

# An Experimental Study on Tumor Colony Forming Assay of Osteosarcoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7814">http://hdl.handle.net/2297/7814</a>

## Tumor colony forming assay の改良による 骨肉腫のコロニー形成の研究

金沢大学医学部整形外科学教室 (主任: 野村 進教授)

横 川 明 男

(昭和60年7月20日受付)

tumor colony forming assay (TCFA) による制癌剤感受性試験は、臨床における治療効果と高い相関を示すとして注目されてきている。しかし、悪性骨軟部腫瘍、特に骨肉腫に対しては TCFA はコロニー形成能、コロニー形成率が低いとの理由から、ほとんど試みられていない。本研究は、従来の癌腫系に行われている Salmon & Hamburger の原法による TCFA を改良して、骨肉腫においても利用できる方法を開発することを目的とした。著者の方法は TCFA のための細胞を収集するにあたって、腫瘍を酵素的に処理して単離細胞浮遊液を調整し、いったん単層培養を行い 1~2 世代分裂増殖した腫瘍細胞を獲得した後、assay に用いる方法である。骨肉腫 15 症例、23 検体を用いて TCFA を施行した。原法では、コロニー形成能 (5 個以上のコロニー形成を認めたもの) 71.4%、コロニー形成率 (コロニー数/播種した腫瘍細胞数 $\times$ 100%) $0.0039\pm 0.0025$  といずれも低率であった。改良法によると、コロニー形成能 91.3%、コロニー形成率  $0.0164\pm 0.0121$  と原法に比較して著明に上昇した。特に感受性判定能率 (30 個以上のコロニー形成を認めたもの) は原法の 26.6% から、本法の 78.3% と有意に高くなった。改良法による骨肉腫 6 検体、5 薬剤を対象とした制癌剤感受性試験の結果は、原法によるそれとほぼ一致するものであった ( $p < 0.01$ ) ことより、骨肉腫の制癌剤感受性試験において改良法が有用な手段となることが示された。

**Key words** osteosarcoma, tumor colony forming assay, chemosensitivity, double soft agar, monolayer cultivation.

制癌剤を用いての化学療法は、悪性腫瘍に対する治療体系の一環として不可欠となってきているが、腫瘍の制癌剤感受性は腫瘍の発生した臓器により、あるいは、同一病理組織像を示す腫瘍において、さらには、同一個体でも時期によってそれぞれ異なることは数多くの報告<sup>1)2)</sup>よりよく知られている。一方、多剤併用投与の中には無効となっているものもあり、これがかえって生体の防御機構を阻害し、宿主抵抗を弱めている可能性も高い<sup>3)</sup>。これらのことは、整形外科領域の悪性腫瘍、特に骨肉腫においても同様であり、腫瘍構成細胞や腫瘍増殖態度が癌腫以上に種々変化に富んでいるだけに、個々の腫瘍に最も効果的な制癌剤を選択し、無効な薬剤を見極めることが重要である。

今日までに組織器官培養法<sup>4)~6)</sup>、細胞化学的方法<sup>7)8)</sup>、核酸前駆物質指標<sup>9)10)</sup>、免疫抑制マウスやヌードマウス移植腫瘍などを用いた制癌剤感受性試験<sup>11)~13)</sup>が試行されてきたが、いずれの方法も一長一短があり、また *in vitro* での成績と臨床効果とが必ずしも一致しないなどの問題点があった。

Salmon & Hamburger<sup>14)</sup>は、二重軟寒天培地を駆使して tumor colony forming assay (TCFA) を確立し、制癌剤によるコロニー形成抑制率を判定することにより、制癌剤の抗腫瘍効果を *in vitro* で評価した。本法が感受性試験の結果と対象とする症例の臨床反応に、高い相関性がみられることを明らかとし、一躍注目を浴びるようになった。しかし、TCFA は肉腫系に

Abbreviations: ACD, actinomycin D; ACR, aclarubicin; ADR, adriamycin; CDDP, cisplatin; CMRL-1066, Connaught Medical Research Laboratory Media-1066; CPM, 4-hydroperoxy cyclophosphamide; CXT, concentration-time product; DEAE-dextran, diethyl-

において、コロニー形成能は癌腫系のそれと比較して著しく低い点が指摘されており<sup>15)16)</sup>、制癌剤感受性試験としては十分に応用されていない。そこで、著者は骨肉腫採取材料をいったん単層培養系に移行した上で TCFA を試み、コロニー形成能を高める方法を確立した。

## 材料および方法

## I. 材料

実験に供した材料は、1983年8月より約1年間に当教室において骨肉腫原発巣、あるいは肺転移巣に対して手術を行った15症例、23検体である(表1)。内訳

Table 1. Clinical characteristics and data of TCFUs of osteosarcoma.

Case	Age Sex §	Primary tumor site	Source † of specimen	Period of culture (days)	Standard method		Modified method	
					No. of colonies/ dish ** (mean)	PE# (%)	No. of colonies/ dish ** (mean)	PE# (%)
1	17/ f	tibia	M	17	30.3	0.0061	46.3	0.0093
2	15/m	tibia	M	26	2.7	0.0005	40.3	0.0081
3-1	48/ f	tibia	S	—	no growth		not done	
3-2			M	19	42.5	0.0085	74.2	0.0148
4-1	12/m	femur	B	22	18.2	0.0036	151.2	0.0302
4-2			S	24	5.6	0.0011	31.3	0.0063
5	50/m	pelvis	B	9	35.5	0.0071	233.0	0.0467
6-1	21/m	tibia	S	20	11.7	0.0023	42.0	0.0084
6-2			M	14	35.0	0.0070	130.9	0.0262
7-1	13/m	humerus	B	22	20.1	0.0040	113.3	0.0227
7-2			S	20	31.4	0.0067	60.1	0.0120
7-1	7/ f	tibia	B	20	1.5	0.0003	42.3	0.0085
8-2			S	24	15.4	0.0031	20.3	0.0041
9-1	11/m	femur	B	18	3.8	0.0008	30.3	0.00064
9-2			S	21	4.5	0.0009	32.0	0.0064
10	8/m	tibia	B	22	19.0	0.0038	15.2	0.0030
11-1	23/m	tibia	S	15	36.7	0.0078	108.0	0.0216
11-2			M	12	10.0	0.0020	165.0	0.0333
11-3			M	12	28.0	0.0056	65.4	0.0131
12	16/m	tibia	M	16	15.3	0.0031	190.0	0.0380
13	16/ f	tibia	M	17	not done		90.5	0.0181
14	14/m	femur	S	—	no growth		not done	
15	38/m	rib	S	24	not done		25.5	0.0051
Mean±SD				18.7± 4.4	19.3±12.8	0.0039±0.0025	81.2+60.3	0.0164±0.0121

§ m, male; f, female.

† B, biopsy specimen; S, surgical material; M, metastatic material from lung.

\* period of monolayer cultivation.

\*\*  $5 \times 10^6$  cells plated per dish.

# Plating efficiency, Number of colonies/number of nucleated cells plated  $\times 100\%$

aminoethyl-dextran; DTIC, dimethyl triazeno imidazole carbaxamide; EDTA, ethylene-diaminetetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; HI, heat-inactivated; MTX, methotrexate; N/C, nuclear/cell; PE, plating efficiency; PS, penicilline-streptomycin solution; RPMI-

は、原発巣の生検材料6検体、手術材料9検体、肺転移巣材料8検体である。

## II. 新鮮腫瘍材料の処理法

手術あるいは生検により得られた腫瘍片を Salmon & Hamburger<sup>17)</sup> および 井上<sup>18)</sup> の方法に従って、McCoy's5A wash にとり、できるだけすみやかに無菌的にハサミで細切した。McCoy's5A wash は、McCoy's5A 培養液 (Gibco) 500 ml にペニシリン、ストレプトマイシン [Penicillin/Streptomycin solution 10,000 units (PS, Gibco)] 5 ml と heat-inactivated (HI) new born calf serum (Gibco) 50 ml を加えたものである。

細切された腫瘍材料を酵素カクテル [Hank's balanced salt solution (Gibco)+collagenase type 1 (Sigma) 0.2 mg/ml, DNase I (Sigma) 0.2 mg/ml, pronase (科研化学) 0.5 mg/ml] にて 37°C, 30 分間処理した後、McCoy's5A wash にて1回洗浄した。さらに、ステンレス製メッシュ (50 メッシュ) でろ過し、ろ液を 25 ゲージ注射針で注射筒内に吸引して集め、単離細胞浮遊液を作成した (図 1)。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。

## III. 単層培養系への移行法

RPMI-1640 培養液 [15%HI-fetal calf serum (FCS, Gibco)+1%PS] を用いて、単離細胞浮遊液の状態となった腫瘍細胞は plastic flask (Corning, # 25100) 内で単層培養を行った。培養液の交換は培養開始 2~3 日目に行った後は 5 日ごとに交換した。37°C の下で、2~3 週で腫瘍細胞がシート状になるのを確認し (図 2 a), 0.025%trypsin+0.02%ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) により再び単離細胞浮遊液として調整した (図 1)。これらの細胞浮遊液もトリパンブルー染色により生細胞数を算定し、 $3 \times 10^6$ 個/ml となるように調整した。

## IV. 二重軟寒天培地の準備

### 1. Base layer の作成

#### 1) Enriched McCoy's5A 培養液

McCoy's5A 培養液 500 ml に 50 ml の FCS, 25 ml の HI-馬血清 (Gibco), 5 ml ピルビン酸ナトリウム (2.2%), 1 ml L-セリン (21 mg/ml), 5 ml L-グルタミン (200 mM) と 5 ml PS を加えて作成した。

#### 2) Plating medium

40 ml enriched McCoy's5A 培養液に、10 ml tryptic soy broth (3%, Difco), 0.6 ml L-アスパラギン (6.6 mg/ml), および 0.3 ml DEAE-デキストラン (50 mg/ml, Pharmacia) を使用直前に加えたものを使用した。

### 3) Base layer (フィーダー層)

3%bacto agar (Difco) を、56°Cの浴槽にて保温して使用した。plating medium と混合し、最終濃度 0.5%の軟寒天となるように調整し、その 1 ml を 35 mm ペトリディッシュ (Corning, # 25000) に播き、二重軟寒天培地の下層とした。

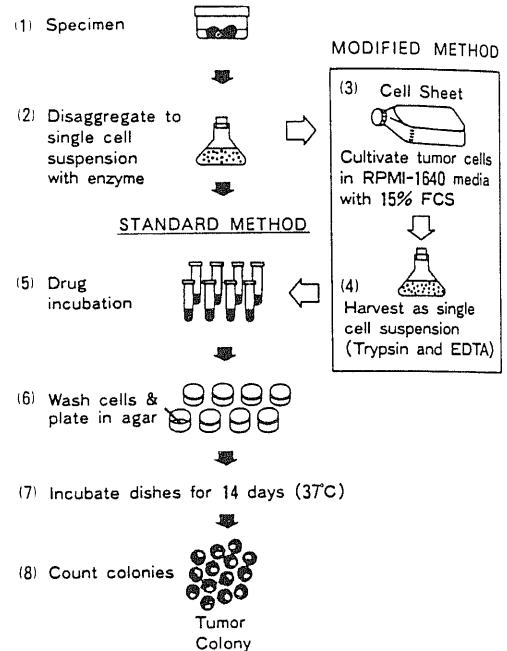


Fig.1. Flow diagram of steps in tumor colony forming assay (TCFA) of osteosarcoma.

(1) Fresh solid tumor was obtained from biopsy or operation materials. (2) The cells from tumor were disaggregated to prepare single cell suspension enzymatically (collagenase type 1, DNase I, pronase). (3) The tumor cells were cultivated in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum (FCS) until the formation of cell sheet in a bottle. (4) The cells were harvested as refined single cell suspension by trypsin and EDTA. (5) The tumor cells were incubated in test tubes with drugs or control medium for 1 hour. (6) The cells were then washed out and plated into double soft agar in Petri dishes. (7) The dishes were incubated for 14 days to permit tumor colony growth. (8) The number of tumor colonies in each dishes was counted under a microscope or with an automatic particle counter and calculated the percent colony inhibition.

1640, Roswell Park Memorial Institute Media-1640; TCFA, tumor colony forming assay; TCFUs, tumor colony forming units; VCR, vincristine.

## 2. Plating layer の作成

### 1) Enriched CMRL-1066 培養液

CMRL-1066 (Gibco) 500 ml に 75 ml 馬血清, 20 ml 塩化カルシウム (100 mM), 10 ml インシュリン (レギュラー, 100 U/ml), 10 ml L-グルタミン, 5 ml ビタミン C (30 mM), 5 ml PS を加えて作成した。

### 2) Double enriched CMRL 培養液

enriched CMRL 培養液 40 ml につき, 0.6 ml L-アスパラギン, 0.3 ml DEAE-デキストランおよび 0.4 ml 2-メルカプトエタノール ( $0.5 \times 10^{-3} M$ ) を使用直前に加えたものを用いた。

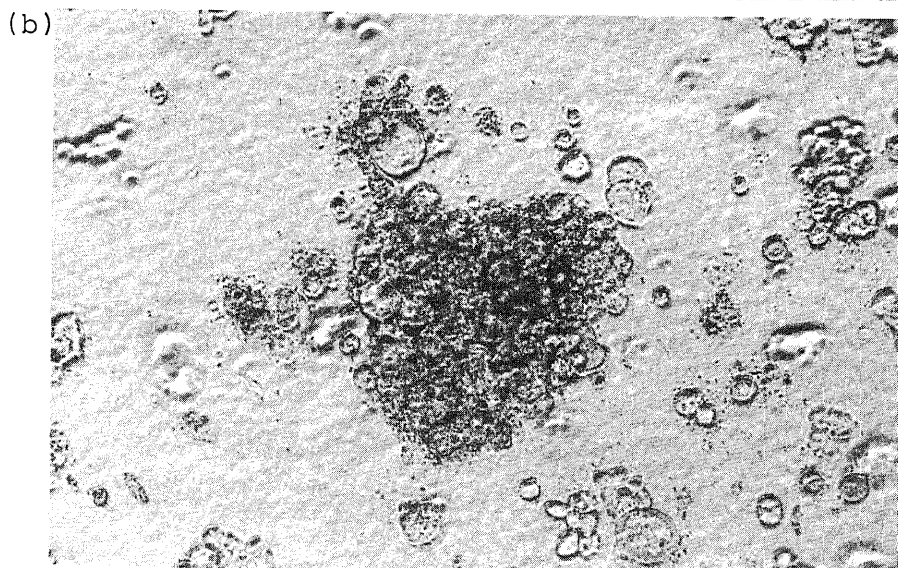
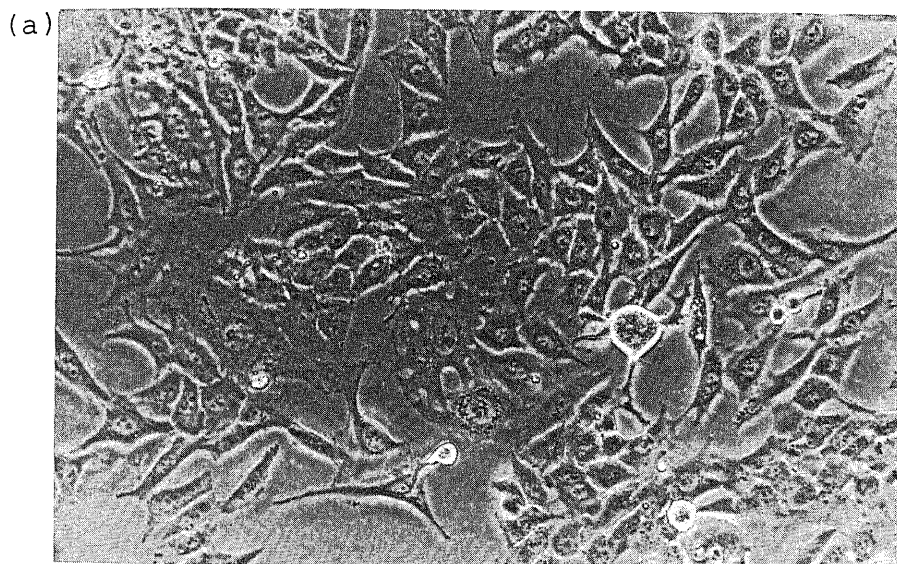
## 3) Plating layer

1 ディッシュ当たり  $5 \times 10^5$  個の細胞密度になるように, double enriched CMRL と最終濃度 0.3% の軟寒天の混合液中に浮遊させた ( $56^\circ C$ )。これを, 先に作成しておいた base layer の上へ重層させた (図 3)。

## V. 薬剤感受性試験

### 1. 1 時間接触の場合

$3 \times 10^6$  個/ml の細胞浮遊液 0.5 ml に, 0.15 ml の薬剤と, 0.85 ml McCoy's5A wash を加えた。コントロールとして薬剤の代わりに生理食塩水を使用し,  $37^\circ C$  で 1 時間接触させた後, McCoy's5A wash にて 2 回洗浄



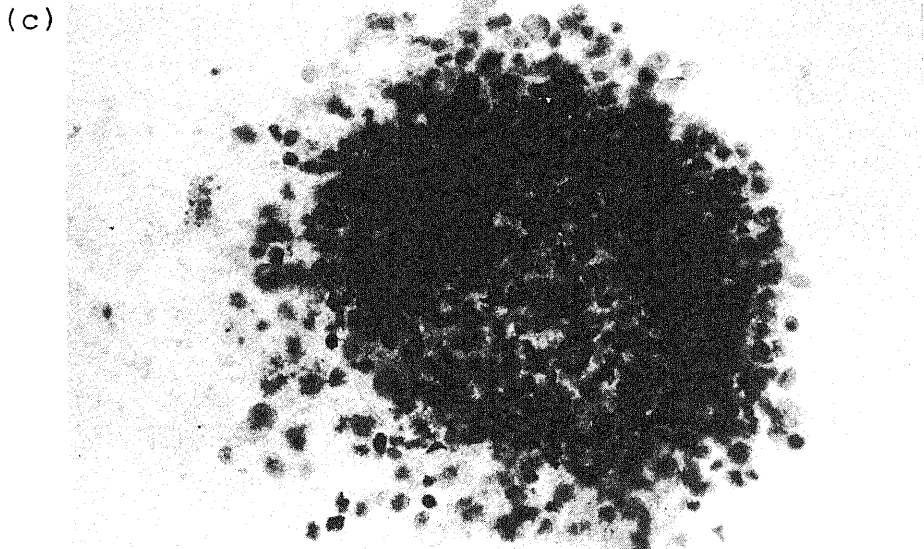


Fig. 2. (a) Cultivated osteosarcoma cells from an 11 year old boy (case 4) in a bottle.  $\times 160$ . (b) Osteosarcoma colony growing in soft agar (inverted microscope).  $\times 160$ . (c) Morphological appearance of an osteosarcoma colony with Papanicolaou's stain.  $\times 100$ .

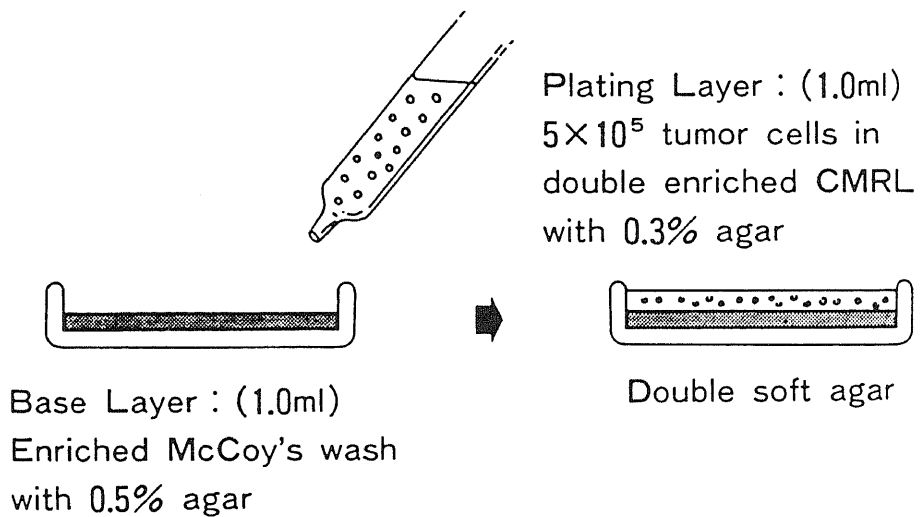


Fig. 3. Components of double soft agar for tumor colony forming assay.

した (1,000g で遠心).

2. 持続接触の場合

$3 \times 10^6$ 個/ml の細胞浮遊液を 0.5 ml, 0.3 ml の薬剤に, 1.9 ml double enriched CMRL を加えた. コントロールは薬剤の代わりに生理食塩水を使用し,  $37^\circ\text{C}$  で約 1 時間 preincubate した. その後, 3% 寒天を 0.3 ml 加え最終濃度 0.3% の軟寒天とし, 3 ディッ

シユの base layer 上へ分注, 播種した.

VI. 二重軟寒天培地の培養

以上のようにして, 播種された腫瘍細胞を含むペトリディッシュを,  $37^\circ\text{C}$  水蒸気飽和状態で, 7.0~7.5% 炭酸ガス培養器内で培養した.

VII. コロニーの算定と同定

細胞播種後, 倒立顕微鏡下で経時的に観察した. 約

48時間以内には個々の細胞(特にコロニー形成細胞)が分裂を開始し、1週間前後で細胞集塊、すなわちクラスタ(7~50個の分裂細胞群)が観察され、2~3週後にはコロニー(50個以上の細胞集団)がみられるようになった(図2, b)。また、4週を過ぎると細胞自己融解が起こってくるため、通常2~3週目で対照群及び薬剤接触群ともコロニー数を算定し、各制癌剤の化学療法効果をその抑制率から判定した。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。

形成されたコロニーをマイクロピペットで取り出し、その形態およびPapanicolaou染色により、腫瘍細胞からなることを確認した(図2, c)。

#### VIII. 制癌剤の選択と濃度、および持続時間の設定

感受性試験を行う制癌剤の濃度は、臨床で使われる時の血中濃度を参考にして決定した(表2)。すなわち、Von Hoffの報告<sup>15)</sup>に従い、ヒトに投与された際の血中最高濃度の約1/10の濃度を標準値として設定した。選択使用した薬剤は、骨悪性腫瘍に対し臨床で比較的效果を期待されているadriamycin (ADM), aclarubicin (ACR), cis-platinum (CDDP), vincristine (VCR), methotrexate (MTX)を代表として用いた。さらに、actinomycin D (ACD), 活性型の4-hydroperoxy cyclophosphamide (CPM), DTIC, ifosphamide, の薬剤でも検討した。

すべてtriplicate (3ディッシュ)で行い、薬剤との接触時間は、おおむね1時間としたが、代謝拮抗剤であるMTXは2週間持続接触とした。また、濃度も大量療法としての使用量で設定した。

#### IX. 統計学的検定法

各方法でのコロニー形成、コロニー形成率、および単層培養に要した期間については、平均値±標準偏差(mean±SD)を算定した。また、統計学的処理はStudentのt検定、 $\chi^2$ 検定、および回帰分析により行った。

#### 成 績

##### I. 薬剤無処理群におけるコロニー形成について

1ディッシュ(播種細胞 $5 \times 10^6$ 個)あたり、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”とした。また、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。コロニー形成率(plating efficiency, PE)は、

$$PE (\%) = \frac{\text{形成されたコロニー数}}{\text{播種細胞数} (5 \times 10^6 \text{個/ディッシュ})} \times 100$$

で表わした。

##### 1. 原法 (standard method) におけるコロニー形成について

骨肉腫におけるコロニー形成能は21検体中15検体(71.4%)にみられたものの、感受性判定可能率は、21検体中6検体(28.6%)と3割に満たなかった。また、PEは $0.0039 \pm 0.0025$  (mean±SD)と、一般の癌腫のPEよりはるかに低い値であった(表3)。

##### 2. 改良法によるコロニー形成について

23検体のうち2検体は、単層培養にて増殖が認められなかったため assay へ導入できなかったが、培養増

Table 2. Anticancer drugs and their concentrations used in vitro.

Drugs	Concentrations used in study ( $\mu\text{g/ml}$ )
Adriamycin (ADM)	0.04
Aclarubicin (ACR)	0.20
Cis-platinum (CDDP)	0.20
Vincristine (VCR)	0.01
Methotrexate (MTX)*	20.00
Actinomycin D (ACD)	0.005
4-hydroperoxy cyclophosphamide (CPM)	3.00
DTIC**	0.10
Ifosphamide	20.00

\* used as high-dose chemotherapy.

\*\* dimethyl-triazeno-imidazole-carboxamide.

Drug concentration was chosen as approximately one-tenth the peak plasma concentration in human pharmacokinetic studies.

殖可能であった21検体すべて5個以上のコロニー形成を認め、91.3%のコロニー形成能であった。さらに30個以上のコロニー形成は18検体78.3%に認められるようになり、原法と比較し感受性判定可能率は有意に上昇した( $p < 0.01$ )。PEでみると、 $0.0164 \pm 0.021$ と極めて高い値を示すようになった( $p < 0.01$ )。

3. 改良培養により、実験に供するまでに十分な増殖(シート状)に要した時間は、採取材料をとわず平均 $18.7 \pm 4.4$ 日であった。

## II. コロニー形成細胞の制癌剤感受性の検討

各制癌剤の感受性をコロニー形成抑制率で表わした。

$$\text{コロニー形成抑制率 (percent colony inhibition)} = \left( 1 - \frac{\text{コロニー数 (薬剤接触群)}}{\text{コロニー数 (コントロール群)}} \right) \times 100(\%)$$

図4は感受性判定可能であった6検体につき、各々5薬剤に対する感受性を原法と改良法の両者における相関を、70%コロニー抑制と50%コロニー抑制の

2点に cut-off point を設け検討したものである。70%コロニー抑制で感受性ありと判定した場合、true sensitive rate 70%, true resistant rate 90%で、全体としての相関は83.3%であった。同様に、50%コロニー抑制で感受性ありと判定した場合、true sensitive rate 83.3%, true resistant rate 91.6%であり、全体の相関は86.7%と極めて高いものであり、70%、50%コロニー抑制のいずれの cut-off point においても、両者における感受性薬剤及び抵抗性薬剤の正診率が高い相関が認められた( $p < 0.01$ )。また、両者のコロニー形成抑制率を回帰分析すると、 $r = 0.731$ の高い相関を示すことが明らかとなった(図5)。

一方、症例11における単層培養細胞を用い、1代、2代、3代、4代、5代及び10代目の継代培養されたそれぞれの細胞群につき、TCFAによる制癌剤感受性を9薬剤について検討したところ、primary cultureとしての原法と、第1代継代培養(1st culture)としての改良法において、両者はほぼ近似の感受性を示した。しかし、2代、3代と継代を重ねるに従いその感

Table 3. Growth of TCFUs of osteosarcoma

Method	No. of specimen tested	No. of growth $\geq 5$ colonies/dish † (%)	No. of growth $\geq 30$ colonies/dish † (%)	Plating # efficiency (%)
Standard method	21	15 (71.4)	6 (28.6)	$0.0039 \pm 0.0025$
Modified method	21	21 (91.3)	18 (78.3) *	$0.0164 \pm 0.0121$ *

†  $5 \times 10^5$  cells plated per dish

# Mean  $\pm$  SD

\*  $p < 0.01$  (significantly different from the standard method)

(a)

		Standard method						
		Modified method			sensitive		resistant	
sensitive		○	□	●	△	▲	●	△
				●		▲		
resistant		○	□	●			○	□
							●	△
							△	▲
							△	▲
total		10					20	

True positive rate 7/10 (70.0%) Overall correlation rate 25/30 (83.3%)  
 True negative rate 18/20 (90.0%) Significant correlation occurred ( $p < 0.01$ ).



(b)

		Standard method	
Modified method		sensitive	resistant
sensitive		○ □ ● ● △ ▲	○
		○ □ ● △ ▲	
		○ ● △	
resistant		○ ● ▲	○ □ △ ▲
			□ △ ▲
			□ △ ▲
			□
total		18	12

True positive rate 15/18 (83.3%)

Overall correlation rate 26/30 (86.7%)

True negative rate 11/12 (91.6%)

Significant correlation occurred ( $p < 0.01$ ).

Fig. 4. Comparison of chemosensitivity on standard method and modified method by the cut-off point on 70% colony inhibition (a) and 50% colony inhibition (b).

Six osteosarcomas (case 1, 3-2, 5, 6-2, 7-2 and 11-1 in Table 1) were studied for each 5 drugs. Individual drugs are illustrated by different symbols, respectively: ○, adriamycin; □, aclarubicin; ●, cis-platinum; △, vincristine; ▲, methotrexate.

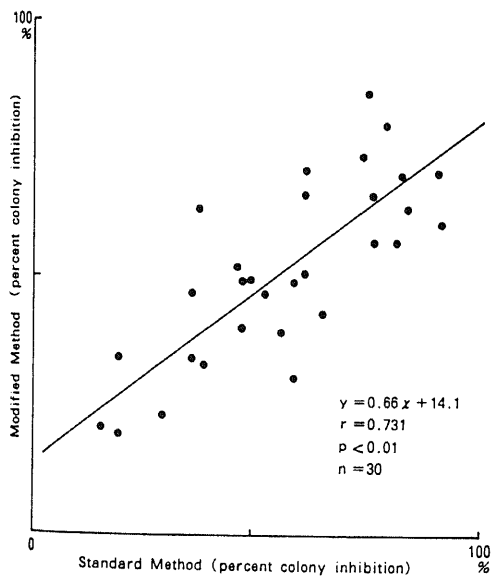


Fig. 5. Relationship of chemosensitivity between standard method (x) and modified method (y). Each points from Fig. 4 was replotted to obtain a more accurate relationship between data from the standard method and this method.

受性にバラツキが出現し、原発巣の性質は徐々に失われていく傾向がうかがえた。さらに5代目から10代目はほぼ同様の感受性を示し、一定化する傾向を認めた(図6)。

## 考 察

### 1. Tumor colony forming assay (TCFA)

#### 1. その概念と歴史

各種の腫瘍は、腫瘍細胞から間質構成細胞に至るまで種々様々な細胞集団の集大成として構成され、その中には、その細胞自身が分裂増殖する能力 (capacity of self-renewal) をもち、その結果、子孫となる細胞を増やしていくことのできる細胞が存在する。これは "tumor stem cell" と呼称されたが、この言葉は血液学の領域での造血幹細胞になぞらえ、腫瘍幹細胞 (tumor stem cell) という概念で腫瘍生物学の分野で想定されたものである<sup>19)20)</sup>。

一方、Salmon & Hamburger<sup>14)21)</sup>は、軟寒天培地内でコロニーを形成する細胞を tumor colony forming units (TCFUs) と呼称した。これと tumor stem cell の両者が同一のものであるかは、いまだ仮説の域をでていないが、幹細胞とは生体において腫瘍増殖にあずかる細胞であり、コロニー形成細胞は生体より摘出され、in vitro 環境下に移されてもなおコロニーを形成

しつづ増殖能を示す細胞であるとの定義<sup>22)</sup>が、最も明確かつ妥当と考えられている。

実験的には、寒天培養での確立された He La 細胞の cell line のクローン化は Puch & Marcus<sup>23)</sup>により、また、正常造血母細胞の clonal assay は Till & McCulloch<sup>24)</sup>によって開発された。その後、正常顆粒球、マクロファージ母細胞およびマウス骨髄細胞を二重軟寒天培地に用いる colony assay 法が Bradley & Metcalf<sup>25)</sup>と、Pluznik & Sachs<sup>26)</sup>らによって開発された。これらを契機に、Arizona Cancer Center の Hamburger ら<sup>21)</sup>はヒト骨髄腫中のコロニー形成細胞の培養法を確立し、human tumor colony forming (stem cell) assay として発表した。その後、諸家により次々にヒト固形腫瘍のコロニー形成細胞の培養成功が報告され<sup>27)-30)</sup>、いずれも in vitro 感受性試験の結果と臨床反応が比較検討され、それらの高い相関性が注目されるようになり<sup>31)</sup>現在に至っている。

## 2. 骨肉腫への導入

肉腫への TCFA の導入は、Von Hoff ら<sup>15)</sup>の 17 例を含め、Alley ら<sup>32)</sup>の 15 例、井上ら<sup>33)</sup>の 11 例など極めて少なく、特に整形外科領域の代表的悪性腫瘍である

骨肉腫への応用はほとんどない。これらの理由として、非上皮性の肉腫細胞は培養が困難であることや、clonogenicity が低いこと<sup>17)</sup>、さらには 症例の絶対数が少ないことが挙げられる。著者が TCFA を骨軟部肉腫系に應用、導入する際に、まず骨肉腫を選択した理由は、第 1 に、ここ数年来骨肉腫の化学療法方向が、Rosen ら<sup>34)</sup>の示す ADM, VCR, MTX, CDDP を主軸とするものに定まってきており、臨床的にも飛躍的な効果をもたらしてきていることから、TCFA の真価の検討、特に臨床との相関性を知るうえで好都合であること、第 2 に、実際の臨床において、前述薬剤に抵抗性あるいは耐性を獲得したと思われる骨肉腫の肺転移症例の治療にあたり、制癌剤感受性試験による効果的薬剤の選択決定は、必要不可欠の問題であり急務を要するという点にある。

## II. Tumor colony forming assay の改良

### 1. 改良法の開発

Von Hoff ら<sup>35)</sup>は腫瘍採取材料別の TCFA に関する価値ある考察として、胸、腹水からの材料や広範な転移巣からの材料は、高い clonogenicity を有しているが、一方、原発固形腫瘍の低い clonogenicity は、機

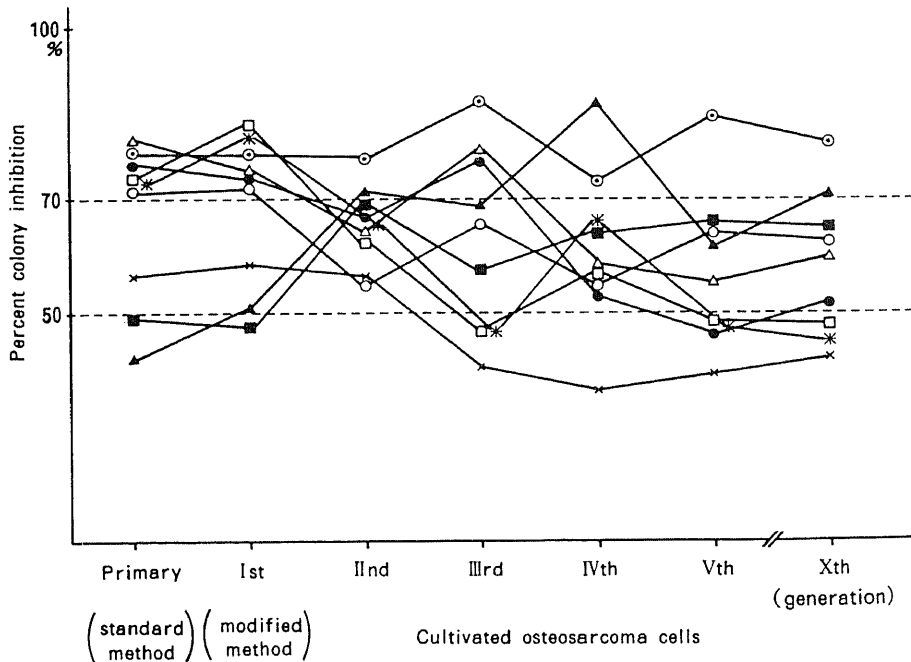


Fig. 6. Relationship of chemosensitivity between primary culture (standard method) and first generated culture (modified method). A specimen (metastatic material) from a 23 year old man (case 11) was studied for 9 drugs. Individual drugs are illustrated by different symbols, respectively: ○, adriamycin; ●, aclerubicin; △, cis-platinum; ×, vincristine; ⊙, methotrexate; \*, actinomycin D; ▲, cyclophosphamide; □, DTTC; ■, ifosphamide.

械的に固形腫瘍を分離し、単離浮遊細胞とすることの困難さを示すと述べている。その問題を解決すべく、Slocum<sup>ら</sup><sup>36)</sup>や MacKintosh<sup>ら</sup><sup>37)</sup>は、固形腫瘍分離に collagenase, pronase, DNase などの酵素を用いて高い clonogenicity の獲得を証明、報告している。著者も骨肉腫材料に対し、すべてこの enzymatical disaggregation method を用いて単離細胞浮遊液を調整した。

また、高い clonogenicity を得るための手段として、Courtenay<sup>ら</sup><sup>38)</sup>は、ヌードマウスや免疫抑制マウスへの腫瘍移植を試み、増殖した腫瘍より再び腫瘍細胞を調整し TCFA に応用している。Buick<sup>ら</sup><sup>39)</sup>や, Carney<sup>ら</sup><sup>40)</sup>は、単層培養化すれば腫瘍の性格は若干変わってくるものの、繰り返し実験が可能なこと、大量の材料を一度に獲得できること、control study として絶対的であることを利点として挙げている。このように受動的に動物へ移植したり、in vitro を経過させたりすることは、腫瘍細胞のコロニー形成能の選択的淘汰への誘導であり、それにより PE が高くなると Rosenblum<sup>ら</sup><sup>41)</sup>は述べている。

そこで著者は、固形腫瘍としての骨肉腫材料を単離細胞浮遊液にした状態から、いったん単層培養系に移行して細胞増殖をはかり、再び単離細胞浮遊液に調整してから TCFA を行う、新しい方法を開発考案した。一般に単層培養系では、腫瘍細胞に混って、fibroblast の増殖もさかんに認められたが、本 assay における二重軟寒天培地では、fibroblast は二層の軟寒天の境界面に移行してコロニー形成には参加せず、その増殖が抑制される方向に働いた<sup>42)</sup>。

原法と改良法の clonogenicity をコロニー形成能、感受性判定可能率、PE により比較検討した。その結果、コロニー形成能は原法の 71.4% に比し、改良法の 91.3% とかなり上昇を示した。特に、感受性判定可能率は原法の 26.6% に対し、改良法の 78.3% と明らかな差を認めた。同時に PE も  $0.0039 \pm 0.0025$  から  $0.0164 \pm 0.0121$  と有意に上昇し、癌腫のそれに匹敵する有意な値を得た。

## 2. 改良法の確立

TCFA においてコロニーは、単一細胞の繰り返される細胞増殖により形成されるが、中には腫瘍に混在した造血系の幼若細胞（マクロファージ、リンパ球、顆粒球）も一部（約 20%）にコロニーを形成しようとされている<sup>36)</sup>。これらの細胞が conditioning factor として作用することは、Hamburger<sup>ら</sup><sup>28)</sup>の研究において、マクロファージを完全に除去した材料では、TCFUs のコロニー形成能が低下することで示された。すなわち、マクロファージは soluble factor を通して、免疫細胞と TCFUs の両者の増殖を制御し、誘導する“両刃の

剣”であると述べている。これらの事実をふまえて、30 個以上のコロニー形成を得たもののみを制癌剤感受性判定可能とすることは、理論的であると考えられる。

形成されたコロニーを Papanicolaou 染色したところ、骨肉腫細胞の同定こそ不能であったが、N/C 比、核の大小不同などの形態学的検索により、腫瘍細胞より成ることが証明された。

原法と改良法の制癌剤感受性の検討では、70% および 50% コロニー抑制において cut-off point を設け評価した結果、いずれにおいても、両者は感受性薬剤および抵抗性薬剤の正診率に相関が認められた。また、回帰分析においても両者に高い相関性が認められたことより、改良法の制癌剤感受性試験の結果は、原法のそれを適確に反映するものと考えられた。

さらに、骨肉腫継代培養過程における制癌剤感受性の変化をみると、primary culture の腫瘍細胞と継代培養された腫瘍細胞の両者は、1～2 世代の継代であればほぼ同等の制癌剤感受性を示したことも、改良法が TCFA の一方法として有用であることを示唆する重要な傍証になると思われた。

以上よりコロニー形成能が高く、PE も癌腫に匹敵する高さを有し、かつ、制癌剤感受性も原法とほぼ同等であることが判明したことより、改良法は、骨肉腫における TCFA として十分にその意義を満たすものと考えられた。

## III. TCFA の問題点と将来の展望

臨床に応用しうる制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ものであること、
- 2) 比較的簡便でかつ迅速に判定できるものであること、
- 3) 少ない臨床材料でも実施可能であること、
- 4) 種々の制癌剤に応用可能であること、
- 5) 評価が客観的である必要があり、試験の成功率が高いこと、などがあげられる。

TCFA は、前述 5 条件はほぼ満たしていると思われるが、骨肉腫を対象とした場合、コロニー形成能および PE の低さが最も大きな壁となっている。これらが高める方法として、低酸素濃度における培養<sup>43)44)</sup>、上層の培地を液体培地とする方法<sup>45)</sup>や、cell free ascites を培地として使用する方法<sup>46)</sup>などが行われ報告されているが、いまだ有効な成果を上げるにいたっていない。著者の方法はこれらの障害を克服し、かつ臨床反応の予言性も高く、生検などの少ない臨床材料からでも、単層培養を経て多量の細胞が獲得でき、TCFA へ実施可能となったことが示された。しかしながら、第 2 の条件である時間的猶予に関しては、従来の方法よりもさらに平均 18.7 日を要することは、今後の問題点とし

てさらに改良の余地が残されている。Tanigawaら<sup>47)</sup>は、TCFAの培養手技と autoradiography の利点を応用し、コロニー算定以外の立場より評価を行う scintillation assay を試みており、腫瘍採取5日後に制癌剤の作用機序に関係なく結果が判定可能である (rapid assay) ことを強調しており、傾聴すべきであろう。

一方、in vitro 制癌剤感受性試験において、検討薬剤の濃度や薬剤との接触時間の設定は重要な問題である。著者は、ヒトに対する化学療法時の腫瘍内濃度に準拠し、より臨床に近い環境として決定した Von Hoff<sup>50)</sup>の方法に従い、ヒトに投与された際の血中最高濃度の約1/10の濃度を標準値として設定した。実際にこの濃度は、one shot 静注時の  $\beta$ -phase 起始部における濃度にほぼ一致し、また、1時間接触による細胞死の検討は、CXT (血中濃度と時間の積) が腫瘍細胞の殺作用効果と最も相関するという点から、合理的な設定条件<sup>48)</sup>といえる。

もう一つの問題点として、masked compound への対処があげられる。著者は活性型の CPM を使用しているが、今後の課題として残されるであろう。

さらに重要な問題は、enzymatical disaggregation を用いる方法であっても完全な単離細胞浮遊液を作成することが困難であり、cell aggregates が種々の割合で含まれることが不可避である点にある。これらがコロニー算定上の誤差の1つとなることが指摘されているが<sup>49)</sup>、改良法の単層培養系を介する操作は、cell aggregates の混入を最少限に阻止し、コロニー算定の false positive を未然に防ぐことに貢献しているものと思われた。

今後、臨床の場で骨肉腫の制癌剤感受性試験として本法を用いていく方針であるが、同時に、骨肉腫のみならず、広く整形外科領域の骨・軟部に発生する肉腫系にも改良法を応用し、その有用性を検討したい。

## 結 論

著者は骨肉腫の制癌剤感受性試験として15症例、23検体を用いて、TCFAの原法および新しい改良法を行い以下の結論を得た。

1. TCFAのための細胞を収集するにあたり、いったん単層培養を行った上で、再び腫瘍細胞を獲得し、assay に用いる方法として新しい改良法を開発した。

2. 原法ではコロニー形成能は71.4%、感受性判定可能率28.6%、 $PE 0.0039 \pm 0.0025$ であったが、本法ではコロニー形成能91.3%、感受性判定可能率78.3%、 $PE 0.0164 \pm 0.0121$ と有意に上昇し、特に感受性判定可能率が上昇したことから感受性試験として十

分に有用と考えられた。

3. しかしながら本法では原法に比し、単層培養のために、さらに $18.7 \pm 4.4$ 日を費す必要があった。

4. 本法における制癌剤感受性の結果は、原法のそれとほぼ一致した結果を示したことから、骨肉腫のTCFAの一方法として用いるものと思われた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜っ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いた富田勝郎助教授に心から感謝いたします。

本研究の遂行に際し、終始御協力を戴いた下崎、沼田両先生の他、整形外科腫瘍班の諸先生方、さらに、多大の御教示と御援助を戴いた癌研究所附属病院、癌化学療法センター井上雄弘先生、千葉県がんセンター高田典彦先生、福井医科大学谷川九彦先生に感謝の意を表します。

なお、本論文の要旨の一部は、第17回制癌剤適応研究会、第57回日本整形外科学会総会、および第3回国際整形災害外科基礎医学会 (SIROT, 1984年9月、ロンドン市) において発表した。

本研究の一部は昭和59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) 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, 684-697 (1956).
- 3) Kondo, T. & Moore, G. E.: The limitations and adverse effects of cancer chemotherapy. *Surgical Forum*, 9, 607-611 (1958).
- 4) 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).
- 5) 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).
- 6) 高瀬武平・山崎安朗・井村慎一・安元三郎・布谷猛・森田聖一・宮沢洋一・荒川弥二郎・高田克弘・山田清夫: 組織培養法によるヒト骨肉腫の研究. *中部整災誌*, 7, 577-589 (1964).
- 7) Dallner, G.: Viability and tetrazolium salt in ascites. *Nature*, 186, 176-186 (1960).
- 8) 近藤達平: 制癌剤の適応—感受性試験. *最新医学*, 19, 2304-2311 (1964).
- 9) Bickis, I. J., Henderson, I. W. D., & Questel, J. H.: Biological studies of human tumors. II.

- In vitro estimation of individual tumor sensitivity anticancer agents. *Cancer*, **19**, 103-113 (1966).
- 10) 藤本 茂・赤尾建夫・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).
- 11) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: Hetero-transplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, **77**, 758-760 (1969).
- 12) Povlson, C. O. & Jacobson, G. K.: Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Res.*, **35**, 2790-2796 (1975).
- 13) Shimamoto, Y., Kameya, T., Nagai, K., Hirohashi, S. Koide, T., Hayashi, H. & Nomura, T.: Transplantation of human tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1251-1260 (1976).
- 14) Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 15) 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. *Ame. J. Med.*, **70**, 1027-1032 (1981).
- 16) Salmon, S. E.: Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. *Cancer Treat. Res.*, **68**, 117-125 (1984).
- 17) 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).
- 18) 井上雄弘・荒川昌享・小川一誠: 制癌剤感受性試験—human tumor stem cell assay. *癌と化学療法*, **9**, 599-605 (1982).
- 19) Buick, R. N.: In vitro clonogenicity of primary human tumor cells: Quantitation and relationship to tumor stem cells, p15-20. *In* S.E. Salmon (ed.), *Cloning of human tumor stem cells*, Alan R. Liss, Inc., New York, 1980.
- 20) 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).
- 21) Hamburger, A. W. & Salmon, S. E.: Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J. Clin. Invest.*, **60**, 846-854 (1977).
- 22) Steel, G. G.: Growth kinetics of tumours, p217-267. Clarendon Press, Oxford, 1977.
- 23) Puck, T. T. & Marcus, P. I.: A rapid method of viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of X-irradiated cells to supply conditioning factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **41**, 432-437 (1955).
- 24) Till, J. E. & McCulloch, E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow. *Radiat. Res.*, **14**, 213-222 (1961).
- 25) Bradley, T. R. & Metcalf, D.: The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust. J. Exp. Biol.*, **44**, 287-300 (1966).
- 26) Pluznik, D. H. & Sachs, L.: The cloning of "mast" cells in tissue culture. *J. Cell Comp. Physiol.*, **66**, 319-324 (1965).
- 27) Jones, S. E., Hamburger, A. W., Kim, M. B. & Salmon, S. E.: Development of a bioassay for putative human lymphoma stem cells. *Blood*, **53**, 294-303 (1977).
- 28) Hamburger, A. W., Salmon, S. E., Kim, M. B., Trent, J. M., Soehlen, B. J., Alberts, D. S. & Schmidt, H. J.: Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar. *Cancer Res.*, **38**, 3438-3444 (1978).
- 29) Buick, R. N., Stanisic, T. H., Fry, S. E., Salmon, S. E., Trent, J. M. & Krasovich, P.: Development of an agar-methylcellulose clonogenic assay for cells in transitional cell carcinoma of the human bladder. *Cancer Res.*, **39**, 5051-5056 (1979).
- 30) Von Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Trent, J. M., Reichert, E. & Altman, A.: Direct cloning of human neuroblastoma cells in agar: a measure of response and prognosis. *Cancer Res.*, **40**, 3591-3597 (1980).
- 31) Salmon, S. E. & Von Hoff, D. D.: In vitro evaluation of anticancer drugs with the human tumor stem cell assay. *Semin. Oncol.*, **8**, 377-385 (1981).
- 32) Alley, M. C. & Lieber, M. M.: Improved optical detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumour cells. *Br. J. Cancer*, **49**, 225-233 (1984).
- 33) 井上雄弘・荒川昌享・宮本宏明・小川一誠・稲垣

- 治郎・堀越 昇・池田幸市・薄井紀子・仲田浩之・安達興一・向山雄人: In vitro colony assay による悪性腫瘍のコロニー形成に関する研究. 日癌治, 19, 1456-1463 (1984).
- 34) 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).
- 35) Von Hoff, D. D., Cowan, J., Harris, G. & Reisdorf, G.: Human tumor cloning: feasibility and clinical correlations. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 6, 265-271 (1981).
- 36) Slocum, H. K., Pavelic, Z. P., Rustum, Y. M., Creaven, P. J., Karakousis, C., Takita, H. & Greco, W. R.: Characterization of cells obtained by mechanical and enzymatic means from human myeloma, sarcoma, and lung tumors. *Cancer Res.*, 41, 1428-1434 (1981).
- 37) MacKintosh, F. R., Evans, T. L. & Sikic, B. I.: Methodologic problems in clonogenic assays of spontaneous human tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 6, 205-210 (1981).
- 38) Courtenay, V. D., Smith, I., Peckham, M. J. & Steel, G. G.: The in vitro and in vivo radiosensitivity of human tumor cells obtained from a pancreatic carcinoma xenograft. *Nature*, 263, 771-772 (1976).
- 39) Buick, R. N., Fry, S. E. & Salmon, S. E.: Application of in vitro soft agar techniques for growth of tumor cells to the study of colon cancer. *Cancer*, 45, 1238-1242 (1980).
- 40) 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).
- 41) 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).
- 42) Bouck, N. & DiMayarca, G.: Evaluation of chemical clonogenicity by in vitro neoplastic transplantation, p226-297. *In* W. B. Jakoby, I.H. Pastan (ed.), *Methods in enzymology*, Vol LVIII (Cell culture). Academic Press, New York, 1979.
- 43) Sridhar, K. S., Plasse, T. F., Holland, J. F., Shapiro, M. & Ohnuma, T.: Effects of physiological oxygen concentration on human tumor colony growth in soft agar. *Cancer Res.*, 43, 4629-4631 (1983).
- 44) Joyce, R. M. & Vincent, P. C.: Advantage of reduced oxygen tension in growth of human melanomas in semi-solid cultures: Quantative analysis. *Br. J. Cancer*, 48, 385-393 (1983).
- 45) Friedman, H. M. & Glaubiger, D. L.: Assessment of in vitro drug sensitivity of human tumor cells using [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation in a modified human tumor stem cell assay. *Cancer Res.*, 42, 4683-4689 (1982).
- 46) Uitendaal, M. P., Hubers, H. A. J. M., McVie, J. G. & Pinedo, H. M.: Human tumour clonogenicity in agar is improved by cell-free ascites. *Br. J. Cancer*, 48, 55-59 (1983).
- 47) Tanigawa, N., Kern, D. H., Hikasa, Y. & Morton, D. L.: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res.*, 42, 2159-2164 (1982).
- 48) 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.
- 49) Agrez, M. V., Kovach, J. S. & Lieber, M. M.: Cell aggregates in the soft agar. "human tumor stem-cell assay". *Br. J. Cancer*, 46, 880-887 (1982).

**An Experimental Study on Tumor Colony Forming Assay of Osteosarcoma** Akio Yokogawa, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J.Juzen Med. Soc., 94, 744-757 (1985)

**Key words:** osteosarcoma, tumor colony forming assay, chemosensitivity, double soft agar, monolayer cultivation

#### Abstract

Tumor colony forming assay (TCFA) has been demonstrated as one of the most reliable chemosensitivity tests for the accurate prediction of the clinical responses to anticancer drugs. However, it has been reported that TCFA for malignant bone tumors, especially osteosarcomas, results in the low growth rate of tumor colony forming units (TCFUs) and the decreased plating efficiency as compared with those of other carcinomas. In this study a method was designed in order to ensure a useful application of TCFA for osteosarcomas. This new method was developed by modifying the standard method of Salmon and Hamburger in the following points. After dissociating the solid tumors into single cells by enzymatic digestion, the cells were cultured in RPMI-1640 medium with 15% fetal calf serum until the monolayer became nearly confluent, and the cells were harvested for seeding on double soft agar plates and the number of TCFUs was assayed. The standard method of TCFA was tried with 23 specimens out of the 15 osteosarcoma cases, but the rate of colony forming ability (71.4%) and the plating efficiency ( $0.0039 \pm 0.0025$ , mean  $\pm$  SD) were low. On the other hand, the modified method increased the rate of colony forming ability to 91.3% and the plating efficiency to  $0.0164 \pm 0.00121$ . Especially, the growth rate of TCFUs successfully submitted for the chemosensitivity test was markedly improved from 26.6% by the standard method to 78.3% by this method. The chemosensitivity to six osteosarcomas by this method was examined with 5 drugs and the data well agreed with those obtained by the standard method ( $p < 0.01$ ). It was concluded that this method was useful and efficient for the TCFA of osteosarcomas.