

Chemosensitivity Test for Bone and Soft Tissue Sarcomas Using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide assay

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8343

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide 比色法を用いた骨軟部悪性腫瘍に 対する抗癌剤感受性試験の研究

金沢大学医学部整形外科講座 (主任: 富田勝郎教授)

森 川 精 二

(平成3年7月17日受付)

骨軟部悪性腫瘍に対する治療において化学療法は重要な位置を占めており、治療成績の向上を目指し実用的で簡便な抗癌剤感受性試験が望まれている。本研究は 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) と96穴マイクロプレート (96 well microtiter plate)、マイクロプレートリーダー (multiwell scanning spectrophotometer) を用いた MTT 比色法 (MTT assay) を骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験として応用し、その実用性を検討する目的で行った。本法はテトラゾリウム (tetrazolium) 塩の一種である MTT が生細胞によって暗青色のホルマザン (formazan) 塩に変化することを利用しており、生じたホルマザン塩の吸光度 (optical density, OD) はマイクロプレートリーダーにより半自動的に測定することができる。まず、11種のヒト骨肉腫由来培養細胞株を用いて基礎的検討を行った。各細胞株において溶解されたホルマザン塩の OD と細胞数は良好な相関関係を示した。これらの細胞株に対して最大血中濃度においてはアクチノマイシンD、アドリアマイシン、シスプラチン、メソトレキセート、ビンクリスチン、サイクロフォスファミドが高い有効率を示した。最大血中濃度の10分の1においてはこれら薬剤も有効率は低かった。これらの薬剤は骨肉腫に有効とされており最大血中濃度における効果判定が適当であると考えられた。また骨肉腫に対する有効性が未だ報告されていないエトポサイドがいずれの細胞株に対しても高い効果を示し、骨肉腫に対する有効性が示唆された。これらの細胞株に対する基礎的検討の結果をふまえて、臨床材料に対して MTT 比色法を用いた抗癌剤感受性試験を行った。過去2年間に手術または生検により得られた骨軟部悪性腫瘍67検体 (58症例) を用いた。67検体中64検体 (96%) に感受性判定が可能であった。1×10⁴個以上の細胞を播種した検体は全て判定可能であった。感受性の判定が可能であった薬剤数は平均8.4剤であった。30検体について臨床効果との関連性を前向き研究 (prospective study) および後向き研究 (retrospective study) によって検討した。MTT 比色法を用いた感受性試験の結果と臨床効果との相関は、真陽性が15検体、偽陽性が2検体、真陰性が10検体、偽陰性が3検体であり、真陽性率が88%、真陰性率が77%で、全体的な予測率は83%であった。本法は少ない材料で迅速に多数の薬剤の感受性を簡便に判定でき、成功率も高く臨床効果との相関も高いことが示された。以上、本研究により MTT 比色法を用いた感受性試験は骨軟部悪性腫瘍に対する実用的な抗癌剤感受性試験になりうるものと考えられた。

Key words Chemosensitivity test, MTT assay, bone and soft tissue sarcoma

Abbreviations: ACD, actinomycin D; ADM, adriamycin; Ara-C, cytarabin; BLM, bleomycin; CDDP, cis-platinum; CI, cytotoxic index; CPA, cyclophosphamide; CYVADIC, cyclophosphamide + vincristine + adriamycin + dimethyl triazeno imidazole carboxamide; 5-Fu, 5-fluorouracil; GCT, giant cell tumor; HTCA, human tumor clonogenic assay; MFH, malignant

抗癌剤を用いての化学療法は、骨軟部悪性腫瘍に対する治療体系の一環として不可欠なものになってきている。一方、腫瘍の抗癌剤に対する感受性は、腫瘍が同一病理組織像であっても異なり、同一個体であっても原発巣と再発巣、転移巣などの時期、部位の違いによって異なることは良く知られている¹²⁾。しかし、現在行われている化学療法のプロトコールは主にその組織型に応じて、経験的に有効と考えられる抗癌剤が用いられており、個々の腫瘍の感受性の差異は考慮されていない。その結果、無効な抗癌剤を投与された患者はその抗癌剤の副作用のみを被ることになるばかりでなく、薬剤耐性の発現によって以後の化学療法に対して反応しにくくなる。したがって個々の腫瘍に対し有効な抗癌剤を選択し、無効な抗癌剤を排除することが望ましい。特に骨軟部悪性腫瘍領域においては多剤併用療法が主流であること、また組織型が非常に多彩であること、化学療法の支援がその治療成績の向上に大きく貢献していること、そして化学療法の効果如何によって患肢温存が可能になる場合もあることなどから、個々の腫瘍に対して抗癌剤の投与前に有効、無効を知ることができれば治療に大きく貢献することは明らかである。

今日までに組織器官培養法¹³⁾、核酸前駆物質を指標とした方法¹⁴⁾、ヌードマウス法¹⁵⁾、ヒト癌コロニー形成法 (human tumor clonogenic assay, HTCA)¹⁶⁾など数多くの抗癌剤感受性試験が試行されてきたが、いずれの方法も一長一短があり、簡便性、迅速性、予言性といった多くの条件を満たす臨床応用可能な理想的な感受性試験は未だに確立されていないのが現状である。3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) はテトラゾリウム (tetrazolium) 塩の一種で、生細胞内の脱水素酵素により還元され暗青色のホルマザン (formazan) 結晶に変化する特徴を有する。1983年、Mosmann¹⁷⁾はこの MTT と96穴マイクロプレート (96well microtiter plate)、マイクロプレートリーダー (multiwell scanning spectrophotometer) を用いた MTT 比色法 (MTT assay) を報告した。著者はこの方法の簡便性、迅速性に注目し、骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験として確立することを意図し、検討を行った。

材料および方法

I. 材 料

実験に使用した材料は、培養細胞としてヒト骨肉腫由来培養細胞株 osteogenic sarcoma Takase strain (OST, 当教室にて樹立)、HOS, MNNG-HOS, KHOS-240S, MG63, KHOS-312H, KHOS-NP, G292 (大日本製薬, 大阪から購入)、SKES-1, U-2OS, SAOS-2 (住友製薬研究所, 大阪より供与) の11種を用いた。臨床材料として過去2年間に骨軟部悪性腫瘍の原発巣、再発巣または転移巣に対し生検または手術を行って得られた67検体 (58症例) を用いた。その内訳は骨原発性腫瘍では骨肉腫 (osteosarcoma) 13検体 (11症例)、軟骨肉腫 (chondrosarcoma) 8検体 (8症例)、悪性線維性組織球腫 (malignant fibrous histiocytoma, MFH) 5検体 (3症例)、脊索腫 (chordoma) 2検体 (2症例)、ユーイング肉腫 (Ewing's sarcoma) 1検体 (1症例)、悪性骨巨細胞腫 (malignant giant cell tumor, malignant GCT) 1検体 (1症例) であり (表1)、軟部腫瘍では MFH 9検体 (8症例)、滑膜肉腫 (synovial sarcoma) 6検体 (5症例)、脂肪肉腫 (liposarcoma) 6検体 (5症例)、横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) 6検体 (5症例)、平滑筋肉腫 (leiomyosarcoma) 3検体 (3症例)、悪性神経鞘腫 (malignant schwannoma) 3検体 (2症例)、線維肉腫 (fibrosarcoma) 1検体 (1症例)、中皮腫 (mesothelioma) 1検体 (1症例)、膠芽腫 (glioblastoma) 1検体 (1症例)、悪性リンパ腫 (malignant lymphoma) 1検体 (1症例) であった (表2)。

細胞株の継代培養や感受性試験の際には培地 Roswell Park Memorial Institute Media-1640 (RPMI-1640) (日本製薬, 東京) 10.2g を蒸留水 900ml に溶解し、オートクレーブにて121°C, 5分で滅菌したものに、7%炭酸水素ナトリウム 30~40ml, ペニシリン (萬有製薬, 東京) 100,000U とストレプトマイシン (明治製薬, 東京) 100mg, グルタミン (協和発酵, 東京) 0.3g, および56°Cで30分間加温し非動化した牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, New York, U.S.A.) 100ml を加えて作成した組織培養液を用いた。

II. 抗 癌 剤

抗癌剤としてアクチノマイシン D (actinomycin D,

fibrous histiocytoma; MMC, mitomycin C; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; MTX, methotrexate; OD, optical density; OST, osteogenic sarcoma Takase strain; PPC, peak plasma concentration; SDI, succinic dehydrogenase inhibition test; VCR, vincristine; VDS, vindesine; VLB, vinblastine

ACD) (萬有製薬), アドリアマイシン (adriamycin, ADM) (協和醸酵), ブレオマイシン (bleomycin, BLM) (日本化薬, 東京), シスプラチン (cis-platinum, CDDP) (日本化薬), シタラビン (cytarabin, Ara-C) (日本新薬, 京都), エトポサイド (etoposide, VP-16) (プリストル・マイヤーズ・スクイブ, 東京), フルオロウラシル (5-fluorouracil, 5-Fu) (協和醸酵), メソトレキセート (methotrexate, MTX) (日本レダリー, 東京), マイトマイシンC (mitomycin C, MMC) (三共, 東京), ビンブラスチン (vinblastine, VLB) (塩野義製薬, 大阪), ビンクリスチン (vincristine, VCR) (塩野義製薬, 大阪), ビンデシン (vindesine, VDS) (塩野義製薬), サイ

クロフォスファミド (cyclophosphamide, CPA) (塩野義製薬) の13剤を用いた. なお CPA は試験管内では不活性であるため, 活性型の 4-hydroperoxycyclophosphamide (4OH-CPA) (塩野義製薬) を用いた. 用いた濃度は臨床投与量における理論的最大血中濃度¹²⁾ (peak plasma concentration, PPC) およびその10分の1を用いた (表3).

III. 培養細胞株を用いた基礎的実験

1. 細胞数と吸光度の相関の検討

各細胞株において 200 μ l の培養液中に細胞が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 個となるように単離細胞浮遊液を作成し, これを96穴平底マイクロウエルプレート (Nunc,

Table 1. Clinical characteristics and data of MTT assay of bone sarcomas

Case	Name	Age / Sex ^{a)}	Type of tumor ^{b)}	Site of primary tumor	Source of specimen	Initial cell number	OD ^{c)} of control (540nm)	Number of assay drugs
1-1	A.N.	18/f	Osteosarcoma	Humerus	Biopsy	2×10^4	0.745	11
1-2					Surgery	2×10^4	0.813	13
2	Y.A.	17/f	Osteosarcoma	Femur	Surgery	7×10^3	0.269	6
3	K.I.	19/f	Osteosarcoma	Femur	Surgery	2.9×10^4	1.322	6
4	T.I.	16/m	Osteosarcoma	Femur	Surgery	2.8×10^4	0.604	3
5	N.Y.	45/f	Osteosarcoma	Tibia	Surgery	1×10^4	0.748	5
6	S.N.	15/f	Osteosarcoma	Tibia	Biopsy	1.9×10^4	0.296	11
7	K.H.	16/m	Osteosarcoma	Tibia	Biopsy	1.5×10^4	0.763	9
8	A.K.	17/f	Osteosarcoma	Femur	Biopsy	2×10^4	1.475	9
9	T.T.	19/m	Osteosarcoma	Femur	Surgery	5×10^3	0.092	—
10	T.K.	18/m	Osteosarcoma	Tibia	Surgery	1×10^4	0.245	11
11-1	S.T.	17/f	Osteosarcoma	Tibia	Biopsy	1×10^4	0.273	11
11-2					Surgery	2×10^4	1.204	11
12	T.S.	48/m	Chondrosarcoma	Tibia	Surgery	1×10^4	0.280	11
13	M.K.	35/f	Chondrosarcoma	Pelvis	Surgery	6×10^3	0.408	6
14	K.T.	74/f	Chondrosarcoma	Scapula	Surgery	2×10^4	1.103	13
15	K.O.	52/f	Chondrosarcoma	Femur	Surgery	3×10^4	1.097	10
16	T.M.	70/m	Chondrosarcoma	Pelvis	Surgery	1.3×10^4	0.216	5
17	K.K.	39/m	Chondrosarcoma	Femur	Surgery	1×10^4	0.452	7
18	Y.S.	43/f	Chondrosarcoma	Humerus	Surgery	1.1×10^4	1.087	11
19	T.S.	30/m	Chondrosarcoma	Spine	Surgery	7×10^3	0.032	—
20-1	A.Y.	21/m	MFH of bone	Femur	Biopsy	3×10^4	0.626	10
20-2					Surgery	1.4×10^4	0.740	8
21-1	U.Y.	72/f	MFH of bone	Femur	Biopsy	2.2×10^4	0.753	4
21-2					Surgery	2×10^4	0.551	13
22	T.N.	48/m	MFH of bone	Femur	Biopsy	2×10^4	0.730	12
23	T.Y.	70/m	Chordoma	Sacrum	Surgery	1×10^4	0.838	6
24	S.K.	38/m	Chordoma	Sacrum	Surgery	3×10^4	2.268	10
25	T.N.	12/m	Ewing's sarcoma	Femur	Surgery	1×10^4	0.655	2
26	T.K.	63/m	Malignant GCT	Femur	Surgery	1×10^4	0.907	12

a) m, male; f, female.

b) MFH, malignant fibrous histiocytoma; GCT, giant cell tumor,

c) OD, optical density.

Roskilde, Denmark) の各ウエルに 200 μ l ずつ分注した。次に各ウエルに 0.15Mリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) に溶解した 2mg/ml の濃度の MTT (Sigma, St. Louis, U.S.A.) を 25 μ l 分注し, 37°C, 5% CO₂ で 4 時間培養した。培養後培地を吸引し, ジメチルスルフォキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) (Sigma) 200 μ l を加え MTT ホルマ

ザン結晶を溶解した。マイクロプレートミキサー MPM-1 (岩城硝子, 東京) にて溶解した結晶を均等に拡散させ, 各ウエルの吸光度 (optical density, OD) をマイクロプレートリーダー (イージーリーダー, EAR340AT) (SLT-Labinstruments, Vienna, Austria) を用いて波長 540nm にて測定した。

2. 培養日数と OD の検討

Table 2. Clinical characteristics and data of MTT assay of soft tissue sarcomas

Case	Name	Age / Sex ^{a)}	Type of tumor ^{b)}	Site of primary tumor	Source of specimen	Initial cell number	OD ^{c)} of control (540nm)	Number of assay drugs
27	S.F.	42/m	MFH of soft part	Trunk	Surgery	8×10 ³	0.460	2
28	T.H.	31/m	MFH of soft part	Neck	Surgery	8×10 ³	1.142	3
29	S.M.	72/m	MFH of soft part	Thigh	Surgery	1×10 ⁴	0.635	6
30	S.T.	62/f	MFH of soft part	Thigh	Surgery	1.4×10 ⁴	0.722	4
31-1	Y.S.	23/m	MFH of soft part	Buttock	Biopsy	2×10 ⁴	0.625	11
31-2					Surgery	2×10 ⁴	0.568	12
32	T.S.	60/m	MFH of soft part	Thigh	Biopsy	1.3×10 ⁴	0.234	8
33	F.I.	79/f	MFH of soft part	Thigh	Surgery	1×10 ⁴	0.246	12
34	K.K.	64/f	MFH of soft part	Forearm	Surgery	5×10 ³	0.021	—
35	K.M.	15/f	Synovial sarcoma	Thigh	Biopsy	7×10 ³	0.261	13
36	H.K.	34/m	Synovial sarcoma	Leg	Surgery	1×10 ⁴	0.767	7
37	M.I.	19/f	Synovial sarcoma	Thigh	Surgery	1.1×10 ⁴	0.371	7
38	N.W.	16/m	Synovial sarcoma	Trunk	Surgery	5×10 ³	0.215	8
39-1	K.S.	46/f	Synovial sarcoma	Thigh	Biopsy	2×10 ⁴	0.621	4
39-2					Surgery	1.7×10 ⁴	0.262	11
40	M.Y.	77/f	Liposarcoma	Thigh	Surgery	1×10 ⁴	0.419	3
41-1	A.O.	39/f	Liposarcoma	Trunk	Surgery	3×10 ⁴	0.934	2
41-2					Surgery	1.1×10 ⁴	0.280	11
42	N.O.	41/f	Liposarcoma	Thigh	Surgery	5×10 ³	0.259	4
43	J.K.	31/m	Liposarcoma	Thigh	Surgery	1×10 ⁴	0.415	11
44	T.O.	61/f	Liposarcoma	Thigh	Surgery	6×10 ³	1.151	1
45-1	M.S.	17/m	Rhabdomyosarcoma	Thigh	Biopsy	2.5×10 ⁴	1.542	13
45-2					Surgery	3×10 ⁴	1.970	9
46	K.T.	2/m	Rhabdomyosarcoma	Thigh	Surgery	2.8×10 ⁴	0.760	10
47	J.U.	13/m	Rhabdomyosarcoma	Elbow	Surgery	1×10 ⁴	0.281	12
48	Y.O.	8/m	Rhabdomyosarcoma	Elbow	Surgery	2.1×10 ⁴	1.849	4
49	Y.T.	2/f	Rhabdomyosarcoma	Leg	Biopsy	2.8×10 ⁴	0.276	12
50	H.N.	70/f	Leiomyosarcoma	Thigh	Surgery	5×10 ³	0.279	7
51	T.K.	45/m	Leiomyosarcoma	Upper arm	Surgery	2.4×10 ⁴	0.551	3
52	T.K.	58/m	Leiomyosarcoma	Trunk	Surgery	1×10 ⁴	0.319	12
53-1	F.H.	40/f	Malignant schwannoma	Thigh	Biopsy	1.8×10 ⁴	1.469	10
53-2					Surgery	2×10 ⁴	0.454	9
54	K.T.	74/f	Malignant schwannoma	Thigh	Surgery	1.4×10 ⁴	0.286	12
55	H.T.	63/m	Fibrosarcoma	Thigh	Surgery	8.4×10 ³	0.415	8
56	K.N.	58/m	Mesothelioma	Trunk	Surgery	1×10 ⁴	0.435	13
57	K.M.	19/m	Glioblastoma	Spinal cord	Surgery	1×10 ⁴	0.783	8
58	K.M.	32/m	Malignant lymphoma	Thigh	Surgery	1.4×10 ⁴	0.374	11

a) m, male; f, female.

b) MFH, malignant fibrous histiocytoma.

c) OD, optical density.

マイクロプレートの各ウエルに細胞の単離浮遊液を 1×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 となるように分注し, 37°C , 5% CO_2 条件下で1~10日間培養した。培養後前述の方法で MTT を加え4時間後に OD を測定した。

3. 抗癌剤の濃度と細胞株に対する効果の検討

各細胞株において $180 \mu\text{l}$ の培養液中に細胞が 1×10^4 個となるように単離細胞浮遊液を作成し, これをマイクロウエルプレートの各ウエルに分注した。同時に接触濃度の10倍濃度に調整した各種抗癌剤を $20 \mu\text{l}$ ずつ加え, $200 \mu\text{l}$ とした。抗癌剤の濃度は最大血中濃度およびその10分の1とした。これを 37°C , 5% CO_2 条件下で3日間培養した。培養後前述の方法で MTT を分注し4時間後に OD を測定した。また, 細胞数を 2×10^3 , 5×10^3 個として同様に検討を行った。

IV. 臨床材料に対する抗癌剤感受性試験

手術あるいは生検により得られた腫瘍片をできるだけすみやかに鉄で細切した。組織培養液で2回洗浄後, ステンレス製メッシュで濾過し, 均一な細胞浮遊液を得た。その際, 0.5%トリパンブルー染色により, 有核生細胞数を算定した。これを $180 \mu\text{l}$ の培養液中に細胞が $5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^4$ 個となるように調整し, マイクロウエルプレートの各ウエルに $180 \mu\text{l}$ ずつ分注した。同時に最大血中濃度の10倍濃度に調整した抗癌剤を $20 \mu\text{l}$ 分注した。3日間培養後, 前述の方法で MTT を分注し, 4時間後 OD を測定した。

V. 抗腫瘍効果の評価と判定法

1. 抗癌剤感受性試験の判定

得られた OD より次式にて細胞毒指標 (cytotoxic index, CI) を求めた。

$$\text{CI} (\%) = (1 - T/C) \times 100$$

T: 抗癌剤投与群の OD の平均

C: 対照群の OD の平均

CI 値が50%以上の場合, その抗癌剤に対して腫瘍が『感受性あり』と判定し, 50%未満の場合は『感受性なし』と判定した。

2. 臨床効果の判定

化学療法臨床効果は, 骨腫瘍においては日本整形外科学会骨・軟部腫瘍委員会の原発性骨悪性腫瘍治療効果判定基準(案)¹³⁾にしたがって判定した。軟部腫瘍においては日本癌治療学会固形がん化学療法直接効果判定基準¹⁴⁾にしたがって判定した。骨腫瘍, 軟部腫瘍いずれにおいても著効 (complete response, CR) ないし有効 (partial response, PR) の場合を臨床で実施された化学療法は『有効』と判定し, 不変 (no change, NC) ないし進行 (progressive disease, PD) の場合を『無効』であると判定した。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定を行った。

VI. 統計学的検定法

二群の平均値の差の検定には, Student's t 検定また

Table 3. Anticancer drugs and their concentrations used in MTT assay

Drug ^{a)}		PPC ^{b)} ($\mu\text{g/ml}$)	1/10PPC ($\mu\text{g/ml}$)	Clinical dosage
Actinomycin D	ACD	0.08	0.008	0.015 mg/kg
Adriamycin	ADM	0.6	0.06	60 mg/m ²
Bleomycin	BLM	3.0	0.3	15 mg/m ²
Cis-platinum	CDDP	2.5	0.25	100 mg/m ²
Cytarabine	Ara-C	250.0	25.0	10 mg/kg
Etoposide	VP-16	34.0	3.4	290 mg/m ²
5-fluorouracil	5-FU	60.0	6.0	15 mg/kg
Methotrexate	MTX	400.0	40.0	12000 mg/m ²
Mitomycin C	MMC	1.5	0.15	20 mg/body
Vinblastine	VLB	0.8	0.08	0.2 mg/kg
Vincristine	VCR	0.37	0.037	0.025 mg/kg
Vindesine	VDS	0.05	0.005	3 mg/m ²
Cyclophosphamide	CPA	30.0	3.0	10 mg/kg

a) 4-hydroperoxy cyclophosphamide in stead of cyclophosphamide was used in vitro study.

b) PPC, peak plasma concentration.

は Wilcoxon の順位和検定 (Wilcoxon rank-sum test) を用いた。抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果との相関性の検討については Yates の連続補正を用いて χ^2 検定を行った。

成 績

I. 培養細胞株を用いた基礎的実験

1. 細胞数と OD

各細胞株において播種細胞数が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ 個/ウェルにおいて細胞数と OD は直線的な相関関係を示した (図 1)。相関係数は OST で 0.997 ($p < 0.01$), HOS で 0.990 ($p < 0.01$), KHOS-240S で 0.987 ($p < 0.05$), MG63 で 0.972 ($p < 0.05$), KHOS-321H で 0.979 ($p < 0.01$), MNNG-HOS で 0.931 ($p < 0.05$), G292 で 0.965 ($p < 0.05$) であった。

2. 培養日数と OD

培養日数と OD の関係では 1 ウェルあたり 5×10^3 ,

1×10^4 個の細胞を播種したものは 3 日目まで OD は直線的に増加し、以後はプラトーとなった。 1×10^3 個を播種した群は 7 日目まで直線的に OD は増加し、以後プラトーとなった。 2×10^4 個を播種したものは 1 日目に OD が最高値を示した (図 2)。

3. 抗癌剤の濃度と各細胞株に対する効果

最大血中濃度における各細胞株に対する抗癌剤の効果を表 4 に、最大血中濃度の 10 分の 1 における効果を表 5 に示した。CI 値が 50% 以上のものを有効とし、有効率 (efficacy rate) を求めた。最大血中濃度における抗癌剤の有効率は $8.0 \pm 2.3/11$ であり、最大血中濃度の 10 分の 1 における有効率は $3.4 \pm 1.5/11$ で、最大血中濃度における抗癌剤の有効率は最大血中濃度の 10 分の 1 における有効率に比べ有意に高かった ($p < 0.01$)。最大血中濃度において ACD, ADM, BLM, CDDP, MTX, VCR, CPA が高い有効率を示した ($p < 0.01$)。またエトポサイドも高い有効率を示した。しかしこれ

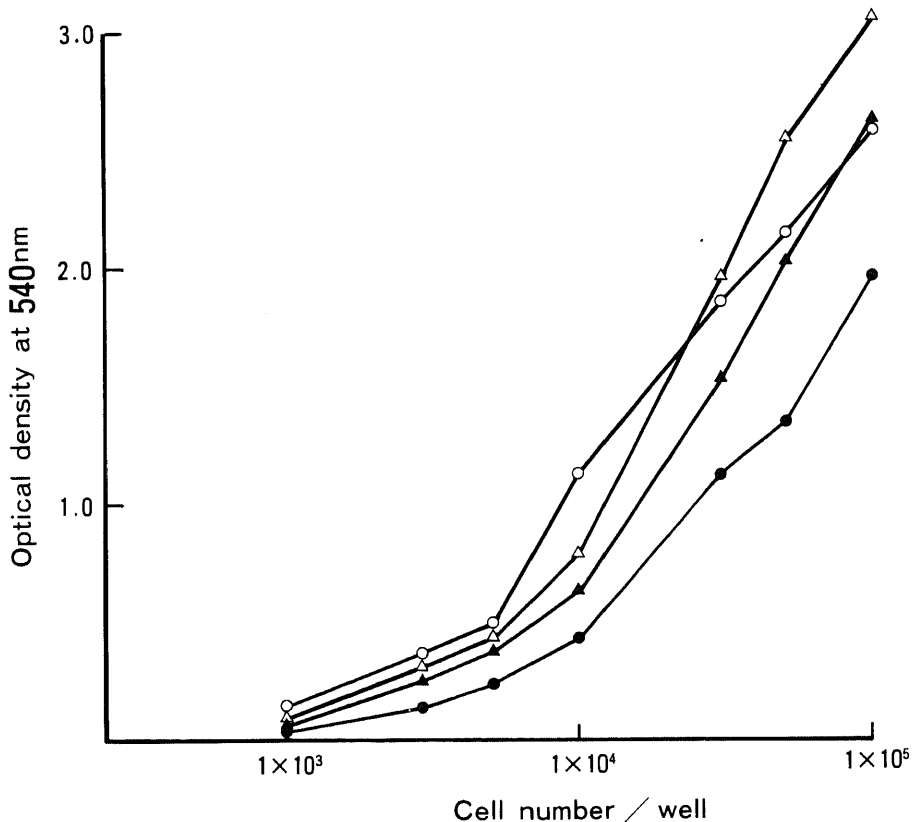


Fig. 1. Relationship between cell number and the optical density at 540nm in MTT assay. A $180 \mu\text{l}$ volume of human osteosarcoma cell suspension was plated in eachwell of 96 well microtiter plate ($1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ cells/well) and a $20 \mu\text{l}$ volume of MTT solution (2mg/ml) was immediately added. The plates were incubated for 4hr and measured. ○, OST; ●, HOS; △, G292; ▲, KHOS-321H.

らの薬剤も最大血中濃度の10分の1においては有効率は低く、他の薬剤と比べ有意差を示さなかった。

4. 播種細胞数と抗癌剤の効果

播種細胞数を 2×10^3 個, 5×10^3 個, 1×10^4 個としてそれぞれの播種細胞数における抗癌剤の効果を検討した(表6)。各薬剤において播種細胞数により抗癌剤の効果に有意差がみられることはなかった。

II. 臨床材料に対する抗癌剤感受性試験

1. 抗癌剤感受性試験

生検または手術により得られた67検体(58症例)にMTT比色法を行った。3日間培養後のコントロール群のOD(540nm)は $0.021 \sim 2.268$ (0.660 ± 0.468)であった。ODが0.2以上の値を示したものを感受性判定可能とした。64検体(55症例)95.5%に抗癌剤感受性判定が可能であった。ODが0.2未満であった3検体は播種細胞数が 5×10^3 個であった2検体(症例9と症例34)と播種細胞数が 7×10^3 個であった1検体(症例19)であった。 1×10^4 個以上を播種した検体は全て判定可能であった。感受性を判定することのできた薬剤数は1~13剤(8.4 ± 3.5 , 平均値 \pm 標準偏差)であった(表1, 2)。

2. 抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果との関連性

感受性判定可能であったものの中で、臨床効果との関連性について検討可能であったものは30検体(25

症例)であった(表7)。その内訳は骨腫瘍が12検体(10症例)で軟部腫瘍が18検体(15症例)であった。このうち生検材料に対して感受性試験を行い、その結果から『感受性あり』と判定された薬剤を臨床に使用できた前向き研究のものは11検体(11症例, 症例1, 6, 7, 11, 20, 22, 32, 35, 45, 50, 58)で、骨腫瘍が6検体, 軟部腫瘍が5検体であった。既に化学療法が施行されていたか、感受性試験の結果にもとづかず薬剤を投与した後向き研究のものは19検体(19症例)で、骨腫瘍が6検体, 軟部腫瘍が13検体であった。30検体のうち本法にて『感受性あり』と判定され、臨床的にも『有効』と判定されたもの(真陽性, true-positive)は15検体で、逆に本法にて『感受性なし』と判定され、臨床的にも『無効』と判定されたもの(真陰性, true-negative)は10検体であった。また本法にて『感受性あり』と判定されたが、臨床的には『無効』と判定されたもの(偽陽性, false-positive)は2検体で、さらに本法にて『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(偽陰性, false-negative)は3検体であった。以上より本法の臨床的な感受性に対する予測率(真陽性検体数/真陽性検体数+偽陽性検体数, 真陽性率, true-positive rate)は88.2%(15/17)で、耐性に対する予測率(真陰性検体数/真陰性検体数+偽陰性検体数, 真陰性率, true-negative

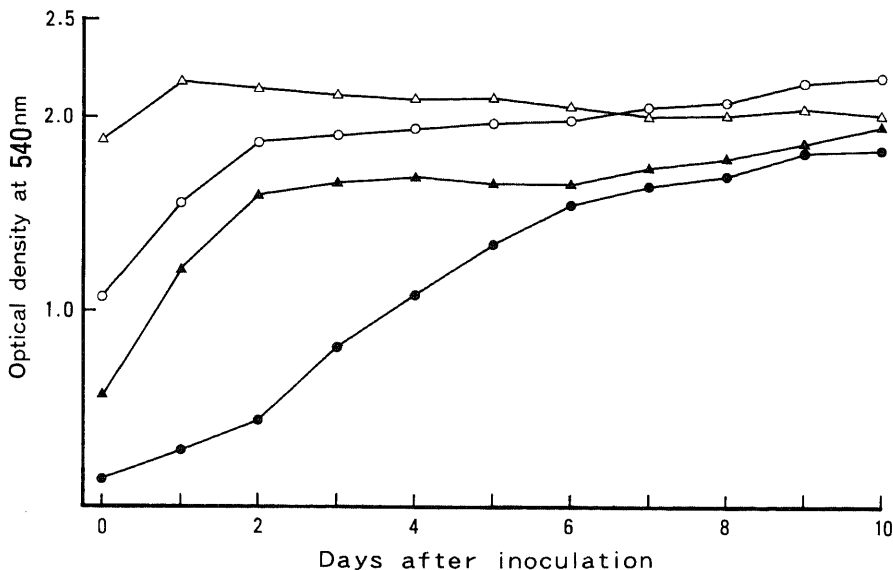


Fig. 2. Relationship between incubation period of tumor cells tested and the optical density in MTT assay. OST cells were plated and incubated for 1~10 days. After incubation, the plates were incubated for another 4hr with MTT and measured. Initial cell number: ●, 1×10^3 /well; ▲, 5×10^3 ; ○, 1×10^4 ; △, 2×10^4 .

Table 4. Effect of anticancer drugs for human osteosarcoma at the peak plasma concentration

Drug	Concen- tration (μ g/ml)	Cytotoxic index ^a (mean \pm SD, %) in cell line of											Efficacy rate ^b
		OST	HOS	HOS 24OS	KHOS 24OS	MG63	KHOS /NP	KHOS 321H	KHOS HOS	MNNG HOS	SAOS-2	G292	
ACD	0.08	93.7 \pm 4.8	88.4 \pm 9.3	94.1 \pm 5.5	94.3 \pm 0.6	95.1 \pm 0.3	71.6 \pm 14.7	59.4 \pm 1.8	33.7 \pm 7.1	48.2 \pm 7.8	60.7 \pm 10.3	33.1 \pm 10.5	8/11
ADM	0.6	87.4 \pm 5.1	90.7 \pm 5.3	82.9 \pm 13.8	86.2 \pm 4.2	93.6 \pm 1.9	82.1 \pm 9.0	56.3 \pm 5.0	87.2 \pm 4.0	42.3 \pm 9.7	95.3 \pm 2.3	77.2 \pm 3.7	10/11
BLM	3.0	22.4 \pm 2.7	56.3 \pm 5.2	67.6 \pm 11.2	50.7 \pm 8.5	79.4 \pm 12.7	67.5 \pm 6.0	56.4 \pm 12.9	24.7 \pm 6.9	37.5 \pm 1.7	58.7 \pm 8.8	28.3 \pm 10.9	7/11
CDDP	2.5	66.7 \pm 6.3	81.1 \pm 7.6	88.8 \pm 9.9	73.5 \pm 7.9	91.8 \pm 5.1	90.1 \pm 3.9	86.0 \pm 6.4	79.3 \pm 4.3	61.0 \pm 6.0	96.4 \pm 1.5	70.5 \pm 8.6	11/11
Arp-C	250.0	29.2 \pm 8.3	55.0 \pm 3.8	47.4 \pm 8.9	58.9 \pm 5.6	64.2 \pm 3.3	22.0 \pm 9.7	48.9 \pm 7.1	34.0 \pm 9.2	18.1 \pm 8.2	83.4 \pm 7.7	17.7 \pm 9.1	4/11
Va-P	34.0	94.7 \pm 2.7	96.2 \pm 1.7	85.9 \pm 8.2	83.8 \pm 5.8	84.0 \pm 10.5	83.2 \pm 6.8	78.4 \pm 5.0	83.3 \pm 5.9	18.4 \pm 3.3	88.0 \pm 4.1	66.3 \pm 5.9	10/11
5-Fu	60.0	36.4 \pm 8.3	67.3 \pm 1.1	80.4 \pm 7.3	47.4 \pm 3.0	83.6 \pm 1.4	66.1 \pm 14.6	49.1 \pm 5.5	40.2 \pm 10.3	36.5 \pm 10.7	63.6 \pm 8.9	69.4 \pm 10.2	6/11
MTX	400.0	50.1 \pm 3.1	64.4 \pm 0.7	60.4 \pm 1.6	54.7 \pm 1.5	53.4 \pm 0.5	69.8 \pm 0.7	55.3 \pm 1.5	34.0 \pm 3.2	36.7 \pm 5.1	90.3 \pm 1.7	31.2 \pm 12.0	8/11
MMC	1.5	34.5 \pm 4.4	45.9 \pm 4.0	68.2 \pm 13.6	58.9 \pm 8.5	62.0 \pm 13.4	37.7 \pm 2.8	57.9 \pm 5.4	47.8 \pm 11.3	27.1 \pm 8.0	91.1 \pm 3.3	21.3 \pm 5.2	5/11
VLB	0.8	78.5 \pm 5.9	93.7 \pm 1.5	83.7 \pm 8.8	52.8 \pm 7.6	86.2 \pm 0.2	80.0 \pm 7.2	77.1 \pm 9.6	46.4 \pm 9.3	42.7 \pm 7.4	78.7 \pm 8.4	3.2 \pm 5.4	8/11
VCR	0.37	78.6 \pm 8.3	94.4 \pm 1.8	87.4 \pm 5.2	62.2 \pm 7.4	74.3 \pm 8.8	81.9 \pm 5.3	76.7 \pm 12.2	56.7 \pm 4.1	52.3 \pm 5.0	90.6 \pm 3.1	23.8 \pm 6.1	10/11
VDS	0.05	69.4 \pm 5.7	87.7 \pm 2.7	60.1 \pm 16.7	49.9 \pm 6.0	62.1 \pm 14.4	63.3 \pm 11.5	47.4 \pm 7.9	47.2 \pm 4.2	42.5 \pm 11.8	92.0 \pm 2.2	19.2 \pm 2.4	6/11
CPA	30.0	98.7 \pm 0.3	99.4 \pm 0.1	99.2 \pm 0.1	99.3 \pm 0.1	99.5 \pm 0.1	99.0 \pm 0.3	99.5 \pm 0.1	97.7 \pm 0.3	97.2 \pm 0.1	96.4 \pm 0.6	95.8 \pm 0.4	11/11

a) Cytotoxic index was expressed as percent calculated by the following formula: (1 - mean of optical density of treated wells/mean of optical density of control wells) \times 100.

b) Efficacy rate = number of cell lines with cytotoxic index higher than 50%/total number of cell lines.

Table 5. Effect of anticancer drugs for human osteosarcoma at the 1/10 peak plasma concentration

Drug	Concen- tration (μ g/ml)	Cytotoxic index ^a (mean \pm SD, %) in cell line of											Efficacy rate ^b
		OST	HOS	HOS 24OS	KHOS 24OS	MG63	KHOS /NP	KHOS 321H	KHOS HOS	MNNG HOS	SAOS-2	G292	
ACD	0.008	21.3 \pm 10.8	0.0 \pm 0.0	53.2 \pm 11.7	37.8 \pm 4.6	61.7 \pm 6.8	58.5 \pm 7.0	0.0 \pm 0.0	9.9 \pm 14.0	38.4 \pm 4.1	0.0 \pm 0.0	4.5 \pm 3.7	3/11
ADM	0.06	29.9 \pm 7.2	9.1 \pm 9.8	47.1 \pm 3.5	14.7 \pm 2.2	58.9 \pm 5.4	53.6 \pm 1.1	0.0 \pm 0.0	28.3 \pm 7.8	12.4 \pm 10.4	80.5 \pm 2.8	15.9 \pm 6.5	3/11
BLM	0.3	17.3 \pm 5.3	7.3 \pm 5.1	56.5 \pm 8.2	6.3 \pm 8.9	57.6 \pm 0.8	44.2 \pm 6.8	1.7 \pm 1.3	10.7 \pm 4.8	5.7 \pm 4.0	37.6 \pm 9.6	11.0 \pm 12.2	2/11
CDDP	0.25	12.1 \pm 12.9	3.4 \pm 2.7	53.0 \pm 3.5	25.6 \pm 5.0	63.3 \pm 1.5	36.4 \pm 7.5	0.0 \pm 0.0	20.6 \pm 11.5	0.0 \pm 0.0	65.5 \pm 2.0	7.1 \pm 9.0	3/11
Arp-C	25.0	27.2 \pm 3.3	13.2 \pm 4.8	34.8 \pm 1.5	37.2 \pm 6.9	54.5 \pm 0.5	22.6 \pm 0.5	43.5 \pm 4.9	30.5 \pm 3.3	12.8 \pm 9.0	0.0 \pm 0.0	8.1 \pm 12.8	1/11
VP-16	3.4	27.3 \pm 6.4	8.1 \pm 11.4	66.3 \pm 4.7	45.6 \pm 8.9	80.0 \pm 8.3	81.5 \pm 3.9	23.3 \pm 6.3	55.0 \pm 8.6	14.6 \pm 8.5	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	4/11
5-Fu	6.0	24.5 \pm 10.4	0.0 \pm 0.0	75.9 \pm 2.0	37.8 \pm 8.4	78.4 \pm 0.7	58.2 \pm 1.9	24.6 \pm 2.1	28.1 \pm 2.0	34.3 \pm 4.9	0.0 \pm 0.0	34.3 \pm 5.6	3/11
MTX	40.0	22.9 \pm 13.8	63.0 \pm 4.4	52.8 \pm 1.4	40.9 \pm 6.5	51.6 \pm 0.9	69.1 \pm 0.6	48.9 \pm 2.8	28.4 \pm 1.7	28.3 \pm 8.4	69.7 \pm 11.3	3.8 \pm 3.2	5/11
MMC	0.15	31.3 \pm 4.6	3.6 \pm 2.6	59.4 \pm 3.8	26.9 \pm 4.1	51.9 \pm 0.9	31.6 \pm 1.8	0.5 \pm 0.8	39.8 \pm 1.7	23.1 \pm 11.0	85.7 \pm 2.7	12.4 \pm 8.0	3/11
VLB	0.08	73.1 \pm 3.5	11.3 \pm 12.3	74.7 \pm 3.0	48.0 \pm 2.8	72.4 \pm 2.0	36.5 \pm 9.8	0.0 \pm 0.0	41.8 \pm 2.0	35.8 \pm 1.9	83.5 \pm 1.5	9.4 \pm 9.9	4/11
VCR	0.037	70.3 \pm 2.4	50.3 \pm 3.1	86.7 \pm 2.5	48.2 \pm 2.1	72.8 \pm 0.4	74.4 \pm 0.8	39.4 \pm 2.3	52.5 \pm 1.5	49.1 \pm 7.3	83.7 \pm 1.7	7.5 \pm 9.0	7/11
VDS	0.005	27.2 \pm 11.3	0.0 \pm 0.0	18.9 \pm 6.1	17.7 \pm 12.9	51.5 \pm 6.1	2.2 \pm 3.1	4.0 \pm 4.4	44.1 \pm 8.8	34.8 \pm 4.4	71.5 \pm 3.7	16.9 \pm 6.0	2/11
CPA	3.0	10.7 \pm 1.5	49.6 \pm 9.8	98.0 \pm 1.2	23.9 \pm 5.6	52.5 \pm 8.7	66.8 \pm 4.1	0.0 \pm 0.0	21.3 \pm 2.4	9.8 \pm 6.5	84.8 \pm 1.8	22.2 \pm 5.4	4/11

a) Cytotoxic index was expressed as percent calculated by the following formula: (1 - mean of optical density of treated wells/mean of optical density of control wells) \times 100.

b) Efficacy rate = number of cell lines with cytotoxic index higher than 50%/total number of cell lines.

Table 6. Effect of drugs at various initial cell numbers on MG63 and G292 cells in MTT assay

Drug	Concentration ^{a)} (μ g/ml)	Cytotoxic index (mean \pm SD, %) in cell line of					
		MG63 at initial cell number of			G292 at initial cell number of		
		2×10^3	5×10^3	1×10^4	2×10^3	5×10^3	1×10^4
ACD	0.08	86.0 \pm 9.4	95.0 \pm 5.7	94.3 \pm 0.6	44.0 \pm 6.0	52.7 \pm 6.8	48.2 \pm 7.8
ADM	0.6	85.0 \pm 0.8	84.7 \pm 1.4	86.2 \pm 4.2	54.7 \pm 3.4	52.9 \pm 10.1	42.3 \pm 9.7
BLM	3.0	50.7 \pm 9.9	40.3 \pm 2.0	50.7 \pm 8.5	35.5 \pm 5.1	32.9 \pm 9.4	37.5 \pm 1.7
CDDP	2.5	75.9 \pm 5.8	73.5 \pm 9.8	73.5 \pm 7.9	53.0 \pm 6.0	66.8 \pm 4.0	61.0 \pm 6.0
Ara-C	250.0	53.7 \pm 0.8	57.7 \pm 7.1	58.9 \pm 5.6	8.5 \pm 4.3	24.1 \pm 5.9	18.1 \pm 8.2
VP-16	34.0	79.5 \pm 1.4	79.6 \pm 3.6	83.8 \pm 5.8	25.0 \pm 6.8	20.0 \pm 5.6	18.4 \pm 3.3
5-FU	60.0	49.3 \pm 0.8	52.0 \pm 10.5	47.4 \pm 3.0	58.1 \pm 18.8	44.1 \pm 3.8	36.5 \pm 10.7
MTX	400.0	56.6 \pm 4.7	59.0 \pm 3.7	54.7 \pm 1.5	30.0 \pm 5.1	27.1 \pm 8.7	36.7 \pm 5.1
MMC	1.5	62.3 \pm 1.7	62.0 \pm 4.8	58.9 \pm 8.5	20.1 \pm 11.1	22.6 \pm 5.4	27.1 \pm 8.0
VLB	0.8	65.9 \pm 0.5	71.0 \pm 6.0	62.2 \pm 7.4	49.6 \pm 8.6	58.6 \pm 1.6	52.3 \pm 5.0
VCR	0.37	54.5 \pm 1.4	59.3 \pm 2.0	52.8 \pm 7.6	48.0 \pm 7.7	47.4 \pm 1.6	42.7 \pm 7.4
VDS	0.05	63.1 \pm 2.2	58.0 \pm 2.8	59.9 \pm 6.0	37.8 \pm 12.8	42.8 \pm 6.8	42.5 \pm 11.8
CPA	30.0	99.0 \pm 2.0	98.5 \pm 1.5	99.3 \pm 0.1	98.3 \pm 1.5	96.5 \pm 2.2	97.2 \pm 0.1

a) Effect of each drug was examined at peak plasma concentration.

Table 7. Clinical response and MTT assay in bone and soft tissue sarcomas

Case	Name	Type of tumor ^{a)}	Clinical chemotherapy	Clinical effect ^{b)}	Results of MTT assay	Correlation ^{c)}
					Drug (cytotoxic index, %)	
1-1	A.N.	Osteosarcoma	CDDP	PR	CDDP (85)	TP ^{d)}
1-2					CDDP (48)	FN
5	N.Y.	Osteosarcoma	CDDP, MTX	NC	CDDP (4), MTX (0)	TN
6	S.N.	Osteosarcoma	CDDP	PR	CDDP (59)	TP ^{d)}
7	K.H.	Osteosarcoma	CDDP	CR	CDDP (50)	TP ^{d)}
8	A.K.	Osteosarcoma	CDDP	PR	CDDP (80)	TP
10	T.K.	Osteosarcoma	CDDP	PR	CDDP (61)	TP
11-1	S.T.	Osteosarcoma	CDDP, CPA, ACD	PR	CDDP (52), CPA (65), ACD (58)	TP ^{d)}
20-1	A.Y.	MFH of bone	CDDP	PR	CDDP (79)	TP ^{d)}
20-2					CDDP (74)	TP
22	T.N.	MFH of bone	CDDP	CR	CDDP (73)	TP ^{d)}
26	T.K.	Malignant GCT	VP-16, CPA	PR	VP-16 (23), CPA (0)	FN
27	S.F.	MFH of soft part	CDDP	NC	CDDP (35)	TN
31-1	Y.S.	MFH of soft part	CDDP, ADM	PD	CDDP (2), ADM (4)	TN
31-2					CDDP (20), ADM (0)	TN
32	T.S.	MFH of soft part	CDDP	PR	CDDP (56)	TP ^{d)}
35	K.M.	Synovial sarcoma	CDDP, ADM	PR	CDDP (57), ADM (74)	TP ^{d)}
38	N.W.	Synovial sarcoma	CDDP, ADM	PR	CDDP (51), ADM (64)	TP
39-1	K.S.	Synovial sarcoma	CDDP, ADM	PR	CDDP (8), ADM (6)	FN
41-1	A.O.	Liposarcoma	CDDP	PD	CDDP (13)	TN
41-2					CDDP (45)	TN
44	T.O.	Liposarcoma	CDDP	NC	CDDP (23)	TN
45-1	M.S.	Rhabdomyosarcoma	ADM, ACD	PR	ADM (92), ACD (93)	TP ^{d)}
47	J.U.	Rhabdomyosarcoma	ADM, MTX	PD	ADM (0), MTX (0)	TN
48	Y.O.	Rhabdomyosarcoma	ACD, BLM, VCR	PD	ACD (60), BLM (26)	FP
49	Y.T.	Rhabdomyosarcoma	ACD, VP-16, VCR	PR	ACD (89), VP-16 (79), VCR (57)	TP
50-1	F.H.	Malignant schwannoma	CDDP	PD	CDDP (52)	FP ^{d)}
50-2					CDDP (23)	TN
51	K.T.	Malignant schwannoma	ADM, MMC	NC	ADM (14), MMC (0)	TN
58	K.M.	Malignant lymphoma	ACD, VCR	PR	ACD (58), VCR (53)	TP ^{d)}

a) MFH, malignant fibrous histiocytoma; GCT, giant cell tumor

b) PR, partial response; NC, no change; CR, complete response; PD, progressive disease

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

d) Correlation were evaluated in prospective studies.

rate) は76.9%であった。また全体としての予測率(真陽性検体数+真陰性検体数/全検体数は83.3% (25/30) と高いものであり、Yates の連続補正を用いて χ^2 検定を行った結果、有意な臨床効果の予言性が認められた($p < 0.01$) (表8)。11症例において実施できた前向き研究の結果は、11例中10例(90.9%)で感受性試験の結果にもとづいて投与された薬剤の臨床効果は「有効」と判定され、前向き研究においても本法の高い予言性が示された。

考 察

骨悪性腫瘍とくに骨肉腫、ユーイング肉腫の予後は化学療法の導入により飛躍的に改善された。骨肉腫は1960年代までは5年生存率5~20%¹⁸⁾と極めて予後不良であったが、1970年代以後ADM, MTX, CDDPを中心とした化学療法が強力に行われるようになり¹⁹⁻²¹⁾、その予後は大幅に改善され5年生存率50%以上となった¹⁹⁾。また、ユーイング肉腫においてもRosenら²⁰⁾、Jafferら²¹⁾などのプロトコールにより飛躍的な治療成績の向上がみられている。一方、軟部悪性腫瘍においては化学療法の導入は遅れていたがCYVADIC(CPA+VCR+ADM+dimethyl triazeno imidazole carboxamide)療法²²⁾、VAC(VCR+ACD+CPA)療法²³⁾やRosenのTプロトコール(T-protocol)²⁴⁾などが行われるようになり、その有効性が報告されている。そして化学療法が有効な場合には生命予後を改善するのみならず、腫瘍切除縁を縮小することにより患肢温存手術の適応が拡大され、機能的予後の改善も望めるようになってきた²⁵⁾。このように今日では化学療法は骨軟部悪性腫瘍の集学的治療の一環として不可欠なものとなってきている。しかし、骨軟部悪性腫瘍の組織型が非常に多彩であること、その発生頻度が骨肉腫で年間全国で百数十例、ユーイング肉腫で二十数例などと低く²⁶⁾、大規模な研究が行えないことや軟部悪性腫瘍に対する化学療法の取り組みの遅れなどから、骨肉腫や小児の横紋筋肉腫を除いては現在のところ広く認められたプロトコールはないのが現状である。また骨肉腫に対するRosenのTプロトコール²⁴⁾や軟部悪性腫瘍に対するCYVADIC療法に代表されるように非常に多数の薬剤の併用療法が主体となっている。しかし、腫瘍は同一組織型でも、同一個体であっても感受性に差異があり¹⁹⁾、これらの薬剤の中には当然無効薬剤も含まれることが予測される。無効な薬剤を投与された場合は患者はその副作用のみを被ることになる。また、抗癌剤に対し耐性を生じ以後の化学療法が効果を示しにくくなる。したがって、理想的には個々の症

例に対して抗癌剤感受性試験を行い、有効な薬剤を選択し、無効な薬剤を排除すること、すなわち化学療法の個別化(Chemo-individualization)が望ましい。このためこれまで種々の抗癌剤感受性試験が試みられてきた。

抗癌剤感受性試験には大別して試験管内感受性試験(in vitro assay)と試験管外感受性試験(in vivo assay)がある。試験管内感受性試験としてはHTCA⁹⁾¹⁰⁾、色素染色排除テスト(dye exclusion test)²⁷⁾、アイソトープ法(scintillation assay)⁹⁾¹⁰⁾、コハク酸脱水素酵素阻害試験(succinic dehydrogenase inhibition test, SDI法)¹¹⁾などがあげられ、試験管外感受性試験としてはヌードマウスへの皮下移植法⁷⁾⁸⁾、腎被膜下移植法(sub renal capsular assay, SRC assay)²⁸⁾、受精鶏卵漿尿膜法²⁹⁾³⁰⁾などがあげられる。しかし、いずれの方法も長所と短所があり、簡便性、迅速性、予言性といった多くの条件を満たす臨床適用可能な理想的な抗癌剤感受性試験は未だにないのが現状である。当科においても骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験としてHTCA、受精鶏卵漿尿膜法などが試みられてきた。

HTCAはSalmonとHamburger⁹⁾により開発された二層軟寒天培地上でコロニーを形成する細胞に対する抗癌剤の感受性をみる方法である。この方法は臨床効果との高い相関性が注目され、Tomitaら¹⁰⁾はこれを骨肉腫に対する抗癌剤感受性試験として検討した。その臨床効果との相関は真陽性率が78%、真陰性率が73%、全体的な予測率は75%と高いものであった³¹⁾。しかし癌腫に比べ肉腫ではコロニー形成率が低く、横川³²⁾は一旦単層培養してからHTCAを行う改良法の培養HTCA(cultivated HTCA)を開発し、その成功率を骨肉腫においては原法の26%から78%に改善しえたが、肉腫全体としては46%と低率であった。また感受性判定までに原法で2~3週間、培養HTCAでは4~6週間と長期間を要すること、細胞凝集によりコロニー数の算定が不正確になることなどが問題であった³¹⁾³²⁾。

佐々木³³⁾は受精鶏卵が免疫学的に未発達でありヒト腫瘍を漿尿膜上に移植できることに注目し、これを抗癌剤感受性試験法に応用できることを報告した。杉原³⁴⁾はこの方法を骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験として研究した。その結果、腫瘍は94%に生着し、感受性判定が可能であった。臨床効果との相関性も高く、真陽性率が100%、真陰性率が93%で全体としての予測率は95%であった。しかし、人工気室の作成に手技的習熟が要求されることや効果判定を腫瘍重量により行っているため腫瘍増殖の遅いものは効果判

定が不正確になる恐れがあることなどの問題がある。

臨床に応用できる抗癌剤感受性試験の条件として、1) 正確に臨床効果の予言性のあること、2) 簡便でかつ迅速に判定できるものであること、3) 少ない臨床材料で実施可能であること、4) 成功率が高いこと、5) 安価な方法であること、6) 評価が客観的であること、などがあげられる。これらの条件のうち臨床効果の予言性が高いことがもちろん重要である。臨床効果の予言性を厳密に検討するためには前向き研究が必要とされるが、整形外科領域においては切筋及び広範切除などの手術により腫瘍を余すことなく切除してしまうため手術後の前向き研究はほとんど不可能である。このため生検後の術前化学療法において前向き研究の必要がある。しかし、HTCAのように判定まで長期間を要するものでは生検後それだけの期間を化学療法を行わず待機しなければならず、実際上は不可能である。このため、より迅速な感受性試験法の確立が切望された。また抗癌剤感受性試験法として広く一般化するためには簡便であることも非常に重要な条件である。

Kondo ら¹⁾は簡便で迅速な抗癌剤感受性試験として、コハク酸脱水素酵素の活性を指標とした SDI 法を発表した。これは細胞活性を酵素学的に測定する試験である。生細胞内に存在するコハク酸脱水素酵素はコハク酸を酸化する際に適当な受容体にコハク酸の水素分子を転移 (transfer) するが、この受容体にテトラゾリウム系酸化還元色素を用い、還元されて生じたホルマザン塩の色の差を比色計により測定する。抗癌剤により細胞が死滅すればこの酵素活性は失われ、還元能力を喪失することになる。Mosmann¹²⁾はテトラゾリウム塩として MTT を用い、96穴マイクロウエルプレートを用いて培養し、マイクロウエルプレートリーダーにて測定する MTT 比色法を報告し、リンパ球幼若化測定法などに用いた。Carmichael ら³³⁾はヒト肺癌由来培養細胞株を用いて MTT 比色法を新規抗癌剤のスクリーニングなどに使用できる可能性を示した。著者はこの方法の簡便性、迅速性に注目し、骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法として確立すべく検討を行った。

MTT は生細胞内の活動性ミトコンドリア内に存在する脱水素酵素により還元され暗青色のホルマザン結晶に変化する。この結晶の OD はリンパ腫由来細胞株などにおいて生細胞数と良好な相関関係を示すことが報告されている¹³⁾。今回ヒト骨肉腫由来細胞株において 1×10^3 個/ウエルから 1×10^5 個/ウエルの範囲において MTT ホルマザン量と細胞数の間に有意な相関関

係を認め、骨軟部悪性腫瘍に対しても MTT 比色法を用いて抗癌剤の効果測定することが可能なことが確かめられた。

播種細胞数は 1 ウエルあたり 2×10^4 個を播種した場合は OD が播種後 1 日目よりプラトーとなり、 2×10^3 個を播種した場合はプラトーに達するまでに 7 日間を要しており、3 日目まで OD が直線的に増加した $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 個が播種細胞数として適当と思われた。また播種細胞数の多少により感受性の結果が左右されないことも示された。

試験管内抗癌剤感受性試験において、検試薬剤の濃度の設定は重要な問題である。著者は 11 種のヒト骨肉腫由来細胞株に対して臨床投与時における理論的最大血中濃度およびその 10 分の 1 の濃度¹²⁾を用いて検討した。最大血中濃度においては従来骨肉腫に有効とされている^{10)~13)22)} ACD, ADM, BLM, CDDP, MTX, VCR, CPA が高い有効率を示した。しかしこれらの薬剤も最大血中濃度の 10 分の 1 においては有効率は低く、他の薬剤と有意差を認めなかった。これら 11 種のヒト骨肉腫由来培養細胞株の薬剤感受性は臨床における骨肉腫の感受性を反映しているものと推測されることから、実際の感受性試験においては最大血中濃度を用いて効果判定を行うことが妥当と考えられた。したがって臨床材料に対する抗癌剤感受性試験においては最大血中濃度を用いて効果判定を行った。

エトボサイドは従来骨肉腫には用いられていなかったが、今回の検討においてほとんど全ての細胞株に対して高い CI 値を示したことから、骨肉腫に対する化学療法の新しい有効薬剤になりうると考えられた。

これらのヒト骨肉腫由来培養細胞株を用いた基礎的検討の結果をふまえて、生検や手術により得られた新鮮臨床材料に対して抗癌剤感受性試験を行った。67 検体に行い 64 検体に感受性判定が可能であり、成功率は 95.5% ときわめて高いものであった。培養細胞株を用いた検討では播種細胞数が 2×10^3 個、 5×10^3 個/well であっても抗癌剤の効果判定の際 CI 値に有意差を認めず、OD も良好であったので、臨床材料に対する抗癌剤感受性試験において当初は 5×10^3 個 $\sim 1 \times 10^4$ 個/ウエル程度を播種していたが、3 日間培養後コントロール群の OD が非常に低値を示し感受性判定ができないものがあった。播種細胞数を 1×10^4 個/ウエル以上とすることにより OD は全例 0.2 以上の良好な値を示し、全例に感受性判定が可能となった。またどの組織型においても高い成功率を示し、成功率は骨肉腫で 92%、軟骨肉腫で 88%、軟部 MFH で 89%、その他の組織型は 100% であった。HTCA においては成功率は

骨肉腫で58%，軟骨肉腫で33%，骨 MFH で55%，軟部 MFH で64%，滑膜肉腫で64%，脂肪肉腫で9%，横紋筋肉腫で55%などであり³²⁾，本法は全体としての成功率が高いばかりでなく，HTCA では成功率が極めて低かった脂肪肉腫や軟骨肉腫においても成功率が高いことが明らかとなった。

また，本法は播種細胞数は1ウエルあたり 1×10^4 個であり，これはHTCAが1ウエルあたり 1×10^5 個を要するのに比べ³²⁾より小数の細胞にて感受性試験を行うことができる。臨床材料より得られる細胞数には限りがあり，小数の細胞で感受性試験を施行できればそれだけ多数の抗癌剤に対する感受性判定が可能となる。本法では平均8.4剤と多数の抗癌剤に対する判定が可能であった。

感受性判定が可能であったもののうち，30検体において臨床効果との関連性が検討可能であった。またこのうち11検体について前向き研究を行うことができた。HTCAにおいては前向き研究はできず全て後向き研究であったが，これはHTCAにおいては感受性判定までに2～6週間と長期間を要するため，この期間化学療法を行わず待機することは実際上不可能であったためであった。本法は感受性判定までに要する期間が3日間と短期間であるため，生検後本法による感受性試験の結果を待ってから『感受性あり』と判定された抗癌剤を投与することが可能であった。前向き研究において本法にて『感受性あり』と判定された抗癌剤を用いて実際に化学療法を行った結果，11症例中10検体(91%)において臨床効果は『有効』であった。1症例が『無効』であったが(症例50)，この症例では生検時の感受性試験でCDDPが『感受性あり』と判定され，化学療法後得られた手術材料に対する感受性試験の結果ではCDDPは『感受性なし』と判定された。この結果からこの症例においては化学療法によって耐性を生じ『無効』となった可能性が示唆された。

後向き研究も加えた全体的な結果，本法は骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法として，真陽性率が87.5%，真陰性率が76.9%，全体的な臨床効果の予測率が82.8%と，高い臨床効果との関連性を有することが確認された。これはHTCAにおける真陽性率78%，真陰性率73%，全体的な予測率75%と比べても高いものであった。

また本法は3日間培養後マイクロプレートに直接MTT試薬を入れればよく，4時間後培地を吸引しDMSOを加える以外洗浄などの操作が不要で，測定もマイクロプレートリーダーを用いて1プレートを数秒から数分で測定でき，結果も正確な数値として表す

ことができる。

このように本法は1)簡便であること，2)3日間と迅速に結果が得られること，3)少量の材料で多数の薬剤の感受性を判定できること，4)半自動的に客観的に測定できること，5)組織型にかかわらず成功率が高いこと，6)安価で特別な技術を要しないこと，7)臨床効果との相関が高いことなどが特徴としてあげられる。これらは理想的な抗癌剤感受性試験としての条件を満たしており，本法は骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験として臨床に応用することができる方法になるものと考えられた。

欠点としては培地を吸引する際に注意しないとホルマザン結晶を吸引してしまう恐れがあること，また正常細胞の混入による影響がある恐れがあることが挙げられる。しかし，軟寒天培地を用いるなどの手技を用いると本法の特徴の1つである簡便性が損なわれる。これらの欠点があり得るとしても本研究の結果高い臨床効果との関連性が得られたことにより，MTT比色法は骨軟部悪性腫瘍に対し実用的な抗癌剤感受性試験として有用であり，十分臨床応用が可能な方法であると考えられた。

結 論

骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験としてMTT比色法を用いた方法を新たに検討した。その結果，以下の結論を得た。

1. ヒト骨肉腫由来培養細胞株においてMTTホルマザンのODと細胞数は良好な相関関係を示した。

2. ヒト骨肉腫由来培養細胞株に対する抗癌剤の効果は最大血中濃度においては従来骨肉腫に有効とされているものが多く，最大血中濃度の10分の1においてはこれらの薬剤の有効率は低く，最大血中濃度における効果判定が適当であると考えられた。またエトポサイドの有効率が高く骨肉腫に対する新しい有効な薬剤になると考えられた。

3. 67検体(58症例)の骨軟部悪性腫瘍の臨床材料を用いて，MTT比色法を用いた抗癌剤感受性試験を検討した結果，64検体(95.5%)に感受性判定が可能であった。播種細胞数が 1×10^4 個以上のものは全例判定可能であった。また判定までに要する期間は3日間であった。このように本法は成功率が高く，少量の材料で多数の薬剤の感受性を迅速に判定でき，また簡便，客観的に測定できるという利点があった。

4. このうち30検体(25症例)において臨床効果との関連性が検討可能であった。11検体(11症例)では前向き研究を行うことができ10検体(10症例)において感

受性試験で『感受性あり』と判定された薬剤の臨床効果は『有効』であった。後向き研究も加えた結果、真陽性率は88%、真陰性率は77%、全体としての予測率は83%であり、高い臨床効果との関連性が得られた ($p < 0.01$)。

このように MTT 比色法を用いた抗癌剤感受性試験は簡便、迅速で成功率が高く少量の材料で多数の薬剤の感受性を判定できる方法であり、また臨床効果に対する高い予言性も得られたことから、骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験として臨床に 응용できる実用的な方法であることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授および、直接御指導、御教示をいただきました金沢大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。本研究遂行に際し御助言、御協力いただきました金沢大学がん研究所化学療法部田中基裕、遠藤良夫両先生、また御協力いただいた土屋弘行、高木泰孝、土田敏典先生の他、整形外科腫瘍班の先生方に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は第48回日本癌学会、第23回制癌剤適応研究会、第23回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、第5回日本整形外科学会基礎学術集会において発表した。本研究の一部は、平成2年度文部省科学研究費補助金一般研究B(課題番号01480365)に依ったことを付記する。

文 献

- 1) Kondo, T., Imamura, T. & Ichihashi, H.: In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann*, **57**, 113-121 (1966).
- 2) Karnofsky, D. A.: Differences between cancers in terms of therapeutic responses. *Cancer Res.*, **16**, 687-697 (1956).
- 3) 長瀬千秋: 培養されたヒト肺癌細胞の制癌剤に対する感受性の測定に関する実験的研究. *肺癌*, **20**, 11-20 (1980).
- 4) 田口鐵男, 薄金真雄, 藤田昌英: Organ culture を用いた制癌剤感受性試験について. *最新医学*, **33**, 48-53 (1978).
- 5) Bickis, I. J., Henderson, I. W. & Questel, J. H.: Biological studies of human tumors. II. In vitro estimation of individual tumor sensitivity anticancer agents. *Cancer*, **19**, 103-113 (1966).
- 6) 藤本 茂, 赤尾健夫, 橋川征夫, 伊藤文二, 高橋誠, 石神博昭, 南 智仁, 宮崎 勝, 伊藤健次郎: Isotope を使用した組織培養による制癌剤感受性試験. *最新医学*, **33**, 2270-2277 (1978).
- 7) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **77**, 758-760 (1969).
- 8) Povlsen, C. O. & Jacobson, G. K.: Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mice. *Cancer Res.*, **35**, 2790-2796 (1975).
- 9) Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 10) Tomita, K. & Yokogawa, A.: Chemosensitivity testing with tumor colony-forming assay for human osteosarcoma. *J. Antibiot.*, **36**, 1228-1233 (1986).
- 11) Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55-63 (1983).
- 12) Scheithauer, W., Clark, G. M., Salmon, S. D., Dorda, W., Shoemaker, R. H. & Von Hoff, D. D.: Model for estimation of clinically achievable plasma concentrations for investigational anti-cancer drugs in man. *Cancer Treat. Rep.*, **70**, 1379-1382 (1986).
- 13) 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍委員会: 整形外科・病理悪性骨腫瘍取り扱い規約, 第2版, 47-54頁, 金原出版, 東京, 1990.
- 14) 小山善之, 斉藤達雄: 日本癌治療学会固形がん化学療法の臨床効果判定基準. *日本癌治療学会誌*, **21**, 929-953 (1986).
- 15) Link, M. P.: Adjuvant Therapy in the Treatment of Osteosarcoma. Important Advances in Oncology, 1st ed., p193-207, Lippincott, Philadelphia, 1986.
- 16) Cortes, E. P., Holland, J. F. & Glidewell, O.: Amputation and adriamycin in primary osteosarcoma: A 5-year report. *Cancer Treat. Rep.*, **62**, 271-277 (1978).
- 17) Jaffe, N., Frei, C. E., Traggis, D. & Bishop, Y.: Adjuvant methotrexate and citovorom-factor treatment of osteogenic sarcoma. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 994-997 (1974).
- 18) Ochs, J. J., Freeman, A. I., Douglass, H. O., Higby, D. S., Mindell, E. R. & Sinks, L. F.: Cis-dichlorodiammineplatinum (II) in advanced osteogenic sarcoma. *Cancer Treat. Rep.*, **62**, 239-245

(1978).

- 19) 土屋弘行, 富田勝郎: 骨肉腫に対する化学療法について. 臨整外, 22, 1139-1146 (1987).
- 20) Rosen, G., Caparros, B., Mosende, C., McCormick, B., Huvos, A. G. & Marcove, R. C.: Curability of Ewing's sarcoma and considerations for future therapeutic trials. *Cancer*, 41, 888-899 (1978).
- 21) Jaffe, N., Paed, D., Traggis, D., Salian, S. & Cassady, J. R.: Improved outlook for Ewing's sarcoma with combination chemotherapy (vincristine, actinomycin D and cyclophosphamide) and radiation therapy. *Cancer*, 38, 1925-1930 (1976).
- 22) 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 Chemothe. Rep.*, 6, 271-282 (1975).
- 23) Jacobs, E. M.: Combination chemotherapy of metastatic testicular germinal cell tumors and soft part sarcomas. *Cancer*, 25, 324-332 (1970).
- 24) Rosen, G.: Role of chemotherapy in the management of bone and soft tissue sarcoma. *In* R. Coombs & G. Friedlaender (eds.), *Bone Tumour Management*, 1st ed., p280-294, Butterworth, London, 1987.
- 25) 土屋弘行, 富田勝郎, 安竹秀俊, 森下 肇, 森川精二, 大野賢朗, 上田善道: 術前化学療法による骨肉

腫患肢温存手術の適応拡大. 別冊整形外科, 17, 68-71 (1990).

- 26) 日本整形外科学会骨軟部腫瘍委員会: 全国骨腫瘍患者登録一覧(昭和61年度), 108-109 頁, 国立がんセンター, 東京, 1986.
- 27) Schrek, R.: A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Am. J. Cancer*, 28, 389-392 (1936).
- 28) Bogden 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.), *Proceedings of the Symposium on the Use of Athymic (Nude) Mice in Cancer Research*, 1st ed., p231-250, Fischer, Inc., New York, 1978.
- 29) 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).
- 30) 杉原 信: 受精鶏卵漿尿膜法を用いた骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験の研究. 十全医会誌, 97, 1032-1043 (1988).
- 31) 土屋弘行, 富田勝郎, 下崎英二, 安竹秀俊, 森下肇, 森川精二, 大野賢朗: 骨軟部悪性腫瘍における抗癌剤感受性試験としての human tumor clonogenic assay (HTCA). 別冊整形外科, 17, 68-71 (1990).
- 32) 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).
- 33) Carmichael, J., Mitchell, J. B., DeGraff, W. G., Gamson, J., Gazdar, A. F., Johnson, B. E., Glatstein, E. & Minna, J. D.: Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br. J. Cancer*, 57, 540-547 (1988).

Chemosensitivity Test for Bone and Soft Tissue Sarcomas Using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylterazolium bromide assay Seiji Morikawa, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **100**, 757—771 (1991)

Key words chemosensitivity test, MTT assay, bone and soft tissue sarcoma

Abstract

Chemotherapy is important in the treatment of patients with bone and soft tissue sarcomas. A practical chemosensitivity test for these tumors has been greatly desired. The present study examined an assay using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenylterazolium bromide (MTT), 96 well microtiter plate and multi-well scanning spectrophotometer (MTT assay) as a chemosensitivity test for bone and soft tissue sarcomas. This assay was based on the selective ability of living cells to reduce MTT, a yellow tetrazolium salt, to a blue-black formazan. The optical density of MTT-formazan was measured semi-automatically using a multi-well scanning spectrophotometer. In 11 cultured human osteosarcoma cell lines, the optical density of the solubilized formazan was found to be proportional to the number of cells. On these cell lines, effective drugs at the peak plasma concentration were actinomycin-D, adriamycin, cis-platinum, methotrexate, cyclophosphamide and vincristine. However, at 1/10 peak plasma concentration, these drugs were not effective. Since these drugs had been reported to be effective against osteosarcoma, this test it suggests that evaluation is valid only at peak plasma concentration. As etoposide, which had not been reported to be effective against osteosarcoma, also showed a high efficacy rate for all cell lines tested, it would also appear to be suitable for chemotherapy of osteosarcoma. On the basis of experimental results on the cell lines used, the MTT assay was applied to clinical specimens. Sixty seven specimens of bone and soft tissue sarcomas were used, each obtained by surgery or biopsy over the past 2 years. Of the 67 specimens, 64 (96%) gave technically successful assay results. All cases seeded over 1×10^4 cells/well were successful. The number of drugs tested in successful specimens were 8.4 (mean). Thirty cases were clinically evaluated prospectively or retrospectively. Analysis of the relationship between this assay and clinical response revealed that 15 cases were true-positive, 2 false-positive, 10 true-negative and 3 false-negative. The true-positive rate was 88%, true-negative rate was 77%, with overall predictive accuracy being 83%. In the MTT assay, many samples and anticancer drugs can be analysed simply and rapidly. A high success rate and a high predictive accuracy of the MTT assay were also shown in this study. The MTT assay would therefore be a practical chemosensitivity test for the treatment of bone and soft tissue sarcomas.