

Chemosensitivity Test of Malignant Brain Tumors Using the Chick Embryo

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: Enkaku, Fumihide メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00017876

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



受精鶏卵漿尿膜法を用いた悪性脳腫瘍に対する 抗癌剤感受性試験

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

円 角 文 英

(平成3年11月5日受付)

悪性脳腫瘍は、脳実質から発生し周囲の正常な脳組織に浸潤していくため、手術のみで治癒することは困難であり、放射線・化学療法を併用した集学的治療が必要である。一方、転移性脳腫瘍は進行癌の部分現象として発生するため、選ばれた症例に対して手術・放射線療法が行われ、化学療法の効果が期待できない場合が多い。化学療法の治療効果を高める目的で個々の症例に対して有効な抗癌剤を選択すべく、数多くの試験管内 (in vitro) および試験管外 (in vivo) の抗癌剤感受性試験が試みられてきた。しかしそれらの既存の方法は、再現性、迅速性、手技、経済性、あるいは治療効果の正確な予測などに関してまだ多くの問題を残している。本研究は、臨床応用が可能で実用的な抗癌剤感受性試験法を確立すべく、受精鶏卵漿尿膜法による悪性脳腫瘍に対する感受性試験を検討し、さらに本法の転移性脳腫瘍モデルとしての有用性につき検討した。まず、鶏卵漿尿膜上に移植したラット脳腫瘍由来培養細胞 (C6 glioma) の生着を確認し、その薬剤に対する反応性を確認した。次に外科的に切除されたヒト脳腫瘍生検材料67検体を用いて全例の生着を確認した。膠芽腫22検体の薬剤感受性は 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU) に対しては30.0%、methyl 6-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (MCNU) に対しては50.0%、cyclophosphamide (CPM), adriamycin (ADM) および cisplatin (CDDP) の三者併用療法 (CPM+ADM+CDDP, CAP) に対しては18.8%であった。悪性星細胞腫7検体においては、ACNU に対しては28.6%、MCNU に対しては42.9%、CAP に対しては14.3%であった。その中で膠芽腫16症例、悪性星細胞腫7症例に対しては臨床経過を追い、後向き研究を行った。その結果、真陽性率 (true positive rate) が55%、真陰性率 (true negative rate) が100%、全体的な予測率は78%と感受性試験の結果と臨床効果の間に高い関連性が認められた ($p < 0.01$)。さらに鶏卵漿尿膜上の血管内にマウス黒色腫由来培養細胞 (B16-F10 melanoma) を移植することによって脳転移実験モデルを作り、ACNU, MCNU, CAP の効果から本法が臨床に即した脳転移実験モデルであることが示唆された。本研究により、受精鶏卵漿尿膜法は悪性脳腫瘍に対する化学療法の臨床効果を予測し得るという点において有望な抗癌剤感受性試験法であり、しかも脳転移実験モデルとしても有用であると考えられた。

Key words chemosensitivity test, chorioallantoic membrane, chick embryo, malignant brain tumor, brain metastasis

悪性脳腫瘍に対する治療においては、手術療法、放射線療法、化学療法の3者による集学的治療が必要である。免疫療法や温熱療法といった治療法が考案され、臨床応用が試みられているが、未だ実験的段階で

あり、確立されたものとはいえない。化学療法の重要性が広く認識されているにもかかわらず、その治療成績は期待された程には向上していない。その理由として、腫瘍が同一組織由来のものであっても、抗癌剤

Abbreviations: ACNU, 1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride; ADM, adriamycin; B16-F10, murine B16-F10 melanoma cell line; C6, rat C6 glioma cell line; BLM, bleomycin; CAM, Chorioallantoic membrane; CAP, combination therapy consisting of CPM, ADM and CDDP; CDDP, cisplatin; CPM, cyclophosphamide;

に対する感受性が異なるという腫瘍細胞の不均質性 (heterogeneity) が指摘されている¹²⁾。これにより同一組織像であっても個々の腫瘍に感受性を有する抗癌剤を投与することが求められる。特に、感受性の無い抗癌剤が投与された場合、患者は骨髄抑制などの副作用のみを蒙ることになる。したがって化学療法開始前に個々の症例に対して抗癌剤感受性試験を行い、有効な抗腫瘍剤の種類を明確にすることは、より確実に治療効果を得る上で重要である。またそれにより無用な副作用を避けることも可能である。

このような観点から個々の患者の腫瘍細胞に対する臨床応用可能な抗癌剤感受性試験を確立しようとする動きが生まれ、数多くの試験管内 (in vitro) および試験管外 (in vivo) 抗癌剤感受性試験が報告されている。前者としてはヒト癌コロニー形成法 (human tumor clonogenic assay, HTCA)¹³⁾、後者としてはヌードマウス法¹⁴⁾、腎被膜下移植法 (subrenal capsule assay, SRC)¹⁵⁾、などが検討されている。しかし、これらの方法は、①臨床での多剤併用療法の効果を単剤毎の感受性に基づいて評価している、②移植腫瘍の生着率が悪い、③コロニー形成率が低い、④試験期間が長い、あるいは⑤試験結果の評価法が定まっていない等の問題点があり、個々の症例における薬剤感受性を評価する方法としては限界がある。そこで細菌に対する薬剤感受性試験のように、確実に評価可能で信頼性が高くかつ迅速に判定でき、しかも臨床応用が可能で簡便な抗癌剤感受性試験法の出現が切望されている。一方、他臓器の悪性腫瘍の脳への転移は臨床上稀なことではないが、脳転移巣の化学療法に関する研究は極めて少なく、脳転移実験モデルとして確立されたものがない。

著者は受精鶏卵漿尿膜上にヒト腫瘍が移植可能であるという Murphy の報告⁷⁾に注目し、これを脳腫瘍に応用することを試みた。即ち、受精鶏卵漿尿膜を用いる方法を個々の悪性脳腫瘍に対する抗癌剤感受性試験として確立することを目的とし、さらにマウス悪性黒色腫由来細胞株を用い、同法の脳転移に対する治療実験モデルとしての可能性について検討を加えた。

材料および方法

I. 材 料

実験に使用した材料は、培養細胞としてはラットグリオーマ由来細胞株 (rat C6 glioma cell line, C6) とマ

ウス悪性黒色腫由来細胞株 (murine B16-F10 melanoma cell line, B16-F10) を用いた。B16-F10 細胞は肺癌研究会癌化学療法センター基礎部鶴尾隆部長より恵与された。臨床材料は過去3年間に金沢大学脳神経外科および関連病院において手術が施行された悪性および良性脳腫瘍67検体 (62症例) を用いた。その内訳は膠芽腫25検体 (20症例)、悪性星細胞腫8検体 (8症例)、良性星細胞腫5検体 (5症例)、稀突起膠細胞腫2検体 (2症例)、上衣腫3検体 (3症例)、髄芽腫4検体 (4症例)、悪性リンパ腫2検体 (2症例)、転移性腫瘍14検体 (14症例)、髄膜腫4検体 (4症例) である。

組織培養液は、Roswell Park Memorial Institute Media-1640 (RPMI-1640) (Gibco, Grand Island, New York) 培地 10.4g を蒸留水 850ml に溶解し、炭酸水素ナトリウム 1.2g を加え濾過滅菌した溶液に、ペニシリン 10,000U/ml とストレプトマイシン 10,000 μ g/ml を含むペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (penicillin-streptomycin, PS, Gibco) 10ml と、56°Cで30分間加温し非働化した牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, Gibco) 150ml を加えて作成した。

II. 受精鶏卵漿尿膜への腫瘍の移植

受精鶏卵 (プリマスロツク×ホワイトレグホン) は後藤孵卵場 (岐阜) より購入後、加湿した孵卵器中37°Cで孵卵した。孵卵11日目の鶏卵を透光 (candling) し、漿尿膜上の血管の位置を定め、そこを中心に回転式のヤスリを用いて卵殻に約1cm四方の傷を付け、ピンセットで卵殻を除去した。卵殻膜直下にある漿尿膜に傷を付けないように注意して、露出した卵殻膜に小さな傷を付けた。予め気室中央の卵殻に小孔を開けておき、そこから気室内の空気を弱く吸引することで卵殻膜と漿尿膜とを剥離し、卵殻膜を除去して人工気室を作った。この露出した漿尿膜上の血管の発達したところに腫瘍を移植した (図1)。1検体1薬剤当り6~8個の鶏卵を使用した。手術により得られた検体はベースト状になるまで鋏で細切し、組織培養液で2回洗浄後、漿尿膜上に50 μ l ずつ移植した。一方、C6細胞の場合は移植位置の保持と細胞の拡散を防ぐ目的で直径8mmの滅菌したテフロンリングを漿尿膜上に置き、一定の細胞数を20 μ lの細胞浮遊液としてリングの中に移植した。このリングは移植後2日目に漿尿膜上から除去した。

III. 抗癌剤の投与方法

CR, complete response; CT, computed tomography; FBS, fetal bovine serum; HTCA, human tumor clonogenic assay; MCNU, methyl 6-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside; NC, no change; PD, progressive disease; PR, partial response; PS,

孵卵14日目(腫瘍移植後3日目)の鶏卵漿尿膜上に腫瘍血管新生が起きていることで腫瘍の生着を確認し、抗癌剤を血管内に投与した。即ち、受精卵を再び透光し、血管の位置を定め、卵殻に約5mm×10mmの長方形の傷を付け、卵殻のみを除去して卵殻膜を露出した。露出した卵殻膜に流動パラフィン(Merck, Darmstadt, Germany)を塗布して血管を見やすくし、実体顕微鏡下に30ゲージ針の付いた注射器を用いて0.1mlの抗癌剤を漿尿膜上の血管内に投与した。多剤投与の場合は抗癌剤を混合後直ちに投与し、投与総量が0.1mlとなるように濃度を調整した。対照群の鶏卵には、生理食塩水0.1mlを同様に投与した。

IV. 抗癌剤と多剤併用療法の組み合わせと投与量

使用した抗癌剤は単剤では脳神経外科領域では臨床的に多用されているニトロソウレア系の1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)-methyl-3-(2-chloroethyl)-3-nitrosourea hydrochloride (ACNU)とmethyl 6-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-6-deoxy- α -D-glucopyranoside (MCNU)の2薬剤、多剤併用療法としては最近その固形腫瘍に対する有効性が注目されているCAP療法⁸[cyclophosphamide (CPM)+adriamycin (ADM)+cisplatin (CDDP)]を用いた。投与量はACNUとMCNUの場合には100 μ g/eggとした。これは投与日の鶏卵胎児平均体重が6.5gであるので、

体重当りに換算すると臨床投与量の7.7倍に相当する。予備実験において、通常の臨床投与量を投与した群においては対照群に比べて腫瘍の増殖阻止率に有意差がなく、100 μ g/egg投与群で初めて有意差が生じたので、本研究では一律100 μ g/eggの投与量を用いた。CAP療法においては各薬剤の臨床投与量(CPM: 350mg/m², ADM: 35mg/m², CDDP: 35mg/m²)が体表面積当りで決められているが、投与日の鶏卵胎児の体表面積が求められないので、鶏卵胎児の平均体重が6.5gであることを基に次の換算式から鶏卵胎児への試験投与量を算出した。

$$X = Y \times 0.17$$

X, 抗癌剤の試験投与量(μ g/egg); Y, 抗癌剤の臨床投与量(mg/m²): 0.17, 換算係数(身長160cm, 体重60kgの成人のヒト体表面積は1.6m²として換算) CAP療法とACNU, MCNUの効果と比較するためには薬剤投与量を前述のように臨床投与量の7.7倍として検討すべきであるが、CAP療法では臨床投与量の2倍投与で鶏卵胎児が死亡し、実験が成立しなかった。したがって、本実験においてはCAP療法では臨床投与量をそのまま用いた。

V. 抗腫瘍効果の判定法

1. 抗癌剤感受性試験の判定

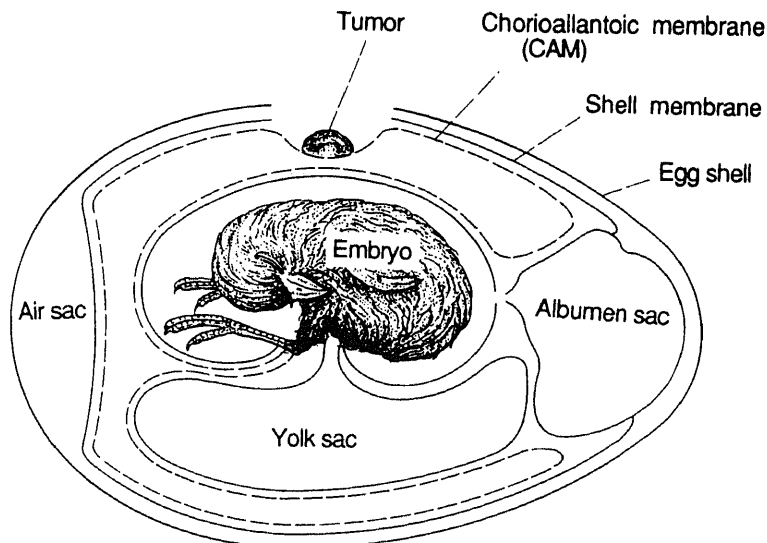


Fig. 1. Schematic drawing of the fertilized chick egg.

penicillin-streptomycin; PVB, combination therapy consisting of CDDP, VLB and BLM; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640; SDI, succinate dehydrogenase inhibition test; SRC, subrenal capsule assay; VLB, vinblastine

抗癌剤投与後4日目即ち腫瘍移植後7日目に漿尿膜上で生育した腫瘍を切り出し、その重量を測定した。対照群の平均腫瘍重量と比較して、腫瘍増殖阻止率を次の式から算出した。

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

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

腫瘍増殖が後述の統計学的検定で5%以下の危険率で有意に抑制された場合、その化学療法に対して腫瘍が『感受性あり』と判定し、それ以外の場合は『感受性なし』と判定した。

2. 臨床効果の判定

化学療法の臨床効果は、厚生省脳腫瘍研究会議(最上班)による治療効果判定基準⁹⁾によった。即ち、抗癌剤投与後2か月でコンピューター断層撮影(computed tomography, CT)上測定又は評価可能病変が消失し、かつその状態が4週間以上継続したものを著効(complete response, CR), 50%以上縮小するとともに、腫瘍による2次の病変の増悪もなく、かつその状態が4週間以上継続したものを有効(partial response, PR), 50%未満縮小または25%未満の増大があるが、腫瘍による2次の病変の増悪もなく、かつその状態が4週間以上継続したものを不変(no change, NC), 25%以上の増大したものを進行(progressive disease, PD)とした。抗癌剤感受性試験

の結果と臨床効果との関連性について統計学的検討を行った。

VI. 転移実験モデルへの応用

孵卵11日目の鶏卵を透光し漿尿膜上の血管の位置を定め、B16-F10メラノーマ細胞 1×10^4 個を薬剤投与の場合と同様の手技で血管内に移植した。メラノーマ細胞移植後3日目に抗癌剤を血管内に投与した。薬剤投与量は薬剤感受性試験に準じた。

抗癌剤投与後4日目に鶏卵胎児の脳と肝臓を摘出し、ブアン液で固定後、各臓器表面上の転移巣数を算出した。対照群の平均転移巣数と比較して、転移阻止率を算出し評価した。転移阻止率の計算式を以下に示した。

$$\text{転移阻止率 (\%)} = \left(1 - \frac{N_T}{N_C}\right) \times 100$$

N_C , 対照群の平均転移巣数 (個); N_T , 抗腫瘍剤投与群の平均転移巣数 (個)

転移巣数が統計学的検定で5%以下の危険率で有意に少ない場合、その化学療法に対して転移巣が『感受性あり』と判定し、それ以外の場合は『感受性なし』と判定した。

VII. 統計学的検定法

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

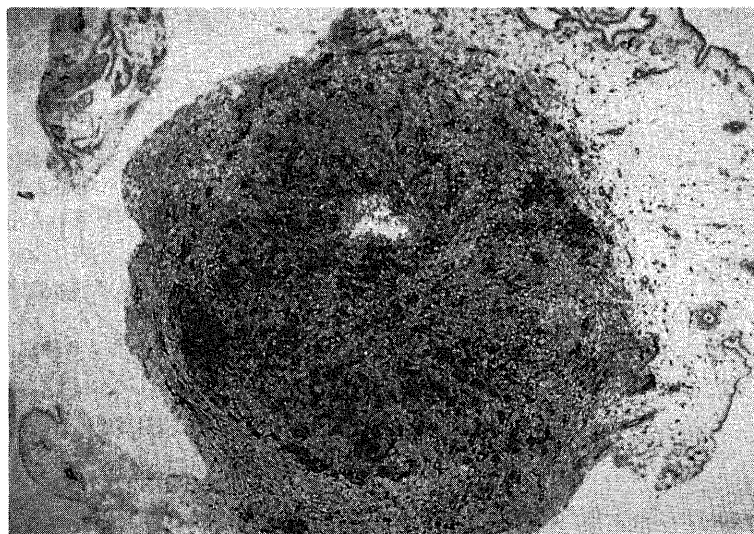


Fig. 2. Photomicrograph showing a rat C6 glioma on the CAM 7 days after transplantation. (hematoxylin-eosin stain, $\times 40$)

$p < 0.05$ を有意とした.

成 績

I. ラットグリオーマ由来培養細胞株 C6 の鶏卵漿尿膜への生着

孵卵11日目に漿尿膜上へ C6 細胞を 2×10^6 個移植して, 孵卵18日目(移植7日目)には全例において肉眼的に腫瘍塊を認めた. 摘出した腫瘍の組織標本においては漿尿膜組織内に集落を形成して腫瘍細胞の増殖を認めた(図2).

II. ラットグリオーマ由来培養細胞株 C6 に対する各種抗癌剤による治療効果

ACNU による腫瘍増殖阻止率は31.4%であり,

Table 1. Effect of various drugs on tumor-forming ability of C6 glioma transplanted onto the chorioallantoic membrane

Drug	Tumor weight (mean±SD, mg)	Inhibition ratio (%)
Saline	11.8±1.8	
ACNU	8.1±1.3	31.4*
MCNU	10.1±2.8	14.4
CAP	17.5±3.7	-48.3

*: $p < 0.01$

Table 2. Take rates of human brain tumors transplanted onto the CAM

Histology	No. of transplantation	No. of takes
Glioblastoma	25	25
Anaplastic astrocytoma	8	8
Low grade astrocytoma	5	5
Oligodendroglioma	2	2
Medulloblastoma	4	4
Ependymoma	3	3
Malignant lymphoma	2	2
Metastatic tumor	14	14
Meningioma	4	4
Total	67	67

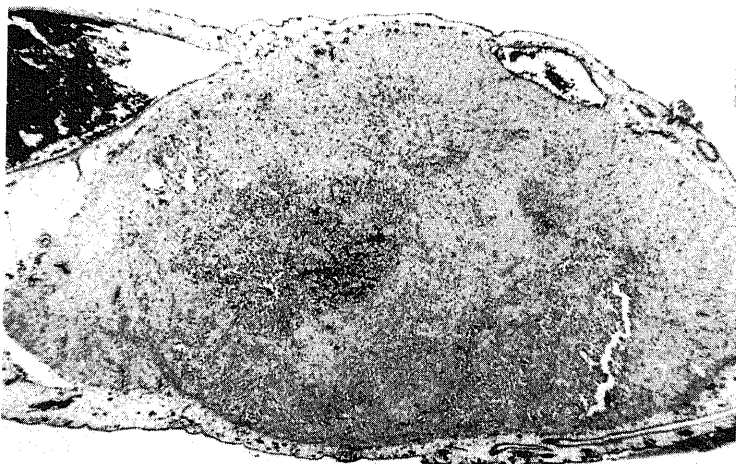


Fig. 3. Photomicrograph showing a meningioma on the CAM 7 days after transplantation. (hematoxylin-eosin stain, $\times 40$)

MCNU のそれは14.4%であった (表1). ACNU は対照群に比べて有意の抗腫瘍効果を示したが, MCNU の抗腫瘍効果は有意なものではなかった. CAP 療法では全く効果は認められなかった.

III. 臨床材料を用いた受精鶏卵漿尿膜法による抗癌剤感受性試験

1. 受精鶏卵漿尿膜法による脳腫瘍の移植

手術により得られた67検体 (62症例) に受精鶏卵漿尿膜法を行い, 全例において移植した腫瘍の生着を認

めた (表2). 組織学的には漿尿膜に包まれていた形で腫瘍が発育していた (図3). また全例において摘出標本と移植腫瘍の病理組織像を比較し, 組織型が保たれていることを確認した (図4). このうち, 抗癌剤感受性判定が可能であったのは59検体 (54症例, 88.1%) であった. 8検体は感受性判定が不能であった. 判定不能であったものの内訳は膠芽腫2検体, 転移性腫瘍3検体, 悪性星細胞腫, 良性星細胞腫, 膠芽腫, 各1例であった. その理由は, 転移性腫瘍1例は薬剤投与時

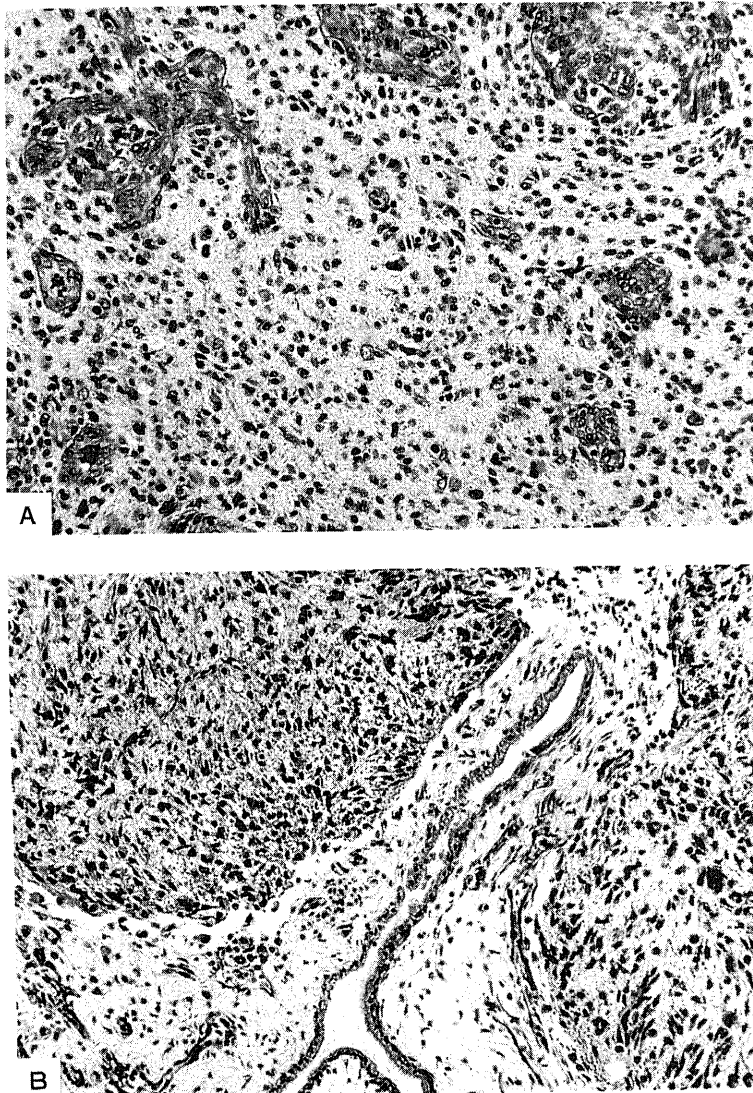


Fig. 4. Photomicrograph showing an original tumor (glioblastoma) obtained at operation (A) and the same tumor on the CAM 7 days after transplantation (B). (hematoxylin-eosin stain, $\times 200$)

の混合感染による宿主鶏卵胎児の死亡であり、他の7例は手術によって得られた腫瘍組織が0.5g以下であり、実験に必要な量が得られなかった例であった。

2. 抗癌剤感受性試験における薬剤有効率

膠芽腫、悪性星細胞腫について薬剤感受性を検討した。検体は膠芽腫が22検体(17症例)、悪性星細胞腫が7検体(7症例)であった。膠芽腫に対する薬剤有効率はACNU 30.0%、MCNU 50.0%、CAP療法18.8%、悪性星細胞腫に対する薬剤有効率はACNU 28.6%、MCNU 42.9%、CAP療法14.3%であった(表3)。

3. 抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果との関連性

実際に抗癌剤が使用された症例に関して、後向き研究として臨床効果を検討した。感受性試験が行われ臨床的に抗癌剤が用いられた症例は、膠芽腫16症例(ACNU使用11例、MCNU使用5例)、悪性星細胞腫7症例(ACNU使用3例、MCNU使用4例)であった(表4)。CAP療法は臨床的には1例も施行しなかった。

判定結果で『感受性あり』と判定された抗癌剤を使用した11例の臨床効果は、PR 6例、NC 5例、であった。『感受性なし』と判定された抗癌剤を使用した12

Table 3. Drug sensitivity ratios of malignant brain tumors transplanted onto the CAM

Tumor	ACNU	MCNU	CAP
Glioblastoma	6/20 ^{#1} (30.0%)	8/16(50.0%)	3/16(18.8%)
Anaplastic astrocytoma	2/7 (28.6%)	3/7 (42.9%)	1/7 (14.3%)

^{#1}: No. of sensitive/No. of transplantation

Table 4. Association between the chick embryo assay and the clinical response of an individual malignant glioma to the chemotherapy

Case No.	Age(yrs)/ Sex	Inhibition ratio (%) ^{#1}			Treatment after operation ^{#2}	CT response ^{#3}	Correlation ^{#4}	Survival ^{#5} (months)
		ACNU	MCNU	CAP				
Glioblastoma								
1	F. Y. 68/F	-12.4	11.6*	-2.3	MCNU/RT	PR	TP	9 D
2	Y. M. 52/M	40.4**	25.4**	-5.3	ACNU/RT	PR	TP	14 D
3	I. T. 74/M	17.5*	2.0	4.0	ACNU/RT	PR	TP	18 D
4	N. S. 60/M	18.6	/	41.9**	ACNU/RT/IFN	NC	TN	6 D
5	Y. T. 75/M	-5.1	67.3**	8.0	ACNU/RT	NC	TN	9 D
6	S. H. 14/M	27.0	/	/	ACNU/CDDP/VP-16/RT	NC	TN	10 D
7	S. S. 63/M	-28.3	/	-44.0	ACNU/RT/IFN	NC	TN	11 D
8	S. T. 26/M	11.3	18.3*	/	ACNU/RT	NC	TN	12 A
9	T. O. 18/M	4.2	14.9	41.8*	MCNU/RT	NC	TN	15 D
10	M. S. 45/F	15.9	/	/	ACNU/IFN	NC	TN	17 D
11	Y. K. 65/M	-45.0	-59.5	-21.4	ACNU/RT	NC	TN	19 A
12	K. H. 57/F	23.6*	18.1*	-1.5	MCNU	NC	FP	7 D
13	S. I. 55/M	31.6*	/	/	ACNU/RT	NC	FP	9 D
14	S. T. 26/M	21.9*	36.5**	2.7	MCNU/RT	NC	FP	10 D
15	Y. T. 46/F	45.7**	14.7	29.5**	ACNU/RT	NC	FP	10 D
16	S. K. 61/F	9.5	21.9**	11.8	MCNU/RT/IFN	NC	FP	18 D
Anaplastic astrocytoma								
17	T. Y. 64/F	4.8	18.8*	12.3	MCNU/RT	PR	TP	14 D
18	K. N. 51/F	63.1**	42.3*	66.7*	MCNU/RT	PR	TP	29 D
19	Y. T. 60/M	30.3*	28.1*	30.3	ACNU/RT	PR	TP	21 A
20	R. G. 41/F	18.4	12.0	8.6	ACNU/RT	PD	TN	8 D
21	M. O. 41/M	19.4	4.6	23.1	MCNU/RT	NC	TN	23 A
22	A. S. 53/M	9.0	1.7	-24.6	MCNU/RT	PD	TN	27 A
23	M. I. 39/M	-4.5	2.5	7.0	ACNU/IFN	NC	TN	25 A

^{#1} Significance of difference: * = P < 0.05, ** = P < 0.01

^{#2} RT = radiation; IFN = interferon

^{#3} PR = partial response; NC = no change; PD = progressive disease

^{#4} TP = true positive; TN = true negative; FP = false positive

^{#5} A = alive; D = dead

例の臨床効果は、NC 10例、PD 2例であった(表5)。本感受性試験で『感受性あり』と判定され、臨床的にも『有効』と判定されたもの(true positive)は6例であり、逆に本法にて『感受性なし』と判定され、臨床的にも『無効』と判定されたもの(true negative)は12例であった。また、本法にて『感受性なし』と判定されたが臨床的には『有効』と判定されたもの(false negative)は無く、さらに本法にて『感受性あり』と判定されたものの臨床的には『無効』と判定されたもの(false positive)は5例であった。以上より、本法の臨

Table 5. Correlation between the results of embryonated chick assay and the clinical response by computed tomography

Drug sensitivity	CT response		
	PR	NC	PD
Positive	6	5	0
Negative	0	10	2

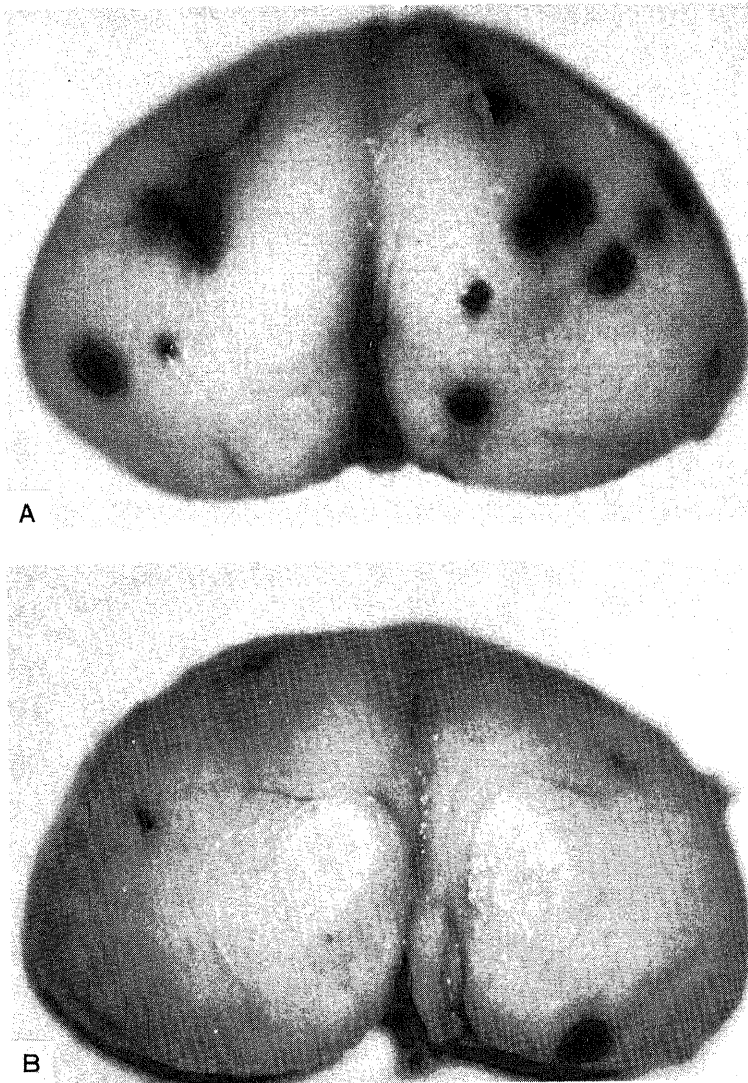


Fig. 5. Photograph showing control chick with multiple metastase 7 days after injection of B16 melanoma into the CAM vein (A) and chick brain treated by MCNU (B).

病的な感受性に対する予測率 (true positive rate) は 55% であり, 耐性に対する予測率 (true negative rate) 100% であった. また全体としての予測率は 78% と高いものであり, Fisher の直接確率検定法を用いた検定にても有意な臨床効果の予言性が認められた ($p < 0.01$).

IV. 受精鶏卵漿尿膜の転移実験モデルとしての応用
 転移実験モデルの対照群では脳表 (図 5) および肝臓表面に多数の転移巣が黒いスポットとして認められた. 脳および肝臓表面に認められた腫瘍転移巣数を算出し, 各抗癌剤の効果と比較した (表 6). 肝転移巣に対しては ACNU, MCNU, CAP 療法各治療群いずれも有意に転移巣数の減少を認めた. 脳転移に対しては, ACNU 治療群および MCNU 治療群においては有意に転移巣数の減少を認め, MCNU 治療群の方がより有効であった. CAP 療法治療群では有意な減少を認めなかった.

考 察

近年抗癌剤開発における進歩は著しく, 臨床上有用な抗癌剤は 30 種にのぼる. 各抗癌剤の効果は, 腫瘍の発生臓器により一定の傾向を示すことが知られており, 例えば胚細胞性腫瘍 (germ cell tumor) には, cisplatin (CDDP), vinblastine (VLB), bleomycin (BLM) を併用した PVB 療法が用いられる¹⁰. しかしこのように臨床効果の予測可能な腫瘍の組織型は限定されており, 大多数の腫瘍に対する抗癌剤および併用化学療法の有効率は低いのが現状である¹¹. 他方, 感受性のない薬剤で治療された場合, 副作用のみが前面にでて, 病勢は進行し, さらに耐性の発現によってその後に行われた第 2 の治療に対する奏効率も悪いことが知られている¹². したがって使用薬剤が有効であるか否かを投与前に明確にすることは臨床極めて重要

である. この目的のために, 試験管内法としては①酵素変化を指標とした方法 [succinate dehydrogenase inhibition test (SDI 法) など], ②培養細胞への放射性同位元素取り込み率を利用した方法, ③培養細胞に抗癌剤を接触させ, その生死で効果をみる方法, ④ HTCA, 試験管外法としては①ヌードマウスへのヒト腫瘍の移植, ②SRC などが抗癌剤感受性試験として研究されてきた.

Rygaard & Povlsen により始められたヌードマウスへのヒト癌の移植は, 移植腫瘍の特徴をよく保持しており, ヒト癌が株ごとに異なる薬剤感受性を有することを明らかにし, この方法を用いて薬剤効果の予言が試みられている¹³⁻¹⁵. しかし, 初代移植では腫瘤形成に 10 日から 3 か月以上とばらつきがあり, 移植成功率が 30~40% であり評価可能率が低い. また, 生着しても初代における増殖は一般に緩慢で評価までに 30~50 週を要することから, 患者が生存中にその腫瘍の抗癌剤感受性を検討することは不可能に近い. さらにこの方法は高価であり, 個々の症例に対する実用的な感受性試験法とは言えず, むしろ新薬のスクリーニングに適していると言える¹⁶⁻¹⁸.

Bogden ら⁹は前述の欠点を補う目的で血流が豊富で腫瘍移植片の観察が容易な SRC 法を開発した. 本法の評価可能率は, 90% 前後と高率であり^{19,20}, 臨床効果との関連性も高く, 現在注目されている試験法である. しかし移植する腫瘍片の大きさや組織特性を一定に保てるのかという疑問や, 宿主反応を包括した評価判定基準が不明確であるという基礎的問題があり, さらに血行の豊富な腎被膜下での移植は, 宿主免疫の関与や術者の高度かつ安定した技術が要求され, 数種の薬剤試験には膨大な数のマウスを要するなどの欠点が指摘されている^{11,21,22}.

Hamburger と Salmon⁹が開発した二層軟寒地培地

Table 6. Effect of various drugs on brain and liver metastasis of B16-F10 melanoma cells in chick embryos

Drug	No. of tumor nodules in the organs [Mean±SD, (IR ^{#1})]	
	Brain	Liver
Saline	16.3±4.8	22.3±4.9
ACNU	12.5±3.3 (23.4%) ^{#2}	10.9±3.6 (51.1%) ^{#3}
MCNU	5.0±1.9 (69.3%) ^{#3}	5.5±3.2 (75.3%) ^{#3}
CAP	14.0±5.5 (14.2%)	12.3±6.6 (44.8%) ^{#3}

^{#1}: IR (Inhibition ratio, %) = $1 - \left(\frac{\text{No. of tumor nodules of treated group}}{\text{No. of tumor nodules of control group}} \right) \times 100$

^{#2}: $p < 0.05$

^{#3}: $p < 0.01$

による HTCA は、95%以上の割合で無効な抗癌剤を選択できるなど、これまでの試験管内抗癌剤感受性試験の中では精度の高い方法である^{23,24)}。しかしコロニー形成率が低く多量の細胞を必要とすること、形成した腫瘍のコロニーの識別の難しさ、抗癌剤の添加条件の問題、判定法、潜在活性型薬剤の取り扱い方などの問題²⁵⁾があり、評価までに時間がかかり高価である²⁶⁾などの難点がある。

HTCA を用いて個々の症例において薬剤感受性を求めようとする試みは Salmon ら²⁴⁾により始められ、その後諸家によって感受性に関しては50~65%、抵抗性に関しては94~97%の予言性であったと報告されている²⁷⁾。悪性脳腫瘍の分野では、Rosenblum らが HTCA を用いて試験管内と試験管外との相関を検討し、感受性に関しては71%、抵抗性に関しては100%の予言性があったと報告している²⁷⁾。既存の抗癌剤感受性試験法は、上述したように種々の問題があり、個々の患者に有効な薬剤を選択するための実用的な検査として確立され、且つ広く臨床応用されるまでに至ったものはない¹¹⁾。

佐々木はヒト腫瘍を受精鶏卵の漿尿膜へ移植する方法⁷⁾に着目し、これを腫瘍の悪性度の判定や抗癌剤のスクリーニング法、抗癌剤感受性試験法などに応用できる可能性について報告した¹¹⁾。そこで著者は、この新しい方法に着目し、この方法を悪性脳腫瘍領域における従来の方法の欠点を補える抗癌剤感受性試験法として確立し、同時に脳転移実験モデルとして応用すべく検討した。

受精鶏卵は古くから生物学や医学の分野で、主にウイルスやリケッチアの培養に使われてきた。1912年 Murphy によって受精鶏卵漿尿膜上への腫瘍の移植が報告され、Dagg らがヒト腫瘍への応用を報告した^{28,29)}。しかし、悪性腫瘍の宿主として果たしてきた役割はヌードマウスに比べ小さなものであり、腫瘍血管増生因子や腫瘍浸潤性等の生物学的解析に用いられるに過ぎなかった^{30,35)}。ヒト腫瘍が漿尿膜上に移植された場合は、ヌードマウスに移植された場合¹⁷⁾と同様に鶏卵胎児という代替の宿主にあっても本来の宿主での腫瘍形態を保っている。脳腫瘍においては Vogel らが漿尿膜上に発育した腫瘍が、移植に用いられた当初の腫瘍の組織学的特異性を保持していることを報告し³⁰⁾。本研究においても図2~4に示したように、組織学的特徴がよく保たれていた。また、扁平上皮癌ではケラチンの蜂巢が観察され、腺癌では分泌物に満たされた腺組織が観察されたと報告されている³⁰⁾。したがって組織学的形態だけでなく、機能の面、とくに抗

癌剤に対する感受性の面でも、もとのヒト腫瘍の性質を保っているものと推定される。

鶏卵漿尿膜を用いる感受性試験のスケジュールとして、移植腫瘍の生着に適した血管が発達し、免疫系が未だ発達しない期間に実験を終了するように、孵卵11日目の鶏卵漿尿膜上に腫瘍を移植し、その1週間後の18日目に腫瘍を摘出するという方法を設定した^{37,39)}。このスケジュールで、漿尿膜上に培養細胞を移植し、生着を確認した(図2)。また抗癌剤の投与時期としては薬剤の腫瘍組織への移行を考慮に入れて、腫瘍移植後3日目の腫瘍血管が十分に発達した時期、つまり孵卵14日目を選んだ。さらに、抗癌剤の投与経路としては、既に血管内投与が適切であると報告されているので⁴⁰⁾、これに従った。

C6細胞はN-nitrosomethylureaによって誘発されたラットグリオーマ細胞であり⁴¹⁾、ヌードマウスやラット脳内への移植細胞として実験に用いられている^{42,43)}。ACNU, MCNUはC6細胞に対して共に用量依存的かつ時間依存的に作用し、ACNUの方がより強力な殺細胞効果を有している⁴⁴⁾。漿尿膜上に移植したC6細胞に対してもACNUの方がより強い腫瘍増殖抑制を示した。佐々木¹¹⁾は、受精鶏卵の漿尿膜に腫瘍を移植したところ、癌腫肉腫を問わず全例生着したと報告している。われわれの研究においても全例生着し、血管内投与時に感染した場合や、得られた材料が0.5g以下と少ない場合以外は感受性の評価が可能であった。

本法による各薬剤の有効率は膠芽腫に対してはACNU 30.0%、MCNU 50.0%、CAP 18.8%、悪性星細胞腫に対してはそれぞれ28.6%、42.9%、14.3%であり、MCNUの高い有効率とCAP療法の脳腫瘍領域における有用性が示唆された。ACNUはその脂溶性なるがゆえに血液脳関門通過性がよく脳腫瘍の臨床に使用されている⁴⁵⁾。MCNUは、より水溶性であるため血液脳関門の通過性が低い。臨床第2相試験でACNU以上の臨床効果が得られたという報告がある⁴⁶⁾。臨床例では血液脳関門の破綻の程度が症例毎に異なっている可能性がある。漿尿膜法では血液脳関門を含めた腫瘍組織への薬剤到達性の問題の評価が不十分である。このことが臨床効果との相関が完全には一致しない理由であろう。

また、同じニトロソウレア系アルキル化剤であるACNUとMCNUでありながら、一方で無効でありながら他方では有効であった検体が7例存在した。臨床的にもそのような症例の存在が報告されている⁴⁶⁾。ACNUとMCNUは共にDNA合成阻害が主な作用機

序であるが、細胞生物学的効果としては MCNU がより多彩な影響を与えることが示されている⁴⁷⁾。このように ACNU と MCNU との間には、薬剤到達性以外にその作用機序の上で若干の相違が存在することも推測される。

既に骨軟部腫瘍⁴⁸⁾や肺癌⁴⁹⁾においては、本法が臨床的にも感受性試験として応用可能なことが示されている。脳神経外科領域においては、臨床材料として脳腫瘍を用いた抗癌剤感受性試験のなかで、臨床効果と相関を示し、有用性が確立しているヌードマウス法と本法を比較した場合、両者は良く相関することが中村らにより報告されている⁵⁰⁾。しかし臨床効果との相関を検討した報告は未だない。

感受性判定可能であったもののうちで、後向き研究的に臨床効果との関連性が検討可能であったものは、膠芽腫16症例、悪性星細胞腫7症例であった。本研究の結果より、悪性脳腫瘍に対する感受性試験法として、受精鶏卵漿尿膜法は真陽性率55%、真陰性率100%、全体的な臨床効果の予測率が78%と、極めて高い臨床効果との関連性を有することが確認された(表5)。試験管内の薬剤感受性試験法である HTCA を用いた脳腫瘍に対する薬剤感受性の成績、真陽性率50~70%、真陰性率100%⁵¹⁾と比較しても遜色ない。ただ、本法では偽陽性例が5例認められた。これは ACNU および MCNU の投与量が臨床投与量の7.7倍であることに起因するものと考えられた。

本法には生着率が高く、短時間にしかも安価に効果判定が出来る利点がある¹¹⁾。また凍結保存した材料を用いても生着率が良く、その材料を用い随時繰り返して感受性試験が可能である¹¹⁾。このような生着率の高さは、鶏卵漿尿膜が単に栄養性に富んだ環境を提供するだけでなく、単なる組織培養とは異なり胎児の成長過程における何らかの成長因子が好影響を与えているものと考えられる。さらに、試験管内の感受性試験では、いわゆる潜在活性型薬剤である CPA は評価できないが、本法ではそのままの形でも評価可能であった。結論として、本法は脳腫瘍においても臨床に近いモデルとして抗癌剤による治療効果を反映する実験系であると考えられる。

B16-F10 悪性黒色腫細胞株の肝転移巣に対しては、ACNU、MCNU、CAP 療法各治療共に効果を示しており、B16-F10 悪性黒色腫細胞株がこれらの治療法に感受性があることが示された。その脳転移巣に対しては CAP 療法は効果を示さず、ACNU、MCNU、特に MCNU の有効性が示された。鶏卵胎児では血液脳関門は孵卵11~15日目に完成するといわれている⁵²⁾⁵³⁾。

即ち、本法において血管内に腫瘍を投与した時点には血液脳関門はまだ存在していないが、薬剤を投与する時点では血液脳関門はほぼ完成しており、一般的に脳血液関門を通過しないとされる薬剤を用いた CAP 療法では実験的な脳転移モデルにおいても効果を示さないもの考えられる。したがって本法が脳転移に対する実験系として臨床に即応したものであることを示唆している。

本法を脳腫瘍領域の抗癌剤感受性試験として応用する場合の欠点としては、①人工気室の作成の際にある程度の手技的習熟が要求される、②効果判定を腫瘍重量で行っているため腫瘍増殖の遅いものは、効果判定が不正確になる恐れがある、③抗癌剤の臨床投与量と実際の試験投与量では相違がある、④漿尿膜法では血液脳関門の問題を解決できない、等が挙げられる。しかしこれらの欠点はあるものの、受精鶏卵漿尿膜を利用した抗癌剤感受性試験は、成功率の高い信頼できる方法であり、実用的な臨床応用が可能なものと考えられる。また、B16-F10 を細胞を用いた実験モデルは、腫瘍の脳転移の実験モデルとしても将来的に有用な方法である。

結 論

悪性脳腫瘍に対する新しい抗癌剤感受性試験法ならびに悪性腫瘍の脳転移実験モデルとして、受精鶏卵漿尿膜法を検討した。その結果以下の結論を得た。

1. 継代株 C6 を用い、受精鶏卵漿尿膜上への脳腫瘍細胞の生着を確認した。さらに ACNU に対しても他の試験法での結果と同様の増殖抑制を示し、本法が有用な実験系であることが判明した。

2. 臨床材料を用いた受精鶏卵漿尿膜への移植は良性脳腫瘍を含めて67検体に施行され、全例に生着を認めた。さらに薬剤感受性試験の判定が可能であったのは59検体(88.1%)であった。このように高い腫瘍生着率と判定可能率が本法の特徴である。

3. このうちの膠芽腫22検体、悪性星細胞腫7検体に対する ACNU、MCNU、CAP 療法に対する薬剤有効率は、膠芽腫がそれぞれ30.0%、50.0%、18.8%、悪性星細胞腫が28.6%、42.9%、14.3%であり、MCNU の高い感受性が示唆された。

4. 膠芽腫16症例、悪性星細胞腫7症例に対しては臨床効果の検討が可能であった。臨床的には ACNU あるいは MCNU が使用され、受精鶏卵漿尿膜法による感受性試験の結果と臨床における効果に関して後向き研究を行った。その結果、真陽性率は55%、真陰性率は100%、全体としての予測率は78%であり、臨床

効果との高い相関性が認められた ($p < 0.01$).

5. 受精鶏卵漿尿膜上の血管内に継代株 B16-F10 を投与することによって脳転移実験モデルを作成した。脳転移は ACNU, MCNU では抑制されたが, CAP では抑制されなかった。本法が血液脳関門を考慮した, 臨床に即応した脳転移実験モデルであることが示唆された。

このように受精鶏卵漿尿膜法を用いた感受性試験は, 従来の方法と比べても臨床予言性は劣らない。また, 本法を応用した脳転移実験モデルは, 血液脳関門の影響を反映する点で臨床に即応したものである。したがって, 悪性脳腫瘍の化学療法に対する臨床効果の予測ならびに転移性脳腫瘍に対する化学療法の実験モデルとして, 受精鶏卵漿尿膜法は信頼性が高く有用な方法であると考えられる。

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山下純宏教授および, 直接御指導御助言を賜りましたがん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深謝いたします。本研究に関し, 貴重な研究材料を御恵与下さった癌研究会癌化学療法センター鶴尾隆先生に感謝申し上げます。また, 臨床材料を提供して下さいました関連施設の各医長先生方に感謝申し上げます。本研究遂行に際し御援助いただいた, 脳神経外科正印克夫助手, がん研究所化学療法部田中基裕助教授, 遠藤良夫先生に感謝致します。

なお, 本論文の要旨の一部は, 第47回日本癌学会総会, 第47回日本脳神経外科学会総会, 第48回日本脳神経外科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Kondo, T., Imamura, T. & Ichihashi, H.: In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann.*, **57**, 113-121 (1966).
- 2) Karnofsky, D. A.: Differences between cancers in terms of therapeutic response. *Cancer Res.*, **16**, 684-697 (1956).
- 3) Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 4) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *APMIS.*, **77**, 758-760 (1969).
- 5) Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K., Hirohata, S., Koide, T., Hayashi, H. & Nomura, T.: Transplantation of human tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**, 1251-1260 (1976).
- 6) Bodgen, A. E., Kelton, D. E., Cobb, W. R. & Esber, H.: A rapid screening method for testing chemotherapy against human tumor xenografts. In D. P. Houchens, & A. A. Ovejera (eds.), *Proceeding of the Symposium on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research*, 1st ed., p231-250, Fischer, Inc., New York. 1978.
- 7) Murphy, J. B.: Transplantability of malignant tumors to the embryos of a foreign species. *J. Am. Med. Assoc.*, **59**, 874-875 (1912).
- 8) Ehrlich, C. E., Einhorn, L., Stehman, F. B. & Blessing, J.: Treatment of advanced epithelial ovarian cancer using cisplatin, adriamycin and cytoxan. *Clin. Obstet. Gynecol.*, **10**, 325-335 (1983).
- 9) 最上平太郎, 生塩之敬, 佐野圭司, 高倉公朋, 半田 肇, 山下純宏, 植木幸明, 田中隆一, 畠中 坦, 野村和弘: 脳腫瘍の治療効果判定基準について. *神経外科*, **26**, 191-194 (1986).
- 10) 松角康彦, 阿部 弘, 田中隆一, 小林達也, 山下純宏, 西本 詮, 生塩之敬, 佐藤 潔, 松谷雅生, 高倉公朋, 佐野圭司: 頭蓋内悪性 germ cell tumor に対する Cisplatin-Vinblastine-Bleomycin 3 者併用療法 (PVB 療法) - 第II 相試験. 癌の臨床, **32**, 1387-1393 (1986).
- 11) 佐々木琢磨: 鶏卵法による癌悪性度の判定と薬剤感受性試験. *ファルマシア*, **23**, 58-62 (1987).
- 12) 藤田昌英: In vitro 抗癌剤感受性テスト. *医学のあゆみ*, **141**, 528-532 (1987).
- 13) Fodstad, O., Aass, N. & Pihl, H.: Assessment of tumor growth and of response to chemotherapy of human melanoma in athymic nude mice. *Br. J. Cancer*, **41** (Suppl.), **4**, 146-149 (1980).
- 14) Osieka, R., Houchens, D. P., Goldin, A. & Johnson, R. K.: Chemotherapy of human colon cancer xenografts in athymic nude mice. *Cancer*, **40**, 2640-2650 (1977).
- 15) Steel, G. G. & Peckham, M. J.: Human tumor xenografts: a critical appraisal. *Br. J. Cancer*, **41** (Suppl.), **4**, 133-141 (1980).
- 16) 下里幸雄: ヌードマウス, その癌研究への応用. がん (山村雄一, 杉村 隆編), 第1版, 313-326 頁, 共立出版, 東京, 1978.
- 17) 北原武志: ヌードマウスを用いた抗がん剤感受性テスト. 癌化学療法の進歩 (山村雄一, 杉村 隆編), 第一版, 31-37 頁, メジカルビュー社, 東京, 1986.
- 18) Bailey, M. J., Jones, A. J., Shorthouse, A.

- J., Raghaven, D., Selby, P., Gibbs, J. & Peckham, M. J.: Limitations of the human tumor xenograft system in individual patient drug sensitivity testing. *Br. J. Cancer*, **50**, 721-724 (1984).
- 19) Griffin, T. W., Bogden, A. E., Reich, S. D., Antonelli, D., Hunter, R. E., Ward, A., Yu, D. T., Greece, H. L. & Costanza, M. E.: Initial clinical trials of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. *Cancer*, **52**, 2185-2192 (1983).
- 20) Levi, F. A., Blum, J. P., Lemaigre, G., Bourut, C., Reinburg, A. & Mathe, G.: A four-day subrenal capsule assay for the testing the effectiveness of anticancer drugs against human tumors. *Cancer Res.*, **44**, 2660-2667 (1984).
- 21) 佐々木康綱: In vitro, in vivo 感受性テストの臨床的意義. 癌化学療法への進歩 (山村雄一, 杉村 隆編), 第1版, 38-46 頁, メジカルビュー社, 東京, 1986.
- 22) Zimmerman, R. J., Van Winkle, T. J., Mantel, N., Freill, E. & Goldin, A.: 5-Fluorouracil treatment of a human colon adenocarcinoma implanted in the subrenal capsule site of athymic mice. *Cancer Res.*, **46**, 694-700 (1986).
- 23) Moon, T. E., Salmon, S. E., White, C. S., Chen, H-S. G., Meyskens, F. L., Durie, B. G. M. & Alberts, D. S.: Quantitative association between in vitro human tumor cell assay results and response to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **6**, 211-218 (1981).
- 24) Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehnen, B., Durie, 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).
- 25) Alley, M. C., Powis, G., Appel, L., Kooistra, K. L. & Lieber, M. M.: Activation and inactivation of cancer chemotherapeutic agents by rat hepatocytes cocultured with human tumor cell lines. *Cancer Res.*, **44**, 549-556 (1984).
- 26) Uitendaal, M. P., Hubers, H. A. J. M., McVie, J. G. & Pinedo, H. M.: Human tumor colonogenicity in agar is improved by cell-free asites. *Br. J. Cancer*, **48**, 55-59 (1983).
- 27) Rosenblum, M. L., Gerosa, M. A., Wilson, C. B., Barger, G. R., Pertuiset, B. F., De Tribolet, N. & Dougherty, D. V.: Stem cell studies of human malignant brain tumors Part 1: Developmental of the stem cell assay and its potential. *J. Neurosurg.*, **58**, 170-176 (1983).
- 28) Dagg, C. P., Karnofsky, D. A., Toolan, H. W. & Roddy, J.: Serial passage of human tumors in chick embryo: Growth inhibition by nitrogen mustard. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **87**, 223-227 (1954).
- 29) Dagg, C. P., Karnofsky, D. A. & Roddy, J.: Growth of transplantable human tumors in the chick embryo and hatched chick. *Cancer Res.*, **16**, 589-594 (1956).
- 30) Mostafa, L. K., Jones, D. B. & Wright, D. H.: Mechanism of the induction of angiogenesis by human neoplastic lymphoid tissue: studies on the chorioallantoic membrane (CAM) of the chick embryo. *J. Pathol.*, **132**, 191-205 (1980).
- 31) Matuno, H.: Tumor angiogenesis factor (TAF) in cultured cells derived from central nervous system tumors in humans. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*, **21**, 765-773 (1981).
- 32) Takigawa, M., Shirai, E., Enomoto, M., Pan, H., Suzuki, F., Shiio, T. & Yugari, Y.: A factor in conditioned medium of rabbit costal chondrocytes inhibits the proliferation of cultured endothelial cells and angiogenesis induced by B16 melanoma: its relation with cartilage-derived anti-tumor factor (CATF). *Biochem. Int.*, **14**, 357-363 (1987).
- 33) Sekiya, S., Oosaki, T. & Takamizawa, H.: Tumor angiogenesis activity of human choriocarcinoma cells grown in vitro. *Gynecol. Oncol.*, **25**, 271-280 (1986).
- 34) 古城信人: 腫瘍血管増生因子に関する実験的研究—とくに培養腫瘍細胞および生体腫瘍組織についての比較検討. 久留米医学会雑誌, **48**, 619-635 (1985).
- 35) Sekiya, S., Oosaki, T. & Takamizawa, H.: Invasion potential of human choriocarcinoma cell lines and the role of lytic enzymes. *Gynecol. Oncol.*, **22**, 324-333 (1985).
- 36) Vogel, H. B. & Berry, R. G.: Chorioallantoic membrane heterotransplantation of human brain tumors. *Int. J. Cancer*, **15**, 401-408 (1975).
- 37) Leighton, J.: *The Spread of Cancer*, 1st ed., p115-191, Academic press, New York, 1967.

- 38) Green, H. & Lorincz, A. L.: The role of a natural antibody in the rejection of mouse tumor cells by the chick embryo. *J. Exp. Med.*, **106**, 111-129 (1957).
- 39) Weber, W. T. & Mausner, R.: Migration patterns of avian embryonic bone marrow cells and their differentiation to functional T and B cells, *In* A. A. Benedict (ed.), *Avian Immunology*, 1st ed., p47-59, Plenum Press, New York, 1977.
- 40) Uchida, H., Sasaki, T., Tanaka, M., Endo, Y., Nitta, K., Nishikawa, K., Chuman, H., Fukuma, H. & Matsumoto, K.: Response to antitumor agents of murine transplantable tumors implanted onto chorioallantoic membrane of chick embryo. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, **78**, 729-736 (1987).
- 41) Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L. & Sweet, W. H.: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science*, **161**, 370-371 (1968).
- 42) Benda, P., Someda, K., Messer, J. & Sweet, W. H.: Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J. Neurosurg.*, **34**, 310-323 (1971).
- 43) Farrell, C. L., Stewart, P. A. & Del Maestro, R. F.: A new glioma model in rat: The C6 spheroid implantation technique permeability and vascular characterization. *J. Neurooncol.*, **4**, 403-415 (1987).
- 44) 原田 廉, 木矢克造, 岡本博文, 魚住 徹: ニトロソウレア系制癌剤 ACNU, MCNU の実験脳腫瘍に対する抗腫瘍効果の比較検討. *神経外科*, **21**, 1017-1023 (1981).
- 45) Takaku, K., Abe, H., Tanaka, R., Kitamura, K., Miwa, T., Takeuchi, K., Yamamoto, S., Kageyama, N., Handa, H., Mogami, H., Nishimoto, A., Uozumi, T., Matsutani, M. & Nomura, K.: Effects of ACNU and radiotherapy on malignant glioma. *J. Neurosurg.*, **64**, 53-57 (1986).
- 46) 若林俊彦, 吉田 純, 鬼頭 晃, 井上 達, 小林達也, 景山直樹: 脳腫瘍に対する MCNU の効果. *癌と化学療法*, **11**, 2729-2737 (1984).
- 47) 小黒昌夫, 柳川 正, 竹永啓三: Nitrosourea系抗癌剤 MCNU の抗腫瘍性—新しい in vitro 抗癌剤感受性試験による検討—. *癌と化学療法*, **11**, 2550-2556 (1984).
- 48) 杉原 信: 受精鶏卵漿尿膜法を用いた骨軟部腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法の研究. *十全医会誌*, **97**, 1032-1043 (1988).
- 49) 龍沢泰彦: 受精鶏卵漿尿膜法を用いたヒト肺癌に対する抗癌剤感受性試験法の研究. *十全医会誌*, **99**, 1068-1079 (1990).
- 50) 中村 治, 佐々木琢磨, 内田博之, 田中基裕, 遠藤良夫, 西川耕平, 松谷雅生, 高倉公朋: 孵化鶏卵漿尿膜移植法によるグリオーマ, 転移性脳腫瘍に対する薬剤感受性テスト. *脳神経外科*, **16**, 353-357 (1988).
- 51) Kimmel, D. W., Shapiro, J. R. & Shapiro, W. R.: In vitro drug sensitivity testing in human gliomas. *J. Neurosurg.*, **66**, 161-171 (1987).
- 52) Wakai, S. & Hiraoka, N.: Development of the blood-brain barrier to horseradish peroxidase in the chick embryo. *Cell Tiss. Res.*, **195**, 195-203 (1978).
- 53) 若井 晋: 血液脳関門, 血液脳脊髄液関門の発生. *脳神経*, **33**, 1077-1092 (1981).

Chemosensitivity Test of Malignant Brain Tumors Using the Chick Embryo Fumihide Enkaku, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. *Juzen Med Soc.*, **100**, 1113—1127 (1991)

Key words chemosensitivity test, chorioallantoic membrane, chick embryo, malignant brain tumor, brain metastasis

Abstract

Multi-modality treatment including surgery, irradiation and chemotherapy is required for patients with malignant brain tumors which invade into surrounding tissue. On the other hand, for treatment of patients with metastatic brain tumors, which indicates advanced cancer, surgery and irradiation are mainly performed since the response rate to chemotherapy is low. To improve the prognosis of patients with cancer, many chemosensitivity tests, either in vitro or in vivo, have been tried to predict the efficacy of anticancer agents in individual patients before administration. However, no test that possesses high reproducibility, rapidity, convenience, low cost and good predictability has been developed so far. In this study, the usefulness of the chick embryo assay as an in vivo chemosensitivity test and also as an experimental model for brain metastasis was evaluated. First, rat C6 glioma cells were grafted on the chorioallantoic membrane (CAM) of chick embryo. This grafting was used to examine the effect of anticancer drugs. Then, 67 surgical specimens including benign tumors were examined by this method. All the tumor specimens tested had been grafted on the CAM; the evaluable ratio was 100%. Effectiveness ratios of ACNU, MCNU and CAP therapy for 22 specimens of glioblastoma, were 30.0, 50.0 and 18.8%, respectively. Effectiveness ratios for 7 specimens of anaplastic astrocytoma, were 28.6, 42.9 and 14.3%, respectively. Among them, 23 instances of previously untreated malignant glioma were evaluated retrospectively to predict the clinical effects, judged by computed tomography. There were 6 (55%) instances in which the assay response correctly corresponded to a clinical response (true-positive). There were 5 (45%) false-positives for the assay, 0 (0%) false-negative and 12 (100%) true-negatives. The overall predictive accuracy was 78% (18/23). Thus, a high-degree of positive association exists between this assay and the clinical outcome. Moreover, as an experimental model for brain metastasis, murine B16-F10 melanoma cells were transplanted into the blood vessel on the CAM and the antitumor effects of ACNU, MCNU and CAP therapy on metastasized melanoma cells in the brains of chick embryos were examined. The drugs which passed through the blood-brain barrier, were effective in this assay system. These results indicate that this in vivo assay system using the chick embryo is a promising method in predicting clinical response in the treatment of malignant brain tumors and is also a useful experimental model for brain metastasis.