

原著

術後補助化学療法に向けた抗癌剤感受性試験(HDRA)の有用性および HDRAを行った膵癌組織でのプロファイリング

照井一史¹⁾ 川崎仁司²⁾ 細井一広¹⁾ 中川潤一¹⁾
板垣史郎¹⁾ 津山博匡¹⁾ 下山律子¹⁾ 袴田健一²⁾
早狩 誠^{1,3)}

抄録 約10種の腫瘍組織(10種)についてHDRA法による抗癌剤の感受性試験を行った。その結果、5-FUはすべての腫瘍組織に対し陽性を示し、CDDPも5-FUと同様に多くの腫瘍組織で陽性を示したが、抑制率はやや低下していた。

術前に5-FUが投与されていない食道癌群における感受性の抑制率は $71.9 \pm 11.6\%$ ($n = 6$)であり、術前に5-FUが投与された食道癌群の抑制率に有意な差は認められず、測定した症例では耐性が生じていない可能性が示唆された。その後S-1投与患者において、5-FUに感受性を示した群は、陰性群に比べ生存日数の延長が認められた。

膵癌組織での5-FUおよびGEMに対する感受性結果から、5-FUまたはS-1が膵癌への薬物療法で有用な薬剤である可能性が示唆された。

膵癌組織に対する質量分析によるプロファイリングを行った結果、5-FUに対する感受性が陰性の試料に出現が増加するシグナルが、5-FU無効例のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

弘前医学 65 : 173—181, 2014

キーワード : 抗癌剤感受性試験 ; HDRA法 ; 5-FU ; ペプチド性物質のプロファイリング。

ORIGINAL ARTICLE

THE USEFULNESS OF ANTICANCER DRUG SENSITIVITY TEST (HDRA) FOR THE ADJUVANT CHEMOTHERAPY AND PROFILING IN PANCREATIC CANCER TISSUE AFTER HDRA

Kazufumi Terui¹⁾, Keiji Kawasaki²⁾, Kazuhiro Hosoi¹⁾, Junichi Nakagawa¹⁾,
Shiro Itagaki¹⁾, Hiromasa Tsuyama¹⁾, Ritsuko Shimoyama¹⁾, Kenichi Hakamada²⁾,
and Makoto Hayakari^{1,3)}

Abstract We measured the sensitivity of anticancer drug for about 10 tumor tissues by using HDRA method. As a result, 5-FU showed sensitivity-positive for all tumor tissues. In addition to 5-FU, CDDP also showed similar sensitivity to many types of tumor tissues; however, the average inhibition rate by CDDP was lower than that by 5-FU.

The inhibition rate of the sensitivity in no neoadjuvant chemotherapy with 5-FU in esophageal cancer was $71.9 \pm 11.6\%$ ($n = 6$). No significant difference between control and neoadjuvant 5-FU therapy was observed in the inhibition rate. These indicated that no patient was chemotherapy-resistant by the neoadjuvant 5-FU therapy in this study. Among patients who received adjuvant chemotherapy with S-1 patients, those who were sensitive to 5-FU prolonged survival time, compared with those who were resistant to 5-FU chemotherapy.

Sensitivity to 5-FU and GEM in pancreatic cancer indicated the availability of either 5-FU or GEM in pancreatic cancer.

It was possibly suggested that in mass spectrometric analysis, increased signals were useful as markers of 5-FU-resistance in chemotherapy.

Hirosaki Med. J. 65 : 173—181, 2014

Key words: anticancer drug sensitivity; HDRA method; 5-FU; peptides profiling.

¹⁾ 弘前大学医学部附属病院 薬剤部

²⁾ 弘前大学医学部附属病院消化器外科学講座

³⁾ 弘前大学大学院医学研究科 薬剤学講座

別刷請求先 : 早狩 誠
平成25年12月19日受付
平成25年12月26日受理

¹⁾ Department of Pharmacy, Hirosaki University School of Medicine & Hospital

²⁾ Department of Gastroenterological Surgery Hirosaki University Graduate School of Medicine

³⁾ Department of Pharmaceutical Sciences, Hirosaki University Graduate School of Medicine

Correspondence: M. Hayakari

Received for publication, December 19, 2013

Accepted for publication, December 26, 2013

緒 言

がん薬物療法を行う目的は大きく3つに分けられる。一つは、手術後の再発予防としての術後補助化学療法である。もう一つは手術や放射線による局所療法では、その効果が十分ではないと考えられる進行がんや再発がんに対する延命を目的とした治療法である。また、術前化学療法は手術が困難である腫瘍を縮小させ、手術が適応可能とするために用いられる。しかしながら、抗がん剤は、がんの種類、部位及び個人の薬剤に対する感受性の差があるため、その効果は同じ薬剤であっても、個々の患者で効果が異なることが知られている。

一般にがん治療は、がんの診断、抗がん剤治療において患者には多大な経済的負担が強いられる。さらに抗がん剤は副作用の出現頻度も高く、そのために薬物療法を断念せざるを得ない場合も少なくない。副作用の予防を目的とした支持療法も積極的に行われているが、使用される薬剤も高価である。無効な抗がん剤が使用された場合には、患者はその副作用により苦しむ可能性が高く、無意味な経済的負担を強いられることとなる。従って、がん化学療法では副作用の軽減および患者の経済的負担の面も含め、適正な抗がん剤の選択は重要である。このような背景から、抗がん剤を投与する前にがん組織(細胞)に対する効果を調べ、より効果のある薬剤を選択する有力な手段である抗がん剤感受性試験が開発された。

抗がん剤感受性試験の基本的原理は、手術等により患者から採取したがん組織の一部を各種抗がん剤の存在する条件下で培養し、がん細胞の生存率(死亡率)を測定し、抗がん剤の効果の有無を判定する方法である。その方法としては、SDI (succinic dehydrogenase inhibition test) 法^{1,4)}、CD-DST (culture drug sensitivity test) 法^{5,6)}、HDRA (histoculture drug response assay) 法⁷⁾などがある。

本研究では、腫瘍組織を3次元培養することにより患者への最適の抗がん剤を選択する *in vitro* の抗がん剤感受性試験である HDRA 法を用いて抗がん剤の感受性試験を行い、その結果について考察を行った。さらに薬物療法が困難である

膵癌について感受性を行った培養液を用い発現変化した物質と感受性との関連性について検討を行った。

方 法

1. 対象

2008年から2012年8月までの4年間に弘前大学医学部附属病院薬剤部でHDRA法による抗がん剤感受性試験を施行した症例を検討資料とした。施行した各疾患名は、胃癌(生検も含む)25症例(31検体)、肝癌8症例(8検体)、食道癌(生検も含む)22症例(33検体)、大腸癌2症例(3検体)、胆管癌(胆嚢癌も含む)9症例(10検体)、腹腔内腫瘍(腹壁腫瘍を含む)8症例(10検体)、膵癌16症例(16検体)、乳癌1症例(1検体)、および脾臓癌1症例(1検体)、計113検体であった。

2. 試薬

各種抗がん剤(フルオロウラシル;5-FU: 協和発酵キリン株式会社, シスプラチン; CDDP: 株式会社ヤクルト本社, ドセタキセル; DOC: サノフィ株式会社, パクリタキセル; PAX: 日本化薬株式会社, イリノテカン; CPT-11: 第一三共株式会社, ゲムシタビン; GEM: 日本イーライリリー株式会社, マイトマイシンC; MMC: 協和発酵キリン株式会社, オキサリプラチン; LOHP: 株式会社ヤクルト本社)は各社より購入し使用した。コラーゲンスポンジはファイザー社製を用いた。ウシ胎児血清(FBS)はフナコシ株式会社より、RPMI 1640およびハンクス溶液はライフテクノロジーズ・ジャパン株式会社より、ダルベコ変法イーグル培地(DMEM)はナカライテスク株式会社よりそれぞれ購入した。3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide (MTT) は和光純薬工業株式会社より購入した。各種 Protein Chip Array および質量校正用マーカー(分子量: 1,084.25~6963.52および7,034~147,300) はBio-Rad社(Hercules, PH)より購入した。その他の試薬は全て特級を用いた。

3. MMT判定法を用いた組織培養抗がん剤感受性試験

抗がん剤感受性試験は簡便かつ臨床効果との相関性が高いとされている HDRA 法を用いた。まず、手術場にて採取した腫瘍組織は、100 U/ml ペニシリン、および100 µg/ml ゲンタマイシンを含むハンクス溶液で十分洗浄し、速やかに壊死部分や正常組織部分を除去した。腫瘍組織を細かく裁断し約10~20 mg の組織を24ウエル・プレート内のコラーゲンスポンジ(約1 cm²大)上に静置した。20% FBS, 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ゲンタマイシンを含む RPMI-1640 培養液に各種抗がん剤を溶解し、各溶液 1 ml/well を各ウエルに入れ、このプレートを5%炭酸ガスを含む大気中37℃で7日間培養した。また、培養後、0.1 mg/ml コラゲナーゼ(type I)を含むハンクス溶液(100 µl)を添加し16時間培養しコラーゲンスポンジを溶解した。その後、MTT 溶液(5 mg/ml) 100 µlを加え4時間さらに培養した。培養液を完全に除去した後、ジメチルスルホキシド(DMSO) 1.0 mlを添加し、細胞内で酵素反応により産生した MTT-フォルマザンを、細胞内から抽出した。3時間後、抽出液100 µlを96ウエルマイクロプレートに移し、各ウエルの吸光度を波長540 nmにて測定した。各抗がん剤の抑制率は、 $(1 - (\text{薬剤群の吸光度/g}) / \text{対照群の吸光度/g}) \times 100$ (%)とした。なお、各抗がん剤の有効性判定濃度及びカットオフ値(抑制率, %)は、5-FU:300 µg/ml (50%), CDDP: 20 µg/ml (50%), DOC: 100 µg/ml (50%), PAX: 40 µg/ml (60%), CPT-11: 0.2 µg/ml (50%), GEM: 1,000 µg/ml (30%) とし、各抑制率以上を有効と判定した。

4. SELDI Protein Chip System による感受性試験培地のプロファイリング

腫瘍について感受性試験を行った培地(コラゲナーゼ処理後)を試験終了後採取し-30℃にて測定時まで保存した。各抗がん剤(GEM, 5-FU, CDDP, PAX, CPT-11)について感受性を行った培地50 µlに50 mM 酢酸バッファー(pH4.5)または50 mM トリスバッファー(pH 8.5)を150 µlを加え十分攪拌した。そのうちの100 µlを強陰イオン交換樹脂(Q10)および強陽イオン交換樹脂(CM10)

装着 Protein Chip Array に付しイオン交換樹脂と十分反応させた後、各洗浄用バッファーおよび蒸留水にて洗浄し未吸着物質および塩類を除去した。その後エネルギー吸収体(CHCA: α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)をチャージし十分乾燥させ SELDI Protein Chip System(型式: PCS4000)にて測定した。

なお、本研究は弘前大学医学研究科倫理委員会の承認(承認番号: 2008-109)を得て実施した。

結 果

1. HDRA 法による癌種別薬剤感受性陽性率

表1に2008年~2012年までに検討した感受性試験結果を示した。対象癌種は、胃癌(31症例: 生検を含む)、肝癌(8症例)、食道癌(33症例: 生検を含む)、大腸癌(3症例)、胆管癌(10症例)、膵癌(16症例)、腹腔内または腹壁腫瘍(10症例)、およびその他(2症例: 乳癌および脾癌各1症例)の合計113症例であった。その中で5-FU(濃度: 300 mg/ml, cut-off 値50%)がすべての症例に対し高い陽性率を示した。中でも胃癌(生検を含む)、肝癌、大腸癌、腹壁腫瘍では80%以上の陽性率を示した。同様にPAXも7癌種において高い陽性率を示し、その陽性率は平均76%であった。次にGEMは胆管癌、膵癌、および腹腔内腫瘍において比較的高い陽性率を示し、特に胆管癌では10症例中7例において陽性となった。次に適応の広いCDDPは胃癌、肝癌、食道癌(生検も含む)で約50%以上の陽性率を示した。しかし、他の癌種ではそれ以下の陽性率であった。CPT-11は今回の検討では陽性を示す癌種は腹腔内または腹壁腫瘍であり、他の癌種では低い陽性率であった(表1)。

2. 術前投与薬剤と感受性の関連性

抗がん剤が術前に使用された場合の感受性試験への影響を検討した。まず術前に抗がん剤が投与されていなかった胃癌24症例では、薬物療法での第一選択薬となる5-FUおよびCDDPに対する感受性は、5-FUが24症例中19例で陽性(陽性率: 79.2%)を示した。また、第一選択として5-FUと併用されるCDDPは24症例中14例で陽性(陽性

表 1 HDRA法による癌種別薬剤感受性陽性率

		胃癌	胃癌 (生検)	肝癌	食道癌	食道癌 (生検)	大腸癌	胆管癌	膵癌	腹腔内 腫瘍	腹壁 腫瘍	その他	合計 平均(%)
5-FU	件数	25	6	8	22	11	3	9	11	5	4	2	106
	%	80	83	88	64	64	100	78	64	60	100	50	76.3
CDDP	件数	25		8	22	11	1	8	11	5	5	2	98
	%	53		50	59	64	100	25	36	0	40	50	48
MMC	件数	2	8	6	2			7	7				32
	%			17	0			57	29				25.8
DOC	件数	24	5	8	19	7	1	8	10		5	2	89
	%	25	40	13	21	14	0	50	10		20	0	19.3
PAX	件数	15		6	6			10	9	4	3	1	54
	%	93		100	83			70	89	75	100	0	76.3
CPT-11	件数	25	6	4	4	1	2	9	11	5	4	1	72
	%	0	17	0	0	0	0	11	0	20	50	0	8.9
GEM	件数	0		1				10	11	5			27
	%	0		100				70	45	40			51
全症例		25	6	8	22	11	3	10	16	5	5	2	113

5-FU：フルオロウラシル，CDDP：シスプラチン，MMC：マイトマイシンC，DOC：ドセタキセル，PAX：パクリタキセル，CPT-11：イリノテカン，GEM：ゲムシタビン。

率：58.3%)を示し，5-FUより低い陽性率となった。さらに，第二選択薬として使用されるDOC，PTXおよびCPT-11においては，DOCが23症例中6例(陽性率：23%)およびPTXが14症例中13例(陽性率93%)となったがCPT-11は24症例すべて陰性を示した(表2A)。胃癌において，病気分類がStage IVの患者の感受性試験結果と有効日数の関連性では，5-FU感受性陽性患者にS-1を含む化学療法を実施した場合には，感受性試験後に選択されたS-1単独または併用療法後に二次治療へ以降する期間または死亡に至る期間(有効日数)の平均日数は429.5日に対して，5-FU感受性陰性の患者では，平均日数は67日となった(表2B)。

一方，術前に抗がん剤が投与されていた例として食道癌について検討した。今回検討した食道癌では22症例中11例に第一選択薬である5-FUおよびCDDPが投与されていた。まず非投与群での感受性試験において，5-FUは11症例中7例(陽性率：64%)で，CDDPは11症例中6例(陽性率：55%)で，陽性率を示した。一方，投与群でも5-FUおよびCDDPの陽性率は，非投与群と同様の陽性率を示し，これらの薬剤による耐性は生じていないことが推定された。

また，第二選択薬となるDOCでは，非投与群

において8症例中3例(陽性率：38%)で陽性を示し，投与群では10症例中1例(陽性率：10%)出あった(表3)。

さらに術後に選択された抗がん剤について，非投与群では，5-FUおよびCDDPに対して陽性を示した症例で5-FUおよびCDDPが選択された症例が1例，第二選択薬であるDOCおよびネダプラチン(NDP)が選択された症例が1例であり，残りの9例では抗がん剤による薬物療法は施行されなかった。一方，術前投与群では5-FUおよびCDDP陽性および陰性に関わらず，11症例中5例に第二選択薬であるDOCが選択され，そのうち4例がNDPを併用，1例がDOC単独投与されていた。その後，2例で5-FUと同様の薬効を示すS-1が単剤投与されていた(表3)。

3. 膵癌における感受性試験

膵癌に対する薬物療法としてGEMおよび5-FUが用いられる。今回検討した膵癌症例では，12症例中9例で術前の抗がん剤投与はされなかった。この非投与群においてGEMは9症例中3例で陽性(33%)，5-FUは6例で陽性(67%)を示した。またCDDPは8症例中2例で，PAXは6症例中5例(83%)で陽性を示した(表4)。

表 2 胃癌患者での抗がん剤感受性試験結果および術後選択薬の効果

A

術前投薬	患者	感受性試験Cut-off値, (%)						術後選択薬剤						Stage	
		5-FU	CDDP	DOC	PAX	CPT-11	GEM	FU	CDDP	S-1	PAX	CPT-11	GEM		
	薬剤濃度 (μg/ml)	300	20	100	40	0.2	1,000								
	Cut-off 値	50%	50%	50%	60%	50%	30%								
無	1	○	×	○	○	×									IA
	2	×	○	×	○	×			○	○	○				IV
	3	○	×	×	○	×									IIIA
	4	×	×	×		×		○	○	○	○	○			II
	5	○	○	×	○	×				○					IV
	6	×	×	×	○	×			○	○	○				IV
	7	○	○	○	○	×			○	○	○	○			IIIA
	8	○	○	○	○	×				○					II
	9	○	×	○	○	×			○	○	○				B
	10	○	○	×		×				○					IV
	11	○	×	×		×			○	○					IIIB
	12	○	○	○		×			○	○		○			IV
	13	○	×	×		×									IB
	14	○	×			×		○	○						II
	15	○	○	×		×			○	○					IIIB
	16	○	×	×		×			○	○	○				IV
	17	○	○	×		×							○		IV
	18	○	○	○		×									I
	19	○	○	×	○	×				○					IIIA
	20	○	○	×	○	×				○					IV
	21	○	○	×	○	×									IB
	22	○	○	×	○	×									III
	23	×	○	×	○	×									II
	24	×	×	×	×	×			○	○	○				IV
有	25	○	×	×	○	×			○					IV	
合計		2	11	16	7	3	1								

B

患者 No.	感受性試験結果 (陽性率%)		選択薬剤	有効日数 (日)
	5-FU	CDDP		
5	○ 74.2	○ 52.6	S-1	168
12	○ 81.2	○ 55.5	シスプラチン + S-1	462
16	○ 56.7	×	シスプラチン + S-1	899
20	○ 74.2	○ 65.0	S-1	189
2	×	○ 54.2	シスプラチン + S-1	71
24	×	×	シスプラチン + S-1	63

A：各種抗がん剤による感受性試験結果, B：Stage IV患者の抗がん剤感受性試験結果と術後選択薬剤による有効日数. Stage は, 感受性試験実施時の病勢分類を示す. 有効期間：1次治療から2次治療までの期間, または1次治療から死亡日までの期間を示す.

S-1：テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム.

一方, 術前に GEM および S-1 の投与を受けた症例では, GEM は 2 症例中 2 例で, 5-FU は 2 症例中 1 例で, CDDP は 3 症例中 2 例で, PAX は 3 症例中 3 例で陽性を示した.

さらに術後に選択された抗がん剤では, 第一選択薬である GEM が陰性例も含め 12 症例中 7 例で選択されていた. 同時に 5-FU と作用機序が類似している S-1 も 12 症例中 8 例で選択され, GEM との併用例は 5 例であった(表 4).

4. SELDI Protein Chip System によるプロファイリング

膀胱で感受性試験を 7 日間行った培養液 (MTT 試薬を含む) について, SELDI Protein

Chip System を用いてペプチド等のプロファイリングを行い, 抗がん剤の感受性と関連する物質の検索を行った.

その結果, 5-FU で感受性試験を行った症例において, 陰性群で特異的に高発現するシグナル (m/z: 1,381.8, 1,954.1, 2,289.6, および 2,608.5, 図 1B) が認められた. 一方陽性群でも高発現している物質 (m/z: 669.2 および 2,384.4, 図 1C) が認められ, これらのシグナルは, GEM や DOC の陽性試料においても比較的高い頻度で検出できた (データ未掲載). 同様に CDDP では, 陽性群で特異的に高発現している物質 (m/z: 3,179.8 および 3,336.1) が認められた.

表 3 食道癌患者での感受性および術後選択薬

術前投薬	患者	感受性試験						術後選択薬剤					
		5-FU	CDDP	MMC	DOC	PAX	CPT-11	FU	CDDP	S-1	DOC	NDP	
無	1	×	×	×									
	2	×	×				×						
	3	○	○		×						○	○	
	4	○	○		○	○	×						
	5	×	×		×								
	6	○	○		○								
	7	○	○		×			○	○				
	8	×	×										
	9	○	○		×	○							
	10	○	○		○	○							
	11	○	×		×	×	×						
有	12	○	○		○	○							
	13	×	×		×								
	14	○	×		×								
	15	○	○		×						○	○	
	16	×	×		×								
	17	○	○		×								
	18	○	○		×								
	19	○	○		×					○	○		
	20	×	×		×						○	○	○
	21	×	×		×					○	○	○	○
	22	○	○									○	○
合計							1	1	2	6	5		

術後選択薬剤は、感受性試験後に患者に投与された薬剤。
NDP: ネダプラチン。

考 察

抗がん剤感受性試験は、術後補助化学療法にとって有用であるとされている。弘前大学医学部附属病院薬剤部では、消化器癌を対象に7種類の抗がん剤について感受性試験を行った。その中で、多くの癌疾患において使用されてきた5-FUは、今回の検討でも多くの癌疾患において高い陽性率を示し、多くの癌疾患に使用されることを裏付けた。このようなことから、術後補助療法を行う上で抗がん剤感受性試験は、適正な薬物療法および患者への経済的負担の軽減からも重要である。

本研究では、術前に抗がん剤を投与されていない胃癌症例について感受性試験と術後に選択された抗がん剤との関連性を検討した。その結果、胃癌において第一選択薬である5-FUは24症例中19例で感受性試験が陽性を示した。その中で、11例で5-FUまたは同様の作用機序を示すS-1が選択されていた。一方、陰性例においても3例に、

S-1が選択されていた(表2)。

このような違いは、抗がん剤の選択には感受性試験のみならず同時に行っている病理学的所見も加味し総合的な選択なされた結果と推定される。5-FUまたは、S-1が選択されなかった症例の中には、早期胃癌(Stage Ia~Ib)のため胃癌のガイドライン⁸⁾に従い術後の補助化学療法が必要とされない症例が含まれていた。このような症例におけるがんが再発した場合の薬剤選択として感受性試験の有効性を今後検討する必要がある。また、胃癌において、病分類がStage IVの患者の感受性試験結果と有効日数の関連性では、5-FU感受性陽性患者と陰性患者の平均有効日数が429.5日と67日であった(表2B)。この結果については症例数が少ないため、関連性について検討することは困難ではあるが、抗がん剤感受性試験が無効な薬剤の選択に有用な情報提供であることが示唆された。

一般に抗がん剤の長期投与は薬剤耐性を生じることが多い。本検討では食道癌に術前投与され

表 4 膀胱患者での感受性および術後選択薬

術前投薬	患者	感受性試験					術後選択薬剤				
		GEM	5-FU	CDDP	PAX	CPT-11	GEM	S-1	CDDP	PAX	CPT-11
無	1	×	○	○	×	×		○			
	2	○	○	×	○	×	○	○			
	3	○	○	×	○	×	○	○			
	4	○	○	×	○	×	○				
	5	×	○	×		×	○				
	6	×	○			×		○			
	7	×	×	×	○	×		○			
	8	×	×	○	○	×					
	9	×	×	×							
有*	10	○	○	○	○	×	○	○			
	11	○	×	○	○	×	○	○			
	12			×	○	×	○	○			○
						合計	7	8			1

*: 術前投与薬剤: GEM + S-1

術後選択薬剤は、感受性試験後に患者に投与された薬剤。

た5-FUとCDDPの影響について、感受性試験結果への影響について検討した。その結果、術前に5-FUが投与されていない群での感受性は、約64%であり、その時の抑制率は71.9 ± 11.6% (n = 6)であった。一方、術前5-FUが投与された群では抑制率は69.8 ± 7.3% (n = 7)であった。また、感受性試験で陰性を示した症例での術前投与薬剤の影響は、非投与群および投与群での抑制率はそれぞれ37.0 ± 11.7%および24.8 ± 16.5%であり、両群間に有意な差は認められず、今回測定した症例では耐性が生じていない可能性が示唆された。

次に薬物療法が困難とされる膀胱について治療薬であるGEMおよび5-FUについて感受性試験を行った結果、GEMでは11症例中5例で陽性を示し、そのうちの2例は術前薬としてGEMが投与されていた(表4)。また抑制率は投与群で39.0 ± 8.5% (n = 2)、非投与群で53.7 ± 3.8% (n = 3)と非投与群で高い感受性を示す傾向が認められたが例数が不十分のため有意差を求めるまでには至らなかった。一方、5-FUでは11症例中7例で陽性を示し(表4)、術前薬非投与群での抑制率は62.8 ± 7.5% (n = 6)であり、食道癌での抑制率とほぼ同様の結果を示した。なお、投与群では1例で約80%の抑制率であった。

術後選択された抗がん剤は11症例でGEMの単独、またはGEMとS-1の併用が選択されていた(表4)。現在、膀胱の術後補助療法としてはGEM単独療法の有用性が報告されている⁹⁾。ま

た、2013年のASCOでは、膀胱術後補助療法において、GEM単独療法に対してS-1単独療法の優越性が示された¹⁰⁾。有用な2つの薬剤を選択するため、感受性試験の結果を考慮することでより有効な薬物療法につながると考えられる。術後補助療法として選択された薬剤は、膀胱に対する優れた抗がん剤はこの二剤が主流であること、そして病理学的所見、患者の身体所見を考慮して選択されたものと推定される。また切除不能膀胱の治療として、GEST試験の結果において、全生存期間は、GEM単剤が8.8ヵ月、S-1単剤が9.7ヵ月であり、同等であることが示された(HR=0.957, p=0.0003)。S-1とGEMを併用する治療法では10.1ヵ月であり、GEM単剤よりも優れていることは統計学的に証明されていない(HR=0.875, p=0.1496)¹¹⁾。また、切除不能膀胱の薬物治療ではS-1とGEMのいずれを先行使用するかについての有益なエビデンスは確立されていない。術後再発した症例の薬剤選択として、感受性試験の有用性の評価は今後の検討課題である。

次に膀胱に対する感受性試験の培養液について発現変化する物質の解析を行った。その結果、5-FUへの感受性陰性群の培養液において特異的に発現が増加するシグナルが認められ、それらの質量数(m/z)は1,381.8, 1,954.1, 2,289.6, および2,608.5であった(図1, B)。一方陽性群でも特異的に発現が増加するシグナルが認められ、それらの質量数は669.2および2,384.4であった(図1,

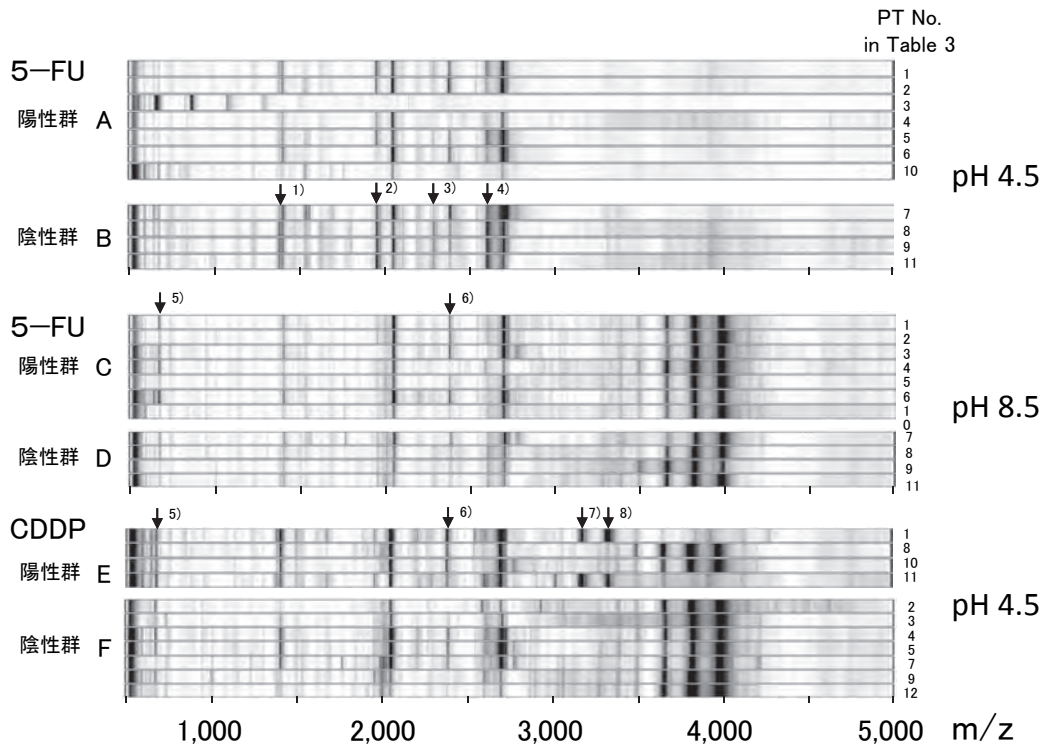


図1 膵癌における SELDI Protein Chip System による感受性試験培地のプロファイリング(Gel View)

5-FU および CDDP の陽性群および陰性群試料について質量分析を行った. 使用した Array はいずれも強陰イオン交換樹脂装着(Q10)を用い, 抽出条件は pH 4.5 および 8.5 にて行った.

A : pH 4.5, 5-FU 感受性陽性患者, B : pH 4.5, 5-FU 感受性陰性患者, C : pH 8.5, 5-FU 感受性陽性患者,

D : pH 8.5, 5-FU 感受性陰性患者, E : pH 8.5, CDDP 感受性陽性患者, F : pH 8.5, CDDP 感受性陰性患者,

↓ : 特異的に発現した質量数を示す.

1): $m/z=1,381.8$, 2): $m/z=1,954.1$, 3): $m/z=2,289.6$, 4): $m/z=2,608.5$, 5): $m/z=669.2$, 6): $m/z=2,384.4$, 7): $m/z=3,179.8$, 8): $m/z=3,336.1$.

C). さらに CDDP においては陽性群で特異的に発現が増加するシグナルが認められ, それらの質量数は 669.2, 2,384.4, 3,179.8 および 3,336.1 であった(図1, E). なお, 質量数は 669.2 および 2,384.4 は 5-FU (図1, C) および CDDP (図1, E) の感受性試験の試料以外に GEM および DOC の感受性試料でも検出され, 陽性試料で多い傾向を示した(データ未掲載). 5-FU 感受性陰性群で認められた物質は, 5-FU に対する耐性機構に関与している物質の可能性も考えられる. 一般に抗がん剤の耐性機構には, 抗がん剤の細胞内への移行に関わる ABC(ATP-binding cassette) 輸送体ファミリー(P-糖蛋白, MRP: multidrug resistance-related protein, BCRP: breast cancer related protein) や細胞内で活性化や不活性化に関わる CE(carboxyestrane: CPT-11 の活性化) や DPD

(dihydropyrimidine dehydrogenase: %FU の代謝酵素) や EGFR の過剰発現など様々な機序が明らかとなっている¹²⁾. また, 膵癌に過剰発現している腫瘍マーカーは, CEA, CA 類, DUPAN-2, KMO-1, NCC-ST-439 などの糖鎖性物質が報告されている. 本研究において陽性群で検出された物質は暴露された抗がん剤により死滅したがん細胞細胞由来の可能性や, 陰性群で検出された物質は 5-FU 抵抗性を示す物質の可能性も推定され興味深い. いずれにしろ, これらの物質の構造解析により抗がん剤に対する感受性との関連性が明らかとなると考えられる.

本研究では抗がん剤感受性試験の有用性について検討した. 胃癌患者で Stage IV の 5-FU 感受性陰性の患者において, 有効日数が短いことから, 感受性試験が術後補助療法の薬剤選択のひと

つになる可能性あると考える。感受性試験は手術時に採取した患者自身の組織を使用した試験であることから、その結果は信頼性が高いと思われるが、今後膵癌や食道癌においても病勢分類や生存期間と感受性結果との関連性を検討することが重要である。また、今回膵癌の感受性試験において、検討した培養液中に出現した物質の構造解析を行い、少なくとも5-FUが無効な患者の同定に貢献できる可能性を今後検討する必要があると考えられる。

引用文献

- 1) Kondo T, Imamura T, Ichihashi H. In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Gann* 1966;57:113-21.
- 2) Suto A, Kubota T, Shimoyama Y, Ishibiki K, Abe O. MTT assay with reference to the clinical effect of chemotherapy. *J Surg Oncol* 1989;42:28-32.
- 3) Saikawa Y, Kubota T, Furukawa T, Suto A, Watanabe M, Kumai K, Ishibiki K, et al. Single-cell suspension assay with an MTT end point is useful for evaluating the optimal adjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994;85:762-5.
- 4) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55-63.
- 5) Kobayashi H, Higashiyama M, Minamigawa K, Tanisaka K, Takano T, Yokouchi H, Kodama K, et al. Examination of in vitro chemo-sensitivity test using collagen gel droplet culture method with colorimetric endpoint quantification. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:203-10.
- 6) Hoffman RM. In vitro assays for chemotherapy sensitivity. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993;15:99-111.
- 7) Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM. Clinical applications of the histoculture drug response assay. *Clin Cancer Res* 1995;1:305-11.
- 8) 胃癌治療ガイドライン 日本胃癌学会P26-7.
- 9) Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, Yamamoto J, Nakao A, Egawa S, Doi R, et al. A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer* 2009;101:908-15.
- 10) Maeda A, Boku N, Fukutomi A, Kondo S, Kinoshita T, Nagino M, Uesaka K. Randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with gemcitabine versus S-1 in patients with resected pancreatic cancer: Jpn Adjuvant Study Group of Pancreatic Cancer (JASPAC-01). *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:227-9.
- 11) Ueno H, Ioka T, Ikeda M, Ohkawa S, Yanagimoto H, Boku N, Fukutomi A, et al. Randomized phase III study of gemcitabine plus S-1, S-1 alone, or gemcitabine alone in patients with locally advanced and metastatic pancreatic cancer in Japan and Taiwan: GEST study. *J Clin Oncol* 2013;31:1640-8.
- 12) 泉二登志子. 序～薬剤耐性のメカニズム～. *血液フロンティア* 2010;20:17-21.