

# 癌治療における抗癌剤感受性試験の応用

## — 第 2 報 —

佐々木智子<sup>1</sup> 保谷 俊行<sup>1</sup> 高橋 秀史<sup>1</sup>  
中島 信久<sup>2</sup> 松岡 伸一<sup>2</sup> 秦 温信<sup>2</sup>

札幌社会保険総合病院 検査部<sup>1</sup> 外科<sup>2</sup>

MTTを用いた in vitro による SDI 法 (succinate dehydrogenase inhibition test) にて抗癌剤の感受性試験を種々の癌組織について行ってきたが、今回は病期Ⅳの胃癌組織について行った結果を報告する。同時に p53, erbB2, Thymidylate synthetase (TS), Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) の免疫組織化学染色も実施した。抗癌剤感受性試験の結果と生存日数との関連は症例数が少ないためかあきらかではなかったが、比較的予後が悪いといわれている p53陽性例にも生存日数が比較的長い症例があった。

キーワード：胃癌、抗癌剤感受性、p53、erbB2、TS、DPD

### 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。癌の化学療法を行うにあたっては、腫瘍・宿主・薬剤の関係が重要であり、より有効で宿主に副作用の少ない抗癌剤を予め選択できれば理想的である。そのために抗癌剤感受性試験を行い、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。

抗癌剤感受性試験は、現在まで種々の報告で行われていた。1966年、近藤ら<sup>1)</sup>によってコハク酸脱水素酵素活性を指標とした succinate dehydrogenase inhibition test (SDI 法) が報告された。さらに1983年、Mondmann<sup>2)</sup>が酵素受容体としてより鋭敏な tetrazolium 塩である 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) を用いた方法 (MTT法) を報告し、簡便で迅速な方法として繁用されるようになった。我々は、この方法によって過去3年間に各種癌に対し抗癌剤感受性試験を

行ってきた<sup>3)</sup>が、今回は胃癌病期Ⅳの症例について、5-FU と CDDP の結果を中心に、病理学的所見および臨床経過などとの比較検討を行った。

### 対象および方法

#### 1) 対象

1998年1月から2000年8月までに、当院において手術が施行された病期Ⅳの胃癌症例から得られた腫瘍組織10例を用いた (表1)。

#### 2) 方法

##### a. SID 法

前原らの方法<sup>4)</sup>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

表1 胃癌症例における各抗癌剤の I.I.

	case 1	case 2	case 3	case 4	case 5	case 6	case 7	case 8	case 9	case 10
組織型	tub2	tub2>por2	sig	por2	sig>muc	muc>sig	tub2	por1	por2>tub2	por2
リンパ管転移	n3	n2	n2	n1	n1	n1	n2	n3	n3	n1
p53	-	-	-	2+	±	-	2+	-	-	-
erbB2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
TS	±	-	-	-	-	+	±	2+	-	-
DPD	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
MMC	52.0	83.0	4.5	35.7	43.7	81.1	17.9	53.0	82.8	49.8
ADM	-1.9	63.7	1.5	NT	NT	75.6	7.1	46.2	63.4	31.7
5-FU	35.3	52.9	9.0	28.6	-13.9	76.0	-26.8	37.6	35.3	15.7
CDDP	35.5	62.8	23.9	39.3	39.9	79.2	33.9	50.7	35.9	40.6
VP-16	-6.6	43.0	NT	NT	NT	41.4	NT	34.9	24.7	42.2
CPA	58.9	89.3	NT	NT	NT	8.5	NT	68.7	82.9	67.5
MTX	0.6	30.2	NT	-17.9	-38.6	9.6	NT	25.4	24.1	38.6

—: I.I.がマイナス数値

NT: 細胞数低値により測定不可

に缺で切り刻み150 $\mu$ mのナイロンメッシュでろ過し、細胞数を3 $\times 10^5$ /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 $\mu$ lに分注し、さらに各種抗癌剤を100 $\mu$ lづつ加えて、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>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 $\mu$ lを加え、37 $^{\circ}$ C 3時間反応させる。生成された紫色のホルマゼンをDMSO 150 $\mu$ l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。

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

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. 免疫組織化学染色

脱パラフィンの後、前処理として microwave 照射 (500w、5分 $\times$ 4) による抗原賦活を行い、各染色の1次抗体で染色後、Labeled streptavidin Biotin (LSAB) 法によって免疫組織化学染色を行った。腫瘍細胞の核が明らかに染色された病変部分が検鏡視野内の5%以上存在するものを陽性とし、それ未満を陰性とした。

P53は抗P53モノクローナル抗体 (DO7, Novocastra 社)、erbB2は抗HER2モノクローナル抗体 (ZYMED LABORATORIES INC.)、Thymidylase synthetase (TS) は抗TS抗体 (大鵬薬品工業 kk より供与)、Dihydropyrimidine dehydro-genase (DPD) は抗DPD抗体 (大鵬薬品工業 kk より供与) を使用した。

#### 3) 薬剤

mitomycin-C (MMC : 10 $\mu$ g/ml)、adriamycin (ADM : 4 $\mu$ g/ml)、5-fluorouracil (5-FU : 100 $\mu$ g/ml)、cisplatin (CDDP : 20 $\mu$ g/ml)、etoposide (VP-16 : 20 $\mu$ g/ml)、cyclophosphamide (CPA : 30 $\mu$ g/ml)、methotrexate (MTX : 50 $\mu$ g/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。

また当院における胃癌患者に対する化学療法の投与方法は、術前投与は、CDDP 15mg/m<sup>2</sup> 週4回、5-FU は300mg/m<sup>2</sup>を14日間連日投与これを1コースとして1~2コース行う。術後は、CDDP 6mg/m<sup>2</sup>週1回、UFT は250mg/m<sup>2</sup>を連日経口投与した。

## 結 果

### 1) 各種薬剤抗癌剤の比較

10症例で解析し得た各種抗癌剤のSDIにおいて、効果があるとされたI.I. 値50%以上は、CPA 4例、MMC, ADM およびCDDP は3例、5-FU 2例で、VP-16とMTX はいずれも効果はみられなかった。

### 2) 5-FU と CDDP の有効症例における比較

抗癌剤感受性の結果5-FU とCDDP の両方または片方にI.I.50%以上の有効であった感受性群3症例 (No. 2, 6, 8) では、P53とDPD は全て陰性であり、TS は2例に陽性、erbB2は1例に陽性を示した (表2)。

これに対し、非感受性群7例 (No. 1, 3, 4, 5, 7, 9, 10) では、P53が7例中3例で陽性であった。一方、TS は2例が弱陽性を示したが他は陰性であった。また、erbB2は全例陰性、DPD は1例のみ陽性であった (表3)。

### 3) 生存日数の比較

Kaplan-Meier 法による累積生存曲線で、感受性群と非感受性群の比較を行った (図1)。50%生存日数は感受性群で265日、非感受性群のそれは153日

表2 5FU, CDDP の感受性群 (I.I. が50%以上)

	組織	リンパ 節転移	蛋白発現				生存日数
			p53	erbB2	TS	DPD	
case 2	tub>por2	n2	-	+	-	-	127
case 6	muc>sig	n1	-	-	+	-	265
case 8	por1	n3	-	-	2+	-	300>

表3 5FU, CDDP の非感受性群 (I.I. が50%未満)

	組織	リンパ 節転移	蛋白発現				生存日数
			p53	erbB2	TS	DPD	
case 1	tub2	n3	-	-	±	-	147
case 3	sig	n2	-	-	-	-	335
case 4	por2	n1	2+	-	-	-	118
case 5	sig>muc	n1	±	-	-	-	170
case 7	tub2	n2	2+	-	±	-	400>
case 9	por>tub2	n3	-	-	-	+	135
case 10	por2	n1	-	-	-	-	153

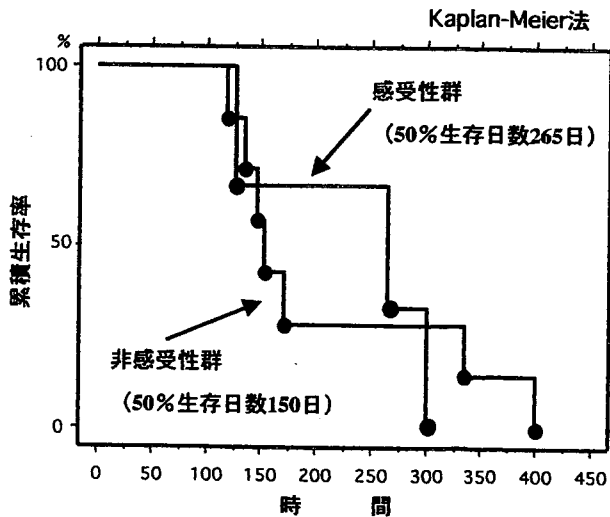


図1 病期IV胃癌の生存曲線

であったが、有意差をみとめなかった。また、P53で強陽性を示した例 (No. 7) では、400日以上生存日数を示した。

## 考 察

今回の検討では10症例と少ないため、薬剤感受性と生存日数との関連は明らかにできなかった。この原因の1つとして、SDI法の実施の可否には、回収腫瘍細胞の多寡が大きく関与することになる。しかし、胃癌組織では、硬癌の状態で癌細胞が少ないことが多い。そのため、細切やメッシュによるろ過の過程で細胞の損失、損傷あるいは正常細胞の混入が生じることがある。実際に我々の10症例でも、low grade rateのために評価できなかったり、培養後のOD値が培養前より低値のため評価ができない例もあった。官澤<sup>5)</sup>は、OD値に影響する因子として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存在があるとしている。特に胃癌細胞は上述した条件下での検査のため、正確な結果をうることが難しいという側面を持っている。

我々の症例10例のSDI法における薬剤の感受性I.I.では、CPAが検査できなかった4例を除いて、6例中4例が50%を示した。山上<sup>6)</sup>らの報告ではCCDPが他の薬剤に比べ、高感受性を示したとし、5-FUは有為差はなかったとしている。しかし、5-FUは固形癌の化学療法剤として広く使用され、現在ではCDDPとの併用が胃癌に対する標準的化学療法と考えられている。

そこで、5-FUの抗腫瘍効果予測を目的として、TSとDPDの免疫組織染色も行った。TSは5-FUの標的酵素であり、DNAの合成阻害作用に関わるkey enzymeである。in vitroの研究では、5-FUの耐性細胞には、TSの過剰発現や活性の亢進が認められることが報告されている<sup>7)</sup>。一方、腫瘍内のDPDの高発現も、5-FUに対する感受性に相関すると言われており<sup>8,9)</sup>、実際に臨床においても腫瘍のDPDが5-FUを中心とした化学療法の効果を規定することが確認されている<sup>10)</sup>。今回のTSとDPDの陽性例は、それぞれ4例と1例であり、感受性試験の結果との関連は明らかではなかった。一方、5-FU時間依存性の薬剤では、ある程度血中濃度が高くないとその効果は判定できない欠点を有することから、多剤によるSDI法による感受性試験の考慮する必要があると考えられた。

また、癌の悪性度、予後を予知するP53、erbB2とも比較したが、抗癌剤感受性試験の結果と生存日数との関連は症例数が少ないため明らかにできなかった。しかしながら比較的予後が悪いといわれているp53陽性例にも生存日数が比較的長い症例がみられた。

近年、分子生物学の進歩により転移の有無や予後の診断が可能となっている。MTTを用いたSDI法の有用性を確立するために、これらの新しい技術で得られた結果も加えて比較検討することが重要である。

## 文 献

- 1) 近藤達平, 市橋秀仁, 今村達雄, 他: 制癌剤適応判定法について, 癌の臨床 10: 17-21, 1964.
- 2) Monsmann T: Rapid colprimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55-63, 1983.
- 3) 秦 温信, 松岡伸一, 安念一哉, 他: 癌治療における抗癌剤感受性試験の応用に関する研究—とくに乳癌における臨床応用について—, 社会保険医学雑誌 40: 74-79, 2000.
- 4) 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) 検査一, 臨床病理 38:14-18, 1990.
- 5) 官澤文彦: HTC 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) 抗癌剤感受性テストの基礎と臨床 - Human tumor clonogenic assay -: HTCA を中心にして. 末柝恵一, 西條長宏監修, 協和企画通信, 1985, 39-52.
- 6) 山上祐機, 谷村 弘: 抗癌剤感受性試験とその応用について - 純化腫瘍細胞による抗癌剤感受性試験を応用した消化器癌化学療法, Human cell: 8, 185-188, 1995.
- 7) Etienne MC, et al: Response to fluorouracil therapy in cancer patients; The role up tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity, J Clin Oncol. 13: 1663-1670, 1995.
- 8) Spears CP, Gustavsson, Mitchell MS, et al: Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumors and normal liver of patients given intravenous 5-FU. cancer Res 44: 4144-4150, 1981.
- 9) Peters GJ, et al: Time course of inhibition of thymidylate synthase in patients treated with fluorouracil and leucovorin. Semin Oncol 19:26-35, 1992.
- 10) Salonga D, et al: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have a low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase, Clin cancer Res 6:1322-1327, 2000.

## **Evaluation of antitumor drugs using the in vitro chemosensitivity test in the cancer therapy : The 2nd report**

Tomoko SASAKI, Toshiyuki YASUTANI, Shuji TAKAHASHI

Department of Clinical Laboratory, Sapporo Social Insurance General Hospital

Nobuhisa NAKAJIMA, Sinichi MATUOKA, Yoshinobu HATA,

Department of Surgery, Sapporo Social Insurance General Hospital

We studied sensitivity of cancer cells from patients with various cancer tissues to anticancer agents using succinate dehydrogenase inhibition (SDI) test. In the present study, we report a study using stomach cancer tissue from patients with stage VI of gastric cancer. We also immunohistochemically studied the expression of p53, erbB2, thymidylate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase in these tissue. There was no significant correlation between the results of SDI tests and the prognosis of the patients most likely due to a limited number of the cases. Although there are reports suggesting that expression of mutant p53 in the cancer cells may be associated with poor sensitivity to anticancer agents, a few cases showed relatively long survival despite of the expression of p53 in the tissue in the present study.