

癌治療における抗癌剤感受性試験の応用

—第1報—

佐々木 智子, 保谷 俊行, 大西 淳一, 高橋 秀史, 関谷 千尋
松岡 伸一¹⁾, 秦 温信¹⁾, 佐野 文男¹⁾

札幌社会保険総合病院 検査部, 同 外科¹⁾

我々は、乳癌12症例について MTT を用いた SDI 法で 7 種類の抗癌剤 Mitomycin-C(MMC)、Adriamycin(ADM)、5-Fluorouracil(5-FU)、Cisplatin(CDDP)、Etoposide(VP-16)、Cyclophosphamide(CPA)、Methotrexate(MTX)、の感受性試験を行った。

併せて、この結果と ER と PgR 値を比較してみた。

- 1) 乳癌の各種感受性の評価は、12症例中10例 (83.3%) が可能であった。
- 2) 各種抗癌剤の有効性 (I.I. $\geq 50\%$) は、CDDP が10例中5例 (50.0%) ともっとも高く、MTX が1症例ともっとも低かった。
- 3) 乳癌組織型と抗癌剤感受性の関連は明らかでなかったが、予後の悪いといわれる硬癌にも感受性の高い例がみられた。
- 4) ER、PgR 両陽性例に感受性の低い症例が、一方、両陰性例に感受性の高い症例がみとめられた。

キーワード：抗癌剤、薬剤感受性、SDI 試験

はじめに

現在、多くの抗癌剤が開発され、癌治療に大きな役割を果たしているが、個々の癌組織で抗癌剤の感受性が異なる。そのため、抗癌剤の感受性試験を行い、その結果に基づいて治療薬剤の選択を行うことは、治療効果の成績向上に寄与するとともに、効果が少ない薬剤から生ずる副作用を回避できる可能性がある。

我々は、乳癌組織における各種抗癌剤の感受性試験を、in vitro による succinate dehydrogenase inhibition test (SDI 法)¹⁾ を用いて行なっているので、その結果を第1報として報告する。

対象および方法

1) 対象

1998年1月から1999年7月までに、当院において手術が施行された乳癌12例から得られた腫瘍組織ならびに乳癌細胞 MDA-MB-453 (理研細胞銀行) を用いた。

2) 方法

a. SDI 法

前原らの方法²⁾ に準じ、以下のように行った。癌組織をできるだけ無菌の状態で採取し、1~2 mm 角に鋏で切り刻み150 μm のナイロンメッシュでろ過し、細胞数を $3 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整する。これをマイクロカルチャープレート (Sumitomo Bakelite) に100 μl に分注し、さらに各種抗癌剤を100 μl づつ加えて、37°C、5%CO₂ インキュベーター (ESPEC BNA111) で72時間培養する。培養後、0.4%MTT、0.1%コハク酸ナトリウム10 μl を加え、37°C 3時間反応させる。生成された紫色のホルマザンを DMSO150 μl を加えて溶出し、540nm 波長の ELISA reader (Bio Tek ELX808) で吸光度を測定する。

感受性の判定は、以下の式に基づいて Inhibition index (I.I.) を求めた。

$$\text{I.I.} = (a - P) / (a - m) \times 100$$

ただし、P は癌腫瘍細胞に薬剤を作用させた時の

吸光度、aは薬剤を入れないで同じ操作を行った時の吸光度、mは薬剤とMTTとも入れないで行った時の吸光度である。I.I.が50%以上を薬剤効果があると判定した。

b. エストロゲン、プロゲステロンレセプター
エストロゲン (ER) は13fmol/mg以上、プロゲステロンレセプター (PgR) は10fmol/mg以上を陽性とした。

3) 薬剤

mitomycin-C(MMC : 10 μg/ml)、adriamycin (ADM : 4 μg/ml)、5-fluorouracil(5-FU : 100 μg/ml)、cisplatin(CDDP : 20 μg/ml)、etoposid(VP-16 : 20 μg/ml)、cyclophosphamide (CPA : 30 μg/ml)、methotrexate(MTX : 50 μg/ml)の7種類を使用し、感受性に用いる濃度は、通常使用量血中ピーク値の約10倍量とした。

結 果

1) 乳癌細胞株 (MDA-MB-453) と各種薬剤の比較

I.I.がもっとも高かったのは、CPA (93.8%) で、次いでMMC (86.7%)、以下CDDP (79.9%)、ADM (68.0%)、VP-16 (34.4%)、5-FU (33.8%)、

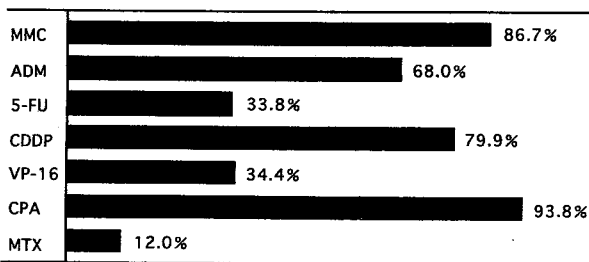


図1 乳癌細胞株(MDA-MB-453)におけるI.I.値

MTX (12.0%) の順となった。(図1)

2) 乳癌症例と各種抗癌剤の比較

乳癌細胞株の結果を踏まえて、12症例における各種抗癌剤毎の感受性を比較した。乳癌の組織型の分類では、乳頭腺管癌4例、充実腺管癌6例、硬癌2例であった。ER、PgRとも陽性は4例、ERのみ陽性1例であった。

case 7と10は、コントロールの吸光度が0.01以下で、細胞の low growth rate が原因と思われる、判定不能となり、検討対象から除外した。また、case 2は、細胞数が少なく、5種類の抗癌剤しか測定できなかった。—表示の部分は、コントロール(a)より抗癌剤を作用させた時の吸光度(P)が高くなり、計算上、負の値を示したものである。

全薬剤のI.I.が50%以上を示したのは、case 8で、次いでcase 9が1剤(MTX)にのみ感受性がなかった。この2例は、ER、PgRとも陰性であった。

また、全ての薬剤に対し無効であったのはcase 1,6, 11であった。case 6、11は、ER、PgRがともに陽性であった。硬癌のcase 3では、CDDPにのみ感受性があった(表1)。

3) 10症例における各種抗癌剤の有効率の比較

判定不能な2症例を除いて、各種薬剤の感受性を比較した、I.I.が50%以上示した薬剤は、CDDPが10例中5例(50.0%)ともっとも高く、次いでADMおよびCPA、MMC、VP-16、5-FUとなり、MTXが10例中1例(10.0%)しか感受性を示さなかった。図1で示した乳癌細胞株のI.I.と比較すると、もっとも有効であった薬剤はCDDPとCPAの違いはあるが、VP-16、5-FU、MTXは同じ順位の感受性を示した(図2)。

表1 乳癌症例における各抗癌剤のI.I.

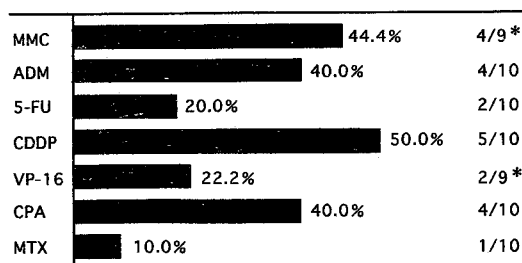
| | case1 | case2 | case3 | case4 | case5 | case6 | case7 | case8 | case9 | case10 | case11 | case12 |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|
| 組織型 | 2a2 | 2a1 | 2a3 | 2a2 | 2a2 | 2a1 | 2a3 | 2a2 | 2a1 | 2a1 | 2a2 | 2a2 |
| ER/PgR | -/- | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ | +/+ | -/- | -/- | -/- | +/+ | +/+ |
| MMC | 37.7 | NT | 33.3 | 64.5 | 3.4 | 36.7 | NT | 82.4 | 90.4 | 31.3 | 21.7 | 56.1 |
| ADM | 14.0 | 67.6 | 31.9 | 55.1 | — | 24.2 | 110.0 | 74.1 | 87.8 | — | — | — |
| 5-FU | — | 49.2 | 5.8 | 13.8 | — | 2.5 | — | 56.5 | 81.6 | — | — | — |
| CDDP | 36.8 | 64.8 | 68.1 | 76.1 | 7.2 | 41.7 | — | 80.3 | 83.6 | 18.8 | 15.7 | 24.5 |
| VP-16 | — | NT | — | 13.0 | — | — | NT | 55.4 | 57.8 | — | — | — |
| CPA | 39.5 | 64.8 | 15.9 | 42.0 | 64.5 | 21.7 | NT | 68.9 | 89.5 | — | 27.4 | — |
| MTX | — | 35.2 | 2.9 | 8.0 | — | — | NT | 58.0 | 24.8 | — | — | — |

2a1 : 乳頭腺管癌 2a2 : 充実腺管癌 2a3 : 硬癌

■ : コントロールOD値が0.010以下につき評価不能例

ER : エストロゲンレセプター PgR : プロゲステロンレセプター

— : I.I.がマイナス数値 NT : 細胞数低値により測定不可



*: 1例は判定不可

図2 10症例における各種抗癌剤有効率(I.I.の50%以上)の比較

考 察

SDI法はTCA回路のATP産生に関与する細胞のコハク酸脱水素酵素活性を生成されたformazanをOD値として判定する生化学的方法であり、この酵素活性と細胞のviabilityとの高い相関性が報告されている^{1, 2, 3)}。

検査を施行する上で細胞数が 3×10^5 /ml以上必要となる。検査施行の可否には、回収細胞数の多寡が関与するが、生体内から腫瘍を取り出す過程で血流遮断や機械的損傷によって生細胞率が低下する、あるいは細切やメッシュによる濾過の過程での細胞の損失や損傷が生じることがあるとされている⁴⁾。実際に我々の12症例中2例はLow growth rateのため検討できず、また培養後のa値がP値より低値のため評価できない例もあった。

しかし、このことがSDI法の限界を示すものではない。官澤⁵⁾は薬剤感受性細胞と非感受性細胞の混在、さらに非増殖期細胞の細胞の存在がOD値に影響を与えることがあるとしている。すなわち、薬剤の作用が出ない非増殖期細胞と薬剤作用が発現する増殖期細胞の比率がOD値に問題となる。

今回用いた各種抗癌剤の有効性の比較では、乳癌細胞株と10症例における有効性の順は、ほぼ同じような結果を示した。CDDPの高感受性の結果は、胃癌症例において検討した宮本ら⁶⁾が、使用した薬剤の数が異なるもののそれぞれ63.6%、27.3%とした報告と同様であった。

一方、乳癌組織型と抗癌剤の感受性との関連は例数が少ないため明らかではないが、予後が悪いとされる硬癌(case 3)でも、CDDPで感受性が高かった。また、ER、PgR両陽性例に感受性の低い症例が、両陰性例に感受性の高い例が認められた。乳癌細胞がエストロゲン感受性をもつ場合は、エストロゲン存在下で初めて悪性増殖を示し、これにさらに

癌性の遺伝子変異が追加されると、エストロゲンが存在しなくても悪性増殖を示すホルモン非依存性癌に悪性化することが考えられる。今回の検討から、SDI法がER、PgR両陽性例においては、効果的抗癌剤の他に、内分泌療法の抗エストロゲン剤の選択も考慮できることが示唆された。

さて、5-FU、VP16、MTXの有効性は、他に比べ低く出現した。これは、細胞に単独に作用させた結果である。しかし、近年は多剤併用の治療法が確立されて、その効果が多数報告されている。その意味では、SDI法においても、多剤併用による感受性の評価も必要と考えており、今後の検討課題としたい。また5-FUは、過去40年以上も抗癌剤として使用されてきており、長期間の使用による血中濃度も重要な因子とされている⁷⁾。したがって、より長時間培養によるアッセイ法も検討課題である。

SDI法による抗癌剤の感受性試験と臨床効果の間には、まだまだ解離する所見がみられるが、癌細胞および癌組織の採取から培養方法の手技や管理をさらに向上させることにより、さらに効果的な抗癌剤治療に役立つものと確信している。

ま と め

- 1) 乳癌の各種抗癌剤感受性評価は、12例中10例(83.3%)が可能であった。
- 2) 各種抗癌剤の有効性(I.I. $\geq 50\%$)は、CDDPが10例中5例(50.0%)とともっとも高く、MTXが1症例とともっとも低かった。
- 3) 乳癌組織型と抗癌剤感受性の関連は明らかでなかったが、予後の悪いといわれる硬癌にも感受性の高い症例がみとめられた。
- 4) ER、PgR両陽性例に感受性の低い症例が、一方両陰性例に感受性の高い症例がみとめられた。

文 献

- 1) 近藤達平、市橋秀仁、今村達雄、ほか：制癌剤適応判定法について、癌の臨床 10: 17~21、1964年
- 2) 前原喜彦、鴻江俊治、江見泰徳、ほか：癌細胞の感受性検査 - SDI (succinate dehydrogenase inhibition) 検査 -、臨床病理 38: 14~18、1990年

- 3) 近藤達平：抗癌剤の感受性決定、日本臨床（秋期臨時増刊号）42：104～117、1984年
- 4) 浅沼史樹、山田好則、河村栄二、ほか：固形腫瘍の抗癌剤感受性試験としてのSDI（succinic dehydrogenase inhibition test）の検討、日癌治 26：1095～1103、1991年
- 5) 官澤文彦：HTCAによる抗がん剤併用効果の予測、厚生省がん研究助成金によるシンポジウム・第8回（1984）抗がん剤感受性テストの基礎と臨床—Human tumor clonogenic assay：HTCAを中心にして—、末耕恵一、西條長宏監修、協和企画通信、1985年、39～52
- 6) 宮本京子、福地かおり：SDI法を用いたヒト悪性腫瘍1000検体における制癌剤感受性、臨床病理 38：1273～1278、1990年
- 7) 白坂哲彦、相羽恵介、荒木浩、ほか：5-fluorouracilとLow Dose Cisplatinとの併用療法および新規経口抗癌剤S-1の理論、癌と化学療法、26：456～465、1999年

Evaluation of Anti-tumor Drugs using the In-vitro Chemosensitivity Test in Breast Cancer Therapy :The first report

Tomoko SASAKI, Toshiyuki YASUTANI, Junichi OHNISHI,
Shuji TAKAHASHI, Chihiro SEKIYA

Department of Clinical Laboratory, Sapporo Social Insurance General Hospital

Sinichi MATUOKA, Yoshinobu HATA, Fumio SANO

Department of Surgery, Sapporo Social Insurance General Hospital

We evaluated the in vitro chemosensitivity of breast cancer cells from 12 patients to seven anticancer reagents by the succinate dehydrogenase inhibition (SDI) test. The anticancer reagents include mitomycin-C (MMC), mdriamycin (ADM), 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin (CDDP), etoposide (VP-16), cyclophosphamide (CPA), and metotrexiate (MTX). We further compared the chemosensitivity with the level of each estrogen receptor and progesteron receptor determined by a chemical assay.

- 1) In this study, ten of twelve cases (83%) were evaluatable for complete analysis.
- 2) When the inhibition index was more than 50%, it was determined to be effective in this study. CDDP was effective in five of ten cases (50%) showing the most broad effectiveness, while MTX was effective in only one case.
- 3) We failed to demonstrate the significant relationship between the histologic type of breast cancers and the chemosensitivity in the limited number of the present cases. However, it seemed worth to note that some cases with scirrhou type, which might be poor in prognosis, showed high inhibition index.
- 4) We observed a tendency for the cases with both positive estrogen and progesteron receptors to be less chemosensitive. The cases with negative receptors were relatively chemosensitive, suggesting that the hormone receptor status may affect the chemosensitivity.