

ヒト腎細胞癌の基礎的研究

第1報：ヒト腎細胞癌単層培養の経験

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：園田孝夫教授）

松	田	稔
長	船	匡男
古	武	敏彦
園	田	孝夫

大阪大学医学部第3内科学教室（主任：山村雄一教授）

渡	辺	信一郎
波	田	寿一

A FUNDAMENTAL STUDY OF RENAL CELL CARCINOMA

PART 1. *IN VITRO* LONG-TERM CELL CULTURES OF
RENAL CELL CARCINOMAS

Minoru MATSUDA, Masao OSAFUNE,
Toshihiko KOTAKE and Takao SONODA

*From the Department of Urology, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. T. Sonoda, M. D.)*

Shinichiro WATANABE and Toshikazu HADA

*From the Department of Internal Medicine, Osaka University Hospital**(Chairman: Prof. Y. Yamamura, M. D.)*

During the past 2 years, cancerous tissues surgically removed from the patients with renal cell carcinoma had been submitted to *in vitro* cell cultures for the purpose of obtaining established human renal cell carcinoma cell lines.

Tissue fragments were trypsinized into single cell suspension and resuspended in culture medium of RPMI 1640 augmented with inactivated fetal calf serum (20%), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). Incubation was carried out with humidified air with 5% CO₂ at 37°C.

Out of fifteen renal cell carcinomas, epithelial cell growth were observed in ten cases. However long-term maintenance of these monolayers were achieved only in two cases, over a period of 10 months and 8 months respectively. The cytological, biochemical identification of these cells is currently in progress.

はじめに

腎細胞癌は本邦における悪性腫瘍のうち、約1.5%を占め、欧米に比し、けっして頻度の高い悪性腫瘍ではないが、臨床的に現在までの手術を主とするその治療成績は5年生存率約40%と、けっして良好なものではない。さらに本腫瘍に対する放射線療法の意義や、化学療法の選択についても議論の余地が多い。また基

礎的にみても本腫瘍はその発生母地や病理組織学的分類に関する検討をも含め、いまだ腫瘍生物学的研究は不十分の域にある。とくに本腫瘍の臨床像の中には腫瘍が宿主の全身におよぼす影響として、発熱、赤沈値の亢進、血清たんぱく質異常、各種ホルモン（副甲状腺ホルモン、レニン、エリスロポエチン、性腺刺激ホルモン）の分泌、肝機能障害の誘発など、それぞれ機序の明瞭でないきわめて多様な性質が経験されてい

る。また本腫瘍の増殖に性ホルモン依存性が示唆される症例のあることもよく知られている。さらに近年では本腫瘍は自然退縮例が他の悪性腫瘍に比しかなり多いことより腫瘍免疫学的視点からもきわめて興味がもたれている腫瘍である。

このようなヒト腎細胞癌を対象とし、その基礎的研究をはじめにあたり、著者は培養ヒト腎癌細胞株樹立をめざし、その試験管内長期細胞培養をおこなってきたが、ここでは現在までのその成績につき簡単に報

告したい。

材 料 と 方 法

腫瘍材料：1975年11月より1977年10月までの2年間に当科ならびに関連病院にて経験され、かつ細胞培養を試みた腎細胞癌は15例である。これら症例の年齢、性別、病理組織学的所見（悪性度、細胞型）などをTable 1 にまとめて示した。なお培養に供した腫瘍組織はいずれも原発巣より得られたものであった。

Table 1. 対象症例と培養結果

対 象 症 例						培 養 結 果		
症 例	年齢	性	培養開始日	組織学的悪性度*	細胞型	初代培養	継代培養	最 終 結 果
1(E.E.)	54	f	12.19.1975	2	clear	不成功	おこなわず	
2(S.Y.)	72	m	12.22.1975	2	mixed	〃	〃	
3(K.Y.)	41	m	1. 7.1976	3	clear	主に線維芽細胞	〃	18週自然消滅
4(Y.K.)	74	m	2. 9.1976	2	clear	上皮様細胞	4 週 目	継代培養後維持不能
5(S.M.)	22	f	2.20.1976	3	granular	上皮様細胞	4 週 目	21週自然消滅
6(A.M.)	60	m	5.12.1976	2	clear	上皮様細胞	おこなわず	18週自然消滅
7(T.O.)	44	m	11.25.1976	3	granular	感染により廃棄		
8(S.A.)	67	f	1.17.1977	2	granular	上皮様細胞	2 週 目	10ヵ月(12代)維持観察中
9(G.A.)	65	m	2. 7.1977	2	clear	主に上皮様細胞	おこなわず	18週自然消滅
10(Y.Y.)	32	f	3.14.1977	2	clear	上皮様細胞	3 週 目	8ヵ月(32代)維持観察中
11(M.E.)	52	f	5. 9.1977	4	anaplastic	上皮様細胞		1 週目感染により廃棄
12(Y.I.)	51	m	6.10.1977	2	clear	上皮様細胞	8 週 目	17週(2代)維持観察中
13(K.N.)	60	m	7.11.1977	2	clear	主に上皮様細胞	6 週 目	14週(2代)維持観察中
14(K.F.)	64	m	7.26.1977	3	mixed	主に上皮様細胞	おこなわず	13週自然消滅
15(M.N.)	68	m	9.25.1977	3	clear	上皮様細胞	未	5 週維持観察中

* Skinren, D. G et al²⁾ の基準による。

初代培養の方法：摘出腎よりできるだけすみやかに腫瘍組織の一部を切り出し、出血、壊死、変性をきたしている部分や、線維性組織と思われる部分を除き、Ca⁺⁺ を含まない phosphate buffered saline(以下 PBS (一) と略す) にてじゅうぶん洗浄する。ついで組織片をカミソリまたはハサミにて 3mm×3mm 程度の大きさに細切する。この組織片を三角フラスコに移し 0.25% trypsin in PBS (一) (阪大微研製) 5~10 ml を加え室温で電磁気かく拌器にて10~20分かく拌し単細胞浮遊液とする。細胞浮遊液は遠心管に移し 1000 rpm, 10分間の遠沈により細胞を集める。未消化組織片にはふたたび新しい trypsin を加え同様の操作をおこない分散細胞を得る。原則として3, 4回の反復で塊のままの組織は培養には使用しなかったが、1例(症例 No. 8)においては trypsin 処理を約3時間施行したにもかかわらず、後にも述べるようにこれからも活発に増殖する上皮様単層培養細胞が得られている。ま

た得られた分散細胞中に赤血球の混入が非常に多い場合には遠沈後赤血球除去用トリス緩衝液¹⁾ を 2~3 ml 加え、数回軽くピペッティングをおこない溶血せしめ、ただちに遠沈する。このようにして得られた細胞は PBS (一) または培養液にて少なくとも2回(赤血球除去用トリス緩衝液を使用した場合には3回以上) 洗浄する。0.1% trypan blue を含む生食液にて生細胞数を白血球計算盤(著者はTatai's Eosinocount—萱垣理科学工業—を使用している) で数え、1×10⁶個/ml 程度の細胞濃度となるように培養液を加える。使用した培養液は基本的には RPMI 1640 に 20%に非動化したウシ胎児血清(FCS)を加え、さらに penicillin 100 u/ml, streptomycin 100 µg/ml を添加したものをを用いたが、このほか、Eagle MEM に血清および抗生物質を同様に添加したものを使用した場合もある。培養液に浮遊した細胞を 25 cm² プラスチックシャーレ(和光純薬工業) に 4~5 ml, または TD 45 培養瓶

(池本理科学工業)に10 ml 程度を加え、ただちに5%炭酸ガス存在下に37°Cにて培養を開始し、少なくとも48時間は培養器を動かさないよう心がけた。また培養液は週2, 3回そのほぼ2/3量を交換した。

結 果

Table 1 に試みた腎細胞癌培養結果も示したが以下簡単にこれらの経過を示す。

No. 1: 細胞分散後 trypan blue にて生細胞を数えたい、死細胞の数が非常に多かったが、培養開始後2週間経過をみても増殖も単層細胞層もつくこともなく、浮遊状態のまま死滅した。また細切した組織片のままで培養もおこなったが、組織片は底面には付着せず、また増殖も観察されなかった。用いた腫瘍組織が不適当な部分であったこと、組織細切が過度になりすぎたこと、静置時間が不じゅうぶんであったことなどが原因と考えられた。

No. 2: 培養開始時の生細胞数は分散細胞の50%以上を占めていたが、3週間培養をつづけても単層細胞層はつくらず、浮遊状態のまま死滅した。本例では培養液のFCS濃度を10%に下げたもの、Eagle MEMにFCSを10%または20%に添加したものも使用したが、結果はいずれも同様であった。組織片のままで培養も試みたが増殖はみられなかった。組織細切が過度であったことや、静置時間が不じゅうぶんであったことが原因ではないかと考えられた。

No. 3: 培養開始後1週間で線維芽細胞様の形態を示す部分と、敷石状に配列し、細胞質内に粗大顆粒を多く含む上皮様細胞が混在する単層細胞層が得られた(Fig. 1)。4週間目頃までは線維芽様細胞は上皮様細胞に比し増殖が旺盛であったが、その後はおもに上皮様細胞がすこしずつ増えつづけていた。18週間にわたり初代培養を維持していたが、これらの細胞は自然に底面より剝離しはじめ、継代のできぬままに自然消滅した。このことからおもに正常線維芽細胞が主体の単層培養であったと考えられる。

No. 4: 培養開始後1週間で敷石状配列を示す上皮様単層細胞層が得られ、増殖もかなり良好で、3週間ではほぼfull sheetの状態となっていた。4週間目、ラバークリーナーによる細胞剝離により継代操作をおこなったが、剝離細胞片はふたたび底面には付着せず、また培養液も酸性化しなくなり維持不能となった。

No. 5: 細胞培養開始時の生細胞は90%以上と非常に高く、培養開始後3日目にはきれいな上皮様細胞層が形成されていた(Fig. 2)。増殖も良好であり、4週

間目に0.125% trypsinにより細胞剝離をおこない継代したが、この時点でふたたび底面に付着した細胞はかなり少なくなり、増殖もきわめて悪く、12週間維持したが自然消滅した。継代時細胞濃度を低くしすぎたことがその後の増殖を不良にした原因の1つであろう。

No. 6: 細胞分散後の生細胞はほぼ50%程度であったが、4日目頃にはFig. 3に示すように細胞内に空胞の多い上皮様単層細胞層が形成されていた。しかしその後の増殖は緩徐となり、9週間目には培養液にポリアミン類の添加(putrescine: 1 n mol/ml, spermidine: 4 n mol/ml, spermine: 4 n mol/ml)をおこなってみたが増殖の状態には変化がみられず、14週目ごろからは代謝も不活発となり、18週で死滅した。

No. 7: 本例は死後4時間の剖検例より得られた腎癌組織を培養に供したが、おそらく組織片採取のさいに混入したと思われる真菌のため培養開始後3日目に廃棄した。

No. 8: 0.25% trypsinによる処理をほぼ3時間にわたりおこなったが、生細胞は80%以上と非常に高く、培養を開始しても2日目には敷石状、一部腺腔形成を思わせる上皮様細胞層がほぼ全面に形成されていた(Fig. 4)。2週目に0.125% trypsinにより継代培養をおこなったが、翌日には大部分の細胞が底面に付着しており、その後の増殖もきわめて良好であった。以後ほぼ2週目ごとに継代をおこない18週9代にまで達していたが、その後増殖は徐々に不良となり、底面より剝離する細胞が目立ちはじめた。培養液をRPMI 1640からEagle MEMに変更したり、FCS濃度も種々にかえてみたが、とくにその増殖の状態には変化がみられず、またインシュリンの添加、ポリアミンの添加、コルチゾールの添加もそれぞれおこなってみたが、ふたたび増殖を旺盛にすることは現在のところ成功していない。12代目まで継代したまま現在10カ月に達しているが、細胞層の一部では増殖がみられ、また一部では変性剝離してゆく細胞がみられるという状態がつづいている(Fig. 5)。

No. 9: 細胞分散後の生細胞はほぼ70%程度であった。培養開始後1週間目には上皮様細胞と、一部線維芽様細胞のまじる細胞層が得られ、4週間目までは良好に増殖していた。しかしその後増殖は不良となり14週目頃からは空胞化、変形などの所見が目立ち、18週で自然消滅した。

No. 10: trypsin処理後の生細胞はほぼ80%であったが、培養開始後1週間目にはすでに敷石状、一部では管腔形成を思わせる細胞配列を示す上皮様細胞層が

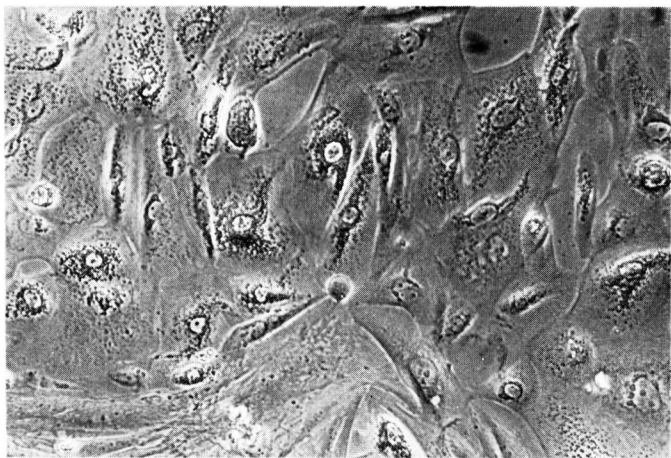


Fig. 1. 症例 No. 3. 細胞質内に粗大顆粒を多く含む上皮様細胞 (×200)

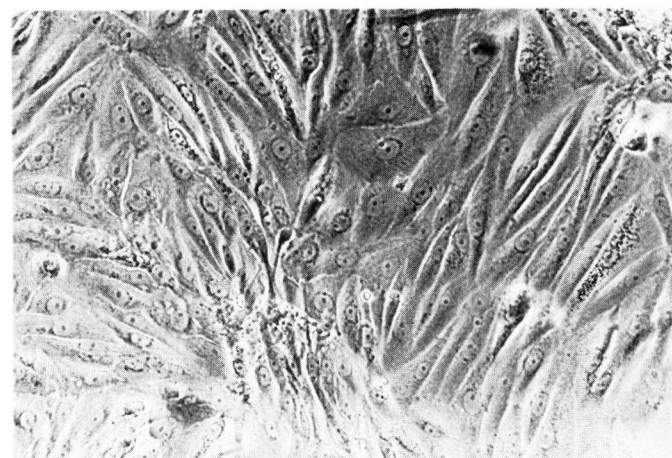


Fig. 2. 症例 No. 5. 透明感に富む上皮様細胞層がみられる. (×200)

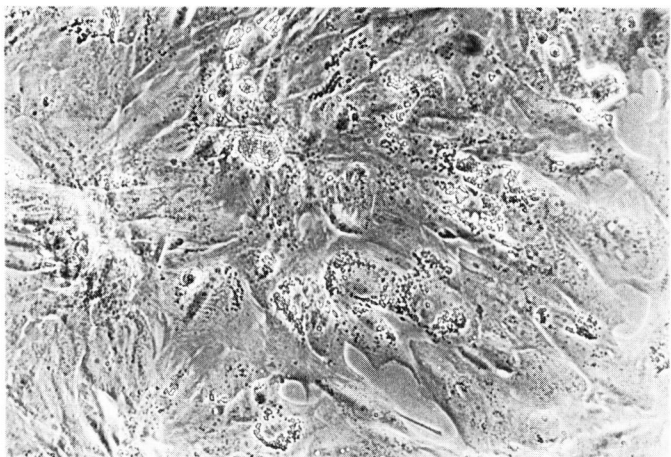


Fig. 3. 症例 No. 6. 細胞質内に空胞が非常に多い. (×200)

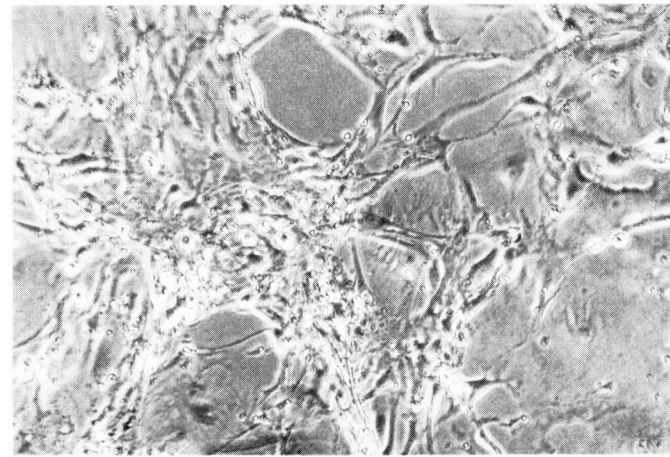


Fig. 4. 症例 No. 8. 一部には腺腔形成を思わせる細胞配列がみられる. (×200)

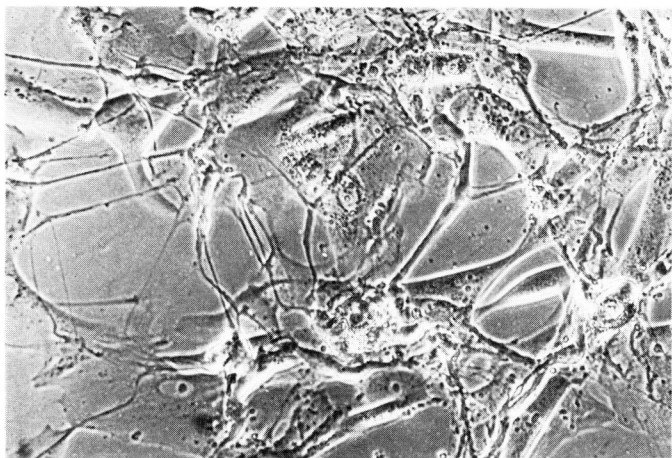


Fig. 5. 症例 No. 8. 培養開始後8カ月目. 細胞内には空胞, 顆粒が多く, 細胞間の突起もかなり長くなっている. ($\times 200$)

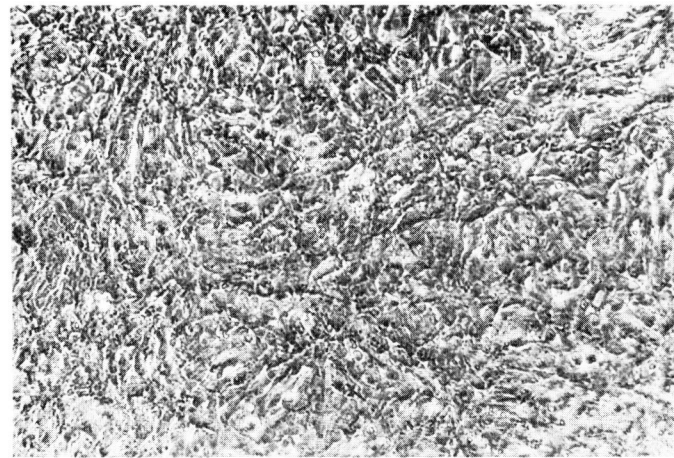


Fig. 6. 症例 No. 10 敷石状配列を示す上皮様細胞. ($\times 100$)

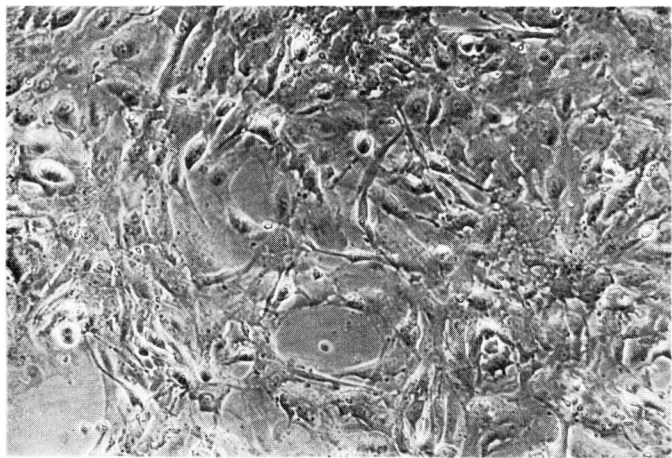


Fig. 7. 症例 No. 10. 培養開始後7カ月目. 一部には腺腔形成を思わせる所見がみられる. ($\times 200$)

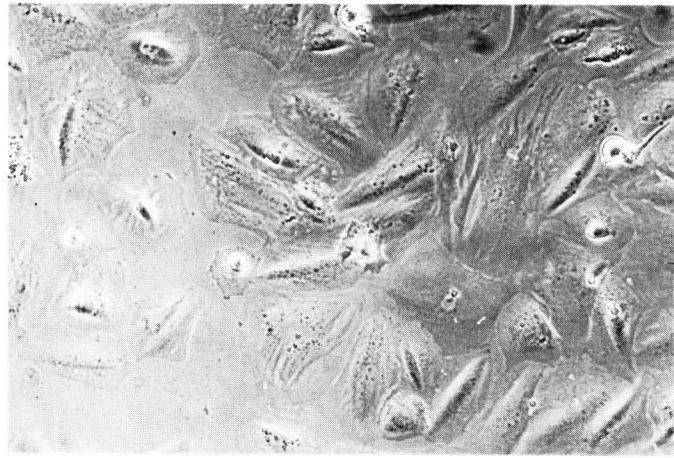


Fig. 8. 症例 No. 12. 細胞相互間の接触が粗であり, 増殖も不良である. ($\times 200$)

得られ、その増殖も良好であった (Fig. 6). 2 週間目頃には full sheet の状態となり、一部には pile up の傾向も認められた. 3 週間目 0.25% trypsin 消化により継代培養を試みたが、その後の単層状態での増殖は良好で、ほぼ 1 週間に 1 度の割合で継代をくりかえしている. 培養開始後 4 カ月目に測定した細胞数倍加時間は 68 時間、染色体数モードはほぼ diploid であった. 増殖形態にはとくに変化のないまま 8 カ月以上を経過しており株細胞として樹立される可能性は高いと思われる (Fig. 7). 生化学的、細胞学的な手段により現在の細胞の由来の同定がおこなわれつつある.

No. 11 : trypsin 処理後の生細胞数はほぼ 90% 程度と非常に高く、培養開始後も 2 日目には透明感に富んだ密に集合する上皮細胞層が得られ、増殖もきわめて良好であったが 1 週間目真菌感染をきたし、さまざまな抗真菌剤を使用しその除去を試みたが成功せず、廃棄を余儀なくされた.

No. 12 : 初代培養時の生細胞はほぼ 70% であり、培養開始後 1 週間目にはほぼ上皮様細胞からなる細胞層が得られた. しかしこの細胞層は No. 3 や No. 5 などでみられたかなり密に集合する細胞層とは異なり、細胞相互の接触はすこしまばらな状態で底面に付着していた (Fig. 8). 増殖もきわめて悪く、継代培養までに 8 週を要したが、その後の増殖も不良であり、現在 4 カ月をすぎて 2 代目のまま維持されている. しかし変性死滅の傾向はほとんどみられず、また培養液の pH 変化からみると代謝はじゅうぶんにおこなわれている.

No. 13 : 培養開始時生細胞は 50% 程度であったが、培養開始後 1 週間で大部分上皮様細胞からなる細胞層が得られた. しかしこの増殖は緩徐であり、継代までに 6 週を要し、またその後の増殖も決して良好ではない. 現在 3 カ月をすぎているが変性、死滅の傾向はほとんど認められない.

No. 14 : 初代培養時の生細胞はほぼ 50% 程度であったが、2 週間目には線維芽様細胞と上皮様細胞の混在する細胞層が得られた. その後両者の増殖はともに良好であったが 4 週間目には線維芽様細胞の占める部分がかなり大きくなり、そのまま 3 カ月間維持したが自然消滅した.

No. 15 : 培養開始時の生細胞はほぼ 80% 程度であり、また細胞濃度を他の場合よりもかなり高かったので、培養開始後 1 週間目にはほぼ完全な上皮様細胞層が形成されていた. 線維芽状細胞の混入も一部に認められた. しかし 2 週間目頃よりこの上皮様細胞は増殖の不良な細胞内顆粒、空胞の多いものと、透明感に富み、

密に増殖する細胞との 2 つが明らかに区別され、前者は徐々に変性剥離してゆき、後者はさらに増殖し、混在する線維芽様細胞を駆逐するいきおいである. 現在 6 週間目であり継代操作を予定している.

考 察

15 例の腎細胞癌手術材料よりその試験管内培養を試みた結果、単層細胞が得られたものは 12 例に達した. しかしこのうち線維芽様細胞が主と思われたものが 2 例あり、残り 10 例 (67%) がほぼ上皮様細胞から成る単層細胞培養であった. 上皮性細胞においてもまれにみられる浮遊状態での細胞増殖は著者の例においては観察されなかった. これら単層細胞のうち 4 例は 4 カ月以上生着し、他はこれ以前に自然消滅あるいは感染のため廃棄せざるをえない状態となった. 6 カ月をすぎて維持されている細胞は 2 例あるが、うち 1 例は 10 カ月目の現在増殖不良の状態にある. 他の 1 例は 8 カ月をすぎ、なお上皮様細胞の形態を保ちつつ活発に増殖している. 増殖不良例においては培養液の変更、血清濃度の変更、ポリアミン類やインシュリンの添加などによりその活発化を試みたがいずれも不成功に終わった. 著者の経験からは癌の組織学的悪性度や細胞型と培養の難易性とのあいだには明らかな関係をみとめることはできなかったが、短期間の培養では未分化な granular cell carcinoma が活発な増殖を示すような印象を受けた.

著者の試みたヒト腎癌細胞培養の現在における結果は以上のようなものであるが、ヒト癌細胞の試験管内培養はこれまで各種の癌を対象として試みてこれ、手技の発達とともにとくに近年では長期培養の成功があいついでいる. またこれらの培養細胞を利用したの研究は癌の生化学的研究、免疫学的研究、制癌剤治療効果判定などに関する知見に重大な寄与をしているが、ヒト腎細胞癌に関しては最近まではその長期培養、株化はけっして容易なものではないとされていた. 最初にこれを試みたのは Richter and Akin (1957)³⁾ であり培養 5 日目の初代培養細胞の性質につき報告をおこなっている. ついで 1961 年 Bergman and Bergman⁴⁾ は 3 例の腎細胞癌の培養をおこなった結果 5 カ月間にわたりこれを維持することができたことを報告している. しかし Dobrynin (1963)⁵⁾ は各種ヒト癌細胞長期培養を試みた結果について報告し、腎細胞癌については成功しなかったとのべている. Jones (1907)⁶⁾ は 14 例の腎細胞癌の培養において少なくとも 4 例が 2 カ月以上維持され、またこのうちの 2 例は 4 回以上の継

代培養がおこなわれ、また1例では新生時期に免疫トランスを誘導されたラットへの移植実験でその原発巣と類似した組織像を示す結節が得られたことを報告している。HuTu IX と名づけられたこの細胞は17代にわたり継代され、またこの細胞を使用した担癌宿主のリンパ球との反応をみる抗腫瘍免疫反応の検索も試みられている。Shoreら(1970)⁷⁾は15例の腎細胞癌培養をおこない、初代培養は13例で成功し、大部分は2, 3回の継代がなされ、その平均生存期間は8週間であったとのべている。またさらに腎細胞癌患者血清の単層培養細胞への影響につき検討し、これが癌細胞の増殖に toxicity を有すること、その toxic factor は 56°C 30分の加温に安定で、紫外線により分解される小分子物質であろうとのべている。この時期以降腫瘍免疫に対する関心の高まりから特異的免疫反応を観察するための標的細胞の必要性にせまられ、多くの研究グループにより細胞培養がなされ、おもに短期単層培養腎癌細胞を使用しての研究がおこなわれてきている。最近 Katsuoka et al (1976)⁸⁾は24例の腎細胞癌培養より7例で上皮様細胞の増殖を観察したが、ほぼ200日で1例を残し自然消滅した経験と、新しい方法としていったんヌードマウスに移植したのち *in vitro* の系に移すと60%で単層細胞培養が可能であったとの研究結果を報告し、株細胞樹立におけるヌードマウスの有用性を強調している。さらに1977年にはいり、本邦においても新潟大泌尿器科グループによる腎癌細胞株(NRC-12)⁹⁾、勝岡らによるKU-2腎癌細胞株¹⁰⁾、東海大グループのエリスロポエチンを産生する細胞株(GEP-1)¹¹⁾が学会で報告されており、またアメリカでもいくつかの腎癌細胞株がすでに樹立されていることが示唆されている。

著者の得た培養細胞ではNo. 10が8カ月をすぎてもなお活発な増殖をつづけており、株細胞として樹立される可能性はじゅうぶんにあると考えられ、現在染色体の詳細な分析、各種酵素のアイソザイムパターン、ヌードマウスにおける移植可能性、クローニング効率の測定など、さまざまな手法により、細胞学的、生化学的にこの培養細胞の諸性質につき検討が加えられている。

結 語

ヒト腎細胞癌に関する基礎的研究の第1報として過

去2年間にわたり試みてきた試験管内単層培養の結果につき簡単に報告した。15例中上皮様細胞の形成されたものは10例(67%)に達し、またその生着期間も最長10カ月とかなり良好な成績が得られている。また8カ月目に達している1例では株細胞樹立の可能性もつよく、現在細胞学的、生化学的に詳細に検討し、その由来細胞の同定をおこないつつあることを述べた。

ご協力をいただいた大阪警察病院、大阪住友病院、大阪厚生年金病院各泌尿器科に感謝します。なお本研究の一部は文部省科学研究費の助成を受けたものである。

文 献

- 1) 吉永 秀：免疫実験操作法A, p. 450, 日本免疫学会編集兼発行, 金沢, 1975.
- 2) Skinner, D.G., Colvin, R.B., Vermillion, C.D., Pfister, R.C. and Leadbetter, W.F.: *Cancer*, **28**: 1165, 1971.
- 3) Richter, K.M. and Akin, R.H.: *Trans. South. Central Section, American Urological Association*, p. 67, 1957. cited by Bergman, R.U. and Bergman, E.T.: *J. Urol.*, **86**: 642, 1961.
- 4) Bergman, R.U. and Bergman, E.T.: *J. Urol.*, **86**: 642, 1961.
- 5) Dobrynin, Y. V.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **31**: 1173, 1963.
- 6) Jones, G.W.: *Cancer*, **20**: 1893, 1967.
- 7) Shore, B., Wise, G.J., McBride, R.A. and Blender, H.: *J. Urol.*, **103**: 554, 1970.
- 8) Katsuoka, Y., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: *J. Urol.*, **115**: 373, 1976.
- 9) 小松原秀一・山本尊彦・独野健一・関根昭一・佐藤昭太郎：第65回日本泌尿器科学会抄録, p. 46, 1977.
- 10) 勝岡洋治・加藤幹雄・河村信夫：第36回日本癌学会総会記事, p. 65, 1977.
- 11) 田島知行, 飯田邦仁, 赤塚 明, 渡辺敏輝・玉置 憲一：第36回日本癌学会総会記事, p. 134, 1977.

(1977年11月24日受付)