

ヒト尿路性器悪性腫瘍のヌードマウスへの 異種移植の研究

—ヒト原発性尿管腫瘍株の樹立とその性状—

愛知医科大学泌尿器科学教室（主任：瀬川昭夫教授）

深津 英捷・山田 博彦・野々村仁志・宮川 嘉真

羽田野幸夫・和気 正史・平岩 親輔・村松 直

山田 芳彰・西川 英二・佐藤 孝充・本多 靖明

千田 八朗*・瀬川 昭夫

浅井病院泌尿器科（部長：平田紀光）

平 田 紀 光

STUDY ON HETEROTRANSPLANTATION OF HUMAN MALIGNANT UROGENITAL TUMORS IN NUDE MICE: ESTABLISHMENT OF THE TUMOR LINE IN NUDE MICE FROM HUMAN PRIMARY URETERAL TUMOR AND ITS CHARACTERISTICS

Hidetoshi FUKATSU, Hirohiko YAMADA, Hitoshi NONOMURA,

Yoshimasa MIYAGAWA, Yukio HATANO, Masafumi WAKI,

Shinsuke HIRAIWA, Tadashi MURAMATSU, Yoshiaki YAMADA,

Eiji NISHIKAWA, Takayoshi SATO, Nobuaki HONDA,

Hachiro SENDA and Akio SEGAWA

From the Department of Urology, Aichi Medical University

(Director: Prof. A. Segawa)

Norimitsu HIRATA

From the Department of Urology, Asai Hospital

(Chief: Dr. N. Hirata)

The tumor line in nude mice is one of the most important experimental animal models for oncodevelopmental studies. We implanted a human ureteral tumor into nude mice, established the tumor line, AM-UT-1, and maintained it by serial transplantation. The characteristics of this tumor line in nude mice are reported. Histologically, the original tumor was a transitional cell carcinoma (grade II, stage B). The transplanted tumor grew locally and had a constant growth pattern during serial passage until the 13th passage in nude recipients and maintained the basic histological, immunohistochemical findings of the original tumor. Both original tumor and serial transplanted tumor had carcinoembryonic antigen (CEA)-producing activity. A high level of serum CEA was also recognized in nude mice.

Key words: Nude mouse, Xenotransplantation, Primary ureteral tumor

* 現：千田クリニック

緒 言

ヌードマウスへのヒト悪性腫瘍の異種移植は、1969年 Rygaard と Povlsen¹⁾ が報告して以来多くの研究者により行なわれ、今日では癌研究における実験モデルとして、その有用性は高く評価されている²⁻⁵⁾。著者らも癌の生物学的性状の究明、感受性のある薬剤のスクリーニングや放射線の効果検討およびその臨床応用を目的として、1981年6月よりヒト尿路性器悪性腫瘍のヌードマウスへの移植実験を試みてきた。今回、ヒト原発性尿管腫瘍株 (AM-UT-I と命名) の継代移植に成功したので、その移植腫瘍の由来、ヌードマウス可移植腫瘍の特性について報告する。

実験方法

1) 移植腫瘍の由来

患者は63歳の男子、血液型はO型。1985年4月16日肉眼的血尿を主訴として来院、入院時の末梢血液像、血液生化学および腫瘍マーカーなどの検査では異常は認められなかった。その他諸検査にて右原発性尿管腫瘍と診断。1985年5月7日右腎・尿管全摘出術兼膀胱部分切除術ならびに後腹膜腔リンパ節郭清術を施行。腫瘍は尿管下部に局限し、リンパ節転移はみられなかった。手術で得られた腫瘍の一部をヌードマウスへ移植した。病理組織学的診断は移行上皮癌 (grade II, stage B) であった。なお、grade は膀胱癌取扱規約⁶⁾、stage は Batata ら⁷⁾ が使用している分類を若干改訂したものをを用いた。

患者は術後 HCFU (300 mg/day) の内服にて経過観察中であり、1987年5月31日現在再発もみられず健康である。

2) ヌードマウスと飼育方法

実験に用いたヌードマウスは静岡実験動物研究所にて Specific pathogen free 環境下にて飼育された BALB/C-nu/nu、生後6～8週齢の雄で、体重20～30g であった。動物の飼育には、飼育室内に飼育棚 (laminar flow clean rack) を設置し、そのなかにポリカーボネイト製ケージを収容し、エチレンオキシドガス滅菌したフィルターキャップで覆った。

室温は $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、飼育室の新鮮空気換気回数は1時間23回であった。各ケージには最大4匹までを入れた。飼育は市販の同型飼料 MF (オリエンタル酵母社製) を用い、飲料水は水道水を給水瓶に入れてオートクレーブにて滅菌 (125°C にて30分間の高圧蒸気滅菌) したものを自由摂取とした。床敷はかなん屑をオートクレーブにて高圧滅菌して使用し

た。ゲージ蓋は自動洗浄器にて 80°C で滅菌し、給水瓶は塩素系消毒薬 (ピューラック) もしくは逆性石けん液 (オスバン液) にて滅菌した。

なお飲料水、飼料、床敷、ケージおよび蓋は週2回定期的に交換を行なった。実験者は滅菌ガウン、マスク、帽子、手術用の滅菌ゴム手袋を着用した。

3) 移植方法

移植に使用した原腫瘍片は術後無菌的に採取し、ペニシリンGカリウム 10,000 U/ml および硫酸ストレプトマイシンを含む培養液 RPMI-1640 液に浸し、冷蔵庫内 (4°C) に保存し2時間後に移植した。実験台に滅菌済みの disposable drape を敷き、腫瘍より壊死部および出血部を可能なかぎり除去した後、メスおよび眼科用ハサミで腫瘍組織を2～3mm 角に細切し、腫瘍片を眼科用小摂子を用いてヌードマウス腹部皮下に移植した。なお皮膚切開部には povidone iodine gel を塗布した。

4) 移植腫瘍の観察

(a) 腫瘍増殖の検討

腫瘍移植後は週1回ヌードマウスの体重を測り、かつ週2～3回腫瘍の長径 (L) および短径 (W) を mm 単位で測定し、腫瘍を回転楕円形と仮定し、その体積 $1/2 (L \times W^2)$ で表し推定重量とした。さらに、各計測時の平均値および標準偏差値を求めて腫瘍増殖曲線を作製し腫瘍増殖の検討をした。

なお、各継代移植時にはヌードマウス5匹を使用し、腫瘍の長径が10mm 以上に達した時点で、壊死部および出血部を避けて初代移植と同様の方法で行なった。

(b) 形態学的検討

移植腫瘍の病理組織学的検索のため、継代移植時点の腫瘍の一部を10%ホルマリン液で固定し、Hematoxylin-Eosine 染色後光顕的観察をした。さらに電顕標本は光顕用切片に隣接した切片を1mm 角に細切し、2.5%グルタルアルデヒド液、1%四酸化オスミウム液にて二重固定し、アルコール脱水、酸化プロピレンによる置換、エポン812包埋後、MT2-B 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、JEM2000EX 型電子顕微鏡にて観察した。

(c) 生物学的検討

移植腫瘍の生物学的性状の検討には、免疫組織化学および染色体分析を行ない、さらに血清 CEA や TA-4 の検索も行なった。免疫組織化学として ABH 同種抗原 (血液型標準血清および DAKO ビオチン化 UEA-I レクチンを使用)、Thomsen-Friedenrich

Antigen (T-抗原には DAKO ビオチン化 PNA レクチン, ノイラミダーゼ処理後の Cryptic T-抗原にはシグマ社製ノイミダーゼ type V を使用) および TA-4 (ダイナボット社製キットを使用) の検索を Avidin-Biotin-Peroxidase Complex 法にて行なった. また, CEA (DAKO ポリクロナール抗体を使用) の検索は Peroxidase-Antiperoxidase Complex 法で行なった. 染色体分析は G バンド法を用いた.

実験結果

1) 腫瘍の生着および増殖

ヌードマウスに移植した原腫瘍は, 2 週目頃より増殖を示し32日目に生着を確認した. 継代4代目までは腫瘍の生着率も50~60%であったが, 5代以降はほぼ100%となった. また, 腫瘍増殖も5代以降は安定し一定の増殖傾向がみられた. 5代株の腫瘍増殖は24日目: 77.8 ± 8.6 mg, 38日目: 312.2 ± 50.1 mg, 52日目: 622.4 ± 171.1 mg, 8代株では24日目 76.5 ± 22.1 mg,

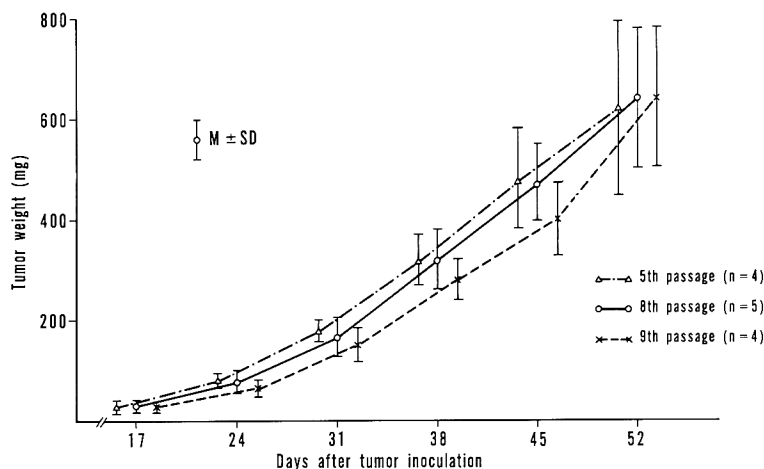


Fig. 1. 腫瘍増殖曲線

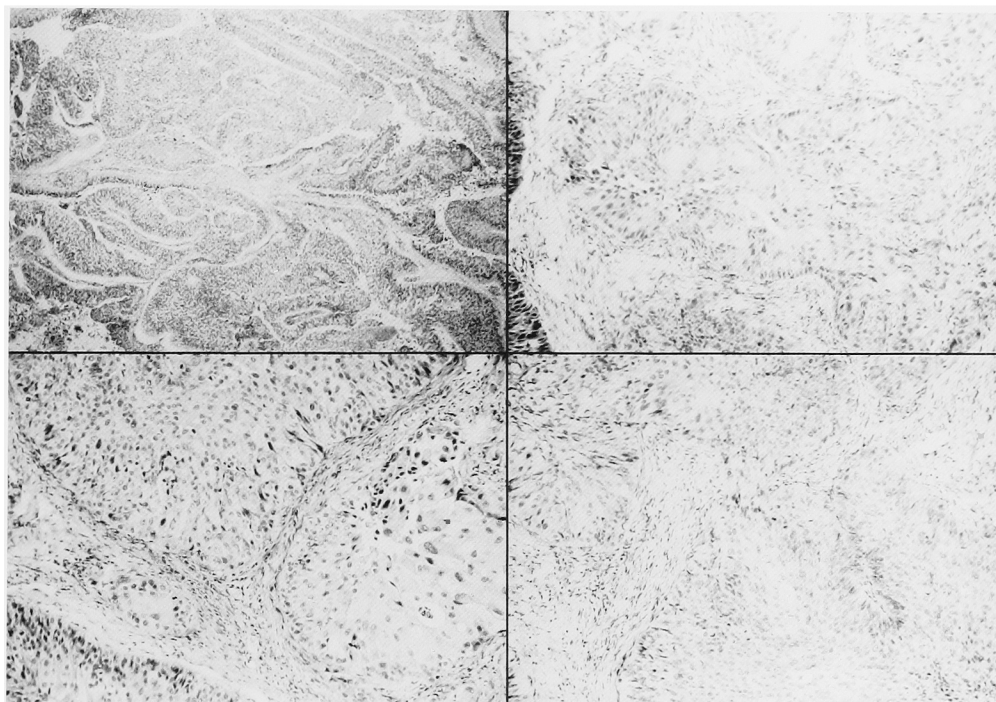


Fig. 2. 光顕像 (左上: 原腫瘍, 右上: 初代, 左下: 5代, 右下: 9代)

38日目: 279.1 ± 42.0 mg, 52日目: 643.1 ± 43.6 mg, 9代株では24日目: 66.2 ± 5.7 mg, 38日目: 279.1 ± 42.0 mg, 52日目: 643 ± 143.6 mg を示した (Fig. 1). なお, 本腫瘍の対数増殖期間中の体積倍加時間は 6.06 ± 0.21 日である. 現在13代目を継代中であり5~12代株とはほぼ同様な増殖を示している.

2) 形態学的性状

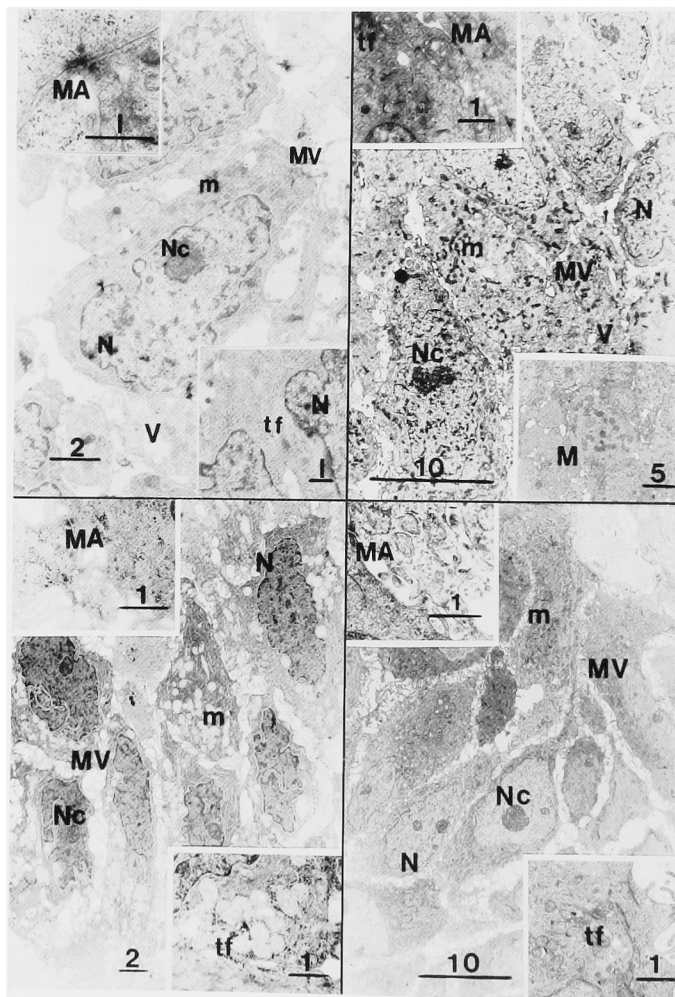
(a) 光顕所見

移植原腫瘍の組織像は, 細い線維性間質を伴い乳頭状に増殖する移行上皮癌細胞を主体とし, 一部扁平上皮化生を呈する部位も認められた. 個々の腫瘍細胞は胞体は明るく, 核は円形もしくは楕円形で mitosis も多少みられ中等度の異型性を示した. 継代初代の組織像は, やや浮腫状の間質を伴い乳頭状に増殖する腫瘍

細胞とところどころに cancer peal 様構造を呈する扁平上皮化生の部分がみられた. 個々の腫瘍細胞は N/C 比が大きく, 核は紡錘形でクロマチンに富み, 原腫瘍に比べてやや高度の異型性を示した. 継代5代株の組織像では, 乳頭状に増殖する腫瘍細胞がおもで, 原腫瘍に比べてやや角化傾向の強い扁平上皮化生を呈する部分が散見された. 間質は比較的豊富な結合組織よりなっている. 個々の腫瘍細胞は胞体も明るく, 核も円形あるいは楕円形で, 原腫瘍とよく似た細胞構造を示した. 継代9代株の組織像は, 組織構築および細胞構造ともに原腫瘍と類似していた (Fig. 2).

(b) 電顕所見

移植原腫瘍の所見としては, 腫瘍細胞表面に短い microvilli が認められ, わずかであるが macula ad-



N: nucleus, Nc: nucleolus, MV: microvilli, MA: macula adherens, tf: tonofilament, V: vacuole, m: mitochondria, M: mitosis

Fig. 3. 電顕像 (左上: 原腫瘍, 右上: 初代, 左下: 5代, 右下: 9代)

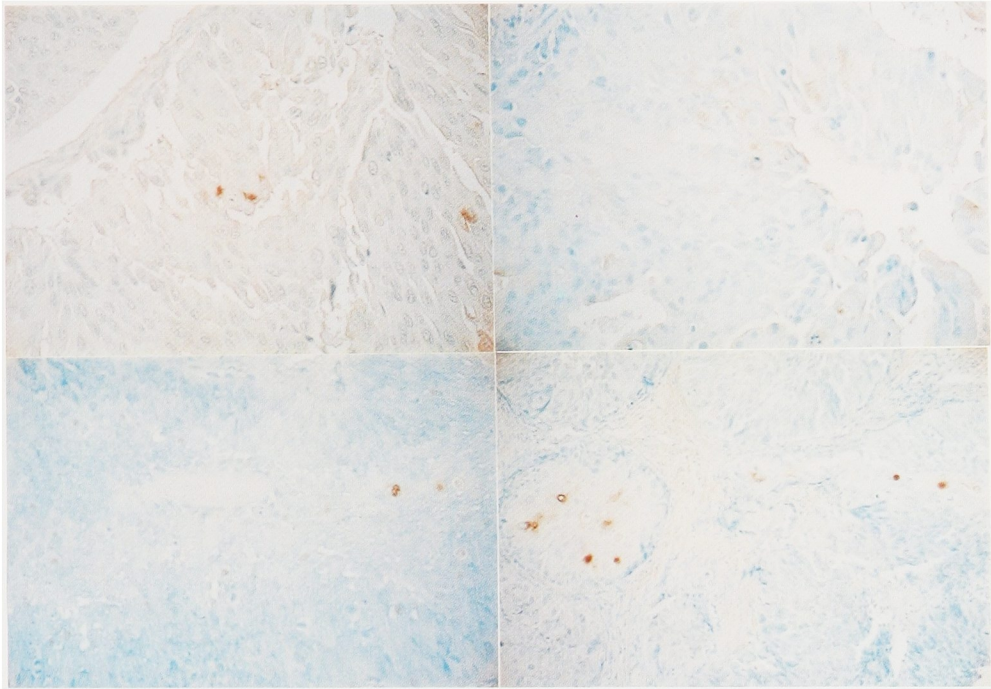


Fig. 4. ABH 抗原 (左上：原腫瘍, 右上：初代, 左下：5代, 右下：9代)

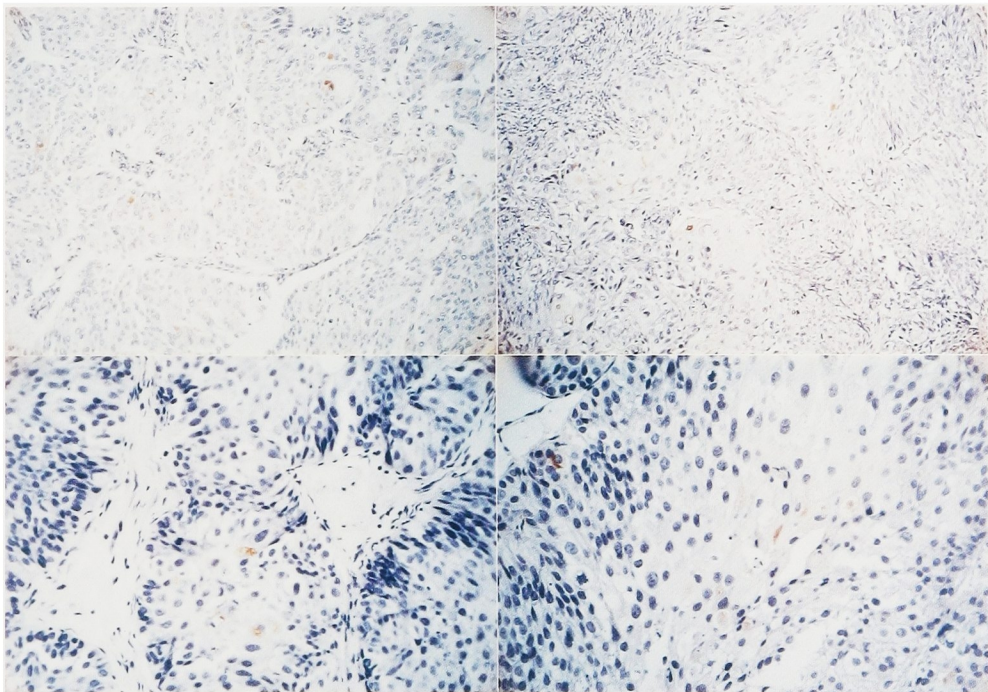


Fig. 5. T-抗原 (左上：原腫瘍, 右上：初代, 左下：5代, 右下：9代)

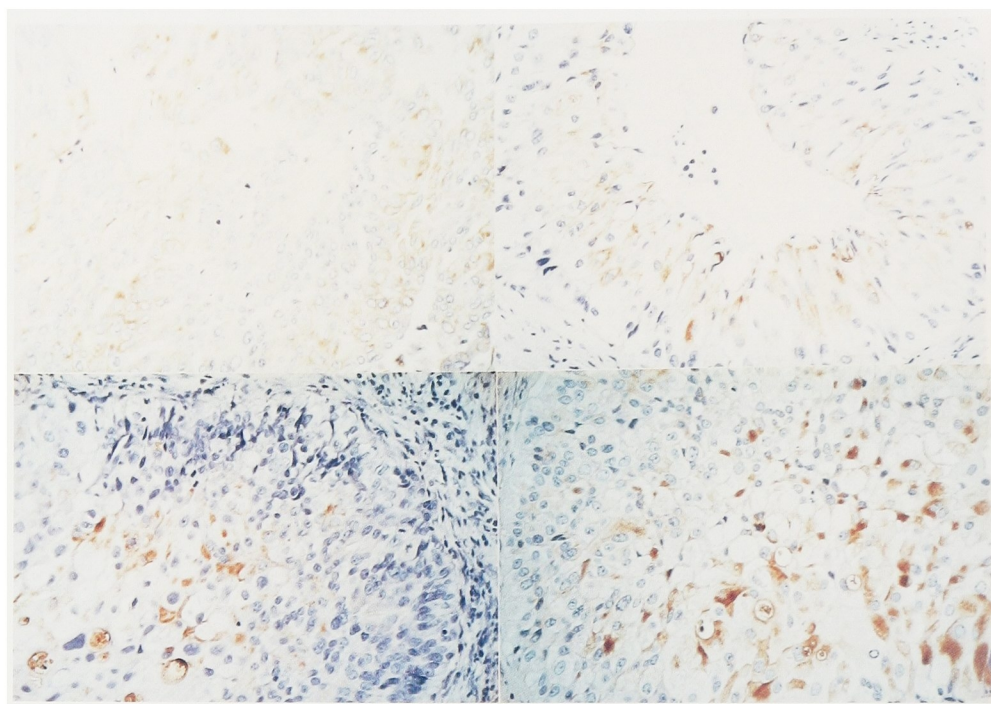


Fig. 6. Cryptic T-抗原 (左上：原腫瘍，右上：初代，左下：5代，右下：9代)

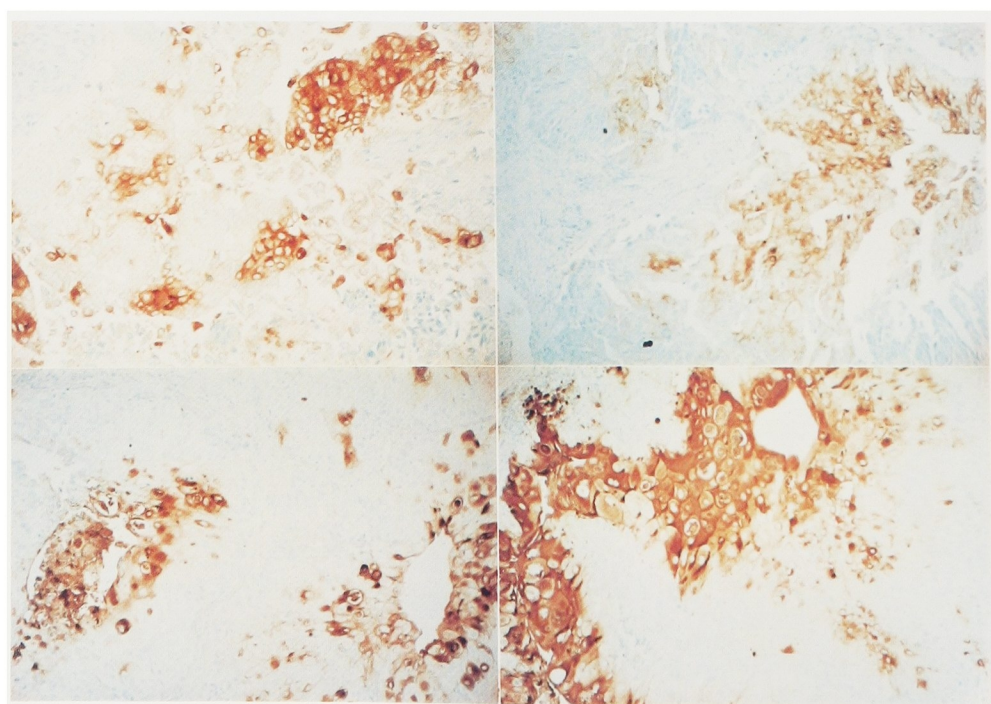


Fig. 7. CEA (左上：原腫瘍，右上：初代，左下：5代，右下：9代)

Karyotype of cells with 85 chromosomes, 8th passage

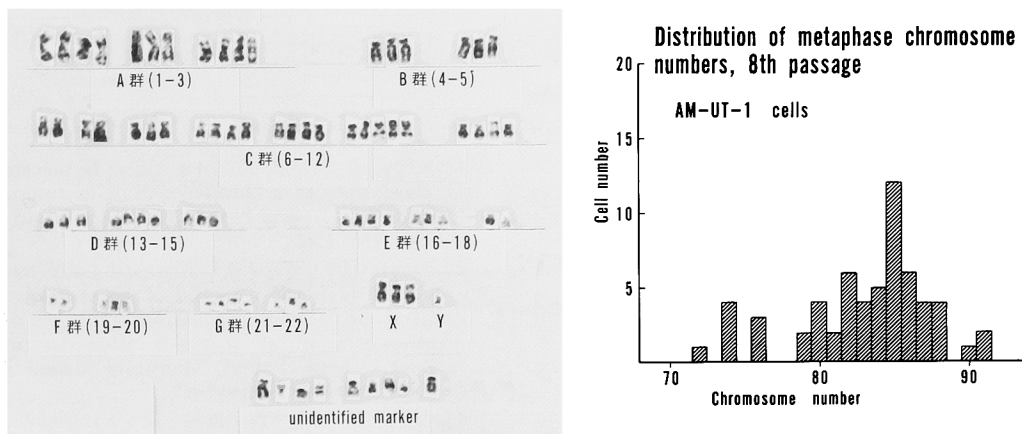


Fig. 8. 染色体分析

herens 様構造の接着がみられる。胞体内には小型の mitochondria を認め、golgi 装置も散見され、少量であるが tonofilament もみられる。核は大きく辺縁不整である。継代初代の所見は、腫瘍細胞の表面に短い microvilli が junction を形成し、わずかに macula adherens 様の接着がみられる。N/C 比は大きく、胞体内には小型の mitochondria が目立ち、tonofilament もみられる。核は大きく辺縁不整で、大型のひも状構造を示す核小体を認める。継代 5 代株の所見では腫瘍細胞表面に microvilli が豊富にみられ、inter junction を形成しており macula adherens 様構造も認める。胞体内は free ribosome, RER のほかに多数の mitochondria を認め、核の周囲には tonofilament が散在している。核および核小体は原腫瘍とほぼ同様である。継代 9 代株の所見は原腫瘍と類似していた (Fig. 3)。以上光顕および電顕所見より、本腫瘍は継代を重ねても、原腫瘍の基本的な組織学的特徴を維持していることが明らかである。

3) 生物学的性状

ABH 同種抗原では A 抗原ならびに B 抗原は陰性であり、H 抗原は原腫瘍および各継代株ともに陽性細胞が認められた (Fig. 4)。

T-抗原および cryptic T-抗原はともに原腫瘍とほぼ同様に各継代株も陽性細胞を認めた (Fig. 5, 6)。

TA-4 は陰性であったが、CEA は原腫瘍および各継代株ともに陽性細胞が認められ、特に扁平上皮化生を示す部分に強く染色された (Fig. 7)。また、ヌードマウス血清の CEA は継代 8 代株では 95.9 ± 26.87 ng/ml ($n=4$)、継代 9 代株は 86.45 ± 45.88 ng/ml ($n=4$) と正常群の 0.16 ± 0.03 ($n=5$) に比べて高値を

示した。

染色体分析は継代 8 代株を使用し、60個の分裂像より検討した。karyotype はヒト型を示し、分析不能染色体 9 個を認めた。なおヒストグラムは hypertriploid から hypertetraploid に分布しており 85 に peak がみられた (Fig. 8)。

考 察

ヌードマウスは胸腺を欠くために T 細胞機能が欠如している特徴があり、異種動物悪性腫瘍の移植が比較的容易とされている。また、ヌードマウス可移植ヒト悪性腫瘍株は継代を繰り返しても、形態学的な面のみならず生物学的な面でも原腫瘍の特性をよく維持している事実より、癌の基礎的・臨床的研究においてきわめて有用な実験モデルといえる。それ故に、ヌードマウス可移植ヒト悪性腫瘍株の樹立は重要であり、本邦でも多数の施設で行なわれている。泌尿器科領域においても、腎細胞癌^{4,5,8)}、腎盂癌^{5,9)}、膀胱癌^{4,5,9)}、前立腺癌^{3,10)}および睾丸悪性腫瘍^{5,9,11)}などのヌードマウス可移植株の樹立の報告がいくつかみられる。しかし、ヌードマウス可移植ヒト尿管癌、また腎盂癌および膀胱癌を含めても移行上皮癌株の報告は比較的少ない。

著者の継代中の AM-UT-I 株は継代初期には生着率がやや悪く、増殖も不安定であったが、継代 5 代以降は 100% 近い生着率を示し、また継代を繰り返しても各継代株はすべて標準偏差内で増殖し継代に伴う増殖変化はみられず、坪井¹²⁾の NM-B-I 株、山内¹³⁾の BT-8 および BT-11 株と同様に安定した株であることが判明した。

ヌードマウスに移植されたヒト移行上皮癌の原腫瘍

と継代腫瘍の組織像の比較検討に関して、由井¹⁴⁾の2株(膀胱癌)は原腫瘍の性格をとく受け継いでいたとし、塚本と熊本⁹⁾も継代可能であった2株(膀胱癌と腎盂癌)は原腫瘍に類似した組織像を示したと述べている。また、岡田と吉田⁵⁾は長期継代中の2株(膀胱癌)のうち、BT-8株は移植を重ねるにしたがって細胞の悪性度は高くなる傾向を呈したが基本的構造は変わらなかったとし、BT-11株も原腫瘍と継代初期の腫瘍にみられた扁平上皮化生の所見が継代を繰り返すうちに消失したが、原腫瘍の移行上皮癌としての特徴をよく保存していると述べている。著者らの継代中のAM-UT-I株も一部に扁平上皮化生を伴う移行上皮癌であるが、BT-11株とよく似た組織像を呈していることから、今後どのような変化を示すか興味深い。

ヌードマウスへの悪性腫瘍の移植実験の結果を臨床面に正しく反映させるためには、継代を繰り返しても形態学的性状が原腫瘍のそれと変わらないことが必要と同時に、生物学的性状も同一でなければならない。著者らは生物学的性状の検討をABH同種抗原、T-抗原、Cryptic T-抗原、TA-4およびCEAなどの免疫組織化学的の面から検索した結果、原腫瘍と継代腫瘍が同一所見を示した。また継代8代株および9代株において血清CEAが高値を示したことから本腫瘍はCEA産生腫瘍と考えられる。ただし、患者自身の手術前の血清CEA値は正常範囲内であった。このことは、患者に対する腫瘍体積比とヌードマウスに対する腫瘍体積比の差ではないかと思われる。

ヌードマウス可移植悪性腫瘍の実験系で臨床に最も期待されるのは、薬剤や放射線の治療効果の検討である。そのためには、移植された腫瘍は100%に近い生着率を示し、かつ一定の増殖を示すこと、さらに継代を繰り返しても原腫瘍と基本的な性質が異なっていない。

著者らが今回樹立したAM-UT-I株は上記の条件を充分満たしていると考えられる。

結 語

ヒト原発性尿管腫瘍のヌードマウス可移植株(AM-UT-I)を樹立し、その特性について述べた。

- 1) 原腫瘍は移行上皮癌(grade II, stage B)であった。
- 2) ヌードマウス可移植腫瘍株は、5代以降ほぼ100%の生着率を示した。
- 3) ヌードマウス可移植腫瘍株は、5代以降安定した一定の増殖を示した。
- 4) ヌードマウス可移植腫瘍株は、継代を繰り返しても原腫瘍の形態学的および生物学的性格をよく維持

していた。

- 5) 本腫瘍はCEA産生腫瘍と考えられた。

なお本論文の要旨は45回日本癌学会総会において当教室の山田芳彰が発表した。

文 献

- 1) Rygaard J and Povlsen CO: Heterotransplantation of a human malignant tumor to nude mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* **77**: 758~760, 1969
- 2) Povlsen CO, Visfeld J, Rygaard J and Jensen G: Growth patterns and chromosome constitutions of human malignant tumors after long-term serial transplantation in nude mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* **83**: 709~716, 1975
- 3) 永井完治・下里幸雄・亀谷 徹: 人の腫瘍のヌードマウスへの移植。移植成績と移植腫瘍の性状について。癌の臨床 **22**: 745~754, 1976
- 4) 秋元成太・中島 均・由井康雄・川井 博: ヒト尿路性器悪性腫瘍のヌードマウスへの移植。泌尿 **32**: 1001~1010, 1978
- 5) 岡田謙一郎・吉田 修: 尿路性器悪性腫瘍のヌードマウス異種移植の研究。移植成績と移植組織の性状。泌尿紀要 **30**: 1749~1767, 1984
- 6) 泌尿器科・病理、膀胱癌取り扱い規約(第1版): 金原出版株式会社 1980
- 7) Batata AM, Whitmore WF, Hilaris BS, Tokita N and Grabstald H: Primary carcinoma of the ureter: A prognostic study. *Cancer* **35**: 1626~1632, 1975
- 8) 大西哲朗・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1報 ヌードマウス可移植性ヒト腎細胞癌株の特性。日泌尿会誌 **75**: 1903~1910, 1984
- 9) 塚本泰司・熊本悦明: ヒト尿路性器癌の可継代腫瘍を用いた抗癌剤の効果検討。ヒト尿路性器癌のNude Mouse 異種移植に関する検討(第2報)。日泌尿会誌 **74**: 1297~1312, 1983
- 10) 川崎千尋・窪田吉信・北島直登・森山正敏・木下裕三・穂坂正彦・原田昌典: ヒト前立腺癌のヌードマウス移植株の樹立とその性状。第45回日本癌学会総会発表(演題2058) 1986
- 11) 町田豊平・三本 誠・柳沢宗利: ヒト男子生殖細胞腫瘍の研究—ヌードマウス可移植性ヒトAFP産生睾丸腫瘍の確立。日泌尿会誌 **72**: 1527~1533, 1981
- 12) 坪井成美: ヒト泌尿生殖器系悪性腫瘍の異種移植に関する研究。(第5報) ヌードマウス移植ヒト膀胱腫瘍(NM-BI)に対する化学療法。日泌尿会誌 **73**: 883~897, 1982
- 13) 山内民男・岡田謙一郎・吉田 修: ヌードマウス継代移植ヒト膀胱癌を用いた Cis-Diamminedichloroplatinum (II) を主剤とする非交差耐性同調多剤併用化学療法の研究。泌尿紀要 **12**: 1781~1797, 1986
- 14) 由井康雄: ヒト泌尿生殖器系腫瘍の異種移植に関する研究。第1報 ヌードマウスへの移植実験およびヌードマウス可移植性ヒト前立腺癌に対する治療実験。日泌尿会誌 **70**: 28~45, 1979

(1987年6月3日迅速掲載受付)