

【原著・臨床】

食道癌治療におけるコラーゲンゲルドロップ包埋培養による抗癌薬感受性試験の有用性

花谷 勇治¹⁾・小林 昶²⁾・小平 進¹⁾・宜保 淳一¹⁾・藤田 正信¹⁾・戸枝 弘之¹⁾¹⁾帝京大学医学部第1外科*²⁾新田ゼラチン株式会社研究開発部

(平成12年10月25日受付・平成12年11月1日受理)

食道癌19症例(原発巣13検体, 転移巣12検体, 生検組織13検体)を対象にコラーゲンゲルドロップ包埋培養による抗癌薬感受性試験(CD-DST)を行った。CD-DSTの培養成功率は, 原発巣85%, 転移巣92%, 生検組織69%であった。7日間培養における食道癌の腫瘍増殖率(7.33±8.43)は胃癌のそれ(2.68±2.95)に比べ有意に高値を示した。原発巣の薬剤感受性は, cisplatin 45%, 5-fluorouracil 45%, mitomycin C 40%, adriamycin 20%, etoposide 18%であった。食道癌では多剤耐性の腫瘍の比率は27%であり, 胃癌のそれ(67%)に比べ低率であった。原発巣の薬剤感受性(T/C比)と転移巣のそれとの間には有意の相関を認めた。5-fluorouracilの抗腫瘍効果はその接触条件によって差を認めなかった。CD-DSTにより, 計測可能病変を有する4例中3例の臨床効果を予測することが可能であった。

Key words: 抗癌薬感受性試験, 食道癌, コラーゲン, CD-DST

食道癌は早期発見が困難なため, 手術のみで治療する症例は少なく, 放射線療法や化学療法のはたす役割が大きい。放射線療法はその効果が照射範囲内に限られるため, 遠隔リンパ節や臓器転移を有する症例には化学療法が第一選択と考えられる。一般的に消化器癌に対する化学療法の効果はあまり良好とはいえないが, 食道癌に関してはcisplatinを中心とする併用療法の効果が高い¹⁾と報告されている。しかし, これらの併用化学療法は副作用も強く, 腫瘍が感受性を示さない場合には, 臨床効果が期待できないだけでなく, 全身状態の悪化を招く危険性が高い。腫瘍の薬剤感受性が判明すれば, 低感受性の腫瘍には無効な薬剤の投与を避けることができるし, 高感受性の腫瘍には副作用を覚悟で積極的に治療を行うことができる。

抗癌薬感受性試験の必要性は古くから認識されており, 多くの方法が開発されてきた²⁻⁵⁾。しかし, 評価可能性が低い, 手技が複雑である, 時間がかかる, 費用が高い, 結果の信頼性に問題があるなどの理由により広く普及するに至った方法はない。これらの問題点をクリアーできる新しい方法として, 小林ら⁶⁾はコラーゲンゲルドロップ包埋培養による抗癌薬感受性試験(CD-DST)を開発した。本法は細胞外基質の1つであるコラーゲンを用いた三次元培養であるため, 癌細胞が生体内に近い形で増殖でき, ①培養成功率が80%前後と高い, ②少ない細胞数でも試験が可能である(5×10³cells/drop), ③無血清培養なので線維芽細胞の増殖を抑制できる, ④生理的な薬剤濃度で感受性が判定できる, ⑤画像解析により線維芽細胞を除外し, 癌細胞のみの感受性を判定できる, などの特長をもつとされている。

われわれはこれまでに胃癌を対象にCD-DSTを行い, その臨床応用の可能性を報告した⁷⁾。今回は食道癌を対象にCD-DSTの臨床応用の可能性を検討したので報告する。

I. 対象と方法

当科に入院した食道癌19例を対象とした。性別は男性18例, 女性1例, 年齢は52~76歳(中央値65歳)であった。癌の進行度はstage I 2例, stage III 6例, stage IV 11例であった。組織型は扁平上皮癌では低分化型4例, 中分化型10例, 高分化型4例, その他癌肉腫1例であった。感受性試験に用いた材料は, 原発巣13検体, 転移巣12検体(リンパ節10, 肺転移1, 肝転移1), 生検組織13検体であった。原発巣検体は切除標本の粘膜側から5~10 mm角の組織を採取した。生検組織は切除標本から内視鏡用生検鉗子により7個の組織片を採取した。

CD-DSTは小林ら⁶⁾の方法に準じて実施した。無菌的に採取した組織をカミソリでペースト状になるまで細切し, 細胞分散用酵素液(EZ[®], 新田ゼラチン(株), 大阪)で37℃, 2時間処理し, 径30ミクロン以下の腫瘍細胞塊浮遊液とした。これを底面にコラーゲンゲルをコートした培養フラスコ(CGフラスコ[®], 新田ゼラチン(株))に注入し, CO₂インキュベーター中で37℃, 24時間予備培養した。コラーゲンゲル層に付着したviabilityの高い腫瘍細胞を回収し, 最終濃度が1×10⁶cells/mLとなるようにtype Iコラーゲン溶液(Cellmatrix Type CD[®], 新田ゼラチン(株))中に懸濁させた。この懸濁液を6ウェルマイクロプレートに30 μLずつ滴下し(3ドロ

ップ/ウェル), CO₂ インキュベーター中で37°C, 1時間インキュベートしてコラーゲンをゲル化させた。コラーゲンがゲル化したら, 各ウェルに培養液(胎児牛血清を10%含む)を添加し, CO₂ インキュベーター中で37°C, 24時間インキュベートした。

抗癌薬は cisplatin (CDDP), 5-fluorouracil (5-FU), mitomycin C (MMC), adriamycin (ADM), etoposide (VP-16) の5薬剤について検討した。各薬剤を最高血中濃度の1/10に相当する濃度(CDDP: 0.2 µg/mL, 5-FU: 1.0 µg/mL, MMC: 0.03 µg/mL, ADM: 0.02 µg/mL, VP-16: 1.0 µg/mL)になるように培養液中に添加し, 24時間接触させた。なお, 5-FUに関しては, このほかに高濃度短時間接触(10 µg/mL, 2.4時間)と低濃度長時間接触(0.2 µg/mL, 120時間)を行った。抗癌薬を含んだ培養液を除去して2回洗浄し, 無血清培養液(PCM-2®, 新田ゼラチン(株))により7日間(5-FU長時間培養の場合には3日間)培養した。培養終了時に, ニュートラルレッドを最終濃度が50 µg/mLとなるように添加し, コラーゲンゲルドロップ中の腫瘍細胞コロニーを2時間染色した。なお, 60 mm径のシャーレに作成しておいたコラーゲンゲルドロップを抗癌薬添加の直前にニュートラルレッドで染色した(0 time)。染色したコラーゲンゲルドロップを10%中性ホルマリン溶液で40分間固定し, 水洗後風乾した。0 time, 対照群, 抗癌薬接触群の腫瘍細胞コロニーの体積を画像解析装置を用いて計測した。抗癌薬接触群と対照群の腫瘍細胞コロニー体積比(T/C)が50%以下の場合には感受性ありと判定した。対照群と0 timeの腫瘍細胞コロニー体積比(腫瘍増殖率: growth rate)を算出し, これが0.8未満の場合には, 対照群の腫瘍細胞コロニー体積の値にかかわらず培養不成功とみなした(low growth rate)。

統計学的検定には χ^2 検定, t検定およびpaired t検定を用い, P<0.05を有意差ありとした。

II. 成 績

1. 培養成功率

CD-DSTの培養成功率は, 原発巣では85%(11/13), 転移巣では92%(11/12), 生検組織では69%(9/13)であった。培養が不成功となった理由は, 増殖不良(growth rateが0.8未満)が6件, 細菌汚染が1件で

あった。増殖不良6件の内訳は原発巣2件, 転移巣1件, 生検組織3件であった。腫瘍増殖率は, 原発巣7.33±8.43, 転移巣4.07±4.37, 生検組織7.13±11.77であった。

2. 食道癌の薬剤感受性

食道癌の薬剤感受性試験成績をTable 1に示した。CDDPとMMCに対しては, 検査材料を問わず, 40%以上の高い陽性率を示した。この他に, 原発巣では5-FUに, 転移巣ではVP-16に対して, 高い陽性率を示した。一方, ADMに対する感受性陽性率はいずれの材料でも20%以下にとどまっていた。感受性陽性と判定された薬剤数をTable 2に示した。検討した5薬剤のすべてに感受性を示したのは原発巣, 転移巣各1検体に過ぎなかった。逆にいずれの薬剤にも感受性を示さなかった検体が原発巣では27%, 転移巣では36%を占めた。

同一症例で原発巣と転移巣の薬剤感受性が得られた症例について, 両者の成績(T/C比)を比較したところ, CDDP, ADM, VP-16では両者間に有意の正の相関関係が得られた(Fig. 1)。原発巣と生検組織の薬剤感受性成績の対応が得られた症例は5例に過ぎず, 両者間に有意の相関は得られなかった。なお, 腫瘍増殖率と薬剤感受性成績との間には有意の相関関係を認めなかった。

5-FUの接触条件による感受性試験成績をTable 3に示した。原発巣, 転移巣のいずれにおいても, 5-FUの接触条件によって明らかな成績の差を認めなかった。

3. 臨床成績との相関

評価可能病変を有する4症例に対し化学療法を行い(4例とも放射線療法を併用した), その臨床効果とCD-DSTの成績を対比した(Table 4)。CD-DSTで有効と判定された薬剤を投与し, 臨床的にも有効であった症例(true positive)が2例, CD-DSTで感受性なしと判定された薬剤を投与し, 臨床的にも有効であった症例(false negative)と無効であった症例(true negative)が各1例であり, 4例中3例で感受性試験成績と臨床効果が一致した。

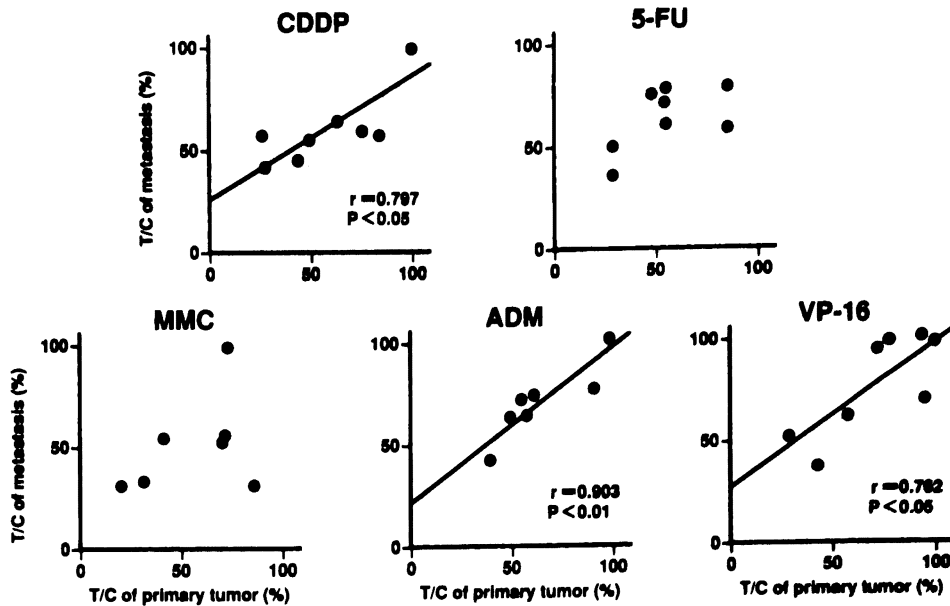
III. 考 察

一般にヒト癌細胞の初代培養は困難であり, 対照群の腫瘍細胞の増殖状況にかかわらず, 計測可能であれば試

Table 1. *In vitro* susceptibility of esophageal cancer to 5 anticancer agents

Drug \ Material	CDDP	5-FU	MMC	ADM	VP-16
Primary tumor	5/11 (45%)	5/11 (45%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	2/11 (18%)
Metastatic tumor	5/11 (45%)	2/11 (18%)	6/10 (60%)	2/10 (20%)	4/11 (36%)
Biopsy specimen	4/9	2/9	3/9	1/8	1/8

CDDP: cisplatin, 5-FU: 5-fluorouracil, MMC: mitomycin C, ADM: adriamycin, VP-16: etoposide



CDDP: cisplatin, 5-FU: 5-fluorouracil, MMC: mitomycin C, ADM: adriamycin, VP-16: etoposide.

Fig. 1. Correlation between T/C ratios of primary and metastatic tumors. With cisplatin, adriamycin, and etoposide, there were significant correlations between the T/C ratios of primary and metastatic tumors.

Table 2. Number of effective drugs *in vitro*

Material	Number					
	0	1	2	3	4	5
Primary tumor	3	2	4	1	0	1
Metastatic tumor	4	1	2	3	0	1
Biopsy specimen	4	1	2	2	0	0

Table 3. Effect of 5-fluorouracil by exposure condition

Material	Exposure	10 µg/mL	1.0 µg/mL	0.2 µg/mL
		2.4 h	24 h	120 h
Primary tumor (effective rate)		59.0 ± 19.8 (4/8)	56.4 ± 20.7 (5/11)	55.6 ± 16.7 (4/8)
Metastatic tumor (effective rate)		60.7 ± 35.4 (3/7)	56.7 ± 22.1 (2/11)	68.9 ± 18.0 (1/7)

Figures in upper row indicate T/C ratio (%)

Table 4. Chemosensitivity detected by CD-DST and clinical response

Case no.	Lesions	Effective drugs <i>in vitro</i>	Clinical therapy	Radiation	Response
8	Primary tumor Lung meta	CDDP, MMC	CDDP + MMC	+	CR PR
9	Lymphnode meta	No drug	CDDP + 5-FU	+	NC
10	Lymphnode meta	MMC	CDDP + 5-FU	+	PR
16	Lymphnode meta	CDDP, MMC, 5-FU	CDDP + 5-FU	+	PR

CD-DST: collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test

CDDP: cisplatin, MMC: mitomycin C, 5-FU: 5-fluorouracil

meta: metastasis, CR: complete response, PR: partial response, NC: no change

験を成立させ、感受性を判定していることが多い。しかし、対照群の腫瘍細胞が培養開始時よりも減少した場合には、抗癌薬（特に静細胞作用の薬剤）の効果が過小評価される可能性が高いと思われる。CD-DSTでは、対照群の腫瘍増殖率が0.8未満の場合には、計測が可能であったとしても培養不成功と判定している。これによって、試験の成功率は若干低下するが、試験成績の信頼性が高まると考えられる。

In vitro 抗癌薬感受性試験では、薬剤の接触条件が問題となる。多くの試験では、臨床と同等の有効率を確保するために、生理的濃度の20倍から30倍あるいは数百倍の高濃度を採用している。しかし、薬剤濃度が高い場合には、通常とは異なる作用機序で抗腫瘍活性を示す可能性があり、臨床との解離が危惧される。CD-DSTではコラーゲンゲルドロップの容積が小さく、培養液中に添加した抗癌薬が十分かつ速やかに腫瘍細胞に到達で

きるため、生理的薬剤濃度を用いた試験が可能で、通常の作用機序による薬剤の効果が判定可能と思われる。

癌細胞の初代培養では線維芽細胞の混入が問題となる。混入した線維芽細胞が増殖すると、癌細胞の増殖を抑制したり、薬剤の効果判定に影響を与える可能性がある。このため、不連続密度勾配遠沈法による癌細胞の純化⁶⁾や、軟寒天培養法⁹⁾による線維芽細胞の増殖抑制などの試みがなされている。CD-DSTでは無血清培地による培養で線維芽細胞の増殖を抑制できる。また、画像解析装置では癌細胞と線維芽細胞の区別が可能であり、画像処理によって線維芽細胞を除外し、腫瘍細胞コロニーのみを計測できるのが大きな利点である。

食道癌原発巣に対するCD-DSTの培養成功率は85%であり、乳癌(80%)、肺癌(89%)、胃癌(80%)の培養成功率と同等であった。食道癌における腫瘍増殖率は 7.33 ± 8.43 であり、胃癌のそれ(2.68 ± 2.95 , $n=24$)に比べ有意に高値であった($P < 0.05$)。腫瘍増殖率は1週間の培養における腫瘍体積の増加率を示すことから、腫瘍の悪性度を示す1つの指標になりうると思われる。

薬剤感受性試験成績をみると、食道癌はCDDPとMMCに対しては検査材料を問わず、高い感受性を示した。この他に、原発巣では5-FUに、転移巣ではVP-16に対し高い感受性を示した。臨床では、食道癌に対するCDDPを含む併用化学療法の有効率は40~60%と報告されており¹⁾、CD-DSTの成績はこれと矛盾しないと考えられた。MMCはわが国で胃癌に多用されているが、今回の成績からは、食道癌への有効性も期待できる薬剤であると考えられた。感受性陽性の薬剤数をみると、胃癌では67%の症例で感受性薬剤数が0であったのに対し、食道癌ではそれが27%にとどまっており、食道癌は胃癌に比べ抗がん剤に対する感受性が高いと考えられた。

5-FUは2つの作用機序を有し、低濃度持続接触では主としてDNA合成阻害を、高濃度短時間接触では主としてRNA機能障害を起こすことにより抗腫瘍効果を示すとされている。胃癌症例の検討では高濃度短時間接触($10 \mu\text{g/mL}$, 2.4時間)および標準接触($1.0 \mu\text{g/mL}$, 24時間)が低濃度長時間接触($0.2 \mu\text{g/mL}$, 120時間)に比べ有意に良好な成績を示し、5-FUの間歇投与の有効性が示唆された⁷⁾。今回検討した食道癌症例では、接触条件によって5-FUの抗腫瘍効果に差を認めず、いずれの投与方法を採用しても良いと考えられた。

通常、抗がん剤感受性試験は切除された原発巣の組織を用いて実施されており、この成績にもとづいて転移巣や再発巣の治療を行っている。しかし、原発巣と転移巣では、癌細胞の生物学的性格が異なる可能性が指摘されている。以前に検討した胃癌症例では転移巣は原発巣に比べ薬剤感受性が低い傾向が認められ⁷⁾、臨床的に問題に

なると考えられた。今回検討した食道癌症例では、原発巣と転移巣の薬剤感受性試験成績には相関関係が認められ、いずれか一方の成績から他方の感受性を推定してよいと考えられた。

CD-DSTでは少量のサンプルでも検査できるのが特長の1つであり、生検組織でも69%の検体で培養が成功し、薬剤感受性を判定することができた。切除不能例に対する化学療法や、進行例に対する術前化学療法を行うにあたり、生検組織で薬剤感受性が判明することはきわめて有用と思われる。今回の検討では切除標本から内視鏡用の生検針子で確実に癌の組織片を7個採取して検体としたが、食道内視鏡検査でも良好なサンプルが得られれば、この程度の成功率が期待できるであろう。

抗がん剤感受性試験の臨床的有用性については多くの報告がある。Kubotaらはhistoculture drug response assay (HDRA)を胃癌の術後補助化学療法に応用し、感受性陽性群は感受性陰性群に比べ術後生存率が有意に高率であったと報告している¹⁰⁾。Von Hoffはcolony assayに関する報告を集計し、2,300例中84%で臨床成績との一致が得られたと報告している。特に真陰性率は91%と高く、無効な薬剤の投与が避けられるとしている¹¹⁾。食道癌は症例数が多くないし、手術侵襲が大きく、術後合併症の発生率も高いため、感受性試験成績が得られても、それを臨床応用できない場合が少なくない。また、放射線照射を併用することが多く、効果判定に影響を与える可能性がある。われわれの検討でも、評価可能病変を有し、CD-DSTと臨床効果の対比ができた症例は4例に過ぎなかった。食道癌に対する抗がん剤感受性試験の有用性判定のための症例を確保するためには、多施設で共同研究を行ったり、術前化学療法施行例を対象にするなどの工夫が必要と思われる。

文 献

- 1) Enzinger P C, Ilson D H, Kelsen D P: Chemotherapy in esophageal cancer. *Semin Oncol* 26 (S-15): 12~20, 1999
- 2) Kondo T, Imamura T, Ichihashi H: *In vitro* test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Jpn J Cancer Res* 57: 113~121, 1966
- 3) Salmon S E, Hamburger A W, Sohnlen B, et al.: Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer agents. *N Engl J Med* 298: 1321~1327, 1978
- 4) Mosmann T: Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55~63, 1983
- 5) Hoffman R M, Connors K M, Meerson-Monosov A Z, et al.: A general native-state method for determination of proliferation capacity of human normal and tumor tissues *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2013~2017, 1989
- 6) Kobayashi H, Tanisaka K, Doi O, et al.: An *in vitro*

- chemosensitivity test for solid human tumors using collagen gel droplet embedded cultures. *Int J Oncol* 11: 449~455, 1997
- 7) Hanatani Y, Kobayashi H, Kodaira S, et al.: An *in vitro* chemosensitivity test for gastric cancer using collagen gel droplet embedded culture. *Oncol Rep* 7: 1027~1033, 2000
- 8) Yamaue H, Tanimura H, Noguchi K, et al.: Chemosensitivity testing of fresh human gastric cancer with highly purified tumor cells using the MTT assay. *Br J Cancer* 66: 794~799, 1992
- 9) Tanigawa N, Kern D H, Hikasa Y, et al.: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* 42: 2159~2164, 1982
- 10) Kubota T, Sasano N, Abe O, et al.: Potential of the histoculture drug-response assay to contribute to cancer patient survival. *Clin Cancer Res* 1: 1537~1543, 1995
- 11) Von Hoff D D: Human tumor cloning assays: applications in clinical oncology and new anti-neoplastic agent development. *Cancer Metast Rev* 7: 357~371, 1988

A clinical application of collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test to esophageal cancer

Yuji Hanatani¹⁾, Hisayuki Kobayashi²⁾, Susumu Kodaira¹⁾, Jun-ichi Gibo¹⁾,
Masanobu Fujita¹⁾ and Hiroyuki Toeda¹⁾

¹⁾First Department of Surgery, Teikyo University School of Medicine,
2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8605, Japan

²⁾Research Laboratory, Nitta Gelatin Inc.

The collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) was applied to 19 patients with esophageal cancer (13 primary tumors, 12 metastatic tumors, and 13 biopsy specimens). Evaluable rates by CD-DST were 85% for primary tumors, 92% for metastatic tumors, and 69% for biopsy specimens. Growth rates of esophageal cancer for 7 days of culture were significantly higher than those of gastric cancers (7.33 vs 2.68). Chemosensitivities of primary tumors were: cisplatin 45%, 5-fluorouracil 45%, mitomycin C 40%, adriamycin 20%, and etoposide 18%. The percentage of multidrug-resistant tumors in esophageal cancers was lower than in gastric cancers (27% vs 67%). There were significant correlations between chemosensitivities (T/C ratios) of primary tumors and those of metastatic tumors. There was no difference between the effects of 5-fluorouracil by exposure condition to the drug. In 3 of 4 patients who had measurable lesions, clinical responses to chemotherapy were predictable by CD-DST.