軟部悪性腫瘍におけるhuman tumor Clonogenic assayの研究

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: 下崎, 英二
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7892

金沢大学十全医学会雑誌　第95巻　第4号　698－714　(1986)

軟部悪性腫瘍における human tumor clonogenic assay の研究

金沢大学医学部整形外科学講座（主任：野村　進教授）
下　崎　英　二

(昭和61年8月18日受付)

軟部悪性腫瘍は組織像，悪性度が多岐にわたる上に，各種の腫瘍の症例数が少ないものが多い．このため，その化学療法は未だに全く混沌とした状態にあり，ここに精度の高い制癌剤感受性試験の必要性が叫ばれている．本研究は，近年主に癌腫において，臨床効果との相関性が高い制癌剤感受性試験として注目されている human tumor clonogenic assay (HTCA)を軟部悪性腫瘍に導入し，臨床応用することを目的とした．対象は，過去3年間に得られた軟部悪性腫瘍32例40検体である．方法は，HTCA の原法（standard HTCA)を行う一方，コロニー形成率を高めるために，横川が骨肉腫に対して行った如く，腫瘍細胞を一世代(約13日間)単層培養し，増殖した腫瘍細胞を用いて HTCA を行った(cultivated HTCA)．その結果，原法では感受性判定可能率（30個以上のコロニー形成を認めたもの）23.7%，コロニー形成率 0.0053±0.0051%（mean±SD）で著しく低かったが，cultivated HTCA では，感受性判定可能率70%，コロニー形成率0.0231±0.0186%と有意な向上を認めた(P<0.01)．また，両方法で共に感受性判定可能であった9検体における8制癌剤に対する感受性を推計学的に比較検討したところ両方法間の制癌剤感受性には殆ど差異はなかった（P<0.01)．さらに，軟部悪性腫瘍の組織学的悪性度とコロニー形成との関係についてみると，組織学的悪性度の低い腫瘍（grade 1）においては，まったくコロニー形成を認めず，主に化学療法の対象となる組織学的悪性度の比較的高い腫瘍（grade 2, 3）においては，cultivated HTCA により87.5%と高い感受性判定可能率が得られた．cultivated HTCA の結果と臨床効果との相関を retrospective に評価したところ，true positive rate 80%，true negative rate 100%で，全体的な予言性は91.7%と有意な相関が認められた(P<0.025)．以上から，cultivated HTCA は，軟部悪性腫瘍においても制癌剤感受性試験として非常に有用であり，さらに，その臨床応用にも充分な期待が持てるものと考えられた．

Key words soft tissue sarcoma, human tumor clonogenic assay, chemosensitivity test, monolayer culture, clinical correlation.

近年，数多くの制癌剤が開発され，現在約30種以上の制癌剤が臨床に用いられている．しかし，どの制癌剤をどの腫瘍に，いかなる方法で投与するのが最適であるかに関しては未だ意見の一致を得ていない．これは，同一臓器の腫瘍，同一病理組織像を示す腫瘍であっても，その制癌剤感受性がそれぞれ異なるからに他ならない．とりわけ軟部悪性腫瘍においては，組織像や悪性度が極めて多彩である上に，各種の腫瘍の症例数が少ないため，臨床上，経験的に有効な制癌剤を突き止めることは非常に困難である．このため，軟部悪性腫瘍の化学療法においては未だに制癌剤とその投与法に明確な方向づけがなされていない．

その意味で，制癌剤感受性試験の占める役割は大きく，個々の患者の腫瘍に対して有効な制癌剤が選択でき

Abbreviations: ACD, actinomycin D; ACR, aclarubicin; ADM, adriamycin; CDDP, cisplatinum; CMRL-1066, Connaught Medical Reseach Laboratory Media-1066; CPA, 4-hydroperoxy cyclophosphamide; C×T, concentration-time product; DEAE-dextran, diethylaminoethyl-dextran; DTIC, dimethyl triazeno imidazole carboxamide; EDTA, ethylen-

る，精度の高い制癌剤感受性試験の開発が必要かつ急務であると考える．ところが，これまでにも数多くの制癌剤感受性試験が開発されてきたにもかかわらず，臨床反応を適確に予言するまでに至ったものは殆どないといっても過言ではない．これらのなかで，Hamburger ら[1]により開発された human tumor clonogenic assay（HTCA）は，個々の癌腫に対する制癌剤の臨床効果を比較的高い確率で予言し得るものとして，近年高い評価をうけている感受性試験法である．

癌腫とことなり一般に肉腫に HTCA を導入するには，コロニー形成率の低いことや症例数が少ないことなどが大きな障害となり，今までに肉腫，特に軟部悪性腫瘍に関する HTCA の報告は見当たらない．当教室横川[2]は，骨肉腫に対し Salmon らの原法[3]（standard HTCA）を改良して，臨床新鮮材料から得られた腫瘍細胞を一旦単層培養系へ移行し，cell population を増加させた上で HTCA を行い（cultivated HTCA），コロニー形成率を向上させて骨肉腫における cultivated HTCA の有用性について報告した．そこで，著者は軟部悪性腫瘍においても，cultivated HTCA が有用であるかを検討し，さらに，本法を用いた制癌剤感受性の結果と臨床効果との相関性について検討した．

材料および方法

I．材　料

実験に使用した臨床新鮮材料は，過去3年間に当教室で生検または手術を行った軟部悪性腫瘍32例（40検体）から得られた（表1）．その内訳は，悪性線維性組織球腫（MFH）11例（15検体），滑膜肉腫5例（9検体），脂肪肉腫5例（5検体），横紋筋肉腫4例（4検体），リンパ管肉腫2例（2検体），平滑筋肉腫2例（2検体），悪性間葉腫・線維肉腫・神経肉腫各1例（1検体）である．各腫瘍の組織学的悪性度，治療法，予後などについては表1に示した．

II．臨床新鮮材料の処理

腫瘍材料をペニシリン・ストレプトマイシン［penicillin/streptomycin solution 10,000 units (PS, Gibco)］を含む培養液［McCoy's 5A (Gibco) wash］内で，できるだけすみやかに無菌的にハサミで細切した．その後，酵素カクテル［Hank's balanced salt solution (Gibco)＋collagenase type I (Sigma) 0.2 mg/ml, DNase (Sigma) 0.2 mg/ml, pronase（科研化学）0.5 mg/ml］にて37°C，30分間処理した．次に，ステンレス製メッシュ（50メッシュ）にて材料をろ過して単離細胞浮遊液を作成した（図1）．集めた腫瘍細胞は，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のち，3×10^6個/mlとなるように調整した．

III．腫瘍細胞と制癌剤との接触

3×10^6個/mlの単離細胞浮遊液0.5 mlに，0.15 mlの制癌剤と McCoy's 5A wash 0.85 mlを加えて37°C，1時間接触させた（図1）．対照液としては，生理的食塩水を使用した．また，時間依存性の代謝拮抗剤は持続接触としたが，この場合には単離細胞浮遊液0.5 mlに制癌剤または対照液を0.3 ml加え，後述の double enriched CMRL 溶液1.9 mlを加えた．

IV．二重寒天培地の作成

1．Under layer（フィーダー層）の作成

McCoy's 5A 培養液500 mlに，heat-inactivated (HI) fetal calf serum (FCS, Gibco) 50 ml, HI-馬血清（Gibco）25 ml, ピルビン酸ナトリウム（2.2%）5 ml, L-セリン（21 mg/ml）1 ml, L-グルタミン（200 mM）5 mlと PS 5 mlを加えて enriched McCoy's 5A 培養液を作成した．次に，plating medium を下記のように作成した．即ち enriched McCoy's 5A 培養液40 mlに tryptic soy broth（3%，Difco）10 ml, L-アスパラギン（6.6 mg/ml）0.6 mlおよび DEAE-デキストラン（50 mg/ml, Pharmacia）0.3 mlを加えた．この plating medium と3% bacto agar (Difco) を混合して最終濃度0.5%の軟寒天となるように調整し，その1.0 mlを35 mlペトリディシュ（Corning, #25,000）に播き，フィーダー層を作成した（図1）．

2．Top layer（培養層）の作成

腫瘍細胞を下記のように作成した培養層内で培養した．CMRL-1066 (Gibco) 500 mlに HI-馬血清75 ml, 塩化カルシウム（100 mM）20 ml, インスリン（100 U/ml）10 ml, ビタミンC（30 mM）5 ml, L-グルタミン（200 mM）10 ml, PS 5 mlを加えて，enriched CMRL-1066 培養液を作成した．次に，enriched CMRL-1066 培養液40 mlにつき L-アスパラギン（6.6 mg/ml）0.6 ml, DEAE-デキストラン（50 mg/ml）0.3 mlおよび2-メルカプトエタノール（0.5×10^{-3}M）0.4 mlを加えて，double enriched CMRL 培養液を作成した．

---

ediaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; HI, heat-inactivated; HTCA, human tumor clonogenic assay; MFH, malignant fibrous histiocytoma; MMC, mitomycin C; MTX, methotrexate; PE, plating efficiency; PS, penicillin-streptomycin solution; RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640; VCR, vincristine.

Table 1. Clinical characteristics of soft tissue sarcomas.

Case	Age/Sex[a]	Type of tumor[b] / Pathologic grade[c]	Site of primary tumor	Surgical procedure	Sourse of specimens[d]	Chemotherapy (drugs used for chemotherapy)[f]	Follow up (months)	Survival[g]
1-1	45/f	MFH / 3	Poples	Wide resection	S	ACR(1 cycle)	24	Alive, L(+)
-2		/ 3			S			
2-1	28/m	MFH / 3	Leg	Wide resection	B	HD-MTX+VCR+ADM(9 cycles)	36	Alive, M(+)
-2		/ 3		Resection	M	CDDP(2 cycles)		
-3		/ 3		Resection	M	VCR+ADM+CPA(1 cycle)		
3	64/m	MFH / 2	Thigh	Wide resection	S	CPA(per os)	18	Alive, L(+)
4	65/f	MFH / 2	Leg	Wide resection	S	(−)	19	Alive
5	66/m	MFH / 3	Forearm	Amputation	B	HD-MTX+VCR+ADM(3 cycles)	34	Alive
6-1	52/m	MFH / 3	Hand	Wide resection	B	ADM(3 cycles)	9	Alive
-2		/ 3			S	VCR+ADM+CPA(4 cycles)		
7	60/m	MFH / 3	Leg	Wide resection	S	VCR+ADM+CPA(2 cycles)	6	Alive, M(+)
8	55/f	MFH / 2	Thigh	Wide resection	S	ACR(2 cycles)	11	Alive
9	79/f	MFH / 2	Thigh	Disarticulation	S	(−)	31	Alive
10	72/m	MFH / 1	Thigh	Wide resection	S	(−)	27	Alive, L(+)
11	65/m	MFH / 1	Thigh	Wide resection	S	(−)	25	Died
12-1	55/f	Synovial sarcoma / 3	Ankle	Amputation	B	CYVADIC(1 cycle), ACR(1 cycle),	18	Died
-2		/ 3			S	MMC+ADM+DTIC(4 cycles)		
13-1	55/m	Synovial sarcoma / 3	Thigh	Amputation	B	CDDP(2 cycles), CYVADIC(3 cycles),	9	Died
-2		/ 3			S	ACR(2 cycles)		
-3		/ 3		Resection	M			
14-1	56/m	Synovial sarcoma / 3	Thigh	Wide resection	B	VCR+ACR(2 cycles)	18	Alive, M(+)
-2		/ 3			S			
15	48/f	Synovial sarcoma / 3	Hand	Wide resection	B	ACR(3 cycles)+R[e]	23	Alive
16	25/f	Synovial sarcoma / 3	Leg	Biopy	M	ACR+ADM+DTIC(2 cycles)+R[e]	3	Died
17	65/m	Liposarcoma / 1	Thigh	Wide resection	S	(−)	35	Alive
18	47/m	Liposarcoma / 1	Thigh	Wide resection	S	CYVADIC(5 cycles)	13	Alive
19	81/f	Liposarcoma / 1	Thigh	Wide resection	S	(−)	33	Alive
20	55/m	Liposarcoma / 3	Buttock	Wide resection	S	(−)	4	Died
21	60/f	Liposarcoma / 1	Thigh	Wide resection	S	(−)	6	Alive
22	33/f	Rhabdomyosarcoma / 3	Upper arm	Wide resection	S	ADM(1 cycle), ACR(2 cycles)	24	Alive
23	8/m	Rhabdomyosarcoma / 3	Foot	Marginal resection	M	HD-MTX+VCR(1 cycle)	2	Died
24	6/f	Rhabdomyosarcoma / 3	Hand	Wide resection	S	ADM(3 cycles), VAC(3 cycles)+R[e]	14	Died
25	38/m	Rhabdomyosarcoma / 3	Leg	Wide resection	S	CDDP(3 cycles)+R[e]	15	Alive, M(+)
26	69/f	Lymphangiosarcoma / 3	Arm	Amputation	S	ADM(3 cycles)	6	Died
27	65/f	Lymphangiosarcoma / 3	Arm	Wide resection	S	ADM(2 cycles)	2	Died
28	77/f	Leiomyosarcoma / 2	Buttock	Marginal resection	S	(−)	8	Alive
29	65/m	Leiomyosarcoma / 1	Leg	Wide resection	S	(−)	28	Alive
30	17/f	Malignant mesenchymoma / 3	Poples	Resection	M	CDDP(3 cycles)	10	Alive, M(+)
31	65/m	Fibrosarcoma / 2	Waist	Wide resection	S	(−)+R[e]	30	Died
32	17/f	Malignant schwannoma / 1	Pelvis	Marginal resection	S	(−)	18	Alive

a, m, male ; f, female ; b, MFH, malignant fibrous histiocytoma ; c, Pathologic grade of malignancy(The American Joint Committee) ; d, S, surgical material ; B, biopsy material ; M, metastatic material from lung ; M', metastatic material from lymphnode ; e, R, radiation ; f, CYVADIC, CPA+VCR+ADM+DTIC ; VAC, VCR+ACD+CPA ; g, M(+), lung metastasis(+) ; L(+), local recurrence(+).

その後，先に制癌剤または対照液と1時間接触させた群をMcCoy's 5A溶液で洗浄し，このdouble enriched CMRL培養液2.7 mlと3％ bacto agarを0.3 ml加え，0.3%の軟寒天として1デイッシュあたり5×10⁵個の細胞数となるように,先に作成しておいたフィーダー層の上に重層させ，二重寒天培地を作成した．制癌剤持続接触の場合も，先述のごとく，培養液を1.9 ml加え，0.3%の軟寒天となるようにagarを加えた．そして，各制癌剤または対照液ごとに各々3デイッシュずつの二重寒天培地を作成した（図1）．

V．二重寒天培地の培養

以上のごとく作成した二重寒天培地を，37°C水蒸気飽和状態で7.0−7.5% CO_2を含んだ培養器で培養した．

VI. Cultivated HTCA

II．にて得られた腫瘍細胞をplastic flask（Corning, #25,100または#25,110）内で，RPMI-1640培養液（15%HI-FCS＋1％PS）を用いて，37°Cのもとで単層培養した．2日−30日（平均13.2日）で培養細胞がシート状になった時点で（図2. a, d），0.025% trypsin＋0.02% ethylene diamine tetraacetic acid（EDTA）により再び単離細胞浮遊液を作成した．この時，trypsin＋EDTAでは充分な単離細胞が得られず，cell aggregatesの混入が多くみられる場合があり，このような場合にはさらに，先述の酵素カクテルを2，3滴加えることで充分な単離細胞を得ることができた．これらの単離細胞浮遊液もトリパンブルー染色により有核生細胞数を算定して3×10⁶個/mlになるように調整した．これにより得られた腫瘍細胞を用いてIII，IV，Vと同様の操作を行った（図1）．

VII．コロニーの算定と同定

50個以上の腫瘍細胞から成る細胞集団をコロニーと判定し（図2, b, e），培養開始後2−3週目でコロニー数を算定した．コロニー算定には，倒立顕微鏡またはautomatic particle counter（Handex CP-2000）を用いた．また，形成されたコロニーが腫瘍細胞から成ることをPapanicolaou染色により確認した（図2, c, f）．

VIII．使用した制癌剤の濃度と接触時間

使用した制癌剤は，軟部悪性腫瘍に対して比較的よく用いられているactinomycin D(ACD), aclarubicin (ACR), adriamycin(ADM), cis-platinum(CDDP), 活性型4-hydroperoxy cyclophosphamide (CPA), mitomycin C (MMC), methotrexate (MTX), vincristine (VCR) の8剤である（表2）．

制癌剤濃度は，通常臨床的に投与された時の最高血中濃度およびC×T (concentration-time product, 血中濃度と時間の積）の約10%の低濃度を用いた[4)5)]．この濃度は，腫瘍内濃度にほぼ一致するといわれる．また，制癌剤との接触時間は，1時間とした[4)5)]が，代謝拮抗剤であるMTXは持続接触とした．

IX．対照群におけるコロニー形成の評価

対照群において，1デイッシュ当り5個以上のコロニー形成がみられたものを『コロニー形成能あり』とし，30個以上のコロニー形成がみられたものを『感受性判定可能』とした．また，コロニー形成率(plating efficiency, PE) は，

$$PE(\%)=\frac{\text{形成されたコロニー数}}{\text{播種細胞数}(5\times10^5\text{個/デイッシュ})}\times100$$

で表現した．

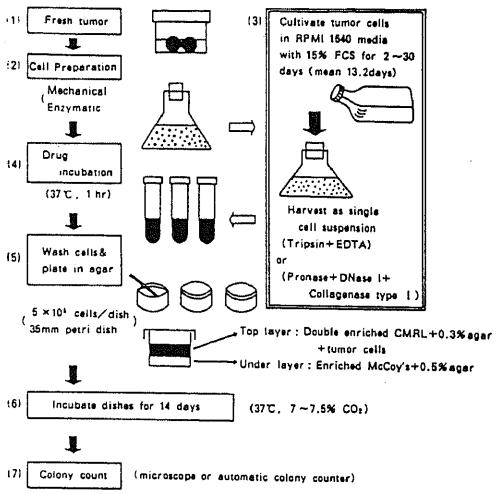
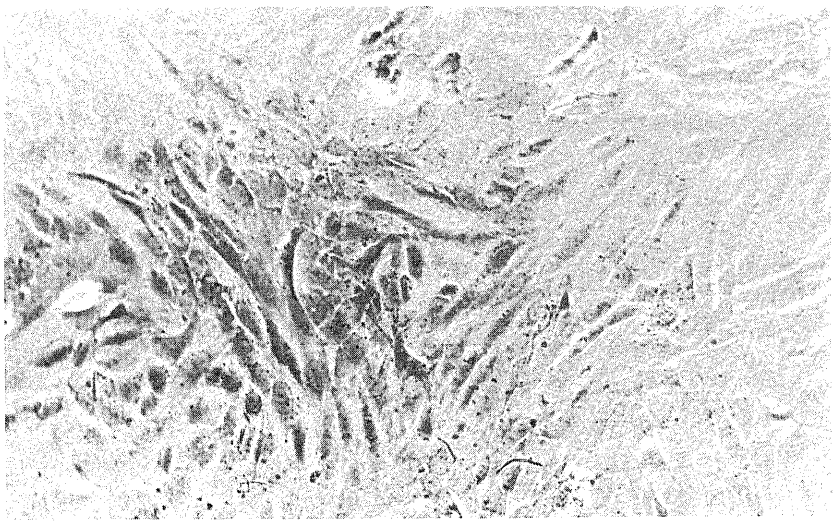
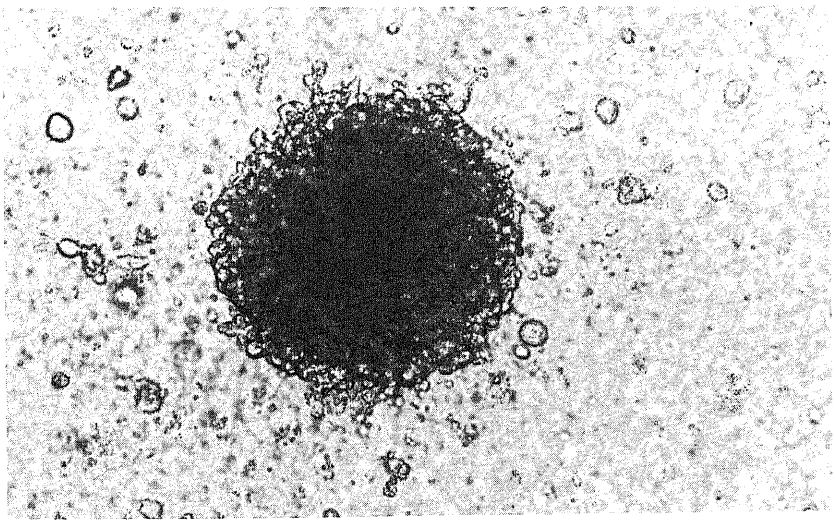


Fig. 1. Methods for the human tumor clonogenic assay of soft tissue sarcomas.
(1) Fresh tumor material was obtained from biopsy or surgery. (2) A single cell suspension was prepared by mechanical and enzymatic disruption of the tumor. (3) The tumor cells were cultured in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum (FCS) until a cell sheet formed in the bottle. The cells were harvested as a refined single cell suspension by trypsin and EDTA or an enzyme cocktail. (4) The tumor cells were incubated in test tubes with drugs or control medium for 1 hour at 37°C. (5) The tumor cells were washed and plated in soft agar in 35 mm Petri dishes. (6) The dishes were incubated at 37°C in 7-7.5% CO_2-humidified air for 14 days. (7) The number of colonies in each dish was counted under a microscope or with an automatic particle counter and the percent colony inhibition was calculated.
(1)→(2)→(4)→(5)→(6)→(7), standard HTCA ; (1)→(2)→(3)→(4)→(5)→(6)→(7), cultivated HTCA.

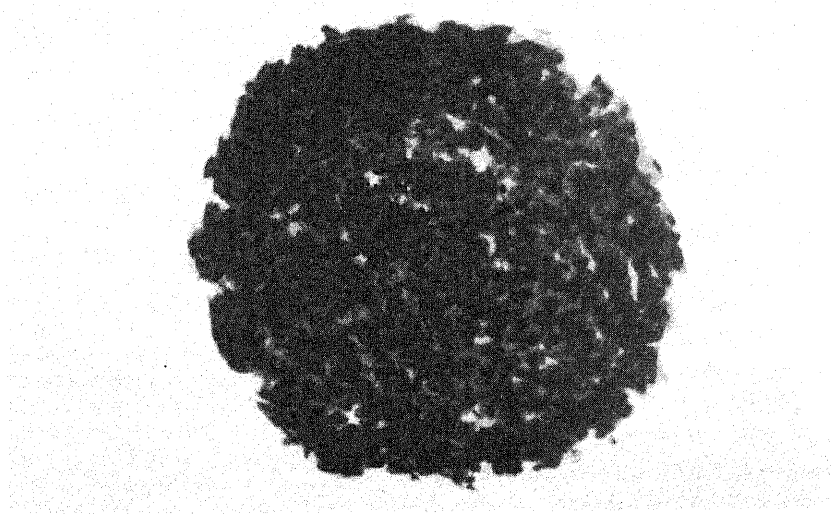
(a)



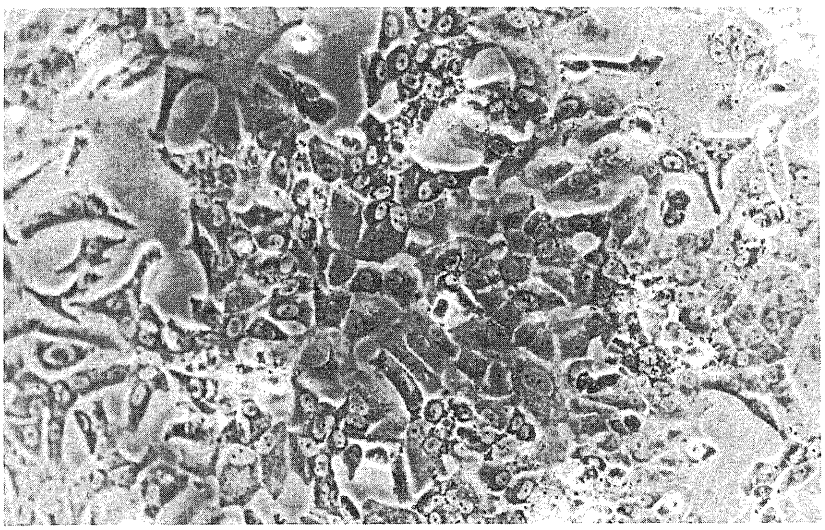
(b)



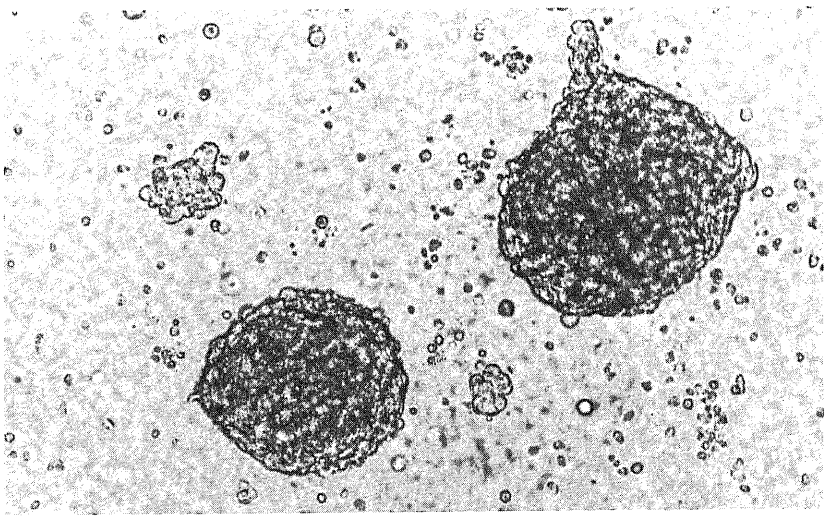
(c)



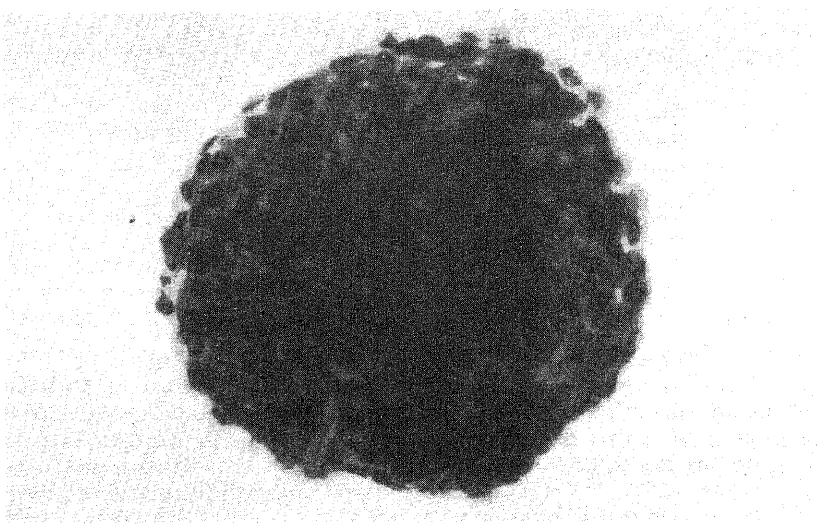
(d)



(e)



(f)



X．コロニー形成細胞の制癌剤感受性の評価

各制癌剤の感受性は，コロニー数算定により得られたコロニー形成抑制率（percent colony inhibition）で表現した．

$$\text{コロニー形成抑制率（\%）} = \left(1 - \frac{\text{制癌剤処理群のコロニー数}}{\text{対照群のコロニー数}}\right) \times 100$$

XI．統計学的検定法

Standard HTCA と cultivated HTCA のコロニー形成の検定には χ^2検定を用い，コロニー形成率に関しては角変換を行ったのちに Welch's t-test を行った．また，両方法間の制癌剤感受性に関しては，相関分析および χ^2検定を行った．cultivated HTCA による制癌剤感受性と臨床効果との相関性に関しては χ^2検定を行った．

成　　績

I．コロニー形成について（対照群において）

各腫瘍の対照群における平均コロニー数およびコロニー形成率を表3に示した．

1．Standard HTCA におけるコロニー形成

コロニー形成能は，38検体中26検体（68.4%）にみられたが，感受性判定可能であったものは38検体中9検体（23.7%）と少なく，さらにコロニー形成率は，0.0053±0.0051%（mean±SD）で著しく低率であった（表4）．

2．Cultivated HTCA におけるコロニー形成

コロニー形成能は，40検体中29検体（72.5%）にみられた．感受性判定可能であったものは，40検体中28検体（70.0%）であり，standard HTCA に比べて感受性判定可能な割合が著しく増加した（χ^2検定，$P<0.01$）．また，コロニー形成率は，0.0231±0.0186%（mean±SD）で standard HTCA のそれと比べて有意な向上がみられた（$P<0.01$）（表4）．

II．軟部悪性腫瘍の組織学的悪性度とコロニー形成との関連

対象とした各腫瘍を通常，軟部悪性腫瘍に対してよく用いられている The American Joint Committee の組織学的悪性度の分類[6]を用いて分類し（図3），組織学的悪性度とコロニー形成との関係を検討した（表5）．この分類は一般的に，細胞密度・細胞の多形性と異型性・核分裂像の頻度・壊死の有無・発育様式などの所見を総合して行う．grade 1（G1）は low grade

Table 2. Anticancer drugs and their concentrations used in this study

Drugs	Concentrations(μg/ml)
Actinomycin D (ACD)	0.005
Aclarubicin (ACR)	0.20
Adriamycin (ADM)	0.04
Cis-platinum (CDDP)	0.20
4-hydroperoxy cyclophosphamide (CPA)	3.00
Mitomycin C (MMC)	0.10
Vincristine (VCR)	0.01
Methotrexate (MTX)[a]	20.00

a, used as high-dose chemotherapy.
Drug concentration was chosen as approximately 10% of the peak plasma concentration.

Fig. 2. Microscopic findings of cultured tumor cells and colonies.
(a) Cultured malignant fibrous histiocytoma (MFH) cells. ×200. (b) MFH colony in soft agar at 14 days of culture. ×200. (c) Morphological appearance of MFH colony at 14 days of culture (Papanicolaou stain). ×160. (d) Cultured synovial sarcoma cells. ×200. (e) Synovial sarcoma colonies in soft agar at 14 days of culture. ×200. (f) Morphological appearance of a synovial sarcoma colony at 14 days of culture (Papanicolaou stain). ×320.

Table 3. Growth of colonies

Case	Standard HTCA		Cultivated HTCA	
	No. of colonies /dish (mean)[a]	PE(%)[b]	No. of colonies /dish (mean)[a]	PE(%)[b]
1-1	33.0	0.0066	84.0	0.0168
-2	32.0	0.0064	43.7	0.0087
2-1	39.0	0.0078	111.0	0.0220
-2	11.3	0.0023	145.0	0.0290
-3	25.0	0.0050	45.0	0.0090
3	31.7	0.0063	79.0	0.0158
4	32.0	0.0064	100.0	0.0200
5	8.0	0.0016	46.0	0.0092
6-1	6.7	0.0013	64.7	0.0129
-2	13.0	0.0026	93.7	0.0187
7	19.0	0.0038	100,0	0.0200
8	28.3	0.0057	55.0	0.0110
9	no growth		38.0	0.0076
10	no growth		no growth	
11	no growth		no growth	
12-1	125.0	0.0250	185.0	0.0370
-2	32.0	0.0064	160.0	0.0320
13-1	7.3	0.0015	47.0	0.0094
-2	11.7	0.0023	67.7	0.0135
-3	13.7	0.0027	463.7	0.0927
14-1	8.0	0.0016	40.0	0.0080
-2	14.7	0.0029	111.7	0.0223
15	not done		167.7	0.0335
16	85.0	0.0170	330.0	0.0660
17	no growth		no growth	
18	no growth		no growth	
19	no growth		no growth	
20	19.0	0.0038	115.0	0.0230
21	no growth		no growth	
22	31.0	0.0062	115.0	0.0230
23	5.7	0.0011	210.0	0.0420
24	no growth		no growth	
25	9.0	0.0018	125.0	0.0250
26	no growth		no growth	
27	no growth		no growth	
28	22.7	0.0045	120.0	0.0240
29	no growth		no growth	
30	25.0	0.0050	75.0	0.0150
31	not done		17.0	0.0034
32	no growth		no growth	
Mean±SD	26.5±26.3	0.0053±0.0051	115.7±92.9	0.0231±0.0186

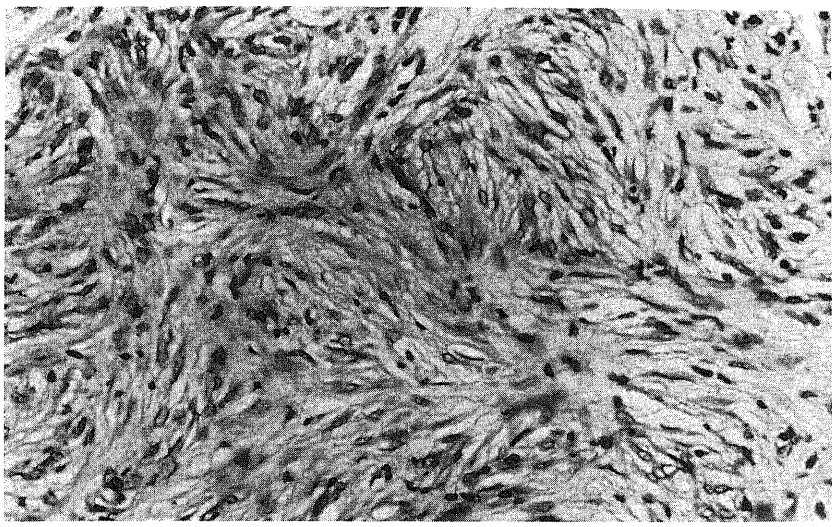
a, 5×10^5 cells plated per dish ; b, Plating efficiency, Number of colonies / number of nucleated cells plated×100%.

Table 4. Comparison of growth of colonies on the standard HTCA and the cultivated HTCA

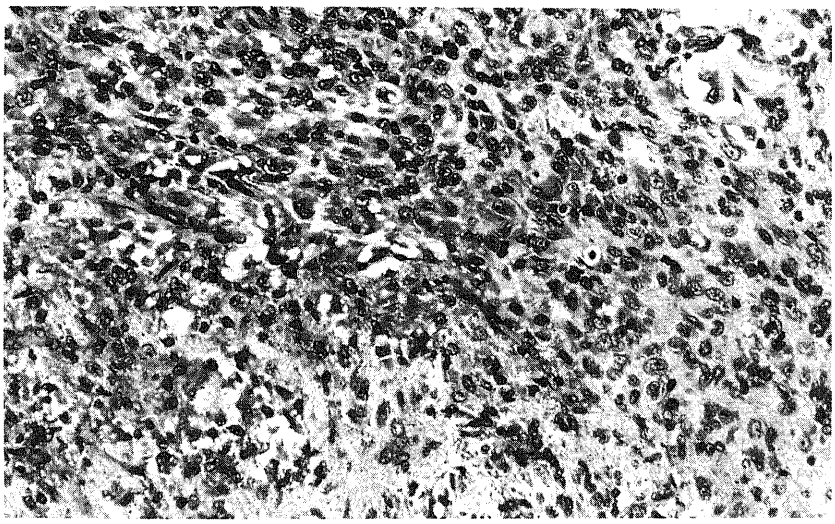
Method	No. of specimens	≧ 5 colonies /dish(%)[a]	≧30 colonies /dish(%)[a]	PE(%)[b]
Standard HTCA	38	26 (68.4%)	9 (23.7%)	0.0053±0.0051
Cultivated HTCA	40	29 (72.5%)	28 (70.0%)**	0.0231±0.0186**

a, 5×10^5 cells plated per dish ; b, Plating efficiency, values are mean±SD. ; **, significantly different from the standard HTCA ($P<0.01$).

(a)



(b)



(c)

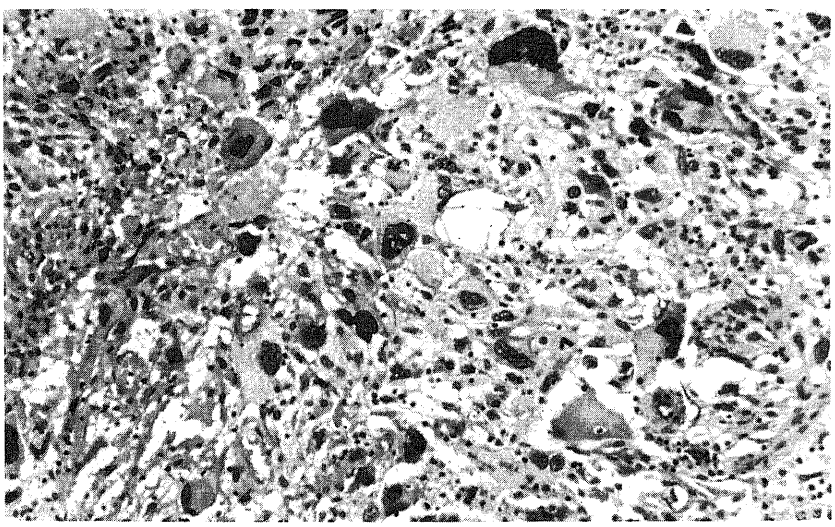


Table 5. Growth of colonies versus pathologic grade of malignancy

Pathologic grade[a]	No. of specimens	Standard HTCA			Cultivated HTCA		
		≧5 colonies /dish[b]	≧30 colonies /dish[b]	PE(%)[c]	≧5 colonies /dish[b]	≧30 colonies /dish[b]	PE(%)[c]
G3 (high)	26	22/25(88.0%)	7/25(28.0%)	0.0052±0.0055	23/26(88.5%)	23/26(88.5%)**	0.0256±0.0213
G2 (moderate)	6	4/5 (80.0%)	2/5 (40.0%)	0.0057±0.0007	6/6(100.0%)	5/6 (83.3%)**	0.0136±0.0083
G1 (low)	8	0/8 (0%)	0/8 (0%)	———	0/8 (0%)	0/8 (0%)	

a. Pathologic grade of malignancy (The American joint Committee); b. 5×10^5 cells plated per dish; c. Plating efficiency, value are mean±SD.; **, significantly different from low grade tumors ($P<0.01$).
Chemosensitivity test was possible in high grade(G3) tumors and moderate grade(G2) tumors;
standard HTCA(G3+G2=9/30)=30%, cultivated HTCA(G3+G2=28/32)=87.5%(significantly different from standard HTCA, $P<0.01$).

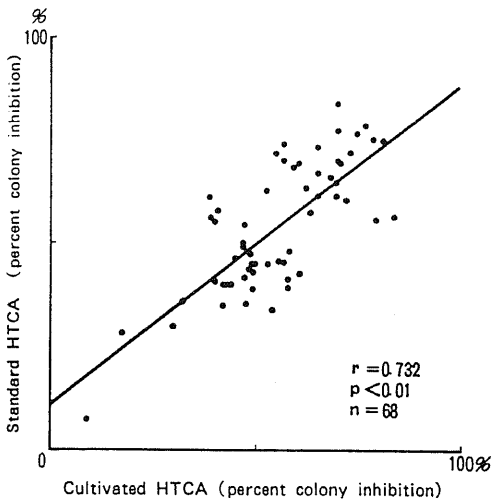


Fig. 4. Correlation by regression analysis between the chemosensitivities as determined by the standard HTCA and the cultivated HTCA.
The points represent the percent colony inhibitions for 8 drugs in 9 specimens (1-1, 1-2, 2-1, 3, 4, 12-1, 12-2, 16, 22 in Table 1) in which the chemosensitivity test was possible by both methods.

malignancy で，grade 2 (G2) は moderate grade malignancy, grade 3 (G3) は high grade malignancy を意味する．

grade 1 (G1) 8検体では，standard HTCA, cultivated HTCA 共にコロニー形成を認めたものはなかった．grade 2 (G2) 6検体では，standard HTCA にて 40% が感受性判定可能であったが，cultivated HTCA においては 83.3% が感受性判定可能となった．grade 3 (G3) 26検体では，standard HTCA にて 28%が感受性判定可能であったが，cultivated HTCA においては 88.5%が感受性判定可能となっていた．G1 を除いて，G2 または G3 と判定した腫瘍においては standard HTCA の 30%から cultivated HTCA の 87.5%に感受性判定可能率が向上した (χ^2検定, $P<0.01$)．また，コロニー形成率については，grade が高くなるにつれて上昇する傾向がみられた．

Ⅲ. Standard HTCA と cultivated HTCA における制癌剤感受性の検討

Standard HTCA および cultivated HTCA の両者において，感受性判定可能であった 9 検体(表 1，症例 1-1, 1-2, 2-1, 3, 4, 12-1, 12-2, 16, 22) における制癌剤感受性を推計学的に比較検討した．まず，両者における 8 制癌剤の感受性を相関分析にて検討すると，$r=0.732$ ($P<0.01$) で高い相関が得られた (図 4)．次に，両者における制癌剤感受性について 70%コロニー形成抑制率，60%コロニー形成抑制率，50%コロニー形成抑制率で各々cut-off point を設けて，感受性制癌剤と抵抗制癌剤を区別して検討した (図 5)．70%以上，60%以上，50%以上の各々のコロニー形成抑制率で『感受性あり』とした場合，true positive rate は各々，69.2%，81.5%，75.6%で true negative rate は各々，90.9%，85.4%，74.1% であった．また，全体としての正診率は各々，86.8%，83.8%，75.0%と高いものであり，χ^2検定においても有意であった ($P<0.01$)．

Ⅳ. Cultivated HTCA を用いて得られた制癌剤感受性と臨床効果との相関について

1．制癌剤効果の判定について

In vitro における効果判定については，Salmon[7]や Von Hoffら[5]の報告を参考にして，70%以上のコロニー

Fig. 3. Pathologic grade of malignancy of soft tissue sarcomas.
(a) Grade 1 showing a little cellularity with abundant collagenous stroma (MFH; Hematoxylin-Eosin stain). ×200. (b) Grade 2 showing moderate cellularity and atypia (MFH; Hematoxylin Eosin stain). ×200. (c) Grade 3 showing marked atypia with pleomorphic features (MFH; Hematoxylin-Eosin stain). ×100.

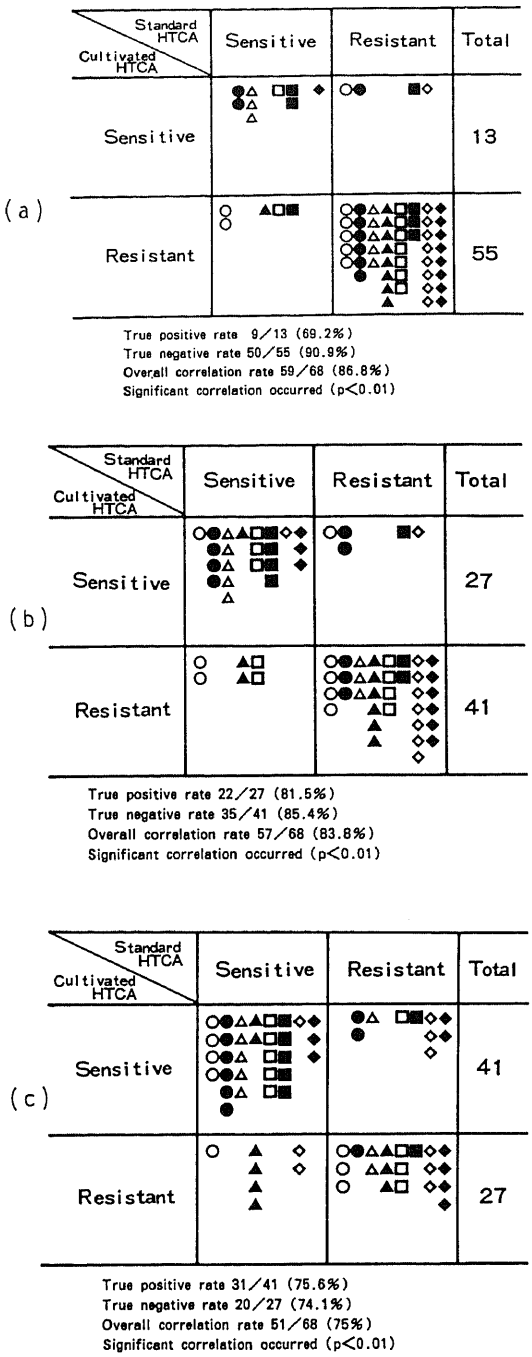


Fig. 5. Correlation between the chemosensitivities as determined by the standard HTCA and the cultivated HTCA.
The data was determined at the following colony inhibition (a), 70%; (b), 60%; (c),50%. Individual drugs are illustrated by different symbols: ○, ACD; ●, ACR; △, ADM; ▲, CDDP; □, CPA; ■,MMC; ◇, VCR; ◆, MTX.

形成抑制率を示した場合を『感受性あり』とし，70%未満の場合を『感受性なし』とした．臨床効果の判定については，小山・斉藤[8]の固形癌化学療法判定基準またはShimosato ら[9]の組織学的判定基準に基いて，それぞれ partial response 以上，grade II_B以上の効果のみられたものを『感受性あり』とした．

2．臨床効果との相関

Cultivated HTCA を行い感受性判定可能であった20例（28検体）のうち10例（12検体）において retrospective に臨床効果との関係が検討可能であった（表6）．10例（12検体）の内，in vitro にて『感受性あり』と判定され，臨床的にも『感受性あり』と判定されたもの（S/S, true positive）は4検体で，逆に，in vitro にて感受性が認められず，臨床的にも無効と判定されたもの（R/R, true negative）は7検体であった．また in vitro にて『感受性あり』と判定されたが臨床的に無効であったもの（S/R, false positive）は1検体で，一方，in vitro にて感受性を認めず，臨床的に感受性を認めたもの（R/S, false negative）はなかった．以上より，本法の臨床的な感受性に対する予言性(true positive rate）は80%で，耐性に対する予言性（true negative rate）は100%であった．また，全体としての予言性は91.7%と高いものであり，χ^2検定にても有意な臨床効果の予言性が認められた（$P<0.025$）．

各腫瘍の in vitro, in vivo の制癌剤効果については表7に詳細を示した．true positive 例において，多剤併用投与の場合70%以上のコロニー形成抑制率を示した制癌剤に対してのみ true positive であると判定した．なお，dimethyl triazeno imidazole carboxamide (DTIC)については，本剤が in vitro においては masked compound であるため，本研究からは除外した．

考　　察

I．軟部悪性腫瘍への HTCA の導入

骨悪性腫瘍の化学療法において，骨肉腫では，MTX, ADM の登場により，その高い有効性から飛躍的な延命率の向上がみられ，MTX と ADM なしでは骨肉腫の治療は語れないとまでいわれるようになった．更に，CDDP の登場により本剤の骨肉腫に対する高い有効性も多く報告され，現在では骨肉腫の化学療法は ADM, MTX, CDDP を主軸としたものに定まってきている[10][11]．また，ユーイング肉腫においても Rosen ら[12], Jaffe ら[13]などのプロトコールにより飛躍的な治療効果の向上がみられている．このように，骨肉腫を代表とする骨悪性腫瘍に対する化学療法の発展はめざましい．

一方，軟部悪性腫瘍の化学療法について，系統だった報告がみられるようになったのは1970年以降からである．Jacobs[14]はVAC（VCR＋ACD＋CPA）療法により横紋筋肉腫の5例中3例，その他の軟部悪性腫瘍の9例中2例に有効性を認めた．O'Bryanら[15]，Benjaminら[16]は，ADM単独投与により各種軟部悪性腫瘍の33－40%に有効性を認め，Gottliebら[17]は，ADMとDTICの併用投与により46%に有効性を認めた．さらに彼らは，CYVADIC(CPA＋VCR＋ADM＋DTIC）療法を118例に行い59%に有効性を認めたと報告し，制癌剤単独投与より併用療法の方が有効であるとした．Benjaminら[18]は，CYVADACT(CPA＋VCR＋ADM＋ACD）療法とCYVADIC療法のrandamized studyを行い，CYVADACTでは35%，CYVADICでは44%が有効であったと報告した．しかし，これらの報告において共通していえることは，制癌剤自体の有効性も低いが，各種軟部悪性腫瘍を一括して取扱っており，結局のところ，どの腫瘍に対して，どの制癌剤の投与が有効であるのか明確にされていない．さらに，Lindbergら[19]は，CYVADACT療法を行った群と，行わなかった群において生存率・転移率に差がなく，化学療法の副作用だけがはなはだしかったと報告している．以上のごとく，軟部悪性腫瘍においては，腫瘍の組織像，悪性度，発育態度が多岐にわたる上に，各種の腫瘍の症例数が少ないために化学療法の傾向がつかめず，このため現在，小児の横紋筋肉腫を除いては，一般に広く認められた制癌剤の投与法や組み合わせがないとまでいわれている[10)20)]．特に，我が国では軟部悪性腫瘍に対する化学療法は緒を発したばかりに等しく，これに関する多数例の報告はなく，20－60%の有効性を述べる文献が散見されるにすぎない[21)22)]．しかも，その投与法は外国の報告を参考にしたり，時には思いつきに近い格好で，各施設において臨床的試行がなされている状態である．そこで，理論的にもより有効な治療を行うためには精度の高い制癌剤感受性試験の開発が必要かつ急務であると考えられ

Table 6. In vitro-in vivo associations

No. of associations In vitro / in vivo	S^a/S	S^a/R	R/S	R/R
12	4	1	0	7

a, In vitro sensitivity was difined as ≧70% colony inhibition.;
S, sensitive; R, resistant; True positive rate=80%; True negative rate=100%; Overall correlation rate=91.7%.
Association between in vitro and in vivo results was significant (P<0.025).

Table 7. Details of in vitro-in vivo associations

Case (type of tumor)	In vivo response	Drugs used in vivo (% colony inhibition in vitro)[a]
True positives for assay		
5. MFH	PR[b]	ADM (75)＋MTX (68)＋VCR (20)
12. Synovial sarcoma	PR	CPA (58)＋VCR (72)＋ADM (70)＋DTIC
15. Synovial sarcoma	PR	ACR (70)
23. Rhabdomyosarcoma	PR	VCR (76)＋MTX (62)
True negatives for assay		
2-1. MFH	NR[c]	ADM (67)＋MTX (57)＋VCR (34)
2-2. MFH	NR	CDDP (37)
6. MFH	NR	ADM (30)
13-3. Synovial sarcoma	NR	CPA (44)＋VCR (57)＋ADM (49)＋DTIC
14. Synovial sarcoma	NR	VCR (33)＋ACR (27)
16. Synovial sarcoma	NR	ADM (48)＋ACR (54)＋DTIC
30. Malignant mesenchymoma	NR	CDDP (30)
False positive for assay		
13-1. Synovial sarcoma	NR	CDDP (71)

a, In vitro sensitivity was difined as ≧70% colony inhibition.;
b, Partial response; c, No response.

る.

HTCAは,他の制癌剤感受性試験が癌細胞の全ての細胞母集団を対象としているのに対して,増殖能を有する細胞,即ち"self renewal"をおこない得る細胞が"stem cell≒clonogenic cell"であるという考えを基本として,これらの細胞を選択的にテストの対象としている[23].このHTCAの特徴には,① 腫瘍の増殖や転移を司ると考えられる自己増殖能のある,即ちクローン形成能のある細胞における制癌剤感受性が検査できること,② fibroblastなどの正常細胞はほとんど増殖せず[24],腫瘍細胞だけの制癌剤感受性が確認できること,などが挙げられる.このため,HTCAでは臨床効果との高い相関性が期待され,主に癌腫についてのこれまでの成績では,種々の他の感受性試験に比して精度が高いという評価がなされている.

そこで,このHTCAを軟部悪性腫瘍に導入することにより,それぞれの腫瘍に感受性の高い制癌剤を選出し,これを臨床応用することでより有効な化学療法が期待できるのではないかと考えた.

II. Cultivated HTCAについて

HTCAでは,一般的に上皮性の腫瘍に比べ非上皮性の腫瘍のコロニー形成率は非常に低いといわれ,肉腫同様にleukemiaやlymphomaなどでも低率である[5)7)25)].HTCAを軟部悪性腫瘍に応用する上で,最大の問題点として,このコロニー形成率の著しく低いことが挙げられる.横川[2)]はその点に着目し,肉腫のコロニー形成率を上昇させるため,材料を一旦単層培養した上でHTCAに移す方法により目的を達成させうることを示し,これを骨肉腫に用いて実証した.

何故,in vitroを経過させるとコロニー形成率が向上したのかについて,主な理由としては,単層培養系にてcell populationを増加させることでclonogenic cellの選択的な増生が生じた可能性が挙げられる.培養株(cell line)を用いた実験で新鮮材料と比べてはるかに高いコロニー形成率が認められるというCarneyら[26)]の報告は,その一証左であろう.

そこで,著者は,横川[2)]が骨肉腫に対して行ったcultivated HTCAを軟部悪性腫瘍に対して行い,本法が軟部悪性腫瘍に応用できるかを検討した.コロニー形成能については,standard HTCAで68.5%,cultivated HTCAで72.5%とほとんど変わりはなかったが,30個以上のコロニー形成をみたもの(感受性判定可能であったもの)については,standard HTCAで23.7%であったが,cultivated HTCAでは70%と有意な向上がみられた($P<0.01$).また,コロニー形成率については,standard HTCAでは0.0053±0.0051%と著しく低率であったが,cultivated HTCAでは0.0231±0.0186%と有意な向上を示した($P<0.01$).その結果,cultivated HTCAによるコロニー形成率は,一般の癌腫のそれと比べても優るとも劣らないものになると考えられた.

次に,この過程により制癌剤感受性に変化が生じないか,ということについて検討すると,成績IIIで示したごとく,standard HTCAとcultivated HTCAの制癌剤感受性においては,相関分析にて高い相関がみられ($P<0.01$),感受性制癌剤と抵抗性制癌剤を区別する上でも高い正診率が得られた($P<0.01$).これにより,一世代の単層培養を介しても,その制癌剤感受性にほとんど影響がないことが伺われた.

以上から,cultivated HTCAは軟部悪性腫瘍においても,standard HTCAの欠点を改良した有用な感受性試験であると考えられた.

III. 組織学的悪性度とコロニー形成

腫瘍の組織学的悪性度とコロニー形成との関係については,Johns[27)]やMattoxら[28)]やRosenblumら[29)]は明らかな相関関係はないが,悪性度が高いほどコロニー形成率が高い傾向がみられると述べている.これは,HTCAの対象となっている腫瘍の増殖や転移に関与するclonogenic cell≒self renewal potential cellが悪性度が高いほど多いためであると考えられる.著者の研究においても,成績IIのごとく悪性度が高いほどコロニー形成率は高い傾向にあり,G1ではコロニー形成を認めたものは1例もなく,G2,G3でのコロニー形成に関しては,standard HTCAでの感受性判定可能率30%が,cultivated HTCAでは87.5%と向上し,9割近い腫瘍が感受性判定可能となった.この結果は,G2,G3といった悪性度の高いものにcultivated HTCAが有用であることを示唆しているものと考えられた.

軟部悪性腫瘍の予後は,組織学的悪性度に大きく左右されるといわれ,Myhre-Jensenら[30)]の報告では,10年生存率がgrade 1,2,3でそれぞれ,93%,57%,23%となっており,Markhedeら[31)]の報告では,それぞれ100%,55%,26%となっている.また,化学療法などの治療を行う上でも,一般に組織学的悪性度が重視される傾向にある.即ち,臨床上G1の腫瘍に対しては手術療法だけで充分とされることが多く,Markhedeら[31)]によればG1の転移率,生存率は手術療法だけでそれぞれ0%,100%であったとされている.そこで,化学療法はG2,G3の腫瘍を主に対象としていることが多い.これを考慮すると,軟部悪性腫瘍におけるcultivated HTCAの有用性がさらに高まるものと考えられた.

IV. 臨床効果との相関について

HTCA と臨床効果との高い相関性については多施設から報告されていて，Salmon ら[32]は 96 症例の卵巣癌・骨髄腫・悪性黒色腫などの悪性腫瘍患者を対象に193検体についてHTCA を行い，臨床効果との相関を retrospective に分析し，true positive rate 61%，true negative rate 96%であったと報告している．また，Von Hoff ら[5]は800症例・36種の悪性腫瘍患者を対象に HTCA を行い，123 例についてretrospectiveに臨床効果との関係を検討し，true positive rate 71%，true negative rate 98%で，臨床効果の予言性は 93%であったと述べている．しかし，これらはいずれもほとんどが癌腫についての報告であり，肉腫特に軟部悪性腫瘍における臨床効果との相関についてのまとまった報告はない．本研究における結果では，true positive rate 80%，true negative rate 100%で，全体的な臨床効果の予言性は 91.7%であり，in vitro の制癌剤感受性の有意な臨床効果との相関がみられ（$P<0.025$），症例数は少ないながら上記の癌腫についての報告とほぼ同等の高い予言性が得られた．これは，軟部悪性腫瘍に対して cultivated HTCA が臨床応用できることを示唆しているものと考えられた．

ただ，Von Hoff ら[5]が指摘するように，retrospective な評価では，表 6 に示すごとき多剤併用療法を行っている場合，true positive 例においては臨床効果が必ずしも in vitro で『感受性あり』と判定された制癌剤の効果を示していないのかもしれない．しかし，逆に，in vitro で無効と判定された場合は臨床的にも無効であることを高い確率で予測することができるといえる．したがって，少なくとも無効な制癌剤を突きとめ得る方法として臨床応用できるものと考えている．

HTCA により真に有効な制癌剤の選択が高い確率でなし得るかの判定には，prospective な臨床効果との相関についての評価が必要である．Von Hoff ら[33]は 246 例の各種悪性腫瘍を対象に prospective clinical trial を行い，true positive rate 60%，true negative rate 85%で全体的な予言性は 80.5%であったとして prospective clinical trial においても HTCA の精度の高いことを報告した．しかし，整形外科領域においては，切断および広範囲切除などの手術にて腫瘍を余すことなくすべて取り去るために，prospective な効果判定がほとんど不可能に近い．故に，現時点では HTCA の臨床効果との相関は retrospective な評価に頼らざるを得ないと考えられる．

結　　論

Human tumor clonogenic assay (HTCA)を軟部悪性腫瘍の制癌剤感受性試験に応用するために，軟部悪性腫瘍 32 例 40 検体を対象として，Salmon & Hamburger の原法（standard HTCA）を行うとともに，コロニー形成率を向上させるために腫瘍細胞を一世代（約 13 日間）単層培養し，増殖した腫瘍細胞を用いて HTCA を行い（cultivated HTCA），以下の結論を得た．

1．Standard HTCA では，コロニー形成率が 0.0053 ± 0.0051 と低く，感受性判定可能率も 23.7%と低いために有用性に乏しかった．しかし，cultivated HTCA によりコロニー形成率が 0.0231 ± 0.0186（$P<0.01$），感受性判定可能率が 70.0%（$P<0.01$）と著明な改善を認めた．また，その制癌剤感受性も standard HTCA のそれとほとんど差異はなかった．（$P<0.01$）．これにより，軟部悪性腫瘍においても cultivated HTCA は感受性試験として有用であると考えられた．

2．組織学的悪性度の低い腫瘍（grade 1）においては，まったくコロニー形成を認めず，主に化学療法の対象となる組織学的悪性度の比較的高い腫瘍（grade 2, 3）においては，cultivated HTCA により 87.5%の感受性判定可能率が得られた．これにより，grade 2, 3 の腫瘍に対して，cultivated HTCA が有用であると考えられた．

3．Cultivated HTCA の結果と臨床効果との相関について retrospective に評価した．true positive rate 80%，true negative rate 100%，全体としての予言性 91.7%と有意な相関性がえられた（$P<0.025$）．これにより，軟部悪性腫瘍においては cultivated HTCA の臨床応用が充分期待できると考えられた．

謝　　辞

稿を終えるにあたり，御指導，御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します．また，終始御指導御教示を戴きました富田勝郎助教授に心から感謝いたします．併せて本研究遂行に際し御協力をいただいた横川，沼田両先生の他，整形外科腫瘍班の先生方，中央検査部病理寺畑信太郎先生に感謝いたします．

なお，本論文の要旨は，第 58 回日本整形外科学会総会，および第 18 回骨軟部腫瘍研究会において発表した．

本研究の一部は昭和 59 年・60 年度文部省科学研究費補助金（C）59570633 号の援助を受けたことを感謝いたします．

文　　献

1）**Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.**: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science, **197**, 461-463 (1977).

2）**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).

3) **Salmon, S. E., Hamburger, A. W., Soehlen, B. G. M., Alberts, D. S. & Moon, T. E.**: Quantitation of differential sensitivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. N. Engl. J. Med., **298**, 1321-1327 (1978).

4) **Alberts, D. S., Chen, H. S. G. & Salmon, S. E.**: In vitro drug assay: Pharmacologic considerations, p197-207. *In* S. E. Salmon (ed.), Cloning of Human Tumor Stem Cells, Alan R. Liss, Inc, New York, 1980.

5) **Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. & Makuch, R.**: Association between human tumor colony forming assay result and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. Am. J. Med., **70**, 1027-1032 (1981).

6) **Russel, W. O., Cohen, J., Enzinger, F., Hajdu, S. I., Heise, H., Martin, R. G., Meissner, W., Miller, W. T., Schmitz, R. L. & Suit, H. D.**: Staging soft tissue sarcoma, p271-279. *In* the University of Texas M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute (ed.), Management of Primary Bone and Soft Tissue Tumors, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, London, 1977.

7) **Salmon, S. E.**: Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. Cancer Treat. Reports, **68**, 117-125 (1984).

8) **小山善之・斉藤達雄**：がん化学療法の臨床効果判定基準，昭和52・53・54年度，1-29頁，厚生省がん研究助成金による研究班報告，1980.

9) **Shimosato, Y., Oboshi, S. & Baba, K.**: Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinomas. Jpn. J. Clin. Oncol., **1**, 19-35 (1971).

10) **阿部光俊**：悪性骨軟部腫瘍の制癌剤治療．日整会誌，**55**, 1729-1741 (1981).

11) **Rosen, G., Caparros, B., Huvos, A. G., Kosloff, C., Nirenberg, A., Cacavio, A., Marcove, R. C., Lane, J. M., Mehta, B. & Urban, C.**: Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: Selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. Cancer, **49**, 1221-1230 (1982).

12) **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).

13) **Jaffe, N., 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).

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

15) **O'Bryan, R. M., Luce, J. K., Talley, R. W., Gottlieb, J. A., Baker, L. H. & Bonadonna, G.**: Phase II evaluation of adriamycin in human neoplasia. Cancer, **32**, 1-8 (1973).

16) **Benjamin, R. S., Wiernik, P. H. & Bachur, N. R.**: A new effective agent in the therapy of disseminated sarcomas, Med. Pediat. Oncol., **1**, 63-76 (1975).

17) **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 bony sarcomas. Cancer Chemother. Reports, **6**, 271-282 (1975).

18) **Benjamin, R. S. Baker, L. H., Rodriguez, V., Moon, T, E., O'Bryan, R. M., Stephens, R. L., Sinkovics, J. G., Thigpen, T. King, G. W., Bottomley, R., Groppe, C, W., Bodey, G. P. & Gottlieb, J. A.**: The chemotherapy of soft tissue sarcomas in adults, p309-315. *In* the University of Texas M. D. Anderson Hospital and Tumor Institute (ed.), Management of Primary Bone and Soft Tissue Tumors, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, London, 1977.

19) **Lindberg, R. D., Murphy, W. K., Benjamin, R. S., Sinkovics, J. G., Martin, R. G., Romsdahl, M. M., Jesse, R. H. & Russel, W. O.**: Adjuvant chemotherapy in the treatment of primary soft tissue sarcomas: A preliminary report, p343-352. *In* the University of Texas M. D. Hospital and Tumor Institute (ed.), Management of Primary Bone and Soft Tissue Tumors, Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago, London, 1977.

20) **Lawrence, W., Neifeld, J. & Terz, J. J.**:

Adjuvant therapy for sarcomas in adult, p167-175. *In* R. H. Egdahl (ed.), Manual of Soft-tissue Tumor Surgery, Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, 1983.

21) **福間久俊**：骨軟部悪性腫瘍の化学療法．日整会誌，**50**, 1193-1207 (1976).

22) **後藤　守・山脇慎也・姥山勇二**：悪性軟部腫瘍の化学療法．臨床整形外科，**15**, 1035-1040 (1980).

23) **Selby, P., Buick, R. N. & Tannock, I.**: A critical appraisal of the "human tumor stem-cell assay". N. Engl. J. Med., **308**, 129-134 (1983).

24) **Salmon, S. E.**: Background and overview, p3-13, *In* S. E. Salmon (ed.), Cloning of Human Tumor Stem Cells, Alan R. Liss, Inc., New York, 1980.

25) **Tomita, K. & Yokogawa, A.**: Chemosensitivity testing with tumor colony-forming assay for human osteosarcoma. J. Antibiot., **36**, 1228-1233 (1986).

26) **Carney, D. N., Gazdar, A. F. & Minna, J.D.**: Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimens taken directly from patients with small-cell carcinoma of the lung. Cancer Res., **40**, 1820-1823 (1980).

27) **Johns, M. E.**: The clonal assay of head and neck tumor cells: Result and clinical correlations. Laryngoscope, (Suppl. 28) **92**, 1-26 (1982).

28) **Mattox, D. E., Von Hoff, D. D., Clark, D. E. & Aufdemorte, T. B.**: Factors that influence growth of head and neck squamous carcinoma in the soft agar cloning assay. Cancer, **53**, 1736-1740 (1984).

29) **Rosenblum, M. L., Vasquez, D. A., Hoshino, T. & Wilson, C. B.**: Development of a clonogenic cell assay for human brain tumors. Cancer,**41**, 2305-2314 (1978).

30) **Myhre-Jensen, O., Kaae, S., Madsen, E. H. & Sneppen, O.**: Histopathological grading in soft-tissue tumors. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A, **91**, 145-150 (1983).

31) **Markhede, G., Angervall, L. & Stener, B.**: A multivariate analysis of the prognosis after surgical treatment of malignant soft-tissue tumors. Cancer, **49**, 1721-1733 (1982).

32) **Salmon, S. E., Alberts, D. S., Meyskens, F. L., Durie, B. G. M., Jones, S. E., Soehnlen, B., Young, L., Chen, H. S. G. & Moon, T. E.**: Clinical correlation of in vitro drug sensitivity, p223-245. *In* S. E. Salmon (ed.), Cloning of Human Tumor Stem Cells, Alan R. Liss, Inc., New York, 1980.

33) **Von Hoff, D. D., Clark, G. M., Stogdill, B. J., Sarosdy, M. F., O'Brien, M. T., Casper, J. T., Mattox, D. E., Page, C. P., Cruz, A. B. & Sandbach, J. F.**: Prospective clinical trial of a human tumor cloning system. Cancer Res., **43**, 1926-1931 (1983).

An Experimental Study on the Human Tumor Clonogenic Assay in Soft Tissue Sarcomas

Eiji Shimozaki, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — Juzen Med. Soc., **95**, 698—714 (1986)

Key words: soft tissue sarcoma, human tumor clonogenic assay, chemosensitivity test, monolayer culture, clinical correlation

Abstract

Soft tissue sarcomas include numerous histologic types with various degrees of malignancy, and the number of cases in each histologic type is rather small. For these reasons, the chemotherapy of soft tissue sarcomas has not yet been established, and a highly accurate chemosensitivity test has been greatly desired. The original method of the human tumor clonogenic assay (the standard HTCA) has recently been regarded as a useful chemosensitivity test for carcinomas. The standard HTCA, however, has not been utilized in sarcomas because of the low colony growth rate (plating efficiency). The present study describes the clinical usefulness of a modified method of HTCA (cultivated HTCA) for soft tissue sarcomas. The cultivated HTCA,

involving short-term (about 13 days) monolayer culture of a single cell suspension, was developed to increase the plating efficiency. The cultivated and standard HTCAs were carried out in forty specimens obtained in the past three years from thirty-two patients with soft tissue sarcomas. In the cultivated HTCA, the plating efficiency ($0.0231 \pm 0.0186\%$) and the success rate for the chemosensitivity test (70.0%) were significantly ($p<0.01$) improved over the very low values obtained in the standard HTCA (0.0053 ± 0.0051 and 23.7%, respectively). The chemosensitivity, which was tested in nine specimens by the cultivated and standard HTCAs, was significantly ($p<0.01$) correlated between these two methods. The pathologic grade of malignancy was found to be correlated to the colony growth. In the cultivated HTCA, colony growth was not observed in low grade tumors (grade 1), but a success rate for the chemosensitivity test was high (87.5%) in moderate and high grade tumors (grade 2 and 3) which often required anticancer drugs. Retrospective evaluation indicated the high correlation between the cultivated HTCA and the clinical efficacy of the anticancer drugs: the true positive rate was 80.0%, the true negative rate 100%, and the overall correlation rate 91.7%. The correlation between the results of the chemosensitivity test and the clinical efficacy was significant ($p<0.025$). The above results indicate that the cultivated HTCA is a useful method for chemosensitivity test in the field of soft tissue sarcomas where the standard HTCA is not applicable because of its low plating efficiency. The cultivated HTCA should provide valuable information on the chemosensitivity of soft tissue sarcomas and contribute to improve the efficacy of the chemotherapy for them.