

鶏卵法による温熱と抗癌剤併用効果の検討

1) 金沢大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 久住治男教授)

2) 金沢大学がん研究所化学療法部 (主任: 佐々木琢磨教授)

打林 忠雄¹⁾ 江川 雅之¹⁾ 浅利 豊紀¹⁾ 中嶋 和喜¹⁾
 久住 治男¹⁾ 遠藤 良夫²⁾ 田中 基裕²⁾ 佐々木琢磨²⁾

RESPONSES OF TUMOR CELL LINES AND SURGICAL SPECIMENS TRANSPLANTED ONTO
 CHORIOALLANTOIC MEMBRANE OF CHICK EMBRYO TO ANTICANCER AGENTS
 IN COMBINATION WITH/WITHOUT HYPERTHERMIA

Tadao Uchibayashi¹⁾, Masayuki Egawa¹⁾, Toyoki Asari¹⁾, Kazuyoshi Nakajima¹⁾, Haruo Hisazumi¹⁾,
 Yoshio Endo²⁾, Motohiro Tanaka²⁾ and Takuma Sasaki²⁾

1) Department of Urology, School of Medicine, Kanazawa University
 (Director: Prof. Haruo Hisazumi)

2) Department of Experimental Therapeutics, Cancer Research Institute, Kanazawa University
 (Director: Prof. Takuma Sasaki)

The chorioallantoic membrane of chick embryo was used to examine the responses of tumor cell lines and surgically resected specimens to anticancer agents in combination with or without hyperthermia. B16-F10 melanoma, KK-47 cell line derived from a transitional cell carcinoma of the bladder and surgical specimens from urological malignancies were transplanted onto the chorioallantoic membrane of chick embryo 10 days after fertilization. The effects of intravascularly injected cyclophosphamide, cisplatin, adriamycin, mitomycin C, vincristine and vinblastine, in combination with or without hyperthermia, on the growth of the grafts were investigated. A 15-minute 42.5°C hyperthermia exhibited most favorable anticancer effects in B16-F10 grafts ($P < 0.01$) of all heating conditions tested. A combined use of hyperthermia and cisplatin, cyclophosphamide or adriamycin demonstrated a significantly high tumor regression rate in B16-F10 grafts ($P < 0.01$). In KK-47 grafts, a single use of cyclophosphamide and a combined use of hyperthermia and cyclophosphamide exhibited a highly significant antitumor regression ($P < 0.05$). Surgical specimens from 14 urological malignancies were subjected to this assay. Growth which was adequate for sensitivity test was obtained in 11 of the 14 malignancies. The results obtained suggest that this assay system may be a useful chemohyperthermia sensitivity test.

要旨: 継代培養細胞株 (B16-F10メラノーマ, ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47) および臨床材料 (腎細胞癌 5 例, 尿路移行上皮癌 9 例) を用いて鶏卵法による温熱と抗癌剤併用効果の検討を行なった。その結果マウス B16-F10メラノーマでは ADR 単独処理群および CDDP+温熱, ADR+温熱, CY+温熱併用群において有意に高い腫瘍発育阻止率が認められた ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。KK-47では CY 単独処理群および CY+温熱処理群において有意に高い腫瘍発育阻止率が認められた ($P < 0.05$)。臨床材料を用いた検討では14例中11例 (79%) において感受性試験の評価が可能であり, 今後これらの結果を臨床応用し, その相関性につき検討していく予定である。

緒言

温熱がん化学療法は, 近年癌集学的治療法のひとつとして注目されている。しかし個々の症例に対する温

熱療法と抗癌化学療法の効果を短時間に判定できる *in vivo* における実験モデルはない。癌治療を行なう場合, 手術または生検により得られた摘出材料を用いて

有効な抗癌剤を選択することや、温熱治療の有効性を検討することは、無効な抗癌剤投与や温熱治療により生ずる副作用や患者への負担を軽減する上で極めて重要であると考えられる。これまで当教室においても human tumor clonogenic assay¹⁾, novel dye exclusion method²⁾および *in vivo*での subrenal capsule assay³⁾による抗癌剤感受性試験を行い臨床応用してきた。しかし簡便で安価にかつ迅速に結果が得られ、かつ prodrug を含む薬剤にも適応可能で臨床効果との相関性が高いといった条件を完全に満たす方法は未だ確立されていないのが現状である。

佐々木らは、1912年 Murphy⁴⁾によって報告された鶏卵漿尿膜上への腫瘍移植法に着目し、この鶏卵法を用いた抗癌剤感受性試験が上記の条件を満たす可能性の高い方法であると報告している^{5)~8)}。

著者らは、佐々木らの方法に準じ、継代株化培養細胞および泌尿器悪性腫瘍患者より得られた臨床材料を用いて感受性試験を行ない、若干の知見が得られたので報告する。

材料および方法

1. 継代培養細胞株：マウス B16-F10メラノーマ、ヒト膀胱癌由来培養細胞 (KK-47)
2. 臨床材料：腎細胞癌 5例、尿路移行上皮癌 9例 (腎盂癌 5例、膀胱癌 4例)
3. 方法：孵卵10日目の受精鶏卵を candling し、漿尿膜上の血管の位置を定め、この部を中心に卵殻に回転式ヤスリを用いて1cm四方の傷をつける。ピンセットを用いて卵殻を除去し、露出した卵殻膜に小さな傷をつける。気室中央の卵殻膜に小孔をあけ、そこから気室の空気を吸引して卵殻膜と漿尿膜とを剝離させ、卵殻膜を除去する。次いで継代培養細胞の場合この露出した漿尿膜の血管の発達した部分に、無菌的に直径8mmのテフロンリングを漿尿膜上に置き培養液にて調整された腫瘍細胞 ($2 \times 10^4 - 2 \times 10^6 / 20 \mu\text{l}$) をその中に移植する。一方固形腫瘍の場合は、無菌的に1~3 mm³に細切し、それぞれの細胞片の重量測定後直接漿尿膜の血管の発達した場所に移植する。腫瘍移植3日目に漿尿膜内の血管内へ各種抗癌剤を注入し、30分後に water bath にて加温処理を行なう。処理後、再び37℃で4日間孵卵器内におき、腫瘍塊を摘出して重量測定する (Fig. 1)。株化細胞を用いた場合には判定時の処理群における腫瘍重量を対照群とのそれと比較し腫瘍発育阻止率 (Inhibition rate: IR) を求め、推計学的検定により感受性を判定した。一方臨床固形腫瘍

Fig. 1 鶏卵法を用いた温熱化学療法の基本検定

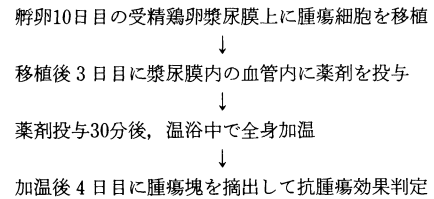


Table 1 薬剤濃度

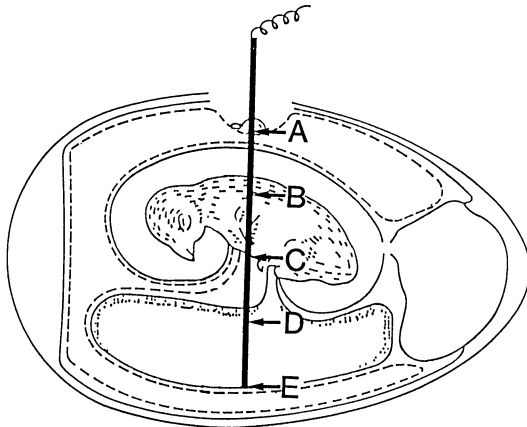
薬 剤	投与量 (μg/egg)
CDDP	10.0
MMC	5.0
CY	100.0
ADR	40.0
VCR	0.5
VLB	0.2

を用いた場合には、各処理群での処理前後の腫瘍重量変化を対照群でのそれと比較し、各処理により生じた抗腫瘍効果を推計学的に検討した。さらに判定時に得られた組織について病理組織学的にも検討した。用いた抗癌剤濃度は臨床投与量を、鶏卵胎児の平均体重(薬剤投与時で5.1g)に換算して決定した (Table 1)。

結 果

1. はじめに、water bath で鶏卵を加温した場合の鶏卵内温度分布につき検討した。温度測定はタカラスターミスターD925 (宝工業株式会社, 神奈川) およびセンサーSXX-67 (同社, 神奈川) を用いて卵黄深部より1cm間隔および移植腫瘍内で温度測定を行なった。その結果 A-E の各点での温度差は最大0.2℃であり、以後の加温処理中の温度測定は、卵黄中心部付近にセンサーを置き温度測定を行なった (Fig. 2)。
2. B16-F10メラノーマを用いて加温条件の検討を行なった。加温温度を42, 42.5および43℃に設定した。同時に加温時間を5, 10, 15および20分に設定した。その結果42.5℃, 15分加温で最も高いIRが得られた (Table 2)。
3. ついで B16-F10メラノーマに対する温熱併用化学療法の抗腫瘍効果につき検討した。その結果温熱または薬剤単独群では ADR 処理群においてのみ有意に高い腫瘍発育阻止率が認められたが、その他の薬剤処理ではいずれも有意の抗腫瘍効果は認められなかった。これに対し各薬剤に加温処理を併用することによりいずれも有意の抗腫瘍効果が認められた (Table 3)。

Fig. 2 鶏卵内温度分布



A: 43.16 ± 0.46 , B: 43.16 ± 0.45 , C: 43.18 ± 0.43 , D: 43.06 ± 0.61 , E: 43.18 ± 0.46

Table 2 B16-F10メラノーマに対する温熱療法の抗腫瘍効果 (加温条件の検討)

温度(°C)	時間(分)	IR(%)
42.0	10	-18.9
	15	13.0
42.5	10	38.2**
	15	59.7**
	20	29.0*
43.0	5	43.3**
	10	51.6**
	15	全卵死亡

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ n=5

Table 3 B16-F10メラノーマに対する温熱化学療法の抗腫瘍効果

薬剤 with/without 温熱	薬剤投与量 ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	判定時腫瘍重量 (mg) (平均値 \pm 標準偏差)	IR(%)
CONTROL	—	107.7 \pm 77.0	—
CDDP	10	47.0 \pm 35.5	56.4
ADR	40	21.4 \pm 10.6	80.1*
CY	100	54.7 \pm 24.4	49.1
HPT(42.5°C 15')	—	59.9 \pm 19.7	44.0
CDDP+HPT	10	17.2 \pm 6.9	84.0**
ADR+HPT	40	26.4 \pm 14.5	75.4**
CY+HPT	100	35.9 \pm 24.5	66.7**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ n=5

4. ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47細胞を用いて同様の実験を行なった。加温条件の検討では、いずれの加温処理にても有意の抗腫瘍効果は認められなかつ

Table 4 ヒト膀胱癌由来細胞株 KK-47細胞に対する温熱療法の抗腫瘍効果

温度(°C)	時間(分)	IR(%)
42.0	10	4.8
	15	5.5
	15	2.8
42.5	10	3.4
	20	9.2
	15	4.8
43.0	5	4.8
	10	6.4
	15	全卵死亡

いずれも有意差なし n=5

Table 5 ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47細胞に対する温熱化学療法の抗腫瘍効果

薬剤 with/without 温熱	薬剤投与量 ($\mu\text{g}/\text{egg}$)	判定時腫瘍重量 (mg) (平均値 \pm 標準偏差)	IR(%)
CONTROL	—	147.6 \pm 72.4	—
CDDP	10	123.0 \pm 97.8	16.7
ADR	40	132.6 \pm 87.4	10.2
CY	100	80.3 \pm 53.7	45.6*
HPT(42.5°C 15')	—	140.5 \pm 75.6	4.8
CDDP+HPT	10	182.1 \pm 77.6	-23.4
ADR+HPT	40	122.7 \pm 78.4	16.9
CY+HPT	100	89.8 \pm 78.9	39.2*

* $p < 0.05$ n=5

た (Table 4). ついで温熱併用化学療法の抗腫瘍効果につき検討した。その結果 CY 単独および CY+温熱処理群においてのみ有意の抗腫瘍効果が認められた (Table 5).

5. 次に手術的に摘出された臨床材料を用いた感受性試験を行なった。推計処理が可能で、一応温熱または抗癌剤の抗腫瘍効果を知りうる事が可能であった症例は14例中11例 (79%) であった (Table 6).

6. 抗癌剤単独, 温熱単独または温熱併用薬剤感受性試験可能症例につき検討した。はじめに臨床材料を用いた場合の加温条件 (特に加温時間) につき検討した。症例 1 に対する温熱感受性試験の結果は, 42.5°C, 30分および60分加温により有意に高い腫瘍発育阻止率が認められ (Table 7), 効果判定時に得られた対照群の腫瘍組織所見では viable cell が多数認められた (Fig. 3). これに対し30分および60分の温熱処理群では著明な壊死性変化が認められ (Fig. 4), 腫瘍重量の減少を支持する所見と考えられた。この結果に基づき今後臨床材料を用いた実験系での加温条件を42.5°C, 30分と定めた。症例 5 についてみると対照群では一部壊死性

Table 6 症例一覧

Case 1	腎盂腫瘍	HPT5', 15', 30', 60'
Case 2	腎腫瘍	HPT5', 15', 30', 60'
Case 3	膀胱腫瘍	HPT30'
Case 4	膀胱腫瘍 (局所再発)	CDDP, ADR, HPT, CDDP+HPT, ADR+HPT
Case 5	腎盂腫瘍	ADR*, HPT*
Case 6	腎腫瘍	生着せず
Case 7	腎腫瘍 (骨転移)	VLB, 5-FU, HPT*, VLB+HPT, 5-FU+HPT
Case 8	膀胱腫瘍	生着せず
Case 9	腎盂腫瘍	判定不能
Case 10	腎盂腫瘍	CDDP, HPT, CDDP+HPT
Case 11	膀胱腫瘍	CDDP, HPT, CDDP+HPT
Case 12	腎腫瘍	VLB**, 5-FU, HPT*, VLB+HPT**, 5-FU+HPT**
Case 13	腎腫瘍	VLB
Case 14	腎盂腫瘍 (リンパ節転移)	CDDP, ADR

*P<0.05 **P<0.01

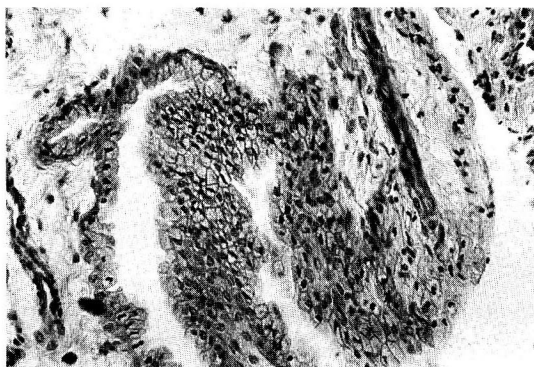
Table 7 症例1(腎盂癌)に対する温熱療法の抗腫瘍効果

温熱	移植時腫瘍重量 (mg) (平均値±標準偏差)	判定時腫瘍重量 (mg) (平均値±標準偏差)
CONTROL	24.98±8.92	34.60±9.80
HPT 5'	23.95±7.12	30.90±16.61
HPT 15'	25.65±7.17	25.60±13.63
HPT 30'	24.76±7.44	21.78±10.20**
HPT 60'	27.61±6.76	26.47±9.73**

HPT ; 42.5°C

**P<0.01 n=5

Fig. 3 対照群の組織学的所見 (HE 染色, ×200), viable cell が認められる



変化を有するも周辺には明らかな viable cell を認め (Fig. 5), 一方 ADR または温熱処理群では全て壊死となっており (Fig. 6), Table 8 に示したように推計処理により得られた結果を支持する所見であった。最

Fig. 4 加温 (30, 60分) 後の組織学的所見 (HE 染色, ×200), 壊死性変化が認められる

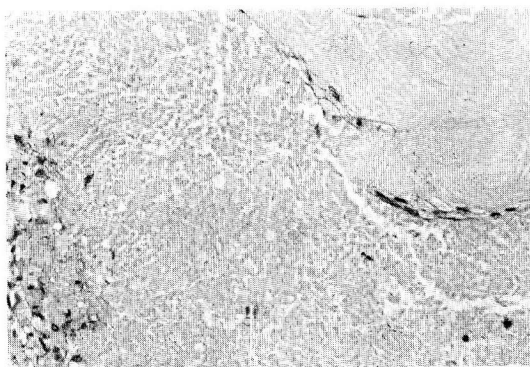


Fig. 5 対照群の組織学的所見 (HE 染色, ×100), 一部壊死性変化を伴うが周辺には viable cell が認められる

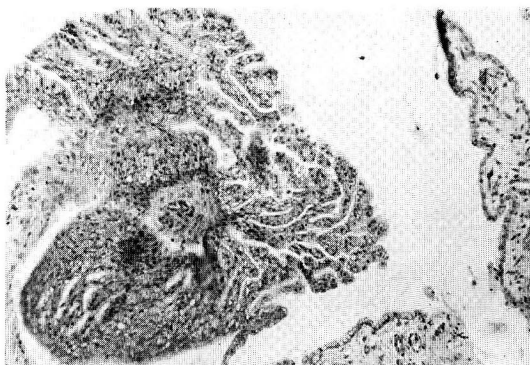


Fig. 6 ADR (または温熱療法) 処理群の組織学的所見 (HE 染色, ×200), 壊死性変化が全体におよんでいる



後に移植時腫瘍重量に比較し, 判定時重量が対照群で減少している症例 4, 10, 11 について検討した。腫瘍組織所見では, いずれも一部 viable cell を認めるも大

Table 8 症例5(腎盂癌)に対する温熱または抗癌化学療法の抗腫瘍効果

薬剤 温熱	移植時腫瘍重量 (mg) (平均値±標準偏差)	判定時腫瘍重量 (mg) (平均値±標準偏差)
CONTROL	1.66±1.21	3.26±1.40
ADM	1.64±1.02	1.87±0.83*
HPT	1.58±0.98	1.29±0.35*

*p<0.05 n=5

部分が壊死となっていた。

考 察

既に述べたように、Murphyが鶏卵漿尿膜上に腫瘍を移植したことに着目し、国内では1985年協同研究者の佐々木がこれを *in vivo* におけるヒト癌悪性度判定法および薬剤感受性試験の1つとして研究開発し報告した。この方法の特徴は、1. 簡便、2. 安価、3. 迅速に結果が得られ、4. prodrugを含む薬剤の感受性試験が可能であるとされている。従来より行なわれている感受性試験としては *in vitro* での human tumor clonogenic assay (HTCA), *in vivo* でのヌードマウス背部皮下移植法や subrenal capsule assay (SRCA) が挙げられる。しかしこれらの方法では細菌の感受性試験のように、簡単な操作により結果が得られないのが現状である。HTCAでは抗癌剤感受性試験としての精度が高くその有用性が注目されているが、コロニー形成率が低く依然問題が残されている。またヌードマウスを用いる方法は生着率が期待されるほど高くなく、抗癌剤感受性試験を行なうまでに1~3カ月を要する点で臨床応用する感受性試験として十分なものとは言えないものと考えられる。subrenal capsule assayは比較的短期間で結果が得られ、prodrugも判定可能であることなどの長所があるが、薬剤感受性判定法に関して統一された基準が設定されておらず、今後この点が解明されてゆく必要があると考えられる。以上のごとく、現在治療前に個々の患者について、温熱感受性ならびに適切な抗癌剤選択をなしえる方法はなく、今回我々は鶏卵法を用いた感受性試験を試みた。その結果14例中11例において温熱化学療法の評価が可能であった。さらに病理組織学的検討でもこの方法により得られた結果の有用性が示唆される所見と考えられた。しかし対象群で効果判定時の腫瘍重量が、移植時のそれと比較し減少している症例が一部に認められた。これらの症例に関しても推計学的検定による抗腫瘍効果の判定は一応可能であり、いずれの薬剤または

温熱処理が高い腫瘍発育阻止率を有するかという結果は得られる。しかし対象群の組織学的検討でいずれも壊死となっており、このような症例における推計学的検討の意義は低いものと考えられた。すなわち従来より行なわれている推計処理により抗腫瘍効果を判定する場合、対象群での腫瘍増殖が認められない症例では組織学的検討を同時に行なう必要性が高いものと考えられた。今後はこれらの症例をどのように判定し、かつ臨床応用していくべきかが残された課題であり、今回得られたこれらの結果に基づく臨床応用により、臨床効果との相関性を検討することが今後必要であると考えられる。

本研究の一部は、文部省がん特別研究(1)(課題番号63010046, 古賀班), および文部省科学研究費補助金(課題番号63570742)の援助を受けたもので、付記して謝意を表す。

文 献

- 1) 打林忠雄, 久住治男, 浅利豊紀, 小橋一功, 天野俊康, 内藤克輔: 尿路悪性腫瘍における human tumor clonogenic assay を用いた抗癌剤感受性試験の検討。泌尿紀要, 33, 1575—1580, 1987.
- 2) Naito, K., Hisazumi, H., Mihara, S., Asari, T., Kobashi, K., Amano, T. and Uchibayashi, T.: Chemosensitivity study of urological malignancies using a novel dye-exclusion method. Cancer Chemother. Pharmacol., 20(Suppl.), 1—5, 1987.
- 3) 小橋一功, 長野賢一, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男: Adriamycin と Methotrexate の併用療法が有効であった進行性尿路移行上皮癌の一例。Subrenal Capsule Assay の臨床応用。癌と化学療法, 14, 3359—3363, 1987.
- 4) Murphy, J.B.: Transplantation of malignant tumors to the embryos of a foreign species. J. Am. Med. Assoc., 59, 874—875, 1912.
- 5) 佐々木琢磨: 鶏卵漿尿膜上のヒト癌に対する抗癌剤感受性試験。病態生理, 6, 311—312, 1987.
- 6) 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.
- 7) 佐々木琢磨: 鶏卵法の抗癌剤感受性試験への応用。実験医学, 5, 562—564, 1987.
- 8) Uchida, H., Sasaki, T., Tanaka, M., Endo, T., Nitta, K., Nishikawa, K., Chuman, H., Fukuma, H. and Matsumoto, K.: Response to antitumor agents of murine trans plantable tumors implanted onto chorioallantoic membrane of chick embryo. Jpn. J. Cancer Res., 78, 729—736, 1987.

(1988年10月18日受理, 特別掲載)