

ヌードマウス可移植ヒト腎細胞癌に対する 各種抗癌剤の抗腫瘍効果

名古屋大学医学部泌尿器科学教室（主任：三矢英輔教授）

本 多 靖 明

EFFECT OF VARIOUS ANTI-CANCER DRUGS ON HUMAN RENAL CELL CARCINOMA SERIALLY TRANSPLANTED INTO NUDE MICE

Nobuaki HONDA

From the Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

(Director: Prof. H. Mitsuya)

Using two xenografts of human renal cell carcinomas serially transplanted in nude mice (AM-RC-1 and AM-RC-6), both of which maintained the basic histologic features of the original tumor and showed a constant growth rate, the effects of various anticancer agents against 2 target tumors were evaluated.

MitomycinC (MMC), adriamycin (ADM), cisplatin diaminodichloride (CDDP), 5-fluorouracil (5FU), 5-fluoro-2'-deoxy- β -uridine (FUDR) and human lymphoblastoid interferon (HLBI) against AM-RC-1, and MMC, ADM, CDDP, vinblastin (VBL) and etoposide (VP-16) against AM-RC-6. Drugs other than HLBI were administered 3 times in total every three to five days by intraperitoneal injection according to Battelle Columbus Laboratories Protocol and HLBI was injected daily for 10 days intraperitoneally. Anti-cancer effects were evaluated based on tumor growth curve and changes of histologic findings.

In terms of tumor growth only MMC (in a dose of 3 mg/kg) revealed a statistically significant inhibitory effect against both AM-RC-1 and AM-RC-6 (respectively $P < 0.001$ and $P < 0.05$).

Concerning AM-RC-1, a significant difference ($P < 0.01$) was recognized in the ADM group (5 mg/kg) at the time of the second administration, but evaluation could not ultimately be done owing to appearance of acute toxicity after the last dose.

The most remarkable histologic changes by light microscopy were recognized in the MMC group (in a dose of 3 mg/kg) against AM-RC-1. They were degenerative findings such as intracellular and nuclear vacuolation, karyorrhexis, karyolysis, karyopyknosis and marginal hyperchromatosis, which corresponded to grade IIa of the classification of the National Cancer Center. The other drugs administered to AM-RC-1 exhibited only grade 0 to grade I changes. On the other hand, in AM-RC-6, histologic changes were mild (less than grade II) for all the drugs.

Electron microscopic features were as follows. AM-RC-1: Marked increase of vacuole of organella was observed and lumens were filled with a large quantity of debris in MMC group (3 mg/kg). In the ADM group (5 mg/kg) there was debris in lumens, although almost no changes of organella were seen. CDDP groups (both 5.6 mg/kg and 2.8 mg/kg) showed autophagic vacuole in the cytoplasm and increased collagen fibers in the stroma but little changes of organella.

AM-RC-6: Mild intracellular vacuolation was recognized in the MMC group (3 mg/kg). Watery degeneration and microfibrils were found in the cytoplasm in both ADM (5 mg/kg) and CDDP (5.6

mg/kg, 2.8 mg/kg) groups.

The tumor growth inhibitory effects determined by the proliferation curve were demonstrated to be in relatively good accordance with histologic changes except for the MMC group (3 mg/kg) against AM-RC-6.

Key words: Nude mouse, Renal cell carcinoma, Chemotherapy

緒 言

腎細胞癌は発生頻度こそさほど高くないが、泌尿器科領域では予後不良の代表的疾患であり、現在まで種々の治療法が試みられてきたにも拘らず、いまだ満足すべき治療成績は得られていない。この理由として腎細胞癌患者の約30%が診断確定時すでに臨床的に明らかな転移を有すること、さらに根治的腎摘出術が行なわれた患者の約半数に術後、局所再発もしくは遠隔転移が認められ¹⁾、しかもこれらの転移巣に対する効果的な治療方法がないことがあげられる。したがって腎細胞癌の予後を改善するためには転移巣に対する有効な治療法の確立が不可欠であり、免疫療法あるいは化学療法に期待するところが極めて大きい。免疫療法については欧米を中心に種々の方法が行なわれているが、特筆すべき治療効果は認められず²⁾、化学療法も、これまで各種の抗癌剤が単独あるいは併用で用いられ、vinblastin, chloroethyl-cyclohexy-nitrosourea (CCNU) などの有効性が諸家により報告されているが、response rate は一般に10~20%前後と低く³⁾、既存の抗癌剤の限界が感じられる。それゆえ近年、インターフェロンを始めとした新しい薬剤に対する期待が高まり、すでに臨床への導入が試みられており、その有効性を指摘する文献もみられる^{4,5)}。一方癌化学療法を合理的に行なうためには、細菌の感受性試験におけると同様に、個々の症例について抗癌剤感受性試験を行ない、最適な薬剤を選択するのが理想であり、そのために種々の *in vitro* あるいは *in vivo* 感受性試験が試みられつつあるが、なお問題点が少なくない。1974年 Povlsen ら⁶⁾がヌードマウス可移植 Burkitt lymphoma に対して cyclophosphamide による治療実験を行ない、この薬剤が有効であり、かつ増殖抑制効果と組織学的変化が一致することを証明して以来、ヌードマウス可移植ヒト悪性腫瘍に対する各種化学療法実験が広く行なわれ、これらの実験結果と同一薬剤による臨床効果がよく相関することが明らかにされた。ヌードマウス-人癌系を用いた *in vivo* 感受性試験にもいくつかの欠点があるものの、他の方法に比してより生体に近い条件下で抗癌剤の効果を判定す

ることができ、またこの *in vivo* 実験成績が治療効果の予測を可能ならしめた事実および腎細胞癌に対する化学療法が確立されていない現状を考慮すると、ヌードマウス可移植ヒト腎細胞癌を用いた *in vivo* 実験系は抗癌剤のスクリーニングなどに極めて有用な方法と思われる。今回著者は当教室にてヌードマウスに継代維持しているヒト腎細胞癌株 (AM-RC-1 および AM-RC-6) を target tumor として、各種抗癌剤の効果を腫瘍増殖曲線および組織学的所見の変化に基づいて検討したので報告したい。

実験材料ならびに実験方法

1) 実験動物および飼育方法

使用したヌードマウスは静岡実験動物研究所にて SPF 環境下で飼育された BALB/C-nu/nu, 生後6~8週齢 (体重 20~23 g) の雄あるいは雌であり、飼育方法は既報⁷⁾に述べた。

2) 使用した腫瘍 (樹立株)

実験に供した腫瘍は当教室で継代維持しているヌードマウス可移植ヒト由来腎細胞癌株 (AM-RC-1 および AM-RC-6) で、増殖の安定した継代株 (AM-RC-1 は7代目以降, AM-RC-6 は9代目以降) を target tumor として用い、1群最低6匹とした。両株とも継代移植率はほぼ100%で、対数増殖期における腫瘍体積倍加時間は各々5.38±0.10日, 5.65±0.37日であり、原腫瘍および継代腫瘍の組織学的特徴は既報⁷⁾の通りである。

3) 腫瘍の継代移植法

すでに報告したごとくである⁷⁾。

4) 使用した抗癌剤および投与方法 (Table 1)

実験に用いた抗癌剤は mitomycin C (MMC), adriamycin (ADM), 5-fluorouracil (5FU), 5-fluoro-2'-deoxy-β-uridine (FUDR), cis-platinum diaminodichloride (CDDP), vinblastin (VBL), etoposide (VP-16), human lymphoblastoid interferon (HLBI) の8種類であり、投与方法は HLBI を除いて Battele Columbus Laboratories Protocol (BCLP) の方法⁸⁾に準じて決定した。即ち腫瘍径が6~8 mm に達した時点で、できるだけ大きさの揃った

Table 1. Method of drug administration

Tumor	Drugs	Dose (single)	Intervals	Route
AM-RC-1	MMC	3 mg/kg	q 3~5d×3	i.p.
		1.5 mg/kg		
	ADM	5 mg/kg	q 3 d×3	i.p.
		2.5 mg/kg		
	5FU	50 mg/kg	q 4 d×3	i.p.
		25 mg/kg		
	FUDR	733 mg/kg	q 3 d×3	i.p.
AM-RC-6	MMC	367 mg/kg	q 3 d×3	i.p.
		5.6 mg/kg		
	CDDP	2.8 mg/kg	q 3 d×3	i.p.
		1×10 ⁹ U/kg		
	HLBI	1×10 ⁷ U/kg	daily×10	i.p.
		1×10 ⁷ U/kg		
	VP-16	10 mg/kg	q. 4~5d×3	i.p.

ものを選び、群分けし(1群最低6匹)、原則として通常マウスのLD₅₀値を最大総投与量とし、1/3 LD₅₀値、1/5 LD₅₀値、1/6 LD₅₀値、1/10 LD₅₀値、1/20 LD₅₀値を1回投与量と決め、生理食塩水に溶解して、3~5日ごとに3回その0.5 mlを腹腔内に投与した。HLBIは北原ら⁹⁾の実験を参考にして、ヌードマウスの体重1 kg 当り1×10⁷ unit (U)あるいは1×10⁸ Uを1回投与量とし、可能な限り連日計10回腹腔内に投与を行なった。なお対照群には同量の生理食塩水のみを腹腔内に投与した。

5) 抗腫瘍効果の判定法

AM-RC-1は腫瘍移植後5週過ぎより、またAM-RC-6は4週を過ぎる頃より中心壊死の傾向が強くなるため、移植後4~5週目までに実験が終了するようにし、以下に述べる2つの方法に基づいて抗癌剤の効果判定を行なった。

①腫瘍増殖曲線による効果判定：腫瘍移植後、週2~3回 sliding caliper にて腫瘍の長径(L)および短径(W)を測定し、腫瘍を球状もしくはラグビーボール状と仮定し、 $1/2 (L \times W^2)$ を腫瘍体積として求めた。横軸に腫瘍移植後の日数、縦軸に腫瘍体積(平均値±標準偏差(Mean±SD))を記入し、腫瘍増殖曲線を作製した。抗癌剤の投与開始時、各群間で腫瘍体積にいくぶんばらつきがあるため、投与前と投与後の体積の変化率($\frac{\text{投与後の体積} - \text{投与前の体積}}{\text{投与前の体積}} \times 100$)

の差について治療群と対照群の間で student *t*-testを行ない、腫瘍増殖抑制効果の有無を推計学的に検討した。なお抗癌剤による急性毒性のため体重減少の高度(初回投与時の体重の20%以上の減少)なもの、あるいは感染などによる wasting disease のため全身衰弱の強いものは効果判定の対象から除外した。

②組織学的変化による効果判定：抗癌剤もしくは生理食塩水投与終了後、原則として1週間以内にヌードマウスを sacrifice し、腫瘍を摘出後にその一部を10%ホルマリン液で固定し、hematoxylin-eosine (H-E) 染色の後、光顕的観察に付した。組織学的効果の判定は Shimozato ら¹⁰⁾の国立がんセンター分類に基づいて行なった。さらに電顕標本は光顕用切片に隣接した切片を1 mm 角に細切し、2.5%グルタルアルデヒド液-1%オスミウム酸にて二重固定し、アルコール脱水、酸化プロピレンによる置換、エボン812包埋後、MT2B ウルトラトームにて超薄切片を作製し、酢酸ウラニール-クエン酸鉛二重染色を施行後、日立HU12A型電子顕微鏡にて観察を行なった。

実験結果

実験結果の概要を Table 2 に示した。

1) 腫瘍増殖曲線による各種抗癌剤の腫瘍増殖抑制効果

(A) AM-RC-1

① MMC 投与群 (Fig. 1) : conventional mouse のLD₅₀値(9 mg/kg)を参考にして、1回投与量3 mg/kg、1.5 mg/kgの2群について検定を行なった。3 mg/kg 群では1回目投与時点で対照群との間に推計学的有意差はなかったが($P>0.1$)、2回目投与時点では対照群との間に $P<0.01$ 、3回目投与時点では $P<0.001$ の有意な増殖抑制効果が認められた。1.5 mg/kg 群では投与開始後から実験終了時まで対照群との間に有意差は認められなかった($P>0.1$)。両投与群とも実験期間を通じて体重減少はほとんどみられなかった。

② ADM 投与群 (Fig. 2) conventional mouse のLD₅₀値(15 mg/kg)を参考にして、1回投与量5 mg/kg、2.5 mg/kgの2群についていずれも腹腔内投与で実験を行なった。5 mg/kg 群では1回目投与時点で対照群との間に $P<0.01$ 、2回目投与時点でも $P<0.01$ と有意な増殖抑制効果が認められたが、3回目投与後6匹中2匹が死亡し、3匹が20~31.6%の体重減少をきたしたので、3回目投与終了時点では推計学的検定を行ない得なかった。2.5 mg/kg 群では3回目投与時点における体重減少が6匹とも20%以下(4.5~18.2%)であった。本投与群では投与開始後から実

験終了時まで、対照群との間に推計学的有意差は認められなかった ($P>0.1$).

③ 5FU 投与群: conventional mouse の LD_{50} 値 (250 mg/kg) を参考にして, $1/5 LD_{50}$ 値 (50 mg/kg), $1/10 LD_{50}$ 値 (25 mg/kg) を1回投与量として, この両群について効果を検討した. 50 mg/kg 群では6匹中3匹, 25 mg/kg 群では6匹中2匹に体重減少がみられたが, いずれも5~10%前後であり, 推計学的検定に支障はなかった. 両群とも投与開始から最終投与後まで, 対照群との間に有意差は認められなかった ($P>0.1$).

④ FUDR 投与群: ddY 系マウスの LD_{50} 値 (2,200 mg/kg), $1/2 LD_{50}$ 値 (1,100 mg/kg) を総投与量とし, 1回 733 mg/kg, 367 mg/kg を腹腔内に投与した. 733 mg/kg 群では6匹中4匹に20%以上 (20.9~38.1%), 他の2匹もそれぞれ 11.6%, 19.5% の体重減少が認められ, 急性毒性が考えられたので推計学的検討を行わなかったが, 対照群とはほぼ同様の増殖曲線を示した. 367 mg/kg 群では体重減少は軽微であり, 実験期間を通じて対照群との間に有意な増殖抑制効果は認められなかった ($P>0.1$).

⑤ CDDP 投与群: ICR 系マウスの腹腔内投与における LD_{50} 値 (17 mg/kg) を参考にして, 1回投与量を $1/3 LD_{50}$ 値 (5.6 mg/kg), $1/6 LD_{50}$ 値 (2.8 mg/kg) とし, この2群について抗腫瘍効果を検討した. 5.6 mg/kg 群では最終投与後に6匹中5匹に20%以上 (20.4~24%) の体重減少がみられたので, 2回目投与時点で推計学的検討を試みたところ, 有意差は

認められなかった ($P>0.1$). 2.8 mg/kg 群でも体重減少は6匹全部にみられたが, 20%以下 (2.0~17.4%) であり, 薬剤投与開始後より実験終了時まで推計学的有意差は認められなかった ($P>0.1$).

⑥ HLBI 投与群: 北原⁹⁾ の実験をもとにして1回投与量を 1×10^7 U/kg および 1×10^8 U/kg とし, 10回投与後に効果を検討した. 両群とも体重減少は軽微であり, 投与開始後より実験終了時まで対照群との間に有意な増殖抑制効果は認められなかった ($P>0.1$).

(B) AM-RC-6

① MMC 投与群 (Fig. 3): conventional mouse の LD_{50} 値 (9 mg/kg) および $1/2 LD_{50}$ 値 (4.5 mg/kg) を総投与量とし, 1回 3 mg/kg, 1.5 mg/kg を腹腔内に投与し腫瘍増殖抑制効果を検討した. 3 mg/kg 群では2回目投与後より増殖抑制傾向がみられ, 最終投与後1週間目に推計学的検討を行なったところ, 対照群との間に有意な増殖抑制効果が認められた ($P<0.05$). 1.5 mg/kg 群では一見増殖が抑制されているかのごとき印象を与えるが, 推計学的有意差はなかった ($P>0.1$).

② ADM 投与群: 5 mg/kg, 2.5 mg/kg を1回投与量として増殖抑制効果を検討した. 5 mg/kg 群では2回目投与時点で抑制効果はみられず, 最終投与後は6匹中5匹に20%以上の体重減少がみられたので, 推計学的検定を行ない得なかった. 2.5 mg/kg 群ではいずれも体重減少は軽度であったが, 実験期間を通じて有意な増殖抑制効果は認められなかった ($P>0.1$).

③ CDDP 投与群 (Fig. 4): 1回投与量 5.6 mg/kg,

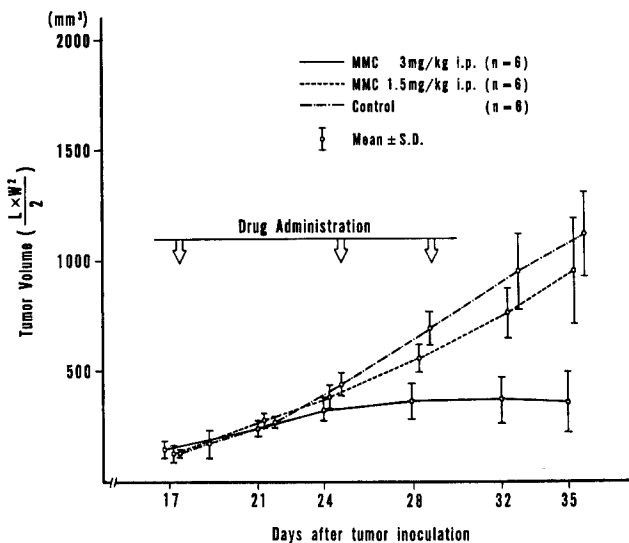


Fig. 1. Effect of mitomycin C against AM-RC-1 (7th passage)

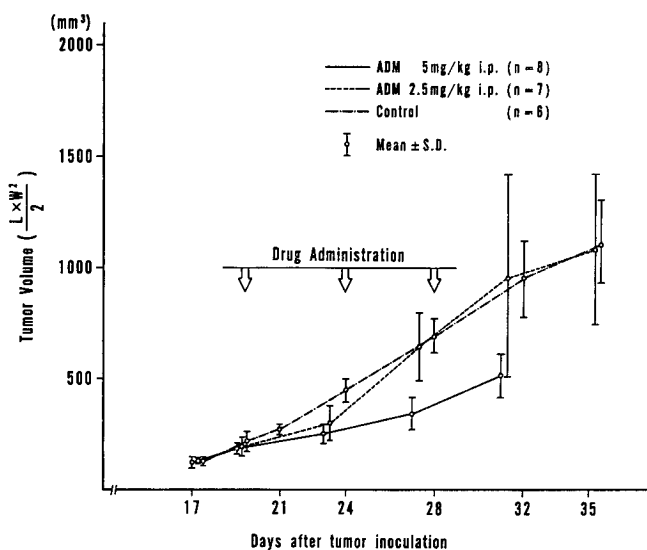


Fig. 2. Effect of adriamycin against AM-RC-1 (7th passage)

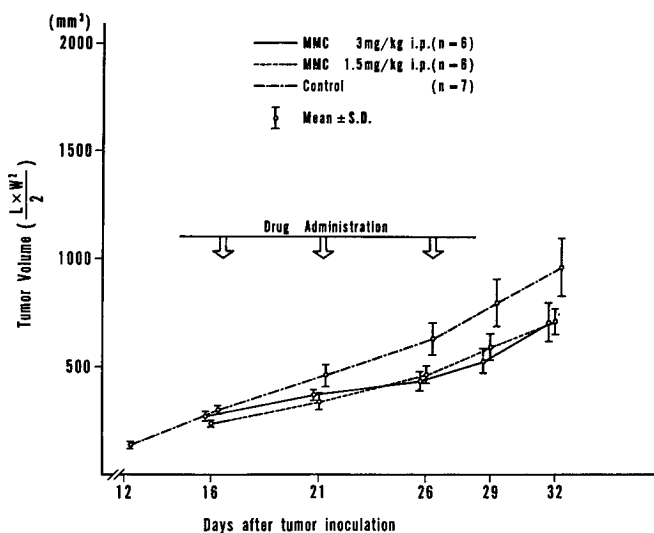


Fig. 3. Effect of mitomycin C against AM-RC-6 (9th passage)

2.8 mg/kg の2群で増殖抑制効果を検討した。5.6 mg/kg 群では6匹中1匹は初回投与後に死亡したが、2回目投与時点での体重減少は5匹とも20%以下(6.8~15%)であり、対照群との間に有意な増殖抑制効果が認められた($P < 0.05$)。しかし最終投与後は5匹中4匹が高度な体重減少を示したため、検討が不可能であった。2.8 mg/kg 群では最終投与時点で6匹全部が20%以下(2.1~16%)の体重減少を示し、投与開始より実験終了まで対照群との間に有意差は認められなかった($P > 0.1$)。

④ VBL 投与群: conventional mouse の腹腔内投与時の LD_{50} 値 (2.7 ± 0.5 mg/kg) を参考にして、1回投与量 1 mg/kg, 0.5 mg/kg にて実験を行なった。両群とも軽度の体重減少をみたが、増殖曲線は対照群とほとんど変わらず、全実験期間を通じて推計学的有意差は認められなかった($P > 0.1$)。

⑤ VP-16 投与群: MF₂ (SPF breed) Albino マウスの腹腔内投与における LD_{50} 値 (105 mg/kg) を基準にして、1回投与量を 10 mg/kg および 5 mg/kg に決め、この両群の腫瘍増殖抑制効果を検討した。10

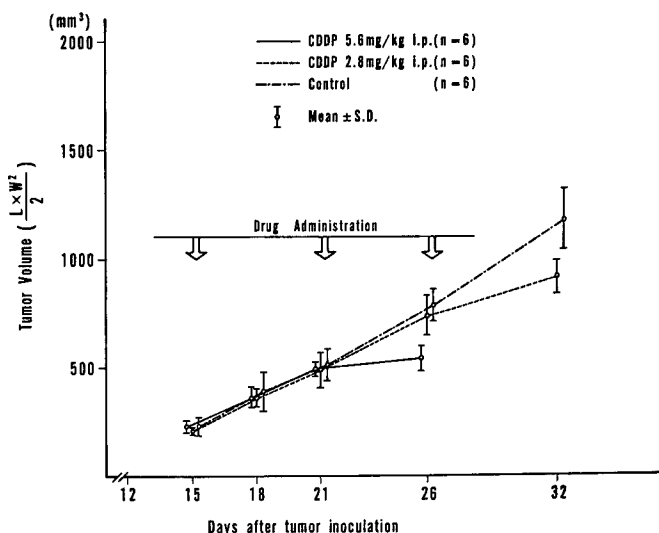


Fig. 4. Effect of cis-platinum against AM-RC-6 (11th passage)

Table 2. Results of anti-tumor effect

Tumor	Drugs	Dose	Tumor growth inhibitory effect (P value)	Histological effect by L.M.(N.C.C.)
AM-RC-1	MMC	3mg/kg	P < 0.001	6 II a
		1.5mg/kg	N.S.	I
	ADM	5mg/kg	N.E.	I
		2.5mg/kg	N.S.	I
	5FU	50mg/kg	N.S.	0
		25mg/kg	N.S.	0
	FUDR	733mg/kg	N.E.	I
		367mg/kg	N.S.	I
	CDDP	5.6mg/kg	N.E.	I
		2.8mg/kg	N.S.	I
AM-RC-6	HLBI	1×10^8 U/kg	N.S.	0
		1×10^7 U/kg	N.S.	0
	MMC	3mg/kg	P < 0.05	I
		1.5mg/kg	N.S.	I
	ADM	5mg/kg	N.E.	I
		2.5mg/kg	N.S.	I
	CDDP	5.6mg/kg	N.E.	0
		2.8mg/kg	N.S.	0
	VBL	1mg/kg	N.S.	0
		0.5mg/kg	N.S.	0
	VP-16	10mg/kg	N.E.	0
		5mg/kg	N.S.	0

N.S.: Not significant (P > 0.1), N.E.: Not Evaluated

mg/kg 群では最終投与後6匹中5匹に高度な体重減少がみられたため、推計学的検定は不可能であった。なお最終投与後より腫瘍増殖が対照群に比して緩徐になっているが、これは抗癌剤の効果によるものかあるいは不良な全身状態に起因するものか明らかでなかった。5 mg/kg 群では体重減少は軽度であり、推計学的検定を行なったところ、有意差は認められなかった (P > 0.1)。

2) 組織学的所見の変化に基づいた各種抗癌剤の抗腫瘍効果

(A) AM-RC-1

(a) 光顕像

①対照群：腫瘍細胞は pleomorphism が著明で、sheet 状あるいは小腺腔に形成して増殖し、核は異型性が高度で mitosis もしばしば認められる。

② MMC 投与群：Fig. 5 は 3 mg/kg 群である。腫瘍細胞は細胞質の腫大、空胞化が著明で、核の濃縮、核の膨化・空胞化、核崩壊、核膜過染および核溶解などの変性・壊死像が広汎に認められ、国立がんセンター分類の grade IIa に相当する所見であった。Fig. 6 は 1.5 mg/kg 群の組織像である。全体的に腫瘍細胞の軽度の変性所見が認められたが、大部分の腫瘍細胞は viable で grade I に相当した。

③ ADM 投与群：Fig. 7 は 5 mg/kg 群である。一部の腫瘍細胞に細胞質の膨化、空胞化、核の膨化など変性所見がみられたが、全体的には grade I の変化であった。2.5 mg/kg 群も 5 mg/kg 群とほぼ同様な所見を示した。

④ 5FU 投与群：50 mg/kg, 25 mg/kg の両群とも腫瘍細胞の異型性は強く、対照群と比べてもまったく組織学的所見の変化は認められなかった。

⑤ FUDR 投与群：733 mg/kg 群 (Fig. 8), 367 mg/kg 群とも腫瘍細胞の一部に細胞質の空胞化、核濃縮、核の膨化などの変性所見が認められたが、全体的には軽度であった (grade I)。

⑥ CDDP 投与群：Fig. 9 は 5.6 mg/kg 群の組

織像である。腫瘍細胞は所々に細胞質の膨化、空胞化、核の崩壊、染色性の低下などがみられるが、大部分は viable な細胞であった。2.8 mg/kg 群も 5.6 mg/kg 群とほぼ同様な変化を示し、両群とも grade I の組織学的効果であった。

⑦ HLBI 投与群： 1×10^8 U/kg (Fig. 10), 1×10^7 U/kg 群とも腫瘍細胞の変性所見はまったく認められなかった。

(b)電顕像

①対照群：Fig. 11 は継代7代目の腫瘍の電顕像である。腫瘍細胞は一部に microvilli がよく発達した腺腔様構造を形成している。核は N/C 比が大きく大型で細胞の中心に存在する。chromatin はほぼ全体に均一に分布し、核小体は明瞭なひも状構造を呈している。細胞質内には粗面小胞体、遊離リボソームが多数認められ、少数の小型ミトコンドリアが散見する。腫瘍細胞は互いにかなり接しているが、デスモゾームは少ない。これらの所見は原腫瘍と極めて類似していた。

② MMC 投与群：Fig. 12 は 3 mg/kg 群である。核膜は不規則で切れ込みがみられ、細胞質内小器官には空胞の増加が認められた。腺腔は開大し、腺腔内には細胞質内小器官の debris が充満し、腺腔に面した一部の腫瘍細胞には electron dense の顆粒もみられ、変性所見を疑わしめた。1.5 mg/kg 群では 3 mg/kg 群でみられたような変化は軽度であった。

③ ADM 投与群：Fig. 13 は 5 mg/kg 群である。腫瘍細胞は腺腔を形成し、多数の microvilli が認められ、腺腔内には debris がみられた。核は N/C 比が大きく、クロマチンは核内に均一に分布している。細胞質内小器官の変化は少ない。間質には膠原線維が増生し、腫瘍細胞を囲繞している像が認められた。2.5 mg/kg 群ではほとんど変性所見はなかった。

④ CDDP 投与群：Fig. 14 は 5.6 mg/kg 群である。腫瘍細胞の核は N/C 比が大きく、クロマチンは均一に分布し、核小体はひも状構造を呈する。腺腔を形成している腫瘍細胞の細胞質内にはやや多数の粗面小胞体と少数のミトコンドリアが存在するが、細胞質内小器官の変化は認められなかった。腺腔内には小器官の debris が充満し、また間質には膠原線維が増生している所見が認められ、場所によっては巨大な autophagic vacuole も散見した。2.8 mg/kg 群でも 5.6 mg/kg 群とほぼ同様の所見であった。

⑤ 5FU および FUDR 投与群：5FU 投与群は 50 mg/kg 群および 25 mg/kg 群とも変性像はほとんどみられなかった。Fig. 15 は FUDR 733 mg/kg

群である。腺腔様構造内に全体に凝固壊死に陥った腫瘍細胞が認められ、小型化し、核凝縮した一部の腫瘍細胞は押しだされている。細胞質内には lamella body を入れた空胞を認めるが、細胞質内小器官の変化は軽度であった。

⑥ HLBI 投与群：Fig. 16 は 1×10^8 U/kg 群で

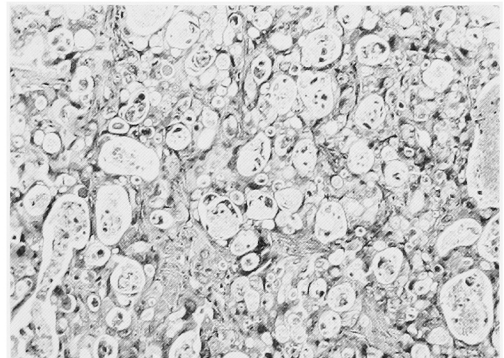


Fig. 5. AM-RC-1 に対する MMC 3 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 50$)

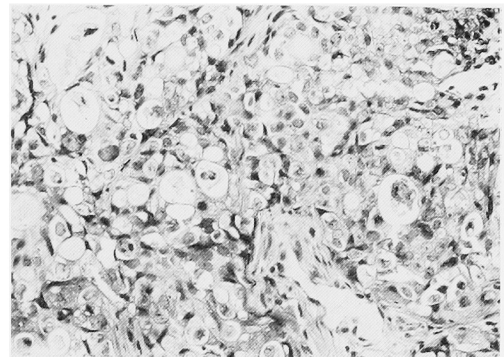


Fig. 6. AM-RC-1 に対する MMC 1.5 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

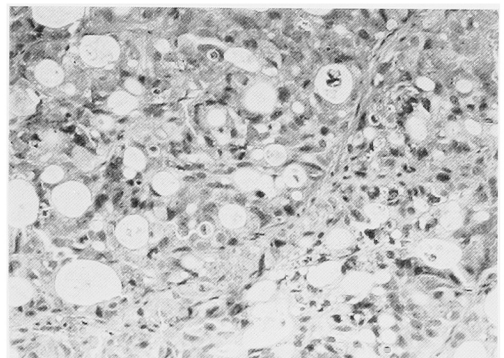


Fig. 7. AM-RC-1 に対する ADM 5 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

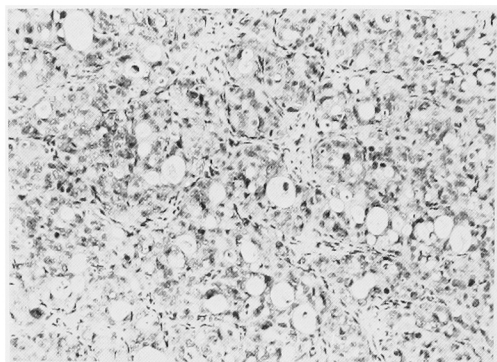


Fig. 8. AM-RC-1 に対する FUDR 733 mg/kg 群の組織像 (H-E染色, $\times 50$)

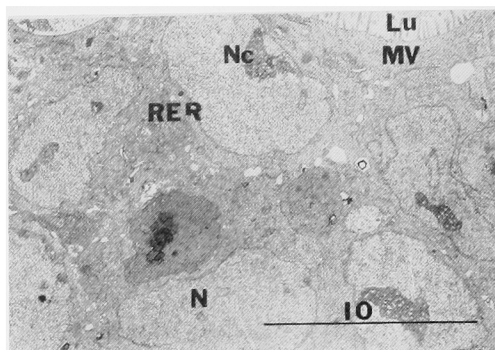


Fig. 11. AM-RC-1 の継代7代目の腫瘍の電顕像 ($\times 6,840$) N: nucleus, Nc: nucleolus, MV: microvilli, Lu: lumen, RER: rough endoplasmic reticulum

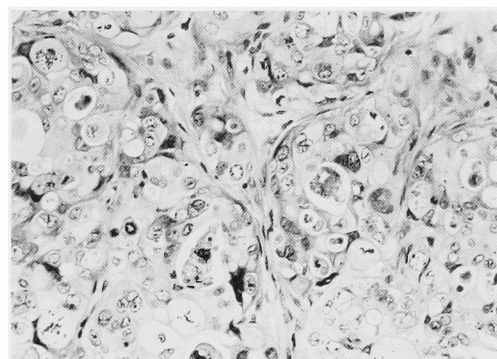


Fig. 9. AM-RC-1 に対する CDDP 5.6 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

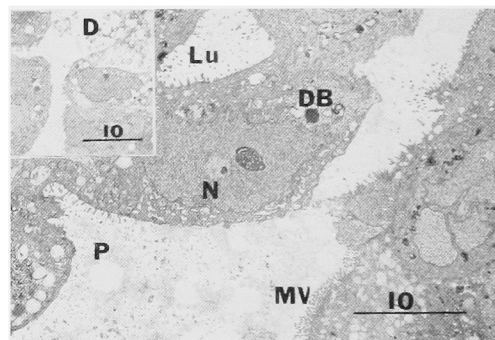


Fig. 12. AM-RC-1 に対する MMC 3 mg/kg 群の電顕像 ($\times 3,990$) N: nucleus, Lu: lumen, DB: dense body, MV: microvilli, D: debris

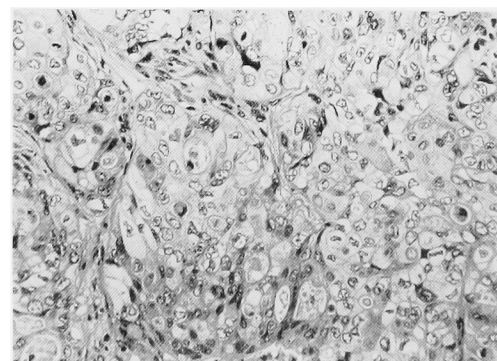


Fig. 10. AM-RC-1 に対する HLBI 1×10^8 U/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 100$)

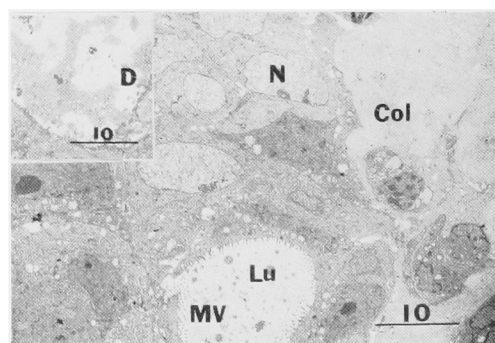


Fig. 13. AM-RC-1 に対する ADM 5 mg/kg 群の電顕像 ($\times 3,990$) N: nucleus, MV: microvilli, Lu: lumen, Col: collagen fiber, D: debris

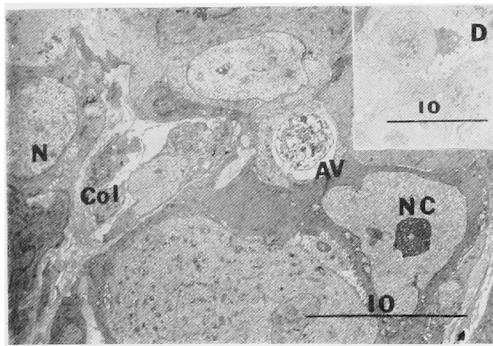


Fig. 14. AM-RC-1 に対する CDDP 5.6 mg/kg 群の電顕像 ($\times 5,760$)
N: nucleus, NC: nucleolus, Col: collagen fiber, AV: autophagic vacuole, D: debris

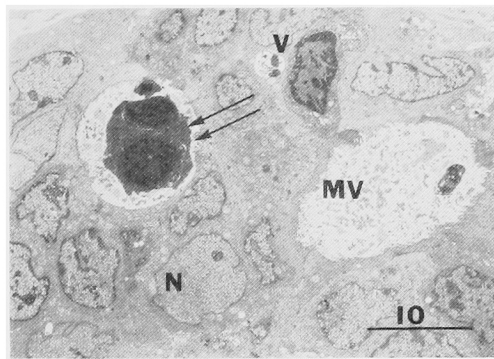


Fig. 15. AM-RC-1 に対する FUDR 733 mg/kg 群の電顕像 ($\times 3,420$)
N: nucleus, MV: microvilli, V: vacuole, $\Rightarrow$ degenerative tumor cell

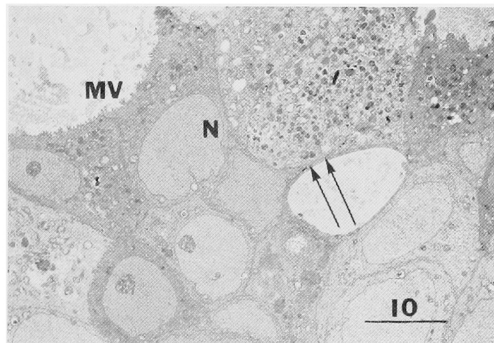


Fig. 16. AM-RC-1 に対する HLBI 1×10^8 U/kg 群の電顕像 ($\times 3,990$)
N: nucleus, MV: microvilli, $\Rightarrow$ one cell necrosis

ある。一部の腫瘍細胞は細胞質内小器官が debris と
して遊離しており one cell necrosis の像を呈して

いるが、他の腫瘍細胞に変化はみられなかった。 1×10^7 U/kg 群も同様の所見であった。

(B) AM-RC-6

(a) 光顕像

① 対照群：腫瘍細胞は淡明で豊富な細胞質と比較的大型の核を有する clear cell および細胞質が好酸性で淡く顆粒状に染まる granular cell からなり、これらの細胞が alveolar pattern を呈して増殖している。核は大小不同で pleomorphism に富み、mitosis も散在し、核小体が顕著である。間質は乏しく、細い毛細血管が腫瘍細胞を取り囲んでいる。本腫瘍は原腫瘍の組織像と極めて類似していた⁷⁾。

② MMC 投与群：Fig. 17 は 3 mg/kg 群の組織像である。対照群と同様に腫瘍細胞は clear cell と granular cell が混在している。腫瘍細胞の一部に細胞質の膨化、核の膨化、核濃縮、核の染色性の低下、核小体の消失などの変性所見が軽度認められるが、大部分の腫瘍細胞は viable で mitosis も豊富である。間質は一部膠原線維を主体とする結合組織の増生をみるが、大部分は薄い壁をもつ毛細血管により構成され、胞巣状に増殖する腫瘍細胞に直接に接している。1.5 mg/kg 群でも 3 mg/kg 群と同様な所見が認められ、両群とも grade I の変化を示した。

③ ADM 投与群：Fig. 18 は 5 mg/kg 群である。全体的に対照群と極めて類似した組織像を示すが、腫瘍細胞の一部に細胞質の膨化、核の膨化、核濃縮、核の染色性の低下などの変性所見が軽度認められた。間質は一部に結合組織特異的膠原線維の増生を認めるが、対照群と同様に主として毛細血管よりなっている。腫瘍組織の中心部に壊死巣が散在するが、抗癌剤による変化よりもむしろ循環障害によるものと考えられた。2.5 mg/kg 群では腫瘍細胞および間質に抗癌剤による変化はほとんど認められなかった。

④ CDDP 投与群：Fig. 19 は 5.6 mg/kg 群である。clear cell と granular cell が混在しているが、clear cell が減少し、granular cell が主体をなし alveolar pattern を呈して増殖している。腫瘍細胞の細胞質および核に抗癌剤による変性所見は認められなかった。2.8 mg/kg 群でも 5.6 mg/kg 群と同様に腫瘍細胞の変化はまったくみられなかった。

⑤ VBL 投与群：Fig. 20 は 1 mg/kg 群の組織像である。全体的に clear cell が少なく、granular cell 優位である。腫瘍細胞の一部に変性所見がみられるが、大部分は viable で、核の大小不同が著明で pleomorphism に富み、mitosis も多数存在する。間質は一部に膠原線維を主成分とする結合組織が増生し

いるが、大多数の腫瘍細胞は毛細血管によって直接囲まれている。0.5 mg/kg 群も 1 mg/kg 群と同様に抗癌剤の効果は軽微であった。

⑥ VP-16 投与群：Fig. 21 は 10 mg/kg 群である。clear cell が比較的少なく、granular cell が優位である。腫瘍細胞は N/C 比が大きく、核は大小不同で pleomorphism に富み mitosis も多い。間質は毛細血管を主成分とし、線維性結合組織は少ない。5 mg/kg 群も 10 mg/kg 群とほぼ同様の組織学的所見を呈し、抗癌剤による変化はほとんど認められなかった。

(b)電顕像

①対照群：Fig. 22 は継代 9 代目の腫瘍の電顕像である。腫瘍細胞は互いに密着し、細胞質内には脂肪顆粒の存在を示唆する electron dense body が認められる。また細胞質の広い範囲にわたって糖原顆粒も認められ、これらが集合して糖原野を形成している。粗面小胞体、小型のミトコンドリアが豊富で、ゴルジ装置も散見するが、細胞質内小器官の発達がそれほど著明でない細胞もある。核は大きく N/C 比が大で、クロマチンは均一に認められる。この所見は原腫瘍のそれと極めてよく類似していた。

② MMC 投与群：Fig. 23 は 3 mg/kg 群である。細胞質の外側に沿って小器官が欠損した空胞変性の像が認められる。残存せる小器官は細胞の中心にあり、大小多数のミトコンドリアおよび electron dense の lamella が多数存在する。核の変化はほとんどなく、核縁は不整で円形、大型の核小体が認められる。1.5 mg/kg 群では変性所見は認められなかった。

③ ADM 投与群：Fig. 24 は 5 mg/kg 群である。広い細胞質の space に細胞質内小器官がほとんど消失しており、watery degeneration の像を呈している。残存せる小器官は細胞質の一部にのみ認められ、小器官の間にも watery degeneration がみられた。また一部の腫瘍細胞では vesicle が細胞質内に充満し、microfibril が認められた。核小体は小型化し、全体に density も増している。2.5 mg/kg 群ではほとんど変化は認められなかった。

④ CDDP 投与群：Fig. 25 は 5.6 mg/kg 群である。核小体は主として granular component からなる。細胞質内には豊富なミトコンドリア、粗面小胞体が認められ、microfibril も存在するが、小器官の変化は少ない。細胞質の一部には watery degeneration が認められる。また one cell necrosis の像もみられた。2.8 mg/kg 群でもほぼ同様の所見であった。

⑤ VBL 投与群：1 mg/kg 群では核内全体に均一にクロマチンが分布し、核小体は球形である。細胞質内には粗面小胞体が多数認められ、糖原野も存在するが、所々に大きな空胞をみる以外に変化はなかった。0.5 mg/kg 群でも 1 mg/kg 群と同様の所見であった。

⑥ VP-16 投与群：10 mg/kg 群、5 mg/kg 群の両群とも抗癌剤によると思われる変化はまったく認められなかった。

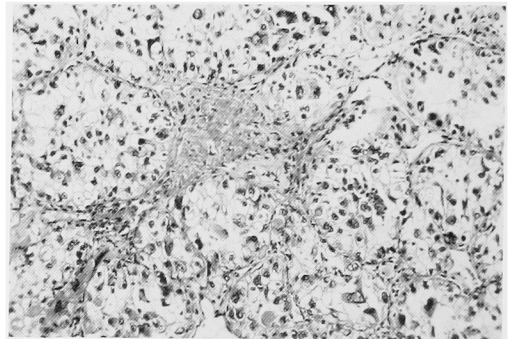


Fig. 17. AM-RC-6 に対する MMC 3 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 50$)

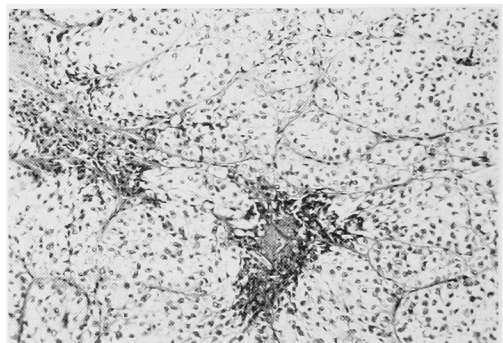


Fig. 18. AM-RC-6 に対する ADM 5 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色 $\times 50$)

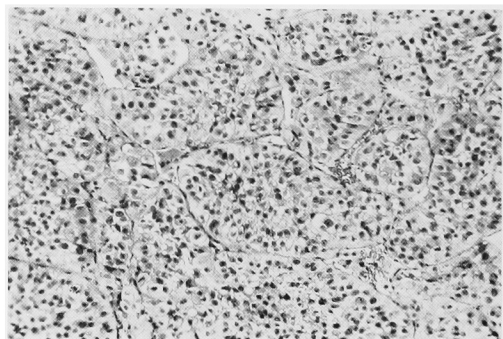


Fig. 19. AM-RC-6 に対する CDDP 5.6 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 50$)

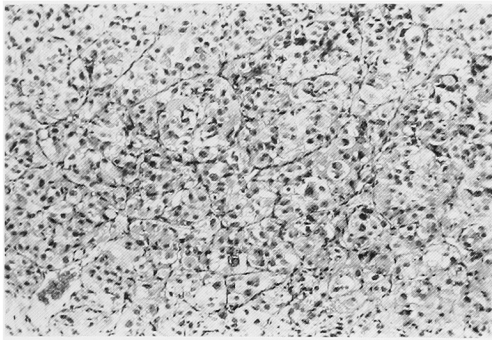


Fig. 20. AM-RC-6 に対する VBL 1 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 50$)

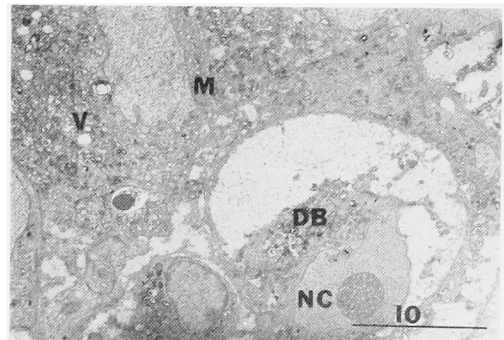


Fig. 23. AM-RC-6 に対する MMC 3 mg/kg 群の電顕像 ($\times 4,560$)
NC: nucleolus, M: mitochondria, V: vacuole, DB: dense body, RER: rough endoplasmic reticulum

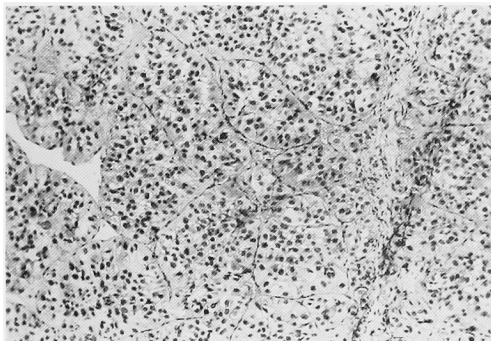


Fig. 21. AM-RC-6 に対する VP-16 10 mg/kg 群の組織像 (H-E 染色, $\times 50$)

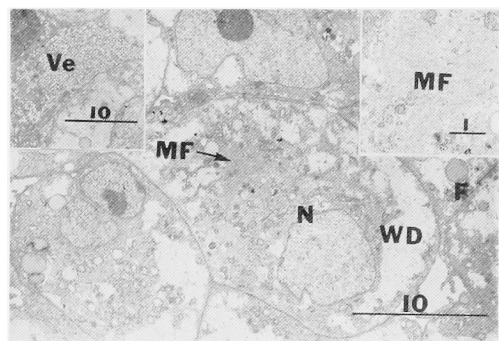


Fig. 24. AM-RC-6 に対する ADM 5 mg/kg 群の電顕像 ($\times 4,560$) N: nucleus, WD: watery degeneration, Ve: vesicle, MF: microfibril

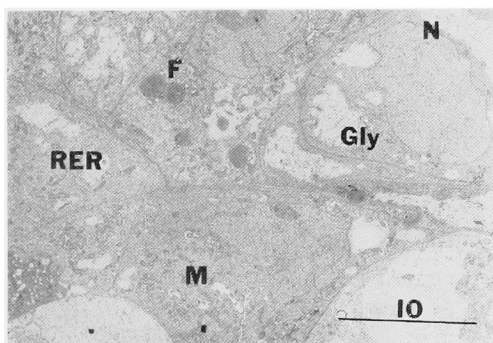


Fig. 22. AM-RC-6 の継代9代目 (対照群) の電顕像 ($\times 4,560$)
N: nucleus, F: fat Gly: glycogen, M: mitochondria, RER: rough endoplasmic reticulum

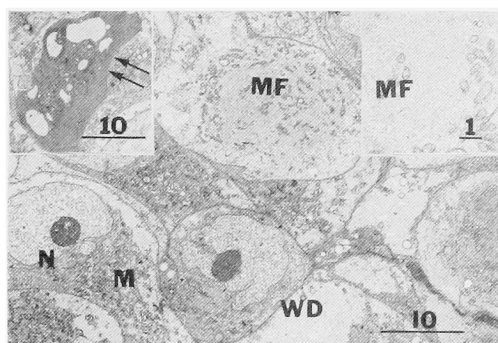


Fig. 25. AM-RC-1 に対する CDDP 5.6 mg/kg 群の電顕像 ($\times 2,850$)
N: nucleus, M: mitochondria, WD: watery degeneration, MF: microfibril, $\Rightarrow$ one cell necrosis

考 察

1) ヒト腎細胞癌移植ヌードマウスに対する各種抗癌剤の効果

MMC の腎細胞癌に対する有効率は極めて低いといわれている。小泉¹¹⁾ はヒト腎癌由来培養細胞株 KN-41 をヌードマウスにもどし移植した固型腫瘍に MMC 2 mg/kg, 3 mg/kg を各1回投与したところ、3 mg/kg 群で有意の増殖抑制効果があり ($P < 0.05$)、組織学的にも grade IIa の変化を示し、全体的に中等度の感受性が認められたと述べている。著者は1回 3 mg/kg, 1.5 mg/kg を各々3回腹腔内に投与し、抗腫瘍効果を検討した。AM-RC-1 に対しては 3 mg/kg 群で著明な増殖抑制効果が認められたが ($P < 0.001$)、1.5 mg/kg 群では対照群との間に有意な抑制効果はみられなかった ($P > 0.1$)。また組織学的変化を検討したところ、3 mg/kg 群に於ては、光顕像で腫瘍細胞の細胞質および核の変性・壊死所見が広汎に認められ (grade IIa)、電顕像でも変性所見が著明であったが、1.5 mg/kg 群では変化が少なく、腫瘍増殖抑制効果と組織学的所見はよく一致した。一方 AM-RC-6 においては、3 mg/kg 群で対照群との間に有意の増殖抑制効果が認められたが ($P < 0.05$)、光顕像では腫瘍細胞の変性所見は軽度で、電顕像でも腺腔内に debris をみるものの、細胞質内小器官の変化は軽微であった。同じヒト腎細胞癌由来でも株 (AM-RC-1, AM-RC-6) によって MMC に対する感受性には明らかな違いが認められた。著者の実験結果は、従来ほとんど期待されなかった MMC の腎細胞癌に対する有効性を示唆するものであり、さらに臨床でも近年投与方法の工夫 (MMC マイクロカプセル) により有効例が報告されている。

Hrushesky ら³⁾ の報告によると、ADM は腎細胞癌に対してまったく効果を示さないが、小泉¹¹⁾ はヒト腎癌由来培養株 KN-41 をヌードマウスに移植して固型化した腫瘍に ADM 5 mg/kg, 10 mg/kg を皮下に投与したところ、両群とも対照群との間に有意の増殖抑制効果が認められ、組織学的にも下里一大星分類の GIIa, GIIb の変化を示したという。大西¹²⁾ もヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株 (JRC9, JRC11) に ADM をマウス LD₅₀ (13.7 mg/kg), 1/2 LD₅₀ (6.85 mg/kg), 1/4 LD₅₀ (3.425 mg/kg) を5回腹腔内に投与したところ、JRC 9 は感受性を示さなかったが、JRC 11 は 1/2 LD₅₀ 投与群で有意の増殖抑制効果が認められたと述べている。また Day ら¹³⁾ はヌードマウス可移植腎細胞癌 14877 に ADM,

CDDP, VBL を投与したところ、腫瘍体積増大の抑制効果は ADM が最も強かったと述べている。著者は 5 mg/kg 群および 2.5 mg/kg 群で抗腫瘍効果を検討した。AM-RC-1 に対しては、5 mg/kg 群において2回目投与時点で対照群との間に有意な増殖抑制効果がみられたが ($P < 0.01$)、最終投与後の評価は急性毒性のため不可能であった。2.5 mg/kg 群では増殖抑制は認められなかった。組織学的にみると、光顕像では両群とも一部の腫瘍細胞に軽度の変性所見 (grade I) をみるのみで、また電顕像でも変化は少なかった。AM-RC-6 に対しては両群とも増殖抑制効果を示さず、組織学的にも変性所見は軽度であり、両株の ADM に対する感受性に多少の違いが認められた。小泉¹¹⁾ の報告では KN-41 腫瘍は ADM に対して高感受性を示し、また大西¹²⁾ は JRC 11 株に ADM 1/2 LD₅₀ 投与群が有効であったと述べている。著者の実験では AM-RC-1 に対して 5 mg/kg 群において2回目投与時点でのみ増殖抑制効果が認められたが、組織学的変化は軽微であった。同じヒト腎細胞癌由来にも拘らず、実験に用いる target tumor の ADM に対する感受性の差あるいは薬剤の投与量、投与時期、投与経路などの違いにより抗腫瘍効果も異なると考えられた。著者は各種抗癌剤の効果を統一した投与方法で比較検討するために、ADM を腹腔内に投与したが、ADM は一般に組織吸着性が強く、腹膜からの吸収が不良であるため、臨床における効果よりも過少評価するおそれがあり、今後は局所投与あるいは静脈内投与にて抗腫瘍効果を検討する必要がある。実際に中島¹⁴⁾、久保田¹⁵⁾ はそれぞれヌードマウス可移植膀胱癌、胃癌に対して ADM を腫瘍周囲皮下に局注し、優れた抗腫瘍効果を認めている。ヌードマウス-人癌 *in vivo* 抗癌剤感受性試験の成績を的確に評価し、かつ臨床に正しく反映させるためには、臨床で試みられている投与方法にできるだけ近い方法を選ぶのが望ましいと考えられるも、ヌードマウスへの腫瘍の移植部位が皮下という特殊な場所を考慮すると、種々の投与方法による各種抗癌剤の体内動態、ことに移植腫瘍への薬剤の到達性を熟知する必要がある。

CDDP は1969年 Rosenberg ら¹⁶⁾ により抗腫瘍活性を有することが明らかにされた白金化合物である。臨床的にも、近年各種の悪性腫瘍に対する優れた抗腫瘍活性が注目され、その有効性が確立されつつあり、泌尿器科領域においても睾丸腫瘍を始めとして膀胱癌、前立腺癌に対する効果が認められている。腎細胞癌に対する CDDP の有効率は現在のところ極めて低

いが、腎組織内濃度の高いことを考えると、投与方法なども含めてさらに検討の余地があると思われる。ヌードマウス可移植腎細胞癌を用いた CDDP の抗腫瘍効果の検討は、すでに川村¹⁷⁾、小泉¹¹⁾、塚本¹⁸⁾、Day¹³⁾により行なわれている。川村¹⁷⁾はヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌 (NM-RC-1) に CDDP 1 回量 10 mg/kg, 5 mg/kg, 2.5 mg/kg を腫瘍移植日 (1日目), 5日目, 9日目の計3回投与を行ない、5 mg/kg, 2.5 mg/kg 群で対照群との間に有意の増殖抑制効果を認めており、光顕所見では両群とも細胞質の膨化、硝子様間質の発達特徴的で、核に変性所見がみられ、また電顕像でも壊死性変化および間質の線維性増殖が認められたと述べている。小泉¹¹⁾はヒト腎癌由来培養株 KN-41 をヌードマウスに移植し固型化した腫瘍に CDDP 2.5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg を各1回投与したところ、10 mg/kg 群にのみ増殖抑制効果が認められ、病理組織学的にも国立がんセンター分類の grade IIa に相当する変化を示した。しかし塚本¹⁸⁾は腎癌株 RCC II に、移植後4週目より、CDDP 5 mg/kg を2週に1回、計2回腹腔内に投与したが、対照群との間に推定腫瘍重量の差は認められなかったと述べている。著者は 5.6 mg/kg, 2.8 mg/kg 群の2群について抗腫瘍効果を検討した。AM-RC-1 に対しては、両群とも有意の増殖抑制効果を示さず、光顕像でも腫瘍細胞の変性所見は軽度であった (grade I)。また電顕像では一部に autophagic vacuole が出現し、間質に膠原線維の増生をみ、川村¹⁷⁾の報告した所見に類似しているが、細胞質内小器官の変化はほとんどなかった。AM-RC-6 においても、両群とも増殖抑制効果および光顕所見の変化を示さず、電顕像で腫瘍細胞の一部に watery degeneration が認められたに過ぎなかった。ヌードマウス可移植ヒト腎細胞癌に対して CDDP が有効であるという川村¹⁷⁾、小泉¹¹⁾の実験成績は CDDP が臨床においても期待されうる可能性を示唆しているものの、残念ながらもとの患者に臨床応用されるに至っていない。したがって、今後はヌードマウスの実験結果と臨床効果の関連性についても検討する必要があると考えられる。

Hrushesky³⁾によると 5FU の腎細胞癌に対する有効率は10%程度と低いが、本邦では肺転移巣が完全消失した例も報告されている^{19,20)}ことから、症例によっては期待できる薬剤である。ヌードマウス可移植ヒト腎細胞癌を用いて 5FU の抗腫瘍効果を検討した報告は極めて少ない。大西¹²⁾は JRC-9, JRC-11 に対して 5FU 1回 1/4 LD₅₀ (20.08 mg/kg), 1/8 LD₅₀ (10.04 mg/kg) を腫瘍移植3日目より連続5

日間腹腔内に投与したところ、両株とも 1/4 LD₅₀ 投与群にて有意の増殖抑制効果がみられたと述べている。著者は AM-RC-1 に対して、50 mg/kg, 25 mg/kg を1回投与量とし、計3回投与後に効果を検討した。両群とも腫瘍増殖曲線および組織学的所見のいずれにおいても抗腫瘍効果はまったく認められなかった。5FU は下山²¹⁾によると time dependent の抗癌剤であり、臨床効果発現までに比較的長期間を要するため、本実験における投与方法のように短期間で効果を判定することにはいくぶん問題があり、臨床に用いられる投与方法に近い方法で検討する必要がある。さらに松田²²⁾は 5FU のように皮膚よりも他の臓器に高濃度に分布するような薬剤をヌードマウスの皮下に移植された腫瘍に対して投与した場合、薬効を過少評価する可能性があるため、投与薬剤のヌードマウスでの体内分布特性を考慮する必要があると述べている。

FUDR は Heiderberger²³⁾により合成された 5FU の誘導体であり、*in vitro*において 5FU に比し著しく強い殺腫瘍細胞効果に示し、副作用も 5FU より少ないことが明らかにされたことから、臨床応用が期待できる薬剤である。ヌードマウス可移植腎細胞癌を target tumor として抗腫瘍効果を検討した報告は見当たらない。著者は ddY 系マウスの腹腔内投与における LD₅₀ 値 (2,200 mg/kg) を参考にして、1/3 LD₅₀ 値, 1/6 LD₅₀ 値を1回投与量とし、AM-RC-1 に対する効果を検討したが腫瘍増殖抑制効果はみられず、組織学的にも一部の腫瘍細胞に変性所見を認めたに過ぎなかった。しかし本剤が 5FU の誘導体であることを考えると、薬剤特性を配慮した検討が必要であろう。

VBL は現在のところ、腎細胞癌に対して最も有効な抗癌剤の一つといわれているが、Hrushesky³⁾の報告でも、objective response は25%に過ぎない。川村¹⁷⁾はヌードマウス可移植腎細胞癌に VBL 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg, 2.0 mg/kg を投与したところ、いずれの投与群でも増殖抑制効果はなく、組織学的にもあまり変化はみられなかったと述べている。大西¹²⁾は JRC9, JRC 11株に対して LD₅₀ (2.7 mg/kg), 1/2 LD₅₀ (1.35 mg/kg), 1/4 LD₅₀ (0.675 mg/kg) を週1回、計5回投与した結果、JRC 11株の LD₅₀ 投与群においてのみ、第1週目より腫瘍増殖抑制効果があり、第4週目より有意差が認められたと述べている。著者は 1 mg/kg, 0.5 mg/kg を1回投与量とし、AM-RC-6 に対する抗腫瘍効果を検討したが、両群とも増殖抑制効果はみられず、組織学的変化も軽度であった。

VP-16 はマンダラゲ (*podophyllum peltatum*) から抽出された podophyllotoxin の半合成誘導体である。臨床的には肺癌、悪性リンパ腫などに有効であり、泌尿器科領域でも睾丸腫瘍、膀胱癌に用いられ、有効例が報告されているが、腎細胞癌に対する効果は明らかでない。ヒト腎細胞癌に対する VP-16 の抗腫瘍効果に関する基礎的研究は極めて少ない。久住ら²⁴⁾ はヒト腎癌由来培養細胞株 KN-41 を target tumor とし、*in vitro* のコロニー形成法を用いて殺細胞効果を検討している。一方ヌードマウス可移植腎細胞癌を用いた実験としては、大西ら¹²⁾ が JRC 9, JRC 11 株に対して種々の量で VP-16 を投与しているが、有意の増殖抑制効果を認めていない。著者は MF₂ Albino マウスの腹腔内投与における LD₅₀ 値 (105 mg/kg) を参考に 1 回投与量を 10 mg/kg, 5 mg/kg としたが、両投与群とも増殖抑制効果を示さず、組織学的にもほとんど変化は認められなかった。

インターフェロン (以下 IFN) は 1957 年 Isacacs と Liedermann によりウイルス増殖抑制物質として発見されたが、ヒト悪性腫瘍に対する有効性を最初に報告したのは Strander ら²⁵⁾ であり、以後各種悪性腫瘍に対する IFN (α , β , γ) の効果が検討されてきた。泌尿器科領域では Ikic ら²⁶⁾ が乳頭状膀胱腫瘍に IFN- α を膀胱内および筋肉内に投与し良好な成績をおさめている。腎細胞癌に対しても、近年各種 IFN の応用が試みられ、deKernion ら⁵⁾, Quesada ら⁴⁾ によると α -IFN の有効率は各々 39.5%, 36.5% で、従来の抗癌剤の治療成績より優れ、今後臨床への導入が期待されているが、その作用機序、至適投与法などの解明はまだ十分でなく、人癌-ヌードマウス系を用いた実験での検討は意義が深いと思われる。ヌードマウス可移植腎細胞癌を実験モデルとして、IFN の抗腫瘍効果を検討した研究はみられない。今回著者は Burkitt lymphoma の Namalva line を Sendai virus で誘導した HLBI を、北原ら⁹⁾ の実験を参考に、1 回 1×10^7 U/kg, 1×10^8 U/kg を 10 日間腹腔内に投与し、AM-RC-1 株に対する効果を検討したが、本投与群では増殖抑制効果および組織学的変化は認められなかった。今後は投与量、投与経路などを変え、一方、他の IFN あるいは抗癌剤との併用による効果を検討する必要がある。

2)ヌードマウス可移植人癌を用いた抗癌剤感受性試験の現況と展望

癌治療において化学療法が果たしてきた役割は極めて大きく、これまで多数の抗癌剤が臨床に用いられ、良好な治療成績をあげているが、一方ではその効果がほ

とんど期待できない腫瘍もあり、残された課題は少なくない。人癌に対する抗癌剤の効果を臨床応用の前に、予め正確に知ることの一つである。癌化学療法を合理的かつ有効に行なうためには、腫瘍・薬剤・宿主の相互関係を考慮することは勿論であるが、個々の癌に対して最も感受性の高い薬剤の選択が必須条件であり、そのために今日まで種々の *in vitro* および *in vivo* 抗癌剤感受性試験が行われてきた。1977 年に Salmon, Hamburger²⁷⁾ により開発された Human tumor stem cell assay は、*in vitro* 感受性試験としては現在最も注目されているものであり、生体より採取した腫瘍細胞を二重軟寒天培地で短期間培養し、薬剤の抗癌効果をみる方法である。コロニー形成能が低いこと、手技が繁雑であること、薬剤濃度の設定および薬剤の接触方法、感受性の判定法などの問題点が明らかにされているが、従来の方法に比して臨床効果との相関性が高いことから、優れた方法としてその実用性が検討されている。しかし抗癌剤の生体内における複雑な薬理動態を考慮すると、*in vivo* 感受性試験の方がより望ましい。ヌードマウス可移植人癌は継代を重ねても、形態学的および機能的特徴のみならず抗癌剤感受性の面でも原腫瘍の特徴をよく維持しており、これを用いた感受性試験はより生体に近い条件下で行なわれるため、臨床効果の予見性の高い方法として期待され、その有用性が検討されてきたが²⁸⁾、同時に問題点も明らかにされた。ヌードマウス可移植人癌を用いた感受性試験の結果が臨床に应用されるためには、1)初代移植成功率および継代率が高く、腫瘍の増殖速度が均一で、かつ個々の腫瘍間のばらつきが少ないこと、2)移植腫瘍が原腫瘍の抗癌剤感受性を保ち、かつ継代により感受性の変化を示さないこと、3)短期間で抗癌剤の効果を判定できることなどが不可欠の条件とされている^{14,29)}。諸家の報告によると、人癌のヌードマウスへの生着率は、全体的にみて決して良好とはいえない。そのゆえ生着率を向上させるための種々の工夫が試みられてきた。全身放射線照射もその一つであり、Watanabe ら³⁰⁾ によると造血系腫瘍株のヌードマウスへの移植実験では、脾摘後に放射線を追加すると生着率の向上がみられた。また Ohsugi ら³¹⁾ は、抗リンパ球血清投与および X 線照射がリンパ系腫瘍株の生着率を改善するのに有効であったと述べている。一方河村ら³²⁾ はヒト消化器癌の移植に際して、抗マクロファージ血清の投与が生着を高めたと報している。ヌードマウスへの人癌の移植部位は通常皮下であるが、Epstein ら³³⁾, Giovanella ら³⁴⁾ は、培養細胞株あるいは手術材料を脳内に移植し、極めて高

い生着率を得た。渡辺ら³⁵⁾は脳内接種を実験系として使用する場合には、少数の細胞でよい点、生存期間が皮下移植より短い点などから抗癌剤感受性試験に適しているが、それに際しては血液-脳関門の存在を考慮する必要があると述べている。以上のように種々の方法が試みられているにも拘らず、満足すべき生着率は現在なお得られていない。人癌の抗癌剤に対する感受性がヌードマウス移植系において維持されているか否かについては、臨床例との対比で肯定的な報告が多く³⁶⁻³⁸⁾、継代による感受性の変化も一般に認められないが、継代中に感受性が変化したという報告もあり³⁹⁾、したがってヌードマウスを用いた抗癌剤感受性試験の結果を正しく評価するためには、継代により感受性に变化のないことを絶えず確認しておく必要がある。in vivo ヌードマウス感受性試験の結果を臨床に導入するためには、短期間で抗癌効果が判定できることが不可欠であるが、現在一般に行なわれている皮下移植法は効果判定に数カ月を要し、実用的とはいえない。Bogden ら⁴⁰⁾は短期間で感受性試験の結果を得る目的で、腎被膜下移植法を考案した。本法では腫瘍移植後11日目に判定が可能であるが、ヌードマウスでの人癌の生着率が30%と低いと、さらに彼らはBDFマウスにCPMの前処置を施行し、生着率を高めると同時に6日目に効果判定ができる方法(6日法)を報告した。この6日法は、1) 比較的安価であること、2) 1週間以内に判定が可能なこと、3) 腫瘍の種類を問わず、評価可能率が高いこと、4) 臨床効果との一致性が高いことなどの長所を有するため、各研究者により臨床への導入が検討されつつある。ヌードマウス可移植人癌を用いた抗癌剤感受性試験を個々の人癌に対してルーチンに臨床に応用するには、既述のごとく問題点が多い。しかし感受性のある抗癌剤を予め正確に知ることのできる理想的な感受性試験がない現在、ヌードマウスを用いた実験系により、各種人癌の抗癌剤に対する感受性の傾向を把握することも重要であり、そのためには統一された抗癌剤の投与方法および効果判定法に基づいて、相互に比較検討された実験結果の集積が必要である。薬剤の投与量、投与経路、投与間隔、投与開始時期については、できる限り臨床における投与条件に近い方法を選ぶべきであるが、実験対象が一般に皮下固型腫瘍であるために薬剤の腫瘍組織への到達性などを含めた体内動態を十分に考慮する必要がある。現在のところ確立された投与方法はなく、種々の方法が試みられているが⁴¹⁻⁴⁴⁾、近年Ovejera, Houchens⁸⁾の方法(BCLP法)、即ち腫瘍を球状もしくはラグビーボール状と仮

定し、移植後長径(L)および短径(W)を週2回mm単位で測定し、 $1/2(L \times W^2)$ から推定腫瘍重量を算出し、腫瘍重量が100~300mgに達した時点で薬剤投与を開始する方法が標準化しつつある。著者が実験に用いた腫瘍は移植後数日を経過すると血管新生がみられ、生着率もほぼ100%であるが、腫瘍の増殖速度は必ずしも均一ではなく、なかには異常増殖を示すものも含まれるため、腫瘍の生着を確認後、腫瘍径が6~8mmに達した時点でBCLPの方法に準じて投与を行なった。抗癌剤の効果判定には、腫瘍重量の変化による方法、腫瘍増殖曲線から増殖抑制をみる方法、組織学的変化による方法、tumor markerを用いる方法、autoradiography(ARG)法を利用する方法、延命効果をみる方法などがあり、それぞれ一長一短を有するが、最も一般的な方法は腫瘍増殖曲線を用いる方法、組織学的判定法、相対平均腫瘍重量比から判定する方法である。腫瘍増殖曲線を用いる方法は、対照群の対数増殖法を確認できる利点を有し、対照群との間に推計学的処理を行なうことにより信頼性の高い方法であり¹⁵⁾、組織学的判定法は腫瘍増殖抑制と組織学的変化が一致することから用いられており、腫瘍重量による方法の欠点である腫瘍産生物あるいは中心壊死の影響をカバーできるが¹⁵⁾、定量的評価が困難である。相対平均腫瘍重量比を用いる方法は組織学的判定法との相関性が高く、BCLPの効果判定法として採用されている。tumor markerを指標とする方法は、markerを産生しない腫瘍の場合には適用できないため、普遍的方法とはいえないが、人癌移植ヌードマウスの血中に認められるヒトLDHが腫瘍増殖のmarkerになり得るとの報告があり^{45,46)}、中野ら⁴⁷⁾も担癌ヌードマウスの血清中のヒトLDHsは腫瘍増殖とよく相関し、腫瘍重量による方法よりも鋭敏であると述べている。谷ら⁴⁸⁾は増殖・継代率が30~40%であること、人癌のヌードマウスでの増殖は非常に緩慢なものが多いことから、増殖抑制を指標とした場合、臨床上問題があると述べ、効果判定として組織学的判定法とARG法を採用し、臨床効果との一致性を報告している。著者は腫瘍増殖曲線による増殖抑制および組織学的変化に基づいて効果判定を行なった。AM-RC-1, AM-RC-6はいずれも、腫瘍移植後4~5週を過ぎる頃より中心壊死が進むため、その期間内に実験が終了するように抗癌剤を投与したところ、増殖抑制効果と組織学的効果は比較的良好に一致した。担癌ヌードマウスを用いた抗癌剤感受性試験の結果と臨床効果が極めてよく一致するという成績が、近年相次いで報告されているが、ルーチンの感受性試験として

個々の患者の primary tumor を用いる場合、生着率が低いことと効果判定までに時間がかかることから問題があり、むしろ新抗癌剤の二次スクリーニングとして期待されている。事実米国 NCI では、従来の抗癌剤スクリーニングシステムの効率化を図るため、3種のヌードマウス可移植人癌（結腸癌 CX-1, 乳癌 MX-1, 肺癌 LX-1）を用いて二次のスクリーニングが行なわれ、その有用性が認められており⁴⁹⁾、今後わが国においても実用的価値が大きいと思われる。

結 語

当教室で継代維持しているヌードマウス可移植ヒト腎細胞癌3株のうち、原腫瘍の組織学的特徴をよく保持し、かつ増殖の安定した2株（AM-RC-1 は7代目以降、AM-RC-6 は9代目以降）を用いて、各種抗癌剤（AM-RC-1 に対しては MMC, ADM, 5FU, FUDR, CDDP, HLBI ; AM-RC-6 に対しては MMC, ADM, CDDP, VBL, VP-16）の感受性試験を行ない、腫瘍増殖曲線および組織学的所見の変化に基づいて抗腫瘍効果を検討し、以下の実験結果を得た。

1) 腫瘍増殖曲線よりみて、推計学的に有意な増殖抑制効果がみられたものは、AM-RC-1 においては MMC 3 mg/kg 群のみであった ($P<0.001$)。ADM 5 mg/kg 群では2回目投与時点で増殖抑制効果がみられたが ($P<0.01$)、最終投与後に強い急性毒性が出現したため、有意差検定ができなかった。AM-RC-6 においても同様に、MMC 3 mg/kg 群のみが有意な増殖抑制効果を示した ($P<0.05$)。

(2) 光顕レベルでの組織学的変化を検討したところ、AM-RC-1 では MMC 3 mg/kg 群において、腫瘍細胞の細胞質の膨化、空胞化が著明で、核の濃縮、核の膨化、空胞化、核崩壊、核膜過染、核溶解などの変性所見が広汎に認められた（国立がんセンター分類の grade IIa に相当）が、他の投与群では変化はほとんどなく grade 0~I であった。一方 AM-RC-6 では著明な変性所見を示した抗癌剤はまったくみられず、すべて grade 0~I の変化であった。

(3) 電顕レベルでの組織学的変化をみると、AM-RC-1 では MMC 3 mg/kg 群において、細胞質内小器官の空胞の増加が目立ち、腺腔内に debris が大量に充満していた。ADM 投与群では 5 mg/kg 群において、腺腔内に debris の貯留がみられたが、細胞質内小器官の変化は少なかった。CDDP 投与群では 5.6 mg/kg および 2.8 mg/kg の両群において、細胞質内に autophagic vacuole が散見し、間質に膠原

線維の増生がみられたが、細胞質内小器官の変化はほとんど認められなかった。AM-RC-6 では MMC 3 mg/kg 群において、細胞質内に軽度の空胞変性のみられ、また ADM 5 mg/kg 群、CDDP 5.6 mg/kg 群、2.8 mg/kg 群において、細胞質に watery degeneration が認められた。

(4) 腫瘍増殖曲線による増殖抑制効果と組織学的変化は、AM-RC-6 に対する MMC 3 mg/kg 群を除いてよく一致した。

稿を終えるにあたり、終始深甚なる御指導、御校閲を賜りました名古屋大学医学部泌尿器科三矢英輔教授に深謝致します。また本研究に際し常に適切なる御指導、御助言を頂きました愛知医科大学泌尿器科瀬川昭夫教授、病理学的検索に際し、御指導を賜った愛知医科大学第一病理学花之内基夫助教授（現在中労災病院病理部長）に厚く感謝致します。さらに御協力下さった教室員諸兄に御礼申し上げます。なお本論文の要旨の一部は第32回泌尿器科中部連合総会にて発表した。

文 献

- 1) deKernion JB, Ramming KP and Smith RB: The natural history of metastatic renal cell carcinoma: a computer analysis. *J Urol* 120: 148~152, 1978
- 2) deKernion JB: Treatment of advanced renal cell carcinoma—traditional methods and innovative approaches. *J Urol* 130: 2~7, 1983
- 3) Hrushesky WJ and Murphy GP: Current status of the therapy of advanced renal carcinoma. *J Surg Oncol* 9: 277~288, 1977
- 4) Quesada JR, Swanson DA, Trindade A and Gutterman JU: Renal cell carcinoma: anti-tumor effects of leukocyte interferon. *Cancer Res* 43: 940~947, 1983
- 5) deKernion JB, Sarna G, Figlin R, Lindner A and Smith RB: The treatment of renal cell carcinoma with human leukocyte alpha-interferon. *J Urol* 130: 1063~1066, 1983
- 6) Povlsen CO and Rygaard J: Effect of cyclophosphamide (Endoxan) on Burkitt's lymphoma serially grown in nude mice. *Proceeding of the first international workshop on nude mice*, pp. 285~292, Gustav Fischer verlag, Stuttgart, 1974
- 7) 本多靖明 ヒト尿路性器悪性腫瘍のヌードマウス

- への異種移植。一移植成績と移植腫瘍の性状一。
泌尿紀要 **32**: 1411~1422, 1986
- 8) Ovejera AA, Houchens DP and Barker AD : Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann Clin Lab Sci* **8**: 50~56, 1978
- 9) 北原武志・下山正徳・漢 啓輔・木村禧代二・ヌードマウス移植ヒトがん細胞株に対するヒト線維芽細胞インターフェロンの抗腫瘍性. 最新医学 **37**: 1446~1448, 1982
- 10) Shimosato Y, Oboshi S and Baba K : Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinomas. *Jap J Clin Oncol* **1**: 19~35, 1971
- 11) 小泉久志：ヌードマウスにおける膀胱癌由来培養細胞 KK-47 および腎癌由来培養細胞 KN-41 移植腫瘍の抗癌剤感受性の検討. 日泌尿会誌 **74**: 704~718, 1984
- 12) 大西哲郎・増田富士男 ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌による治療実験の研究. 第2報：抗癌剤の感受性試験. 日泌尿会誌 **75**: 1911~1920, 1984
- 13) Day JW, Shrivastav S, Lin G, Bonar RA and Paulson DF: In vitro chemotherapeutic testing of urologic tumors. *J Urol* **125**: 490~492, 1981
- 14) 中島 均：ヒト泌尿生殖器悪性腫瘍の異種移植に関する研究（第Ⅱ報），ヌードマウス可移植性ヒト膀胱癌に対する治療実験ならびにハムスターへの移植実験. 日泌尿会誌 **70**: 849~866, 1979
- 15) 久保田哲朗・阿部令彦・石引久弥：化学療法とヌードマウス. 診断と治療 **67**: 618~623, 1979
- 16) Rosenberg B, VanCamp L, Trosko JE and Mansour VH: Platinum compounds: A new class of potent antitumor agents. *Nature* **222**: 385~386, 1969
- 17) 川村直樹：ヒト泌尿生殖器系悪性腫瘍の異種移植に関する研究。（第Ⅳ報），ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌に対する数種制癌剤の治療実験. 日泌尿会誌 **73**: 1375~1394, 1982
- 18) 塚本泰司・熊本悦明：ヒト尿路生殖器癌の可継代腫瘍を用いた抗癌剤の効果検討. ヒト尿路生殖器癌の Nude Mouse 異種移植に関する検討（第2報）. 日泌尿会誌 **74**: 1297~1312, 1983
- 19) 公平昭男・近藤猪一郎：5-FU dry syrup 使用の経験. 癌と化学療法 **4**: 1101~1105, 1977
- 20) 増田富士男・町田豊平・木戸 晃・田代和也：腎細胞癌の肺転移. 日泌尿会誌 **70**: 668~677, 1979
- 21) 下山正徳：抗がん剤の殺細胞作用の様式からみた適切な投与法. 最新医学 **28**: 850~859, 1973
- 22) 松田 明・吉岡 修・岡田享子・海老原和雄・青柳祥子・高橋克俊・倉持 浩・梅澤浜夫：人癌移植ヌードマウスを用いる化学療法の研究. 癌と化学療法（特集号）**6**: 77~86, 1979
- 23) Bosch L, Harbers E and Heidelberger C : Studies of fluorinated pyrimidines : V. Effects on nucleic acid metabolism in vitro. *Cancer Res* **18**: 335~343, 1958
- 24) 久住治男・中嶋和喜・黒田恭一：VP-16 のヒト膀胱癌由来培養細胞 KK-47, KW-103, RT4 およびヒト腎癌由来培養細胞 KN-41 に対する in vitro の殺細胞効果. 泌尿紀要 **27**: 771~774, 1981
- 25) Strander H, Cantell K, Carlstrom G and Jakobsson PA : Clinical and laboratory investigations on man: Systemic administration of potent interferon to man. *J Natl Cancer Inst* **51**: 733~742, 1973
- 26) Ikic D, Nola P, Maricic Z, Smudj K, Oresic V, Knezevic M, Rode B, Jusic D and Soos E: Application of human leucocyte interferon in patients with urinary bladder papillomatosis, breast cancer and melanoma. *Lancet* **1**: 1022~1024, 1981
- 27) 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 *New Engl J Med* **298**: 1321~1327, 1978
- 28) Rygaard J and Povlsen CO : Heterotransplantation of a human malignant tumor to nude mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* **77**: 758~760, 1969
- 29) 久保田哲朗・下里幸雄：ヌードマウス移植腫瘍の特性と治療. 人癌とヌードマウス, 下里幸雄, 玉置憲一, 第1版, pp. 158~163, 医歯薬出版, 東京, 1982
- 30) Watanabe S, Shimosato Y, Kuroki M, Sato Y and Nakajima T : Transplantability of human lymphoid cell line, lymphoma, and leukemia in splenectomized and/or irradiated

- ted nude mice. *Cancer Res* **40**: 2588~2594, 1980
- 31) Ohsugi Y, Gershwin ME, Owens RB and Nelson-Rees WA: Tumorigenicity of human malignant lymphoblasts: comparative study with unmanipulated nude mice, antilymphocyte serum-treated nude mice, and X-irradiated nude mice. *J Natl Cancer Inst* **65**: 715~718, 1980
- 32) 河村栄二・宮川 健・黒河輝久・豊田 元・鈴木達夫・川久保安朗・高山光太郎・三浦八重: スードマウスへ移植されたヒト消化器癌の可移植性向上と化学療法の検討. *日癌治会誌* **13**: 689~699, 1978
- 33) Epstein AL, Herman MM, Kim H, Dorfman RF, Dath MRC and Kaplan HS: Biology of the human malignant lymphomas III. Intracranial heterotransplantation in the nude, athymic mouse. *Cancer* **37**: 2158~2176, 1976
- 34) Giovanella B, Nilsson K, Zech L, Yim O, Klein G and Stehlin JS: Growth of diploid, Epstein-Barr virus-carrying human lymphoblastoid cell lines heterotransplanted into nude mice under immunologically privileged conditions. *Int J Cancer* **24**: 103~113, 1979
- 35) 渡辺 昌・佐藤雄一・黒木将仁・中島 孝・北原武志・蜂谷哲他: 化学療法と Blood Brain Barrier の研究. *日血会誌* **44**: 70, 1981
- 36) Povlsen CO and Jacobsen GK: Chemotherapy of a human malignant melanoma transplanted in the nude mouse. *Cancer Res* **35**: 2790~2796, 1975
- 37) 田口鐵男・薄金真雄・藤田昌英・中野陽典・早田敏: Nude Mouse を用いた制癌剤感受性試験について. *最新医学* **33**: 2300~2305, 1978
- 38) Kubota T, Shimozato Y and Nagai K: Experimental chemotherapy of carcinoma of the human stomach and colon serially transplanted in nude mice. *Gann* **69**: 299~309, 1978
- 39) Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR, Gulkin TA and Johnson RK: Effect of serial passage in nude athymic mice on the growth characteristics and chemotherapy responsiveness of 13762 and R3230AC mammary tumor xenografts. *Cancer Res* **38**: 59~64, 1978
- 40) Bogden AE, Kelton DE, Cobb WR and Esber HJ: A rapid screening method for testing chemotherapeutic agents against human tumor xenografts. *Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research*, pp. 231~250, Gustav Fischer, New York, Stuttgart, 1978
- 41) 久保田哲朗・花谷勇治・露木 建・中田彦彦・浅沼史樹・石引久弥・阿部令彦: スードマウス可移植性ヒト胃・結腸癌に対する mitomycin C の効果. 薬剤の投与開始時期に関する検討. *癌と化学療法* **9**: 638~645, 1982
- 42) Povlsen CO, Jacobsen GK and Rygaard J: The mouse mutant nude as a model for testing of anticancer agents. *The Laboratory animal in drug testing*, Spiegel A, pp. 63~72, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1973
- 43) 大沢仲昭・上山義人: スードマウスに移植されたヒト悪性腫瘍を用いる制癌研究について. *医学のあゆみ* **96**: 278~287, 1976
- 44) 藤田昌英・田口 鐵: スードマウスを用いる制癌剤感受性テスト. *癌と化学療法* **9**: 606~615, 1982
- 45) Pesce AJ, Bubel HC and Michael JG: Human lactic dehydrogenase as a marker for human tumor cell grown in athymic mice. *Cancer Res* **37**: 1998~2003, 1977
- 46) DiPersio L, Kyriazis AP, Michael JG and Pesce AJ: Monitoring the therapy of human tumor xenografts in nude mice by the use of lactate dehydrogenase. *J Natl Cancer Inst* **62**: 375~379, 1979
- 47) 中野陽典・熊谷道彦・藤田昌英・早田 敏・田口鐵男 ヒト LDH アイソザイムを用いたスードマウス移植ヒト癌に対する化学療法の効果判定. *医学のあゆみ* **117**: 79~81, 1981
- 48) 谷 忠憲・西廻和春・野宗義博・服部孝雄: スードマウス移植腫瘍の特性と治療. *人癌とスードマウス*, 下里幸雄, 玉置憲一, 第1版, pp. 287~294, 医歯薬出版, 東京, 1982
- 49) Houchens DP, Ovejera AA and Barker AD: The therapy of human tumors in athymic

(nude) mice. Proceedings of the symposium
on the use of athymic (nude) mice in can-
cer research, pp. 267~280, Gustav Fischer,

New York, Stuttgart, 1978

(1986年5月16日迅速掲載受付)