., Kelton, D. E., Cobb, W. R. & Esber, H. J.**: Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsule of normal immunocompetent mice. Exp. Cell Biol., **47**, 281-293 (1979).

3） **Shrivastav, S., Bonar, R. A., Stone, K. R. & Paulson, D. F.**: An *in vitro* assay procedure to test chemotherapeutic drugs on cells from human solid tumors. Cancer Res., **40**, 4438-4445 (1980).

4） **打林忠雄，久住治男，浅利豊紀，小橋一功，天野俊康，内藤克輔**：尿路悪性腫瘍における human tumor clonogenic assay を用いた抗癌剤感受性試験の検討．泌紀要，**33**, 1575-1580 (1987).

5） **Hoffman, R. M., Connors, K. M., Meerson-Monosov, A. Z., Herrera, H. & Price, J. H.**: A general native-state method for determination of proliferation capacity of human normal and tumor tissues *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **86**, 2013-2017 (1989).

6） **Freeman, A. E. & Hoffman, R. M.**: *In vivo*-like growth of human tumors *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **83**, 2694-2698 (1986).

7） **Vescio, R. A., Redfern, C. H., Nelson, T. J., Scott, U. S., Stern, P. H. & Hoffman, R. M.**: *In vivo*-like drug responses of human tumors growing in three dimensional gel-supported primary culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **84**, 5029-5033 (1987).

8） **田谷　正，小林徹治，塚原健治，打林忠雄，内藤克輔，久住治男，黒田恭一**：ヒト尿路悪性腫瘍の組織培養．日泌誌，**68**, 1003-1010 (1977).

9） **Scheithauer, W., Clark, G. M., Salmon, S. E., Dorda, W., Shoemaker, R. H. & Von-Hoff, D. D.**: Model for estimation of clinically achievable plasma concentrations for investigational anticancer drugs in man. Cancer Treat. Rep., **70**, 1379-1392 (1986).

10） **大西哲郎，町田豊平，白川　治**：器官培養法によるヒト腎細胞癌感受性試験．癌の臨床，**35**, 1581-1586 (1989).

11） **佐々木琢磨**：鶏卵奨尿膜上のヒト癌に対する抗癌剤感受性試験．病態生理，**6**, 311-312 (1987).

12） **近藤達平**：抗癌剤感受性の決定．感受性試験の意義と歴史，今後の問題点（近藤達平編），第1版，1-9 頁，金原出版，1984.

13） **Trowell, U. A.**: A modified technique for organ culture *in vitro*. Exp. Cell Res., **6**, 246-248 (1954).

14） **Tchao, R., Easty, G. C., Ambrose, E. J., Raven, R. W. & Bloom, H. J. G.**: Effect of chemotherapeutic agents and hormones on organ cultures of human tumours. Eur. J. Cancer, **4**, 39-44 (1968).

15） **宮田輝夫**：コラーゲンとフィブリン．医器学，**59**, 154-162 (1989).

16） **Mosmann, T.**: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, **65**, 55-63 (1983).

17） **Carmichael, J., DeGraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. & Mitchell, J. B.**: Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res., **47**, 936-942 (1987).

18） **Durand, R. E. & Sutherland, R. M.**: Dependence of the radiation response of an *in vitro* tumor model on cell cycle effects. Cancer Res., **33**, 213-219 (1973).

19） **Ohyama, S., Tanaka, M., Yonemura, Y., Kinoshita, K., Miyazaki, I. & Sasaki, T.**: *In vitro* chemosensitivity test of human gastric carcinomas using collagen gel matrix. Jpn. J. Cancer Res., **82**, 607-612 (1991).

20） **Perrapato, S. D., Slocum, H. K., Huben, R. P., Ghosh, R. & Rustum, Y.**: Assessment of human genitourinary tumors and chemosensitivity testing in 3-dimensional collagen gel culture. J. Urol., **143**, 1041-1045 (1991).

21） **小橋一功**：尿路移行上皮癌における subrenal capsule assay を用いた抗癌剤感受性試験の検討．日泌誌，**80**, 1755-1762 (1989).

22） **Kakehi, Y., Kanamaru, H., Yoshida, O., Ohkubo, H., Nakanishi, S., Gottesman, M. M. & Pastan, I.**: Measurement of multidrug-resistance messenger RNA in urogenital cancers. J. Urol., **139**, 862-865 (1988).

Studies on Chemosensitivity Test of Human Genitourinary Tumors Using Collagen Gel Matrix Masayuki Egawa, Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **102,** 2—9 (1993)

Key words chemosensitivity test, collagen gel matrix, human genitourinary tumor, KK-47 human transitional cell carcinoma, 3-[4, 5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide

Abstract

To establish a convenient and practical anti-cancer chemosensitivity test, an organ culture system using collagen gel matrix (collagen gel matrix assay) was combined with an evaluation method of assessing tumor cell viability using 3-[4, 5-dimethyl thiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), and was studied to evaluate its possibility as a clinically applicable chemosensitivity test. The collagen gel matrix assay has a characteristic potential to allow a transplanted tumor to grow on the matrix for long periods without destroying its three-dimensional tissue structure, which has not been recognized in other conventional organ culture systems so far. A high correlation between the other *in vivo* chemosensitivity tests and the one using the collagen gel matrix assay has been reported to exist when it is performed with an evaluation method of assessing tumor cell viability using ^{3}H-thymidine. However, the use of radioisotope not only limits its availability but increases laborious procedures. Use of MTT provides a convenient, rapid and quantitative evaluation of assessing tumor cell viability without any washing steps during its process of evaluation. Using these two attractive modalities combined, a new chemosensitivity test system was scheduled as follows: A transplanted tumor was incubated on the matrix with an anti-cancer drug for 3 days after a 4 day preculture period, and a chemosensitivity was determined on Day 8 by use of MTT. The comparative study using a human transitional cell carcinoma KK-47 tumor from nude mice demonstrated that the results of the tests using both MTT and ^{3}H-thymidine closely corresponded, indicating that the test using MTT might be applicable to clinical use. The success rate of the test was 85% (34 samples) of 40 clinical samples. The results of the tests on the 14 renal cell carcinoma samples clearly showed low sensitivities compared with those on the 15 transitional cell carcinoma samples. These results may reflect clinical experience since it is well-known that chemotherapy shows little effectiveness againt human renal cell carcinoma. Although evaluation of the predictive value in clinical trials is now in progress, the new chemosensitivity test using the collagen gel matrix assay combined with the evaluation method of assessing tumor cell viability using MTT is thought to hold considerable promise as a chemosensitivity test with the advantages of its convenience, speed and practicability.