

技 術

抗癌剤感受性試験 (CD-DST 法) 導入に向けた
基礎的検討

高橋 一人* 伊藤 実* 小島恵津子*
柴田 瑤子* 船木 千春* 富樫 信*
工藤 和洋** 下山 則彦**

Basic Examination for Introduction of Collagen gel Droplet
embedded culture Drug Sensitivity Test (CD-DST Method)

Kazuto TAKAHASHI, Minoru ITO, Etsuko KOJIMA
Yoko SHIBATA, Chiharu FUNAKI, Makoto TOGASHI
Kazuhiro KUDOH, Norihiko SHIMOYAMA

Key words : chemotherapy — drug sensitivity test — collagen gel

はじめに

癌の化学療法は新薬の開発により選択肢が増えてきているものの、その効果は実際に治療を行って見ないと分からないことが多い。抗癌剤感受性試験は体外で患者癌細胞と抗癌剤を接触させ、癌細胞に対してどれくらい効果があるかを客観的に判定する検査法である。抗癌剤感受性試験の導入は治療成績の向上および患者の身体的負担の軽減につながり、今後需要の増大が予想される。

当院では2006年3月よりCD-DST法 (Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test) による抗癌剤感受性試験を試験的に導入してから3年目になる。当院における抗癌剤感受性試験の現況について報告する。

原 理

CD-DST法による抗癌剤感受性試験は腫瘍細胞をコラーゲンドロップ内に埋め込み培養することで、生体内に近い環境を作りだし、その中で腫瘍細胞に抗癌剤を接触させ、実際に患者へ抗癌剤を投与した場合の感受性を予測する。最終的な抗癌剤感受性の判定は抗癌剤に接触させず培養した腫瘍細胞と抗癌剤に接触させた腫瘍細胞をニュートラルレッドで染色し、各々の染色性の違いを専用の画像解析装置で計測して行う。生きている腫瘍細胞

はニュートラルレッドを取り込んで赤く染まるが、効果を認めた抗癌剤では腫瘍細胞が死滅するため、ニュートラルレッドの染色性が低下する。

対 象

対象は2006年3月から2008年3月までの間に当院検査室に提出された大腸癌66例、胃癌31例、乳癌21例、肺癌による癌性胸水1例、悪性中皮腫1例、腹膜偽粘液腫2例、卵巣癌1例、原発不明癌のリンパ節転移1例、原発不明癌の癌性胸水1例の計125例である。

方 法

CD-DST法の実施にあたっては新田ゼラチン社製ヒト癌細胞初代培養システムキット Primaster を使用した。本試験の大きな流れは図1に示すとおりである。はじめに手術等で摘出された腫瘍組織を壊死や潰瘍部を避けて約1cm角に切り出し、抗生剤を含む生理食塩水で洗浄する。切り出した腫瘍組織片には腫瘍細胞のほかに壊死細胞、間質、脂肪、血球等、本試験に不要な成分が含まれている。そこで物理的、化学的手法によって組織片を細かく分散し、さらにコラーゲンゲルがコーティングしてあるCGフラスコで一晩予備培養を行うことで、コラーゲンゲルに接着する生きた腫瘍細胞を選択的に回収する。回収した腫瘍細胞はコラーゲンゲル溶液に浮遊させ、6穴シャーレの各穴に30 μ lずつ3ヶ所滴下し、コラーゲンドロップを作製する。コラーゲンドロップは

* 市立函館病院 中央検査部臨床病理科 細胞生物検査センター

** 市立函館病院 同 病理研究検査センター

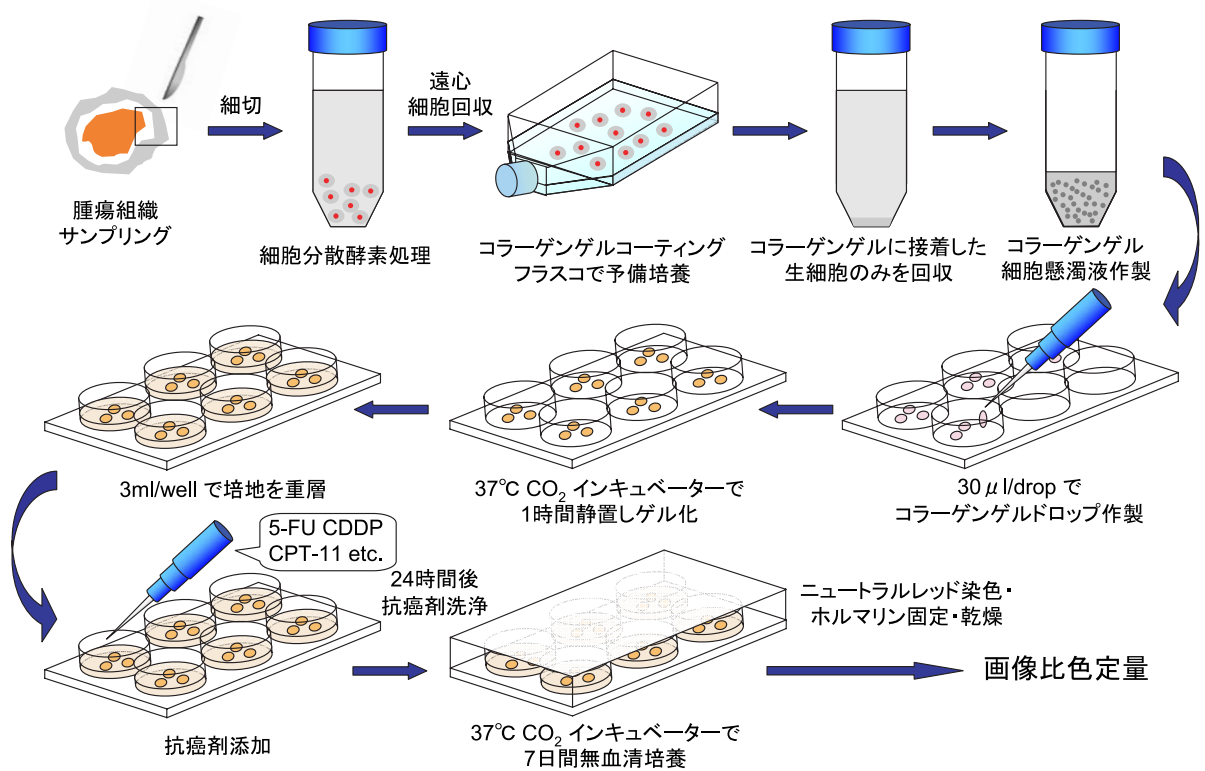


図1 CD-DST法の流れ

10%ウシ胎児血清を添加したDF培地に浸し、CO₂インキュベーターで一晩培養する。翌日、コラーゲンドロップに抗癌剤を接触させ、CO₂インキュベーターで24時間培養する(図2)。同時に対照として抗癌剤に接触させないコラーゲンドロップ(抗癌剤非処理群)も用意する。抗癌剤接触後、添加した抗癌剤を洗浄・除去し、線維芽細胞の増殖を抑える無血清培地にて7日間CO₂インキュベーターで培養を行う。培養終了後、コラーゲンドロップをニュートラルレッドで染色、10%中性ホルマリンで固定し、水洗、風乾する。

抗腫瘍効果の評価は専用の画像解析装置を用いて、ニュートラルレッドの染色度合いの差異を検出し、抗癌剤非処理群(C)と抗癌剤処理群(T)との相対増殖率の比T/C(%)を求め、 $T/C \leq 50\%$ を高感受性、 $50\% < T/C \leq 60\%$ を中等度感受性、 $T/C > 60\%$ を低感受性と判定した。なお、培養途中で細菌や真菌が混入し、腫瘍細胞のみの染色性を測定できない症例や細胞増殖不良により抗癌剤非処理群において2割以上の腫瘍細胞が死滅してしまった症例では抗癌剤の効果を実際に評価できないため判定不能とした。

結 果

CD-DST法の検査成績を年別に集計し、表1に示した。2006年は全体で30例中13例(43.3%)が判定可能であり、7例(23.3%)が細菌や真菌発育、10例(33.3%)

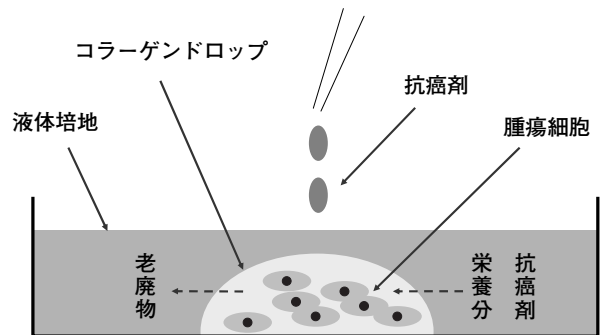


図2 抗癌剤接触

が細胞増殖不良により判定不能となった。症例別にみると大腸癌では10例中3例(30.0%)が判定可能であり、4例(40.0%)が細菌や真菌発育、3例(30.0%)が細胞増殖不良により判定不能となった。胃癌では11例中7例(63.6%)で判定可能であり、1例(9.1%)が細菌や真菌発育、3例(27.3%)が細胞増殖不良により判定不能となった。乳癌では3例中1例(33.3%)で判定可能であり、2例(66.7%)が細胞増殖不良により判定不能となった。肺癌では判定可能例はなく、1例中1例(100.0%)が細胞増殖不良により判定不能となった。その他の癌では5例中2例(40.0%)が判定可能であり、2例(40.0%)が細菌や真菌発育、1例(20.0%)が細胞増殖不良により判定不能となった。

表1 CD-DST の検査成績

全 症 例				
年	判定可能(%)	細菌・真菌発育(%)	細胞増殖不良(%)	件数
2006	13 (43.3)	7 (23.3)	10 (33.3)	30
2007	53 (86.9)	2 (3.3)	6 (9.8)	61
2008	32 (94.1)	1 (2.9)	1 (2.9)	34

大 腸 癌				
年	判定可能(%)	細菌・真菌発育(%)	細胞増殖不良(%)	件数
2006	3 (30.0)	4 (40.0)	3 (30.0)	10
2007	32 (88.9)	2 (5.6)	2 (5.6)	36
2008	20 (100.0)	—	—	20

胃 癌				
年	判定可能(%)	細菌・真菌発育(%)	細胞増殖不良(%)	件数
2006	7 (63.6)	1 (9.1)	3 (27.3)	11
2007	13 (86.7)	—	2 (13.3)	15
2008	4 (80.0)	1 (20.0)	—	5

乳 癌				
年	判定可能(%)	細菌・真菌発育(%)	細胞増殖不良(%)	件数
2006	1 (33.3)	—	2 (66.7)	3
2007	8 (80.0)	—	2 (20.0)	10
2008	7 (87.5)	—	1 (12.5)	8

肺 癌				
年	判定可能(%)	細菌・真菌発育(%)	細胞増殖不良(%)	件数
2006	0 (0.0)	—	1 (100.0)	1
2007	—	—	—	—
2008	—	—	—	—

その他の癌				
年	判定可能(%)	細菌・真菌発育(%)	細胞増殖不良(%)	件数
2006	2 (40.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	5
2007	—	—	—	—
2008	1 (100.0)	—	—	1

2007年は全体で61例中53例(86.9%), 2008年は全体で34例中32例(94.1%)が判定可能であり, いずれの症例においても判定可能例が80%以上であった。

考 察

抗癌剤感受性試験に使用する腫瘍組織は様々な条件の臨床検体のため, 必ずしも細胞培養に適した条件が得られず, 2割程度の症例で判定不能になるといわれている¹⁾²⁾。しかし, 我々がCD-DST法を導入した2006年当初は半数以上が判定不能となった。判定不能となる原因は細菌や真菌混入と細胞増殖不良に大別される。今回の大腸癌症例では細菌や真菌混入と細胞増殖不良の両者がみられ, 胃癌や乳癌では細胞増殖不良による判定不能例が目立った。

大腸癌の細菌や真菌の混入は組織に残存する細菌や真菌の除去に問題があると考えられた。CD-DST法では細菌や真菌汚染を防ぐため, 抗生剤のペントシリンとカナ

マイシン, 抗真菌剤のアンホテリシンBを洗浄液や培地中に加えることを推奨している。しかし, 実際にはこれら薬剤に対して耐性を示す細菌や真菌が高頻度にみられた。耐性を示す細菌や真菌の検索をおこなったところ, *Enterococcus faecium*が原因の1つと考えられた。2007年以降は *Enterococcus faecium*に効果を示すバンコマイシンを洗浄液や培地に追加し, さらに抗真菌剤をアンホテリシンBより効果の強いアムビゾームに変更することで, 有意に細菌や真菌の増殖を防ぐことができた。細胞増殖不良については腫瘍細胞の質的な問題と量的な問題があった。本試験の対象とした大腸癌の多くは進行癌であり, 壊死や潰瘍の目立つ組織であった。そのため活性の低下した細胞を培養に用いたことが細胞増殖不良の原因の1つと考えられた。2007年以降は病理医にサンプリングを依頼することで, 的確なサンプリングが可能となり, 細胞増殖不良例が減少したと思われる。

胃癌や乳癌は腫瘍細胞が固い間質成分に取り囲まれていることが多く, 十分量の腫瘍細胞を分離できず, 細胞増殖不良の原因となっていた。2006年は腫瘍組織をメスや剃刀で細切したのち, 細胞分散酵素で処理を行い, 腫瘍細胞を分離していたが, この方法ではコラーゲンドロップ内に間質細胞や破碎した細胞片等, 本試験に不要な成分の混入が目立ち, 回収できる腫瘍細胞数も少なかつた。この問題を解決するため, 陶器製の家庭用すり下ろし器で組織片をほぐしたのち, 酵素処理を行う方法を考案した。すり下ろし器で組織を処理すると固い間質成分が柔らかくなり, 組織片から腫瘍細胞の剥離が容易となった。また刃物を使わないため, 細胞の損傷も抑えることができた。細胞分離方法を工夫することで, 効率的に腫瘍細胞を採取できるようになり, 細胞数不足による細胞増殖不良例が少なくなった。

肺癌による癌性胸水をサンプルとした症例でも細胞増殖不良がみられたが, 胸水中に対象となる腫瘍細胞がわずかしか認められないことが原因であった。このような事態を防ぐため, CD-DST法を実施する症例では同時に細胞診標本作製し, 検査に適切なサンプルであるかを迅速に判断することが重要と思われた。

1例の悪性中皮腫症例においてCD-DST法を行った結果, 本試験において有効とされた薬剤が実際の治療でも有効であった。このことからCD-DST法の対象となっていない腫瘍症例でも治療の参考となるデータを提供できる可能性が示唆された。

近年, 5-FUを中心に抗癌剤の感受性を遺伝子レベルで測定する報告³⁾⁴⁾⁵⁾が増えてきている。生物学的検査と遺伝子学的検査を組み合わせることによって, さらに安定性と信頼性を向上させたデータの提供が可能になるとと思われる。

ま と め

今回の検討で抗生剤の選択, サンプルングおよび細胞分離技術が細胞培養の成果に大きな影響を与えることが分かった。現在は細胞培養技術の習熟や工夫により, 当院のCD-DST法も安定したデータの提供が可能になった。これらデータを元に患者本位のテーラーメイド医療の1つとしてCD-DST法を行っていきたい。

文 献

- 1) 小林昶運他:新しいIn Vitro抗癌剤感受性試験 Collagen Gel Droplet Embeddes Culture Drug Sensitivity Test (CD-DST) 法の確立とその臨床的有用性の検討. 癌と化学療法. 22:1933-1939, 1995.
- 2) 中川隆公他:CD-DST法を用いた肝細胞癌に対する抗癌剤感受性試験. 癌と化学療法. 31(13):2145-2149, 2004.
- 3) 寺島雅典, 斎藤和好:抗癌剤感受性試験と酵素活性からみた5-FU系薬剤の適応選択. G.I.Reserch 10(2):52-59, 2002.
- 4) Takao Nakahara et al.:Chemosensitivity Assessed By Collagen Gel Droplet Embedded Culture Drug Sensitivity Test, and MDR1, MRP1, and MRP2 mRNA Expression in Human Colorectal Adeno-carcinomas. Pharmaceutical Research. 21(3):406-412, 2004.
- 5) Masaki Kamimoto et al.:Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase gene expression in breast cancer predicts 5-FU sensitivity by a histocultural drug sensitivity test.Cancer Letters 223:103-111, 2005.