

Human tumor clonogenic assay を用いた制癌剤感受性試験と natural human Tumor Necrosis Factor の抗腫瘍効果に関する研究

岡山大学医学部第一外科学教室（指導：折田薫三教授）

岡 本 幹 司

（平成元年 3 月13日受稿）

Key words : Human tumor clonogenic assay, 抗癌剤感受性試験, natural human interferon- α , natural human tumor necrosis factor- α , preclinical early phase II study

緒 言

癌治療を目的にさまざまな治療法が試みられているが、未だ確実な治療法はないと言ってよい。現在癌腫に対する治療法として、手術療法、化学療法、放射線療法、免疫療法、ホルモン療法などがあるが、なかでも手術療法が最も有効であり、早期癌に対しては手術療法のみでほぼ完治可能であると言っても過言ではない。しかし、進行癌に対しては手術療法単独では有効な成績が得難く、補助療法として他の治療法との併用が推奨されている。現在一般的に行われている併用療法は、外科手術後に、adjuvant chemotherapyを追加する方法であるが、投与方法に問題がある。即ち、一定のprotocolのもとに、すべての患者に一律に施行され、個々の患者で異なる制癌剤に対する感受性については軽視され、効果に関係なく一定期間投与されているのが現状である。無効な薬剤を漠然と術後の体力低下をきたした患者に行うことは、副作用の発現を助長し、不運な場合には制癌剤の副作用で死亡する症例も時に見受けられる。従って、慎重な薬剤選択が必要となり、有効薬剤を正確に判定出来る制癌剤感受性試験が望まれるわけである。現在、制癌剤感受性試験は数種類の方法があるが、それぞれ一長一短があり優劣をつけがたいが、比較的短期間に判定され、臨床効

果と高い相関を示すHTCAが、多くの施設で用いられている。本研究でもこのHTCAを用いて、癌患者の術後のadjuvant chemotherapyに用いる薬剤の選択と、癌性胸水・腹水を有する末期癌患者に対する有効薬剤の選択を試みるとともに、新しいnatural human TNF- α (nHuTNF- α)の抗腫瘍効果とnatural human IFN- α (nHuIFN- α)との併用による抗腫瘍効果についても検討したのであわせて報告する。

対象と方法

1. 対 象

当教室とその関連病院で切除された固形癌患者83例と、末期癌患者より得られた胸水・腹水11例を対象とした。nHuTNF- α とnHuIFN- α の併用効果の検討には、当教室で継代培養している、ヒト鼻咽頭癌由来KB細胞とHep-2細胞、ヒト胃癌由来KATO-III細胞、ヒト胃癌由来PC-9細胞の4種類の培養株細胞を用いた。

2. Human tumor clonogenic assay (HTCA)

HTCAは、Hamburger & Salmon¹⁾らの原法を一部改良した方法²⁾ (図1)を用いた。即ち、固形癌組織を細切後、0.8% Collagenase (Sigma), 0.002% DNase (Sigma) 添加のRPMI1640に浮遊させ、37℃、5% CO₂下で2時間静置培養した後、No. 80 stainless meshで濾過し、Ficoll-Conray比重遠沈法で赤血球を除去

し、さらに Ficoll-Conray 二層法でリンパ球を除去して single cell suspension を得た。胸水・腹水はヘパリン 1 ml を加えた 500ml ビンに採取後、遠沈、濃縮した後、同様にして Ficoll-Conray 比重遠沈法及び Ficoll-Conray 二層法にて赤血球及び白血球を除去し、癌細胞の single cell suspension を得た。細胞数を 15×10^5 cells/ml に調製し、各種薬剤と 1 時間接触後よく洗浄した。次に、35mm のプラスチックシャーレ (Falcon) の下層に、feeder layer として 15% FCS 添加 RPMI1640 で調整した 0.5% Agarose (Difco 社, Bacto Agar) の 1 ml をあらかじめ敷き、その上に plating layer として、細胞を 5×10^5 cells/ml 含む 15% FCS 添加の RPMI1640 で調整した 0.3% Agarose 1 ml を重層させた。37°C、5% CO₂ にて 2 週間培養後、倒立顕微鏡を用いて colony 数を算定した。30 個以上の細胞集団を colony とし、対照群で 30 個以上の colony 数が得られた場合を薬剤感受性評価可能例とした。さらに、培養癌細胞を用いた HTCA では、その plating efficiency (PE) が高いため、control 群の

colony 数が 200 前後になるように、1 well あたり癌細胞数が $10^3 \sim 10^4$ 個となるよう plating した。

3. 使用薬剤及びその濃度

用いた抗癌剤とその濃度は (表 1) に示した。薬剤濃度は臨床における one shot 静注後の最高血中濃度値の 1/10 を基準とし、その 1, 10, 10² 倍の 3 濃度を用いた。感受性の判定は、colony 数が control のそれに比べて 30% 以下の場合を感受性有りとした。一方、サイトカインである partial purified nHuTNF- α , nHuTNF- α , nHuIFN- α は林原生物化学研究所より供与されたものを用いた³⁾ (図 2)。また、これらの薬剤については癌細胞と 2 週間接触させ続ける持続接触法を用いた。partial purified nHuTNF, nHuIFN- α ともに臨床使用時の有効血中濃度が不明のため、各種濃度を用いた。

4. Median effect plot 法

Choura ら⁴⁾ が多剤併用効果の解析に用いた方法に準じて行った。即ち、median effect plot 法を用いて、ある効果率における理論的薬剤濃度を算出し、その濃度を使用しある効果率における combination index 値 (CI) を求めた。CI が 1 より大きい場合は拮抗的、等しい場合は相加的、小さい場合は相乗的と評価した。

結 果

1. 臨床材料に対する HTCA

表 2 に示すごとく、各種癌患者 92 名 94 例に対

Table 1 Concentration of anticancer drug

Anticancer drug	Drug concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
MMC	0.1	1.0	10
5-FU	1.0	10	100
ADM	0.04	0.4	4
CPM	10	100	1000
CDDP	0.2	2.0	20
ACNU	0.1	1.0	10
MTX	0.4	4.0	40
BLM	0.1	1.0	10
PEP	0.1	1.0	10

MMC: mitomycin C, 5-FU: 5-Fluorouracil, ADM: adriamycin, CPM: cyclophosphamide, CDDP: cisplatin, ACNU: nimustine, MTX: methotrexate, BLM: bleomycin, PEP: peplomycin

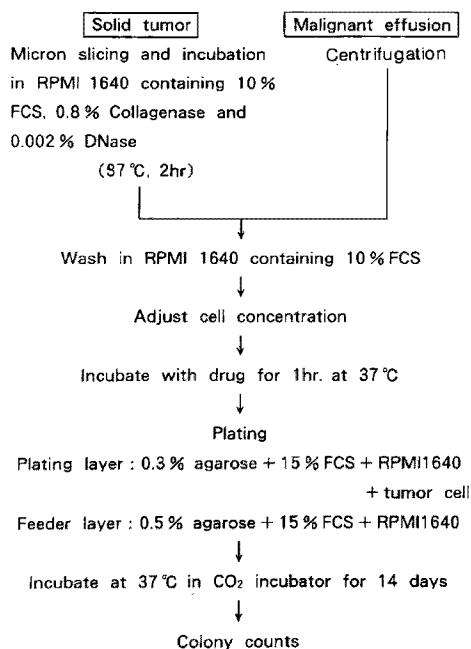


Fig. 1 Schema of human tumor clonogenic assay.

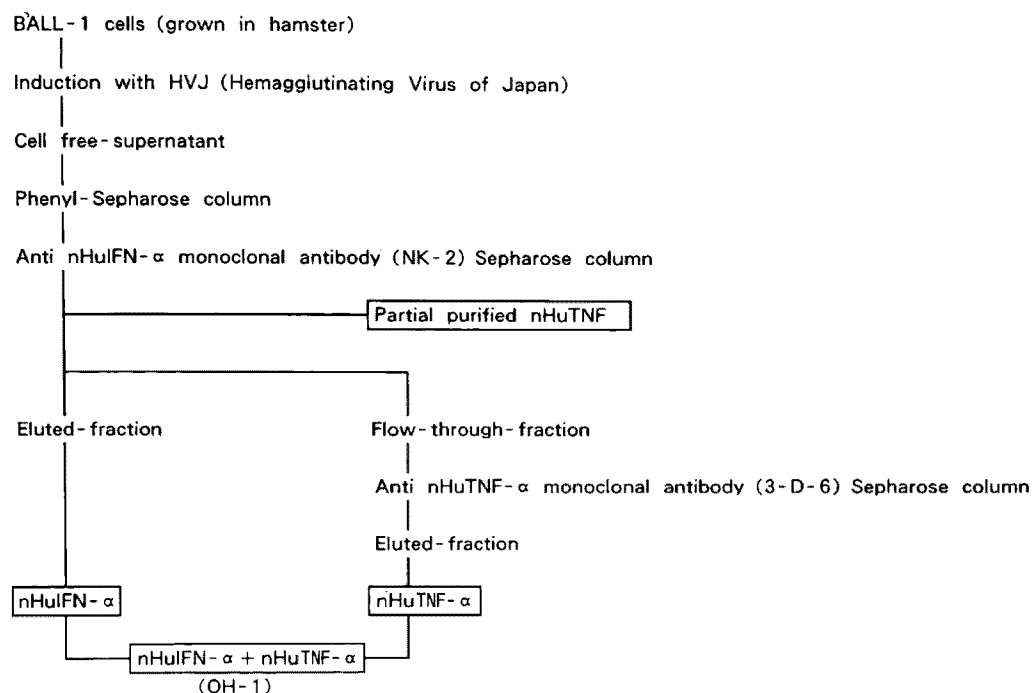
Fig. 2 Schema of the refinement for purified nHuTNF, nHuIFN- α , nHuTNF- α , and OH-1.

Table 2 Colony formation and plating efficiency in HTCA using various human tumors

Type of tumor	No. of specimen producing colonies/total no. of specimen tested	No. of colonies/well	Plating efficiency %
Gastric cancer	18/43 (41.2%)	15—150	0.003—0.03
Colon cancer	3/12 (25.0)	27—108	0.005—0.02
Pulmonary cancer	9/12 (75.0)	15—146	0.003—0.03
Hepatocellular cancer	4/6 (66.6)	16—480	0.003—0.1
Breast cancer	5/6 (83.3)	15—260	0.003—0.05
Pancreatic cancer	4/4 (100)	48—97	0.01—0.02
Thyroid cancer	1/2 (50.0)	1940	0.4
Gallbladder cancer	1/1 (100)	50	0.01
Choledochal cancer	2/2 (100)	46—84	0.01—0.02
other	3/6 (50.0)	16—153	0.003—0.03
Total	50/94 (53.2)	—	—

してHTCAを行い、colony形成がみられたのは、腫瘍別にみると胃癌18例、大腸癌3例、肺癌9例、肝癌4例、乳癌5例、膵癌4例、甲状腺癌1例、胆管癌2例、胆嚢癌1例、その他3例の計50例(53.2%)であった。colony形成別にみると、膵癌4/4例(100%)、乳癌5/6例

(83.3%)、肺癌9/12例(75.0%)と比較的良好であった。しかし、用いた症例の半数以上にあたる胃癌と大腸癌の成績がそれぞれ18/43例(41.2%)、3/12例(25.0%)と不良であった。次に、形成されたcolony数とplating efficiency(PE)でみると、甲状腺癌はcolony数1940個、

Table 3 Susceptibility to anticancer drug in HTCA

Type of tumor	Anticancer drug								
	MMC	5-FU	ADM	CPM	CDDP	ACNU	MTX	BLM	PEP
Gastric cancer	3/18*	7/17	5/18	—	0/8	—	—	—	—
Colon cancer	0/3	1/3	1/3	—	0/3	—	—	—	—
Pulmonary cancer	3/9	—	3/9	1/8	1/9	—	1/9	2/9	2/9
Hepatocellular cancer	2/4	1/4	2/4	—	0/4	—	—	—	—
Breast cancer	0/5	2/5	2/5	0/5	0/5	—	—	—	—
Pancreatic cancer	0/4	0/4	1/4	—	0/4	—	—	—	—
Thyroid cancer	0/2	0/2	0/2	—	0/2	—	—	—	—
Gallbladder cancer	0/1	0/1	0/1	—	0/1	—	—	—	—
Choledochal cancer	0/2	0/2	0/2	—	0/2	—	—	—	—
other	0/3	0/3	1/3	0/2	0/3	1/3	—	—	—
Total	8/51	11/41	15/51	1/15	1/41	1/3	1/9	2/9	2/9
(%)	(15.7)	(26.8)	(29.4)	(0.7)	(2.4)		(11.1)	(22.2)	(22.2)

* : No of specimen showed the positive sensitivity/total No. of Specimen tested.

MMC : mitomycin C, 5-FU : 5-Fluorouracil, ADM : adriamycin, CPM : cyclophosphamide, CDDP : cisplatin, MTX : methotrexate, BLM : bleomycin, PEP : peplomycin.

PEは0.4%と高率であったが、他の癌組織ではcolony数は多くて480個までであり、PEも低率であった。

表3は、用いた薬剤の感受性試験の結果である。5-fluorouracil (5-FU)は持続接触性を用いたが、他の薬剤は1時間接触法を用いた。controlで30個以上のcolonyを形成した50例のうち、感受性を示したのは主に用いた4薬剤のうちadriamycin (ADM)が15例、mitomycin C (MMC)が8例、5-FUが11例、cisplatin (CDDP)が1例であり、ADMに対しやや強い感受性を示した。

2. partial purified nHuTNF- α の抗腫瘍効果の検討

用いた症例は、胃癌4例、肺癌2例、肝癌、胆管癌、直腸癌、その他各1例ずつの計10例であった。結果は図3のごとく、胃癌1例を除く9症例に於て、100U/mlの濃度で30%以上のcolony形成の抑制を示し、300U/mlの濃度で50%以上のcolony形成の抑制を示した。

3. nHuTNF- α とnHuIFN- α の併用効果の検討

nHuTNF- α 、nHuIFN- α と、nHuIFN- α とnHuTNF- α を1:1で混合した謂ゆるOH-1と、partial purified nHuTNFの計4薬剤の抗

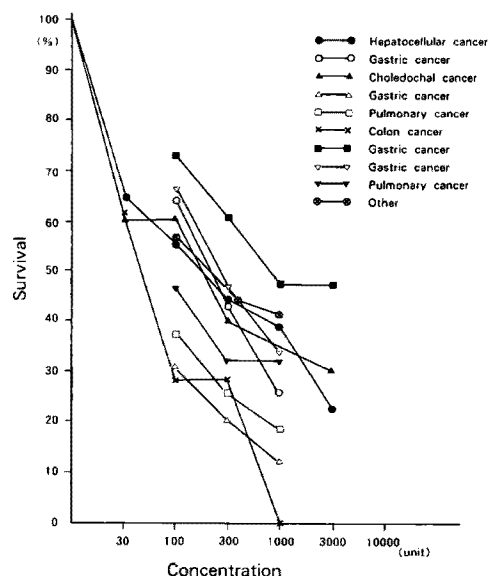


Fig. 3 The antitumor effect of partial purified nHuTNF.

腫瘍効果を、臨床材料およびKB, Hep-2, PC-9, KATO-IIIの4種類のcell lineを用いて、HTCAを施行した結果を図3、図4にした。いずれの薬剤においてもdose dependentな抗腫瘍効果が認められ、KB, Hep-2ではOH-1が、

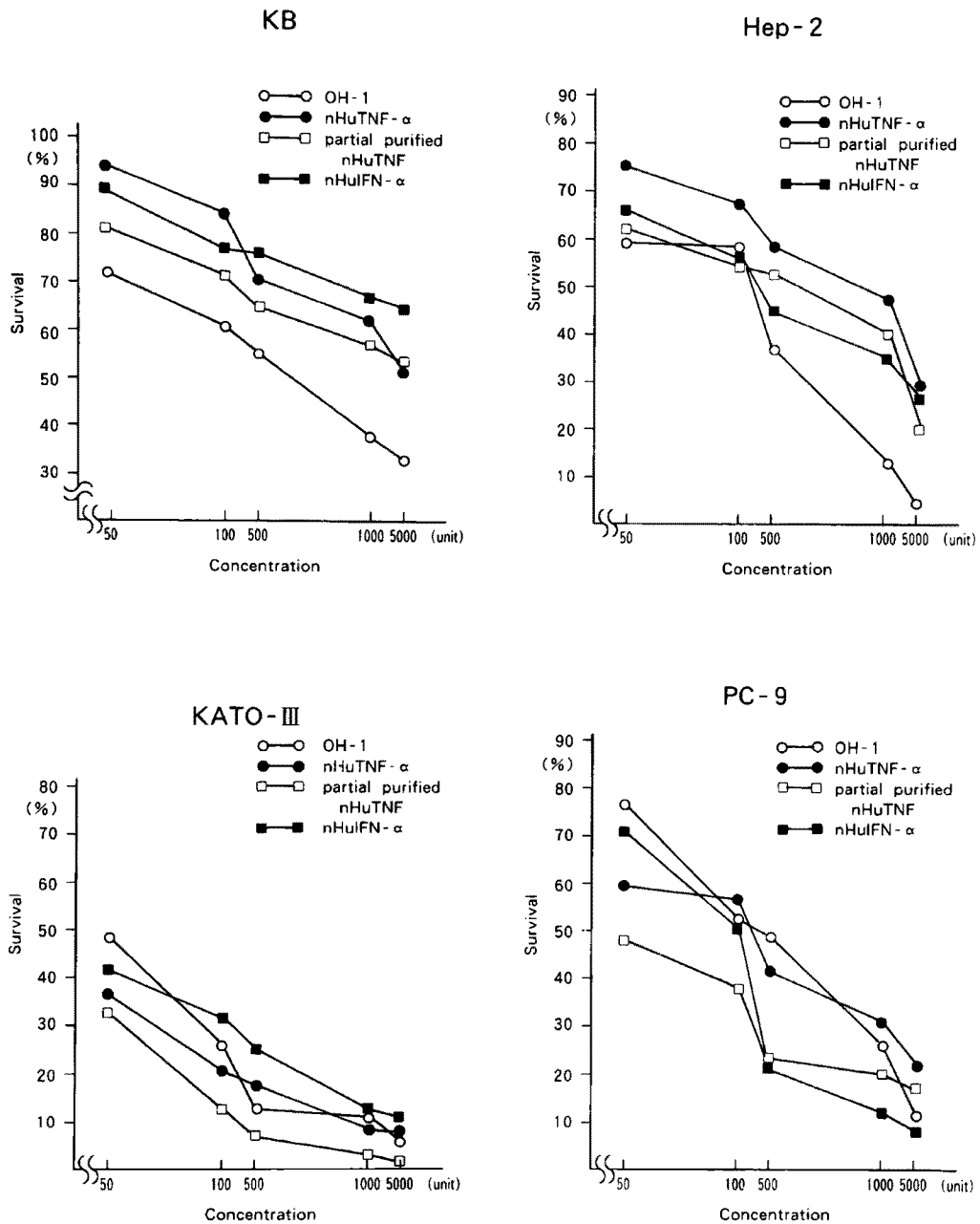


Fig. 4 The synergistic effect was studied in a combination of nHuTNF- α and nHuIFN- α against four cell lines.

KATO-IIIでは partial purified nHuTNF が、PC-9 では nHuTNF- α が最も強い抗腫瘍効果を示した。また、pure な nHuIFN- α と nHuTNF- α の合剤（謂ゆる OH-1）が partial purified

nHuTNF に匹敵する抗腫瘍効果を示す事が明らかとなった。

次に nHuIFN- α と nHuTNF- α の相乗効果を median effect plot analysis を用いて検討し

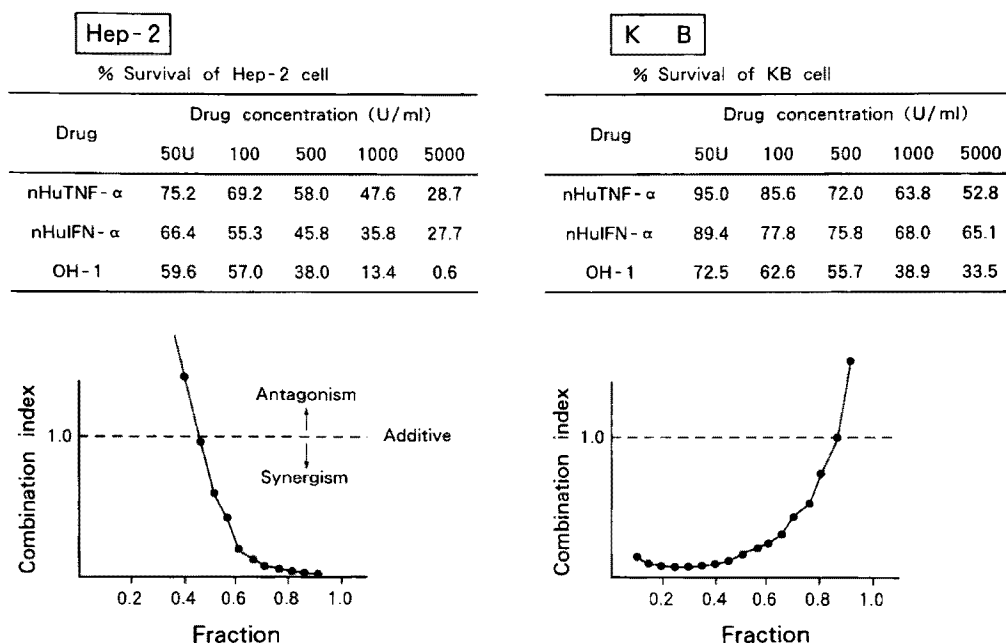


Fig. 5 Results of median effect plot analysis in Hep-2 and KB cell.

た結果を図5に示した。KATO-III, PC-9では相乗効果がみられず, KB, Hep-2で相乗的抗腫瘍効果が認められた。

考 察

制癌剤感受性試験として, HTCAのほか, nude mouse法⁵⁾, Subrenal capsule assay (SRCA)⁶⁾, Scintillation assay⁷⁾, SDI法⁸⁾など種々の方法があり, それぞれに長所短所が報告されている。nude mouse法は, 一度生着すれば繰り返し検査可能であるが, 反面生着率が低く, 結果判定までに長期間を要し, また, nude mouse自体が非常に高価である。SRCAは4-6日と比較的早期に結果が得られ, 通常のmouseを用いるため安価であり, BogdenとVon Hoff⁹⁾のHTCAとSRCAを比較した報告では, 薬剤感受性評価可能であったのはそれぞれ42%, 89%とSRCAの生着率が良好で, 臨床効果との比較でもそれぞれ100% (10/10), 83% (19/23)とHTCAに匹敵する相関を示した。しかし, 検索対象は固形癌のみであり, また, mouseの腎被膜下へ移植した腫瘍片の大きさを4-6日後に測定する場

合, 免疫学的拒絶反応の関与が問題となる。Scintillation assayは, 谷川ら⁷⁾によれば, 薬剤感受性判定可能率及び臨床効果との相関性においてHTCAと遜色なく, 効果判定が5日目に可能であるが, 放射性物質 (³H-thymidineなど)を使用しなければならず, 施設と機材面で制約を受け, 費用も高額となる。SDI法は操作も容易であり, 翌日判定可能であるが, 間質細胞の混入が否定しきれないため, 対象となる細胞が果たして癌細胞だけなのかといった問題点がある。本研究で用いたHTCAについてみると, 1977年にSalmon & Hamburger¹¹⁾によってHuman tumor stem cell assayとして報告され, またたくまに多くの施設で行われるようになった。特徴として, (1)特別の薬品や器具を必要とせず, 現在普遍的に行われている細胞培養という簡単な技術さえあればどこでも行え, (2)2-3週間という比較的短期間で結果が得られる, (3)true positive rateは, 61-71%^{10), 11), 12)}で, true negative rateは91-98%^{10), 11), 12)}と, 臨床効果と高い相関を示す, などが挙げられる。

一方, 問題点としては, 第1に, plating effi-

ciency (PE) が低く、そのため colony 形成が悪く、制癌剤感受性評価可能例が少なくなると同時に、一度に多数の薬剤の評価が出来ない。佐々木ら¹³⁾は比較的培養し易い肺癌を対象とし、colony 形成率が68%、Hiraki ら²⁾は肺癌を主体に他臓器の癌を含め評価可能率が41%、谷川ら¹⁴⁾は種々の癌を対象に60%、Salmon¹²⁾は40—70%とし、いずれも60%前後と低率である。換言すれば、約半数の症例で制癌剤感受性試験が不可能という事になる。本研究では1 plateあたり30個以上の colony を形成した制癌剤感受性評価可能症例は、50/95例 (53.2%) と他施設の報告とほぼ一致した成績ではあったが、不満足な結果であった。一般に colony 形成の良好な癌種は、卵巣腫瘍、メラノーマ、肺癌、乳癌等であるが、本研究で対象とした癌は主に消化器癌であり、胃癌と大腸癌だけで55例と半数以上を占め、特にこの2種類の癌の colony 形成率がそれぞれ41.2%、25.0%と低率であったため、全体の colony 形成率を下げたものと思われる。胃癌の colony 形成率は Hiraki ら²⁾の43%、Tanigawa ら¹⁵⁾の46%と比較して遜色のない結果であった。第2に、固形癌組織から cell suspension を作成時の cell aggregation がある。即ち、1000個の細胞に1つの cell aggregation があったとしても、PE はそれだけで0.1%となり、感受性判定評価時に大きな誤差を生じる結果となる。これを防ぐために、20 μ m nylon cloth¹⁵⁾で濾過したり、培養した当日に aggregation の数を計測して12—20日後の colony 数計測時にその数を減ずる方法¹⁶⁾、Nytex nylon mesh と Polypropylene filter を通して除く¹⁷⁾などの方法が施行されている。第3に、検討薬剤の濃度をなん種類用いるかも問題である。多いほど正確な結果を得られるが、細胞数を多く必要とするため結果的には検討する薬剤数を減らさねばならないのが現状である。第4に、臨床効果と高い相関を示した true positive rate, true negative rate に限界がある。Rose ら¹⁶⁾は PE を改善しても臨床効果との相関率を高めることが出来なかったと報告している。さらに藤本¹⁸⁾は、感受性試験の精度を表現する specificity 及び sensibility がともに90%の試験法においても、制癌剤の有効率が20%

なら、true positive rate は69.2%が限界であり、true negative rate は97.3%が限界である事を数学的に証明している。即ち、HTCA を用いる事によって、有効率20%の制癌剤を3.5倍の70%近くの有効率に高めることが可能であるが、臨床との相関をこれ以上改善することは望めず、このあたりが本法の限界であるとしている。

Salmon ら^{19), 20)}が HTCA を新しい制癌剤の preclinical phase II study として最初にその有用性を報告している。また、HTCA を用いた新しい制癌剤や、IFN^{21), 22)}の preclinical phase II study が行われて良好な成績が報告されている。本研究でも新しい制癌剤である nHuTNF- α の、preclinical phase II study に HTCA を用いて良好な成績を得た。

KB, KATO-III, PC-10 の3株を用いた基礎実験から、partial purified nHuTNF は、time dependent の性質を示したため、持続接触法で検討する必要があると考えられた (data not shown)。また、持続接触法による HTCA を用い、100—300U/ml で抗腫瘍効果の発現がみられる事が明らかとなった (data not shown)。そこで本研究では30U/ml から3000U/ml までの5種類の濃度を用いて、partial purified nHuTNF の抗腫瘍効果を臨床症例より直接に得た癌細胞を用いて HTCA で検討すると、10例中の9例に300U/ml の濃度で% survival が50%以下になる強い抗腫瘍効果を認めた。この結果より、nHuTNF- α を臨床で使用する場合、その血中濃度を300U/ml 以上に維持出来れば、強い抗腫瘍効果が期待出来るものと考えられた。

HTCA を用いた、TNF と IFN の併用効果の検討は、Salmon ら²¹⁾のグループも報告している。彼らは recombinant TNF と recombinant IFN- γ を用いている。TNF の濃度は100—10000U/ml で、IFN- γ は100—1000U/ml を使用し、持続接触法を用いている。8226-myeloma 株と肺癌株に相乗効果を認め、特に8226-myeloma 株では、100U/ml で単独投与の場合、% survival がいずれも35—40%であったが、併用投与の場合はわずか4%を示し、著しい相乗効果があったと報告している。使用した IFN が α と γ との違いや、また、TNF を含め natural と recombinant

の違いなどがあるものの、本研究の結果と同様の結果であった。一方、Broxmeyer²²⁾は正常人骨髓より得た細胞を使用し、HTCAを用いてTNFとINFの併用効果を検討しているが、TNFがnaturalまたはrecombinantのいずれであっても、また、IFN- γ が両者のいずれであっても、TNFとIFN- γ の間では相乗効果が認められたが、TNFとIFN- α の間では相乗効果が認められなかったと報告している。Salmon²³⁾らの報告でも、本研究の場合でも、対象細胞によって異なった結果がえられた。したがって、対象となる細胞の種類を多くして検討する必要がある。TNFとINFの相乗効果の機序については不明な点が多い。Tujimoto²³⁾は、INF- γ を加えて培養すると、細胞のTNFの吸着が増す事より、INF- γ がTNFに対する細胞のreceptor数を増加させるためだとし、弱いながらもIFN- α 及び β でもみられたと報告している。しかし、その後の研究によりTNF receptorが正常細胞にも存在し、TNF receptor数のみで抗腫瘍効果を説明出来ないことが明らかとなった。一方、Naomoto²⁴⁾は細胞周期のS期(蛋白合成期)に特異的に集積するBromodeoxy uridine (BrdU)を用いて検討し、nHuIFN- α 、nHuTNF- α の併用により、G₂/Mがblockされ、S期への細胞の集積が有意に増加することから、相乗効果を示すと報告している。いずれにしても、臨床癌細胞、培養細胞においてnHuIFN- α とnHuTNF- α の相乗的抗腫瘍効果が認められた事から、これらサイトカインの臨床の実際においての有用性が示唆された。nHuIFN- α とnHuTNF- α の合剤(謂ゆるOH-1)は現在臨床において、phase II studyが進行中であり、その抗腫瘍効果が認められている。

結 論

臨床効果と高い相関を示す human tumor

clonogenic assay (HTCA)を用いて、術後のadjuvant chemotherapyに用いる制癌剤と、末期癌患者に対する制癌剤の選択を試みた。また、新しい抗腫瘍剤として注目されているnatural human tumor necrosis factor- α (nHuTNF- α)の抗腫瘍効果を臨床材料より得た癌細胞で検討するとともに、nHuTNF- α とnatural human interferon- α (nHuIFN- α)の併用効果についても検討し以下の結果を得た。各種癌患者92名、94病変に対し施行したHTCAでは、50例(53.2%)で評価判定可能であり、感受性を示したのはADM15例、MMC 8例、5FU11例であった。一方、partial purified nHuTNFの抗腫瘍効果の検討は10症例に施行した。これらのうち、9症例に100U/mlで30%以上、300U/mlでは50%以上のcolony形成抑制率を示す強い抗腫瘍効果が認められた。さらにnHuTNF- α とnHuIFN- α の併用効果を4種類の培養株細胞(KB, Hep-2, KATO-III, PC-9)で行い、KBとHep-2で有意の相乗効果を認めた。従って、nHuTNF- α は強い抗腫瘍効果を持ち、nHuIFN- α との併用により相乗的抗腫瘍作用を認め臨床での効果に期待がもたれた。

稿を終えるにあたり、終始御指導御校閲を賜った恩師折田薫三教授に深甚の謝意を表すると共に、直接御指導頂いた淵本定儀講師に深謝致します。

また、本研究に御協力頂いた教室員の皆様並びに多大の御援助を賜った半田外科病院、半田祐彦先生に心から感謝致します。

尚、本研究の一部は第43回、第44回、第45回日本癌学会総会および14th International Congress of Chemotherapy (Kyoto)、14th International Cancer Congress (Budapest)において発表した。

文 献

- 1) Hamburger AW and Salmon SE: Primary bioassay of human stem cells. Science (1977) 197, 461—463.
- 2) Hiraki S, Ohnoshi T, Numata T, Kishimoto N, Mori K, Yonei T, Yamashita H and Kimura I:

- Anticancer drug sensitivity by human tumor clonogenic assay. *Acta Med Okayama* (1986) **40**, 265—269.
- 3) Fukuda S, Ando S, Snou O, Taniai K, Ando O, Torigoe K, Sugimoto K and Kurimoto M : Simultaneous production of natural human tumor necrosis factor- α , - β and interferon- α from BALL-1 cells stimulated by HVJ. *Lymphokine Res* (1988) **7**, 175—185.
 - 4) Chou TC and Talalay P : Quantitative analysis of dose-effect relationships : The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* (1984) 27—48.
 - 5) Povlson CO and Jacobsen GK : Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Res* (1975) **35**, 2790—2796.
 - 6) Bogden AE, Haskell PM, LePage DJ, Kelton DE, Cobb WR and Esber HJ : Growth of human tumor xenografts implanted under the renal capsul of normal immunocompetent mice. *Exp Cell Biol* (1979) **47**, 281—293.
 - 7) 谷川充彦, 高田泰次, 森本秀樹, 加藤佳典, 丸橋和弘, 中西正樹, 田中猛夫, 橋村孝幸, 日笠頼則 : 適応制癌剤判定法 Scintillation Assay—その基礎と臨床—. *日癌治療会誌* (1985) **20**, 976—983.
 - 8) Kondo T, Imamura T and Ichihashi H : In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agents. *Jpn J Cancer Res (Gann)* (1966) **57**, 113—122.
 - 9) Bogden AE and Von Hoff DD : Comparison of the human tumor cloning and subrenal capsul assays. *Cancer Res* (1984) **44**, 1087—1090.
 - 10) Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BGM, Alberts DS and Moon TE : Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* (1978) **298**, 1321—1327.
 - 11) Von Hoff DD, Bradley E, Sandbach J and Makuch R : Association between human tumor colony-forming assay results and response of individual patient's tumor to chemotherapy. *Am J Med* (1981) **70**, 1027—1032.
 - 12) Salmon SE : Human tumor colony assay and chemosensitivity testing. *Cancer Treat Rep* (1984) **68**, 117—125.
 - 13) 佐々木康綱, 西条長宏, 江口研二, 二見仁康, 管 純二, 宮岡博之, 佐野哲郎, 桜井雅紀, 新海 哲, 富永慶晴, 石原潤一, 高橋秀暢, 宮澤文彦, 星 昭夫 : Human Tumor Clonogenic Assay (HTCA) による制癌剤感受性試験の基礎および臨床的検討. *癌と化学療法* (1986) **13**, 1185—1193.
 - 14) 谷川充彦, 森本秀樹, 秋田利明, 井上 弘, 田中利明 : Clonogenic assay と scintillation assay. *癌と化学療法* (1986) **13**, 1176—1184.
 - 15) Gupta V and Eberle R : Modulation of tumor cell colony growth in soft agar by oxygen and its mechanism. *Br J Cancer* (1984) **49**, 587—593.
 - 16) Rose PG, Beynen AK, Boutselis JG, Minton JP and Milo GE : An improved human tumor stem cell assay in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* (1987) **156**, 730—734.
 - 17) Alley MC and Lieber MM : Improved optimal detection of colony enlargement and drug cytotoxicity in primary soft agar cultures of human solid tumor cells. *Br J Cancer* (1984) **49**, 225—233.
 - 18) 藤本修一, 時田尚志 : 制癌剤感受性試験成績に及ぼす抗癌剤の有効率の影響. 第19回制癌剤適応研究会抄録集 (1986) p. 18.
 - 19) Ahamann FR, Meyskens Jr FL, Moon TE, Durie BGM and Salmon SE : In vitro chemosensitivities of human stem cells to the phase II drug 4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide and prospective in vivo correlations. *Cancer Res* (1982) **42**, 4495—4498.
 - 20) Salmon SE, Meyskens Jr FL, Alberts DS, Soehnlen B and Young L : New drugs in ovarian cancer

- and malignant melanoma : in vitro phase II screening with the human tumor stem cell assay. *Cancer Treat Rep* (1981) **65**, 1—12.
- 21) Soehnlen B, Lie R and Salmon SE : Recombinant tumor necrosis factor exhibit antitumor activity against clonogenic human tumor cells and synergism with gamma interferon. *Pro AACR* (1985) **26**, 303.
- 22) Broxmeyer HE, Williams DE, Lu L, Cooper S, Anderson SL, Bryer GS, Hoffman R and Rubbin BY : The suppressive influences of human tumor necrosis factors on bone marrow hematopoietic progenitor cells from normal donors and patients with leukemia : Synergism of tumor necrosis factor and interferon- γ . *J Immunol* (1986) **136**, 4487—4495.
- 23) Tsujimoto M, Yip YK and Vilcek J : Interferon- γ enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J Immunol* (1986) **136**, 2441—2444.
- 24) Naomoto Y, Tanaka N, Fuchimoto S and Orita K : In vitro synergistic effects of natural human tumor necrosis factor and natural human interferon- α . *Jpn J Cancer Res (Gann)* (1987) **78**, 87—92.

**Test for susceptibility to anticancer drugs by human tumor
clonogenic assay and anticancer effects of natural human tumor
necrosis factor- α and natural human interferon- α**

Kanji OKAMOTO

First Department of Surgery,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

The human tumor clonogenic assay is a test of susceptibility to anticancer drugs which is known to correlate well with clinical effects. In this report, this assay was used to study the antitumor effects of several anticancer drugs and human tumor necrosis factor- α (nHuTNF- α), and the combination effect of nHuTNF- α and natural human interferon- α (nHuIFN- α). Susceptibility to existing anticancer drugs was studied in 94 cases involving 92 patients. Colony formation was obtained 50 cases (53.2%). Of these, susceptibility to ADM was found in 15 cases, to MMC in 8 cases and to 5-Fu in 11 cases. When the antitumor effect of nHuTNF- α was studied in 10 cases obtained from patients with malignant tumor, colony inhibition was shown in 9 cases of more than 30% with 100 units and more than 50% with 300 units. A synergistic effect was assessed with a combination of nHuTNF- α and nHuIFN- α against 4 cell lines (KB, Hep-2, KATO-III, PC-9). The results showed a synergistic effect in KB and Hep-2 cell culture system. From these results, nHuTNF- α seemed to be effective anticancer drugs. The synergistic antitumor effect may be expected if the combination of nHuTNF- α and nHuIFN- α was used clinically.