

ヌードマウス移植ヒト泌尿生殖器腫瘍の
ヌードラットへの移植

日本医科大学泌尿器科学教室（主任：川井 博教授）

秋元 成太・坪井 成美・川村 直樹

中島 均・由井 康雄・吉田 和弘

西村 泰司・富田 勝・川井 博

HETEROTRANSPLANTATION OF HUMAN UROGENITAL
MALIGNANT NEOPLASMS TRANSPLANTED IN
NUDE MICE TO NUDE RATSMasao AKIMOTO, Narumi TSUBOI, Naoki KAWAMURA,
Hitoshi NAKAJIMA, Yasuo YUI, Kazuhiro YOSHIDA,
Taiji NISHIMURA, Masaru TOMITA and Hiroshi KAWAI*From the Department of Urology, Nippon Medical School**(Director: Prof. H. Kawai)*

The present paper presents heterotransplantation of human anaplastic prostatic carcinoma transplanted in the nude mice to the nude rats.

The transplantation was performed in 5 rats, and all rats successfully received the tumor fragment. These transplanted tumors grew rapidly. Histology and growth curve of human prostatic carcinoma transplanted in the nude mouse showed no change before or after the heterotransplantation to the nude rat.

The nude rat would become widely used in cancer research, immunology and the study of infectious diseases.

Key words: nude mouse, nude rat, human urogenital tumor

緒 言

ヒト悪性腫瘍における研究上、腫瘍の異種移植は、現在まで数多くのところみがなされてきた。最近、ヌードマウスの出現により、この免疫不全動物での継代移植が可能となったことは、悪性腫瘍の有力な研究方法の1つとして、その価値が認められつつある。

泌尿器科領域でも、すでにかかなりの継代可能株の報告がみられるが、われわれもヒト泌尿生殖器悪性腫瘍株として、膀胱癌1 (NM-B-1)、腎細胞癌2 (NM-R-1, NM-R-2)、ウィルムス氏腫瘍1 (NM-W-1)、なら

びに国立癌センター病理より提供を受けた前立腺癌 (Pro-1) 株を継代維持している。

しかし、このヌードマウスを飼育しての腫瘍株の継代維持には、その株の特性保持上、微生物学的背景として SPF (specific pathogen free) 以上の条件が必要である。さらにヌードマウスは高価である上に、SPF以上の条件をたもつためには、アイソレーターが要求されるなど、繁雑な手技操作がすくなくない。そこでわれわれは異種移植可能な動物として、通常飼育条件下で実験をおこなえる新生児ハムスターを用い、ヌードマウス移植ヒト泌尿生殖器腫瘍の移植をこころみ、

腫瘍増殖を認め報告した¹⁾。

今回は、ヌードマウス移植ヒト前立腺癌を使用し、ヌードマウスより数倍以上体重があるヌードラットへの移植をおこない、腫瘍収量および組織像の比較を中心に検討したので報告する。

研究 方 法

ヌードマウス移植ヒト泌尿生殖器腫瘍として、ヒト前立腺癌株 (anaplastic prostatic carcinoma) を使用した。この株は、国立癌センター病理において、ヌードマウスですでに13代継代移植されたもの、われわれがヌードマウス (BALBC, nu/nu, 6~8 週雄) を用いて、さらに14代 (通算27代) 継代したものを対象に実験をおこなった。

なおこの株については、(1) ホルモン依存性がきわめてすくなく、(2) 継代中、腫瘍増殖状態に変化がみられず、(3) 長期継代しても制癌剤感受性に変化が認められない、の3点を中心に報告した²⁾。

この株の組織学的特徴³⁾も、起源腫瘍の性格をよくうけつぎ、腫瘍の周辺部では小型で細胞質が dark な細胞が多く、中心部は大型で細胞質がやや clear な細胞が多くみられ、起源腫瘍に比し、間質の増加とともに、増殖が激しいためと考えられるが、壊死部分もやや増加しており、anaplastic な型の腫瘍像である。

使用した先天性無胸腺ラット rnu/rnu は、SPF 条件下で飼育されたものを使用した。

生後8週、雄のヌードラット背部皮下に、摘出したヌードマウス移植ヒト前立腺癌株を可及的に、壊死部分をのぞき、無菌的操作下で 2×2×2 mm に細切し、ヌードマウスに使用した移植針^{2~4)}により、ヌードマウスとはほぼ同様な手技で、移植をおこなった。

移植したヒト前立腺癌株 (Pro-1) は、初代移植より27代継代されたもので、生着率はほぼ 100 %、増殖状態をきわめて良好である。

増殖状態の検討には、推定腫瘍重量ならびに腫瘍増殖曲線を併用した。推定腫瘍重量は、移植腫瘍が皮下に存在し、経時的測定が可能である点を利用し、アメリカ国立癌研究所 (NCI) で使用している Battelle Columbus Laboratories Protocol による方式⁵⁾により、つぎの式より求めた。

$$\frac{(\text{短径, mm})^2 \times (\text{長径, mm})}{2} = \text{腫瘍重量 (mg)}.$$

腫瘍増殖曲線は、移植後1週ごとに、縦径×横径×高さの積を求め、対数値に変換したものをもとに、平均値±標準偏差を算出し、図示した。この腫瘍増殖曲線を(1)移植前、(2)ヌードラットでの状態、さらに(3)ヌードマウスに再移植したとき、増殖状態に異常がみられたか否かを検討した。

同様に、組織像についても、通常組織検査法 (HE 染色, Masson-trichrome 染色, PAM 染色) により、ヌードラットへの移植前、移植中、移植後の3段階にわけ、ヌードラット移植にともなう影響を検討した。

研究 結 果

I. 推定腫瘍重量ならびに腫瘍増殖曲線による検討

5匹のヌードラットに移植した腫瘍はすべて生着した。移植後6週の担癌ヌードラットを Fig. 1 に示すが、腫瘍は一塊となり、3.5×4.0×3.0 cm の類球形を呈し、周囲皮下組織との癒着もほとんどみられず、周囲よりの腫瘍血管新生も確認でき、確実に増殖した所見であった。なお、同程度の大きさの腫瘍を、ヌードラットとヌードマウスとで比較検討すると、ヌードラ

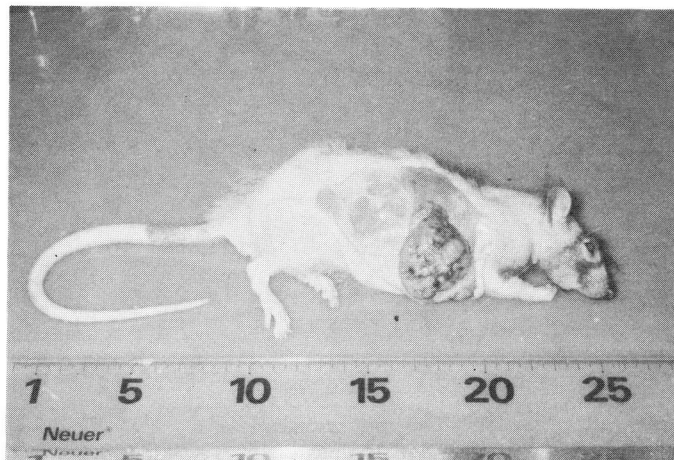


Fig. 1. Nude rat with prostatic carcinoma.

ットにおける方が、組織学的にも、壊死部分が少なく、実際の腫瘍収量はヌードマウスにおけるよりも良好であると推定された。これは、ヌードラットがヌードマウスに比して大きい動物であるため、腫瘍増殖が早く、同時に腫瘍血管新生もすみやかにおこるために、中心壊死のおこる時期が遅れるためではないかと推測される。

1) ヌードラットにおける推定腫瘍重量

$\left[\frac{(\text{短径, mm})^2 \times (\text{長径, mm})}{2} \right]$ につき、平均値 ±

標準偏差値を求め、Fig. 2 に示す。ほぼ4週で約 10 g、5週で約20 g、6週で約 40 g になっていることがわかる。

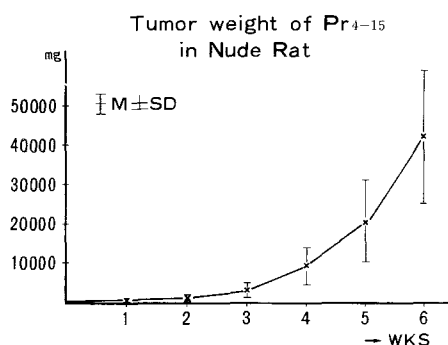


Fig. 2

同様に、ヌードマウスにおける推定腫瘍重量を求めると、4週で約 0.2 g、5週で 0.25 g、6週で 0.38 g で、6週の時点では、初回移植量が違うとはいえ、ヌードラットに比較して実に約 1/100 となっている (Fig. 3)。

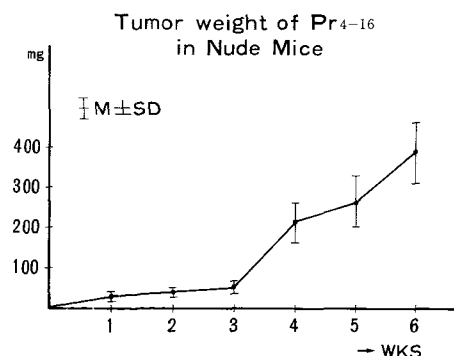


Fig. 3

このように、腫瘍収量の点であきらかな差が認められた。

2) 腫瘍増殖曲線による検討

腫瘍増殖曲線を、ヌードラットとヌードマウスとで

Growth Curve of Pr4-15
in Nude Rat & Nude mouse.

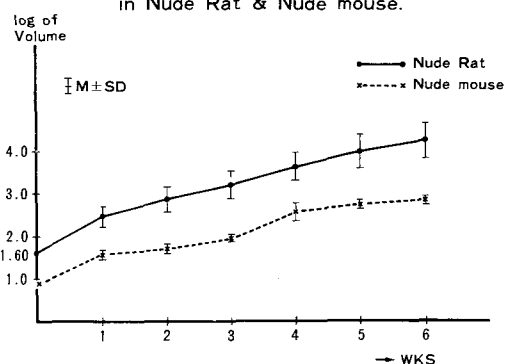


Fig. 4

比較したのが Fig. 4 である。ただし、ヌードラットは $2 \times 2 \times 2$ mm の角の腫瘍片を5個、ヌードマウスは1個を移植したので、正確な比較は困難であるが、増殖状態は両者とも4週まではほぼ同じ上昇カーブを描くが、4週をすぎるとヌードラットの上昇力はそのままだがヌードマウスの上昇力はややおとろえる。つまり、腫瘍収量を考えるとき、ヌードラットの方がより有効であると推察される。

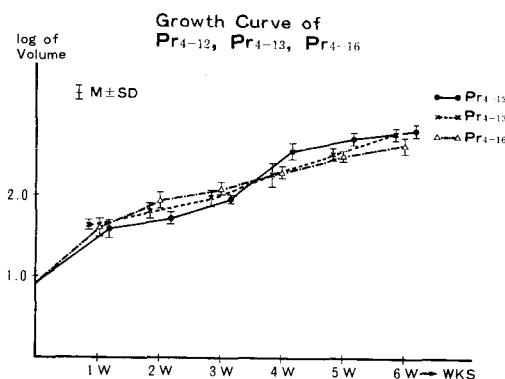


Fig. 5

つぎに、腫瘍をヌードラットを通してヌードマウスにもどしたときの腫瘍増殖曲線を検討した。Fig. 5 に示したが、このなかの Pr4-16 がヌードマウスにもどした直後の腫瘍増殖曲線である。比較のために、Pr4-12 (継代移植25代)、Pr4-13 (継代移植26代) の腫瘍増殖曲線も描いたが、Pr4-16 との間には student *t* test をおこなったが、ほとんど差は認められなかった。いずれの曲線も標準偏差が比較的小さく、増殖状態がかなり一定したものであることを示している。

II. 移植前後の組織像による検討

ヌードマウス移植26代の HE 染色像を Fig. 6 に示

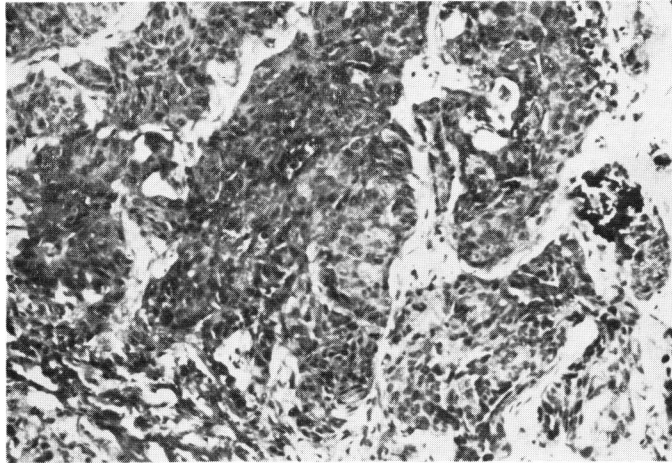


Fig. 6. Histology (HE, $\times 100$) of an anaplastic prostatic carcinoma in nude mouse

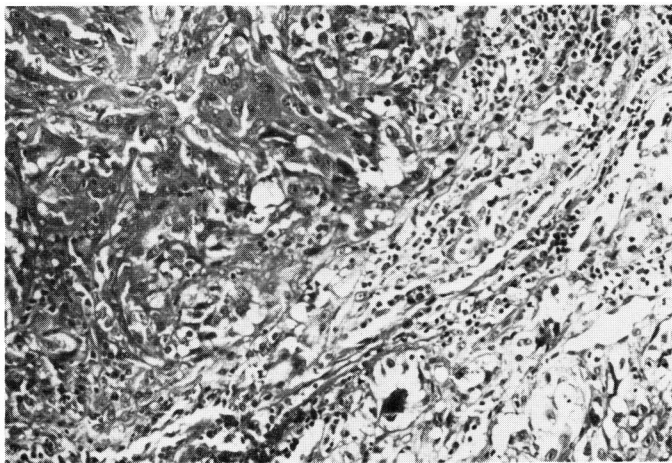


Fig. 7. Histology (HE, $\times 100$) of an anaplastic prostatic carcinoma in nude rat.

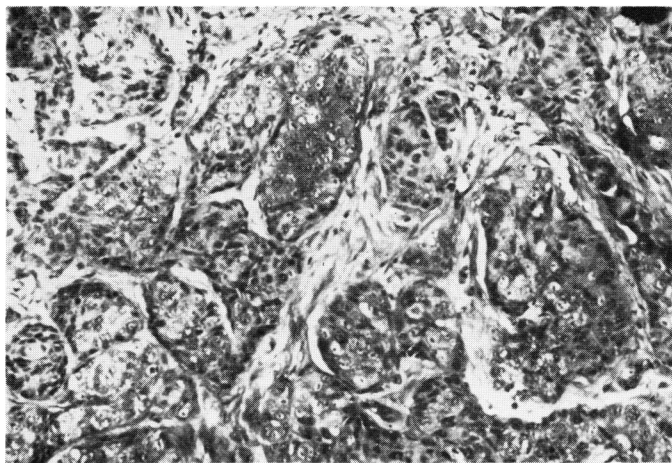


Fig. 8. Histology (HE, $\times 100$) of an anaplastic prostatic carcinoma in nude mouse after transplantation into nude rat.

す。腫瘍の中心部には大型で、やや clear な細胞が多く、周辺部では小型で細胞質が dark な細胞が多くみられており、anaplastic な腫瘍である。

ヌードラットに移植した組織像 (Fig. 7) でも、その性格は十分に保たれており、ヌードマウスにおけるときと同様に、中心部では細胞質が大型でやや clear な細胞が集合し、周辺部では小型でやや dark な細胞から成り立っていた。また、この組織をふたたびヌードマウスにもどしたときの組織像 (Fig. 8) は、ヌードラットにおけるときと同じで、ほとんど変化は認められていない。すなわち、ヌードラットを通す前後の組織上での変化はほとんどみられないことになる。

考 察

ヌードラット rnu/nu は、1953年 Rowett Research Institute で維持されていたラットのコロニーから偶然発見された。このコロニーは、1960年代の初期に絶滅したが、1975年にはふたたび同一コロニーから rnu 遺伝子が発見され、conventional, specific pathogen free (SPF), germ free, の各コロニーが確立した。このヌードラットは、出生直後はうろこ状をした、やや褐色がかった皮膚でおおわれ、2~6週で hairless となってくる。解剖上、胸腺が脂肪組織でおきかわっている。この点、ヌードマウスでは、胸腺が小さく、高度の異常を示しながらも痕跡的にも存在している点⁶⁾でも異なっている。

Festing ら⁷⁾は、ヌードラットとヌードマウスの類似点を指摘し、現在、ヌードマウスが腫瘍学、免疫学、感染学の各領域で多く使用されているが、ヌードラットも同様な分野で用いられるほか、ヌードマウスに比して大きいので、外科的操作もおこないやすく、採血も容易であるという特徴をあげている。基礎的検討として、Vos ら⁸⁾は、ヌードラットの脾においては、胸腺依存領域が欠損していると報告しているのが注目される。

寺田ら⁹⁾は、免疫学的性格を検討し、rnu 遺伝子をホモ型にもつ、このヌードラットでは胸腺依存性抗原 (ヒツジ赤血球) に対する抗体産生は、ヘテロ型 (+/rnu) では、IgM, IgG 抗体ともに産生されるにもかかわらず、ホモ型 (rnu/rnu) では、IgM, IgG 抗体とも検出されないという。さらに、T細胞に、mitogen である CoA, PHA-P に対するホモ型の脾細胞は反応を示さない、などの結果より、rnu 遺伝子をホモ型にもつこのヌードラットにおいては、T細胞機能が欠損しているとのべている。

玉置ら¹⁰⁾は、ヌードマウスで継代維持されているヒ

ト悪性腫瘍10株 (胃癌、肺癌、腎癌、口腔癌、甲状腺癌、平滑筋肉腫、神経芽腫、リンパ腫、骨髄芽球腫) をヌードラット側腹部皮下に移植した。8週齢以下のヌードラットでは全例移植可能で、9週齢以上では22/40と約半数の移植成功率で、ヒト癌の可移植性は、ヌードラットの週齢に依存することが示唆されたとのべている。われわれの使用したヌードラットも8週齢のもので、5匹すべてに生着をみている点からみても、玉置らの主張をほぼ証明するものであろう。

以上のごとく、ヌードラットは、(1) 多量の腫瘍塊採取と、(2) 多量の血液の採取にも有用であり、腫瘍研究の上での有用性は十分にあるものと考えられる。

結 語

1) われわれが保持しているヌードマウス移植ヒト泌尿生殖器腫瘍 (膀胱癌1、腎細胞癌2、前立腺癌1、ウィルムス氏腫瘍1) のうち、増殖状態が良好で、生着率がほぼ100%であるヌードマウス移植ヒト前立腺癌を用いて8週雄のヌードラット背部皮下に移植したが、全例生着した。

2) 推定腫瘍重量は、移植後6週で約40gであり、ヌードマウス6週での0.38gに比して約100倍の重量であった。さらに、組織学的にみても、壊死部分は少なく、実質的な腫瘍収量も十分に得られるものと推定される。

3) ヌードマウスとヌードラットでの組織像の差は認められなかったが、さらにヌードラットを通す前後の組織像でも変化がみられなかった。同時におこなった、移植前後の腫瘍増殖曲線でも差違は認められていない。

ヌードラットは、ヌードマウスとほぼ同じ胸腺欠損動物と考えて、腫瘍研究上多量の腫瘍塊、多量の血液を採取するにも適した動物であると考えている。

本論文の要旨は、第399回日本泌尿器科学会東京地方会で発表した。

文 献

- 1) Akimoto M, Nakajima H, Yui Y, Kawamura N, Kawai H: Heterotransplantation of transplantable human urogenital malignant neoplasms to thymectomized antithymocyte serum treated neonatal hamsters. Acta Urol Jap 26: 119~125, 1980
- 2) 秋元成太・坪井成美・川村直樹・中島 均・由井康雄・吉田和弘・西村泰司・富田 勝・川井 博：ヒト泌尿生殖器系悪性腫瘍の異種移植に関する研

- 究, 第3報, ノードマウス移植ヒト前立腺癌の基礎的検討と数種プラチナ化合物の治療実験. 日泌尿会誌 in press, 1982
- 3) 由井康雄: ヒト泌尿生殖器系悪性腫瘍の異種移植に関する研究, (第1報) ノードマウスへの移植実験およびノ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
- 4) 中島 均: ヒト泌尿生殖器系悪性腫瘍の異種移植に関する研究. 第2報, ノ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
- 5) 花谷勇治・久保田哲朗・山田好則・露木 建・中田宗彦・松本純夫・熊井浩一郎・吉野肇一・石引久弥・阿部令彦: ノードマウス可移植性ヒト胃, 結腸癌5株を用いた実験的化学療法 —Battelle Columbus Laboratories Protocol の評価を中心に—. 日癌治会誌 **15**: 1114~1120, 1980
- 6) 石河園子: ノードマウス胸腺痕跡器官の微細構造, 1. PAM 染色法による検討. 日本網内系学会誌 **19**: 1~10, 1980
- 7) Festing MFW, Má y D, Connors TA, Lovell D, Sparrow S: An athymic nude mutation in the rat. *Nature* **274**: 365~366, 1978
- 8) Vos JG, Kreeftenberg BC, Kruijt BC, Steerenberg P: The athymic nude rat, II. Immunological characteristics. *Clin Immunol Immunopathol* **15**: 229~237, 1980
- 9) 寺田英司・中山太郎・日置恭司・斉藤宗雄・奥平博一: ノードラットのT細胞機能欠損について. *Exp Amin* **29**: 365~367, 1980
- 10) 玉置憲一・日置恭司・丸尾幸嗣・桑原裕子・上山義人・野村達次・吉村真一・秦 順一: 先天性無胸腺ラットの人癌研究への応用について. 日本癌学会総会記事. ラウンドテーブル, p. 19, 1980
(1981年7月20日迅速掲載受付)