

1. 研究課題名：生体等価培養法を用いた制ガン剤薬効評価に関する研究。

— 熱可逆性ハイドロゲルを用いた抗癌剤感受性試験の臨床効果予測性 —

2. 研究機関：聖マリアンナ医科大学 第1外科

3. 研究者：窪田 倭，森 有一

4. 研究協力者：月川 賢、松岡博光

5. 研究期間：平成7年4月～平成12年3月

6. 要約

我々が開発した熱可逆性ハイドロゲル (Thermo-reversible Gelation Polymer; TGP) を用いた新しい三次元抗癌剤感受性試験による大腸癌組織の抗癌剤感受性判定結果と臨床効果を対比し、効果予測性について検討した。抗癌剤感受性試験は当科で開発した TGP 法で行った。判定薬剤には ADM, CDDP, MMC, 5-FU を用いた。本感受性試験を施行した大腸癌 stage 症例 11 例のうち、他病死、無治療の症例を除いた 6 例を対象とした。本感受性試験による感受性判定可能率は 11 例中 10 例 (90.9%) であった。術後、抗癌剤治療した 6 例の内、4 種の抗癌剤のいずれかに感受性を示したのが 3 例、何にも感受性を示さなかったのが 3 例であった。感受性ありの群は、PR: 2 例、NC: 1 例、であった。これに対して、感受性なし群では、NC: 1 例、PD: 2 例となり、奏効率 0% であった。本感受性試験による真陽性率は 2/3 (66.7%)、真陰性率は 3/3 (100%) となった。観察期間が短い、感受性あり群は 3 例とも生存、感受性なし群は 2 例の癌死例がみられた。本感受性試験は、治療効果予測性に優れた方法であることが確認された。

7. 研究目的

抗癌剤感受性試験には検査対象となる検体により、分離癌細胞を用いる方法と癌組織片を用いる方法とに大別される。前者は癌組織から癌細胞を分離する過程で蛋白分解酵素を使用するため、分離された癌細胞は傷害された状態にある。そこに細胞毒性のある抗癌剤を接触させるため、結果が過大評価される欠点を有している。その他、純度の高い癌細胞を得なければ信頼度が落ちる欠点も指摘されている。従って、現在では直接癌細胞を採取できる腹水、胸水貯留患者に限定されている。一方、癌組織片を用いる histoculture drug response assay (HDRA 法) は一個一個の組織片をコラーゲンゲル上に静置するという煩雑性に加えて、抗癌剤接触後の細胞活性 (viability) 測定時に組織片をコラーゲンゲルより回収するため、コラゲナーゼ等の分解酵素を必要とし、細胞に障害を与える欠点を有している。

熱可逆性ハイドロゲルは転移温度より低い温度では可逆的にゾル状態になるので、細胞や組織片に損傷を与えることなく容易に混入、回収が出来る。一方、転移温度より高い温度ではゲル状態になるので、細胞や組織片は生体内と類似の三次元構造の中で培養できる大きな利点がある。そこで我々は培養用基材にこの TGP を用いることにより、従来法の致命的な欠点を解消できるのではないかと推定し、1) 手術時摘出された担癌臓器からの癌組織の TGP 内での初代培養の可能性、2) TGP 内初代癌組織の抗癌剤感受性試験の可能性、3) 抗癌剤感受性試験結果の臨床応用とその相関性を検討した

8. 方法及び材料

(1) TGP と培養液の作成

TGP は吉岡らの方法によって作成した。この粉末に RPMI 1640 (Life Technologies. N.Y. USA) を加え 4 下で 24 時間攪拌溶解し、最終濃度 5.5% (wt/wt) に調整した。さらに 20% fetal calf serum (FCS, Dainippon pharmaceutical Co.Ltd.Australia), penicillin (10000unit/ml)/streptomycin (100 μ g/ml) (Life Technologies. N.Y. USA) L-glutamine 2mM (Life Technologies. N.Y. USA), amphotericin B (ブリストルマイヤーズスクイブ株式会社、東京) 50 μ g/ml, insulin (Sigma chemical Co., St.Louis, MO, USA) 5 μ g/ml を加えて培養液とた。

(2) 症例

1998年6月から1999年7月までに本感受性試験を施行した大腸癌 stage 原発巣手術症例 11 例のうち、他病死、無治療の症例を除いた 6 症例を対象とした。評か判定病変は、肝 6 例、肺 1 例、であった。治療は 5-FU の肝持続動注療法 5 例、全身投与 1 例であった。

(3) 検体採取と組織片の作成

手術より切除された検体を無菌生理食塩水 2000ml でよく洗浄したあと、癌部と正常粘膜を 5mm 角に採取した。抗生剤入り Hanks 液 (Hanks' balanced salt solution; HBSS) (Gibco, Gaithersburg, MD) に 1 時間接触後、壊死組織や血液成分を可能な限り除去し、反復洗浄した。その後組織細切器 (McIlwain Tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. LTD.)) を用い癌組織を 0.5mm ~ 1.0mm 厚に細切した。予め 37 に加温したホットプレート上で、24well プレート (flat bottom multiwell : tissue culture plate (FALCON, Becton Dickinson & Company)) に冷却 (ゾル状態) TGP を 200 μ l/well 注入すると直ちにゲル化し、細切した組織を 1 ~ 2 個包埋した。

(4) 抗癌剤感受性試験

実際の操作手順を Fig. 1 に示す。組織片を包埋した状態で、培養液を 300 μ l/well 添加し、抗癌剤感受性試験用プレートとした。4 種の抗癌剤、adriamycin (ADM) (協和発酵工業株式会社、東京), cisplatin (CDDP) (ブリストルマイヤーズスクイブ株式会社、東京), mitomycin C (MMC) (協和発酵工業株式会社、東京), 5-fluorouracil (5FU) (協和発酵工業株式会社、東京) をそれぞれ添加し、24 時間接触させた。各抗癌剤は最終濃度が ADM; 5.0, 1.0, 0.5, 0.1 μ g/ml, CDDP; 50, 10, 5.0, 1.0 μ g/ml, MMC; 8.0, 4.0, 1.0, 0.4 μ g/ml, 5-FU; 100, 50, 10, 5.0 μ g/ml となるように調整して用いた。24 時間接触後、組織の viability を測定した。

組織の viability の測定は、水溶性の Formazann を形成する WST-8: (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) (株式会社同仁化学研究所、熊本) を各 well に 50 μ l 添加し、10 時間反応させた。

その後 4 に 1 時間保冷し，均一な水溶液の状態にした。Formazann 水溶液を 96well プレートに 200 μ l ずつ分注し，マイクロプレート用比色計（Labsystems Multiscan MS（大日本製薬株式会社））を用いて 450nm（参照波長 620nm）で吸光度を測定した。一方組織片の蛋白濃度測定は BCA 法による BCA Protein Assay Kit を使用して行った。BCA 法による蛋白濃度の測定は，BCA 試薬を各組織に 200 μ l 添加して 37 $^{\circ}$ C，30 分反応させた後，波長 570nm で吸光度を測定した。

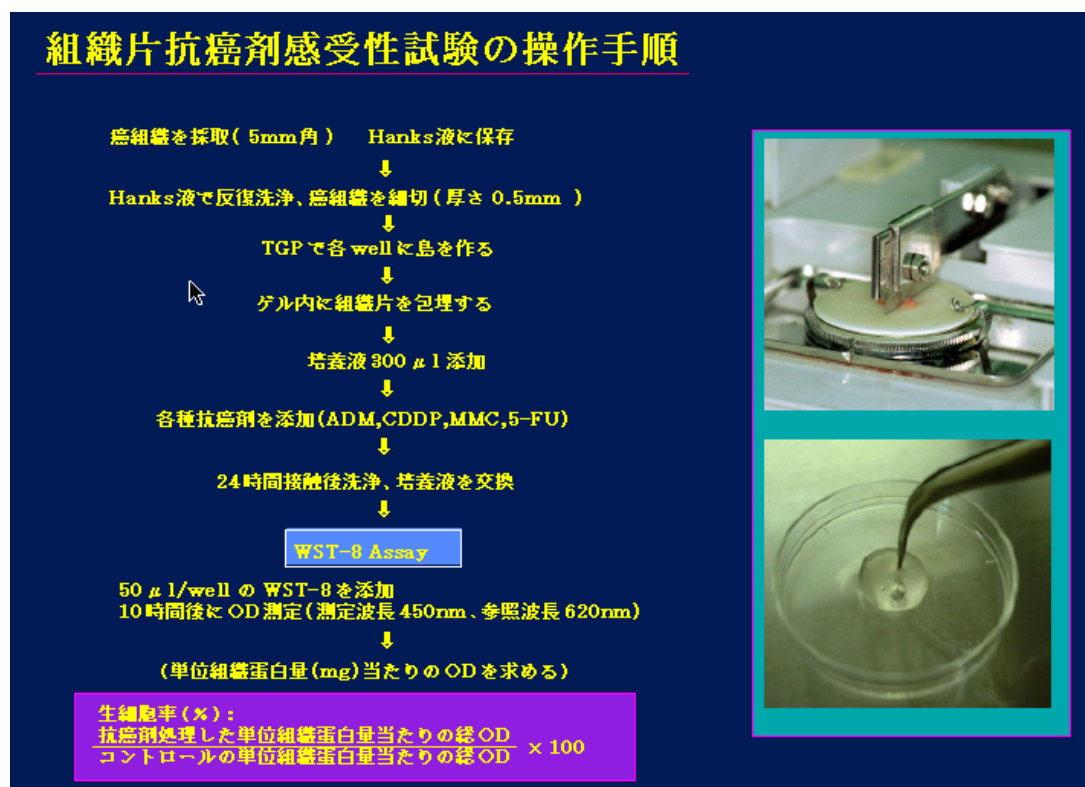


Fig. 1：抗癌剤感受性試験操作手順

組織の viability は組織蛋白量当たりの WST-8 の吸光度で表した。組織の生存率を，組織生存率(%) - (抗癌剤処理した単位組織蛋白量当たりの OD(optical density)/コントロールの単位組織蛋白量当たりの OD) × 100 で求め，各濃度における生存率をプロットし濃度依存曲線を求めた。得られたグラフから各薬剤の IC50 (inhibition concentration; 50%抑制濃度) を算出した。各薬剤について得られた IC50 と最高血中濃度 (Peak Plasma Concentration; PPC) を比較し，IC50 < PPC の場合，感受性ありと判定した。

(5) 臨床効果予測性

臨床効果の評価には，日本癌治療学会の「固形がん化学療法の臨床効果判定基準」を用いて，PR 以上を有効とした。本法で効果ありと判定された抗癌剤が 1 薬剤でも投与されていて臨床効果が有効と判定された場合を「真陽性」，無効であった場合を「偽陽性」，本法で効果なしと判定された抗癌剤が投与されていて臨床効果が無効と判定された場合を「真陰

性」，有効と判定された場合を「偽陰性」とした。

投与薬剤の選択は informed consent の上患者の決定に従った。4 剤とも無効と判定され、患者が投薬を希望した場合は標準的治療薬を投与した。

9. 結果

本感受性試験による感受性判定可能率は 11 例中 10 例 (90.9%) であった。いずれかの薬剤に感受性を示したのは 11 例中 6 例 (54.5%) で、各薬剤に対する感受性は、ADM；4 例 (36.4%)，CDDP；2 例 (18.2%)，MMC；3 例 (27.3%)，5-FU；4 例 (36.4%) であった。術後抗癌剤治療した 6 例についてみると、4 種の抗癌剤のうちいずれかの薬剤に感受性を示したのが 3 例 (感受性あり群) あり、5-FU にも感受性を示した。何れの薬剤にも感受性を示さなかったのが 3 例 (感受性なし群) であった。感受性あり群 3 例の治療効果は、PR：2 例，NC：1 例，PD：2 例となり、奏効率 0% であった。本感受性試験による真陽性率は 2/3 (66.7%)，真陰性率は 3/3 (100%) となった。観察期間が (3 ~ 13 ヶ月) 短く、生存期間に統計学的有意差は認めないが、感受性あり群は 3 例とも生存、感受性なし群は 2 例の癌死例がみられない。(Fig. 2)

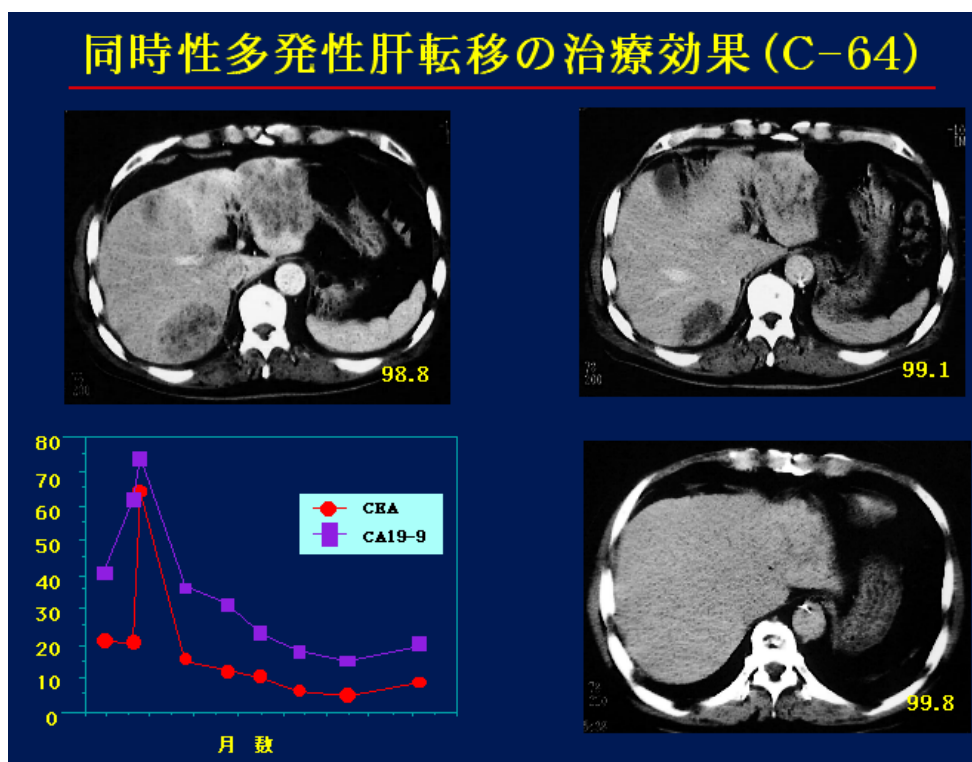


Fig. 2 : 治療効果

10. 考察

消化器固形癌の抗癌剤に対する奏効率は 30 ~ 40 %，特に胃癌では 10 ~ 20 % と報告されている。従って、evidence based medicine に基づかずして、病名のみで盲目的に抗癌剤が投与されている現在、大半の患者は効果のない抗癌剤が投与されているのみならず、副

作用の強い薬剤を服用している。更に大半の薬剤が無効であるので膨大な無駄な医療費が使用されている。従って、手術により摘出された癌組織からその患者にもっとも適し、しかも副作用の少ない抗癌剤が選択できる抗癌剤感受性検査の実用化が切望されている。

抗癌剤感受性試験は、正確であること、すなわち臨床効果予測率が高いこと、操作が簡便であること、安価であること、等が重要である。臨床評価可能症例数は少ないが、本試験法の真陽性率は 66.7%、真陰性率は 100%、従って正診率は 83.4%と高値を示した。現在、繁用されている HRDA 法の真陽性率 50%、真陰性率 95%、正診率 81%に比して高値を得た。特に真陽性率が高値を得たのは HRDA 法では各種抗癌剤に至適 cut off 濃度を臨床的奏功率との相関性より設定したため、無効例（真陰性率）に比重がかかる。一方、著者らは 4 種類濃度を用いて IC50 を求め、この IC50 値が最高血中濃度以下の場合を有効と判定した。従って、有効判定が厳しく、しかも個々患者ごとに判定されるため、真陽性率が高値を示したものと思われる。

一方、簡便性については一連の操作が生理的温度差を利用することにより施行される。さらに組織片の viability 判定に発色基質を MTT から水溶性の tetrazolium 塩を用いる WST-8 法に変更した。すなわち、量色反応を停止するために 4℃、1 時間静置する。この際 TGP はゾル化し、tetrazolium 塩が溶出し直ちに吸光度が測定でき、余分な操作がいっさい不要である。また、従来の単位組織重量当たりの吸光度から、単位組織蛋白量当たりの吸光度で表すことにより、組織片の重量測定が不要となった。これらの簡便化により、4 種類の抗癌剤の 4 種濃度が測定でき、判定結果がより精度の高いものになった。

11. 今後の展開

- 1) 大腸癌以外に胃癌，肝臓癌，膵臓癌など適応拡大する。
- 2) 現在 4 種類の抗癌剤の感受性を施行しているのを 7 種類にする。
- 3) 本法のキット化を計る。

12. 参考文献

なし

13. 研究業績

13-1. 原著論文

松岡博光；熱可逆性ハイドロゲル（TGP）を用いた三次元培養を利用した抗癌剤感受性試験。聖マリアンナ医科大学雑誌（印刷中）

13-2. 総説など

窪田 倭，吉岡 浩，森 有一，松岡博光，月川 賢；生体材料の最近の進歩；温度感応性高分子化合物の原理と応用。外科 61，119 - 122，1999

13-3. 国際学会発表

なし

13-4. 国内学会発表

「平成11年1月以降の発表」

日本消化器外科学会

温度感応性ポリマー (TGP) を用いた大腸癌組織の抗癌剤感受性試験

月川 賢, 窪田 倭, 松岡博光, 田中一行, 松崎弘明, 猪飼英隆, 花井 彰, 及川 博,
小笹貴夫, 赤石 治, 山村卓也, 山口 晋

制癌剤適応研究会

温度感応性ポリマー (TGP) を用いた癌組織の抗癌剤感受性試験

月川 賢, 窪田 倭, 松岡博光, 戸部直孝, 田中一行, 松崎弘明, 猪飼英隆, 及川 博,
小笹貴夫, 赤石 治, 山村卓也, 山口 晋

日本外科学会

蛋白定量を利用した癌組織に対する抗癌剤感受性試験

松岡博光, 月川 賢, 戸部直孝, 田中一行, 松崎弘明, 花井 彰, 及川 博, 瀬尾圭亮,
小笹貴夫, 赤石 治, 山村卓也, 窪田倭, 山口 晋

日本組織培養学会

常温でゾル-ゲル転移する高分子化合物を用いた三次元ゲル内大腸癌組織、正常組織の培養

内野まゆみ, 月川 賢, 松岡博光, 赤石 治, 窪田 倭, 山口 晋

日本消化器外科学会

常温でゾル-ゲル転移する高分子化合物を用いた大腸癌および肝転移組織の抗癌剤感受性試験

松岡博光, 月川 賢, 戸部直孝, 田中一行, 猪飼英隆, 及川 博, 赤石 治, 山村卓也,
窪田 倭, 山口 晋

聖マリアンナ医科大学医学会

熱可逆性ハイドロゲル (TGP) を培養用基材に用いた新しい固形癌の抗癌剤感受性試験

松岡博光, 月川 賢, 戸部直孝, 田中一行, 猪飼英隆, 及川 博, 小笹貴夫, 赤石 治,
山村卓也, 窪田 倭, 山口 晋

日本癌学会

常温でゾル-ゲル転移する高分子化合物を用いた三次元ゲル内固形癌 (転移巣を含む) 組織片、
正常組織片の培養

松岡博光, 月川 賢, 及川 博, 山村卓也, 窪田 倭, 山口 晋

日本癌学会

合理的な抗癌剤の使用は癌性腹水貯留患者の症状緩和に有用である

長嶋 隆, 月川 賢, 松岡博光, 窪田 倭, 山口 晋

日本癌治療学会

ゾル-ゲル熱可逆性ハイドロゲル (TGP) を培養用基材に用いた新しい固形癌の抗癌剤感受性
試験

月川 賢, 窪田 倭, 松岡博光, 陣内祐二, 瀬田 真一, 倉橋優子, 猪飼英隆, 及川
博, 小笹貴夫, 赤石 治, 長嶋 隆, 山村卓也, 山口 晋

日本癌治療学会

癌治療における完治断念後の治療と緩和ケアの問題点

癌性腹水貯留症状の緩和は合理的な抗癌剤投与によって達成可能である。

長嶋 隆、月川 賢、松岡博光、陣内佑二、倉橋優子、瀬田真一、窪田 倭、山口 晋

日本大腸肛門病学会

熱可逆性ハイドロゲル (TGP)を培養用基材に用いた新しい固形癌の抗癌剤感受性試験

松岡博光、月川 賢、田中一行、猪飼英隆、花井 彰、及川 博、小笹 貴夫、赤石 治、山村卓也、窪田 倭、山口 晋

日本消化器病学会

熱可逆性ハイドロゲル (TGP)を培養用基材に用いた新しい固形癌の抗癌剤感受性試験

月川 賢，窪田 倭，松岡 博光，陣内祐二，瀬田 真一，倉橋優子，猪飼英隆，及川 博，小笹貴夫，赤石 治，長嶋 隆，山村卓也，山口 晋

13-5 . 新聞など なし

13-6 . 特許申請 なし

14 .

(1) Clinical application of chemosensitivity test using thermo-reversible gelation polymer for colo-rectal cancer patients.

(2) Department of School of Medicine.

(3) Sunao Kubota, Yuichi Mori

(4) Satoshi Tsukikawa, Hiromitsu Matsuoka.

(5) 1995 – 2000

(6) Abstract

Chemosensitivity test with using thermogeneration polymer (TGP) as a culture medium was performed on the fresh surgical specimens from patients with Stage colorectal cancer. The specimens were cut in pieces, embedded into sol-phase of TGP at 10 and incubated in gel-phase of TGP at 37 with medium containig mitomycin C (MMC), 5-fluorouracil (5-FU), adriamycin (ADM), and cisplatin (CDDP) for 24 hours. The viability of the cancer cells was measured with WST-8. Efficacy rates were 27.3% for MMC, 36.4% for 5-FU, 36.4% for ADM and 18.2% for CDDP. Sixty seven % true-positive rate and 100% true-negative rate were obtained by our TGP method. Although there was no statistical significance in survival times between the high sensitivity group and low sensitivity group, because of short follow up times, 3 patients with having high sensitivity to drugs are alive, but 2 patients with having low sensitivity to drug were died within 12 months.

Our method has higher evaluability and clinical correlativity in comparison with histoculture drug response assay. Therefor, this method seems to be promissing in clinical practice because of simplicity and rapidity.