

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

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

岡田謙一郎・吉田 修

STUDY ON HETEROTRANSPLANTATION OF MALIGNANT UROGENITAL TUMORS IN NUDE MICE: RESULTS OF TRANSPLANTATION AND THE CHARACTERISTICS OF THE EXPLANTS

Kenichiro OKADA and Osamu YOSHIDA

From the Department of Urology, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. O. Yoshida)

Since 1976, we have transplanted 82 urological neoplasms into nude mice, 46 of which (56%) took. Thirty five of them (43% of the total tumors) are being serially transplanted. This rate of success seems to be better than that obtained at other institutes for both neoplasms of urogenital as well as other tissue origin. The explants basically retained the original characteristics of the native tumors not only in histological pattern but also in tumor markers, even after a long term period of heterotransplantation. However, the histological features of some tumor lines seemed to be reduced. A certain cell population was lost during repeated transplantations. Such a clonal selection may have resulted from the outgrowth of the cell population capable of adapting to the transplanted environment.

Nevertheless heterotransplantation experiments in nude mice are one of the most valuable tools in various cancer research including that in the urological field since a rather high percentage of urologic malignancies take while retaining their original characteristics for a long time.

Key words: Urogenital malignancy, Nude mouse, Heterotransplantation

はじめに

ヌードマウスへのヒト癌組織移植の成功が報告されてすでに15年近く経過した¹⁾。悪性腫瘍に対する各種治療方法の効果検討のみでなく、免疫機構の関与を排除した *in vivo* での癌化過程や発癌因子の解明など、いまやヒト癌の基礎的・臨床的研究において不可欠の動物実験モデルのひとつといえる。

ヌードマウスを用いた研究成果の発表も、実におびただしい量にのぼるが、有用性とともこの実験系の限界と問題点があきらかとなったのも事実である。著者は1973年以来西ドイツヴュルツブルグ大学におい

て、また1976年以降は京都大学泌尿器科学教室において、泌尿器科領域の各種良性・悪性腫瘍の異種移植を試み、生物学的特性の検討や諸治療法の検索につとめてきた。成績は逐次発表してきたが²⁻⁶⁾、ヌードマウス実験の過熱が醒め、新たな視点からの研究が生れつつある現状で、この機会に現在までの移植成績をまとめ、発表することは意義あることと考える。

本稿では、泌尿器科領域の悪性腫瘍を中心に、1976年4月から1984年3月末までの8年間の移植成績をまとめ、移植片の特性がどのように保存されまた変化していくか、主として組織学的所見やバイオマーカーの検討で得られた知見を述べる。

実験材料と方法

1. 移植組織

移植に用いた組織は、大部分手術摘除標本により、新鮮でかつ無菌的に得られたもののみに対象とした。

採取した組織片は、10%胎児仔牛血清(FCS)含有のMEM培養液に浸し、抗生物質添加後移植にいたるまで冷蔵庫内に保存した。

2. ノードマウス

移植に用いたノードマウスは、BALB/C (nu/nu)で、日本クレア K.K., 静岡県実験動物農協、および当大学実験動物施設から購入したものをを用いたほか、一部当教室で♂(nu/nu)×♀heterozygote (nu/+)より得た inbred mouse を使用した。特別な実験目的を除いて、初代移植では6~8週齢の雌雄マウスを用いたが、前立腺組織や睾丸腫瘍では雄マウスのみに移植した。すべてのマウスはSPF環境下またはバイオクリーン環境下のラミナ・フロー・ケージラックに収容し、オリエンタル固型飼料、滅菌水にて飼育した。

3. 移植方法

組織片をPBSにて数回洗浄の後、眼科用剪刀にて細切した。初期には薄刃メスにて組織を薄片として移

植を試みたほかは、大部分糊状になるまで細切後14G移植針にて移植した。

通常の移植部位は背部皮下であるが、実験目的によっては大腿部または腹部皮下におこなった。

可移植株となった腫瘍の継代に際しては、屠殺後70%エタノールに30分間浸した後腫瘍を摘除、以下初代移植と同様に処理した。

実験成績

移植成績：初代および継代移植
移植を試みた順に従って臓器別に移植成績を述べる。

1. 前立腺：癌および肥大症組織

7種類の前立腺癌を延べ18匹のノードマウスに初代移植し、3腫瘍(43%)が5匹(28%)にtakeした。

しかし移植片の生着は組織学的に認められたものの増殖はほとんど見られず、2代継代されたものが1種のみ(PC-1)であった(Table 1)。上記以外の継代株PC-NCCは、前立腺癌転移リンパ節より国立ガンセンター病理部において可移植株として樹立され^{7,8)}、10代継代された後に供与されたもので、以後7年3ヵ月にわたり通算72代継代中である。

前立腺組織の生体外維持は一般に困難で、ノードマウスでの移植成功例の報告は多くない。著者はかつて

Table 1. 前立腺癌の移植成績

#	名称	Take	初代マウス数	Takeマウス数	継代数	移植期間(日)	備考
1	PC-1	+	6	3	1	93	前立腺全摘除標本
2	PC-NCC	(+)	(2)	(2)	71*	2,702*	前立腺癌転移リンパ節
3	PC-3	+	2	1	0	58	全摘標本
4	4	-	2	0	0	-	〃
5	5	-	2	0	0	-	転移リンパ節
6	6	-	2	0	0	-	TUR切除標本
7	7	-	3	0	0	-	原発巣および肝転移(剖検)
8	8	+	1	1	0	65	転移リンパ節
			18	5			
			(18%)				

* 59.3.11.までの継代数を示し、現在なお進行中。

第10代から継代されたため、初代移植の検討には含まない。

Table 2. 前立腺癌移植片の性状と生着率

移植組織の性状	腫瘍の数	初代移植マウス数	Take	
			マウス数	率(%)
単細胞ないし微小細切	4	14	5	36
粗大細切(〜1mm ³)	3	10	6	60
薄片(Φ<1mm wt<50mg)	14	64	53	83
	21	88	64	73

移植成績とマウスのホルモン環境との相関について検討し、移植片の形態維持にアンドロジェン刺激の必要なことをあきらかにした²⁾。そのほかの因子として、移植片の形状と移植成績との相関をまとめた（Table 2）。

表にみるごとく、小さな薄い切片を用いたのが移植成績が良く、前立腺組織に限ってはこの形状で移植を継続することにした。

肥大症組織もヌードマウスへの移植を試みた。すでに発表したものを除き、6種類の腺腫を24匹に移植、4種の肥大症組織が7匹（29%）に生着した。しかし

Table 3. 前立腺肥大症組織の移植成績

#	Take	初代マウス数	Takeマウス数	継代数	移植期間(日)
PA 1	+	5	2	0	249
2	+	6	1	1	100
3	—	2	0	0	—
4	—	4	0	0	—
5	+	6	1	0	119
6	+	1	3	0	39
		24	7 (29%)		平均127

Table 4 腎腫瘍の移植成績

腫瘍の種類	#	Take	初代マウス数	Takeマウス数	継代数	移植期間(日)	備考
腎	NT-1	+	5	3	1	121	
	2	+	2	1	0	77	
	3	—	2	0	0	—	
	4	+	4	2	2	222	
	5	—	1	0	0	—	剖検時肺転移巣
	6	—	3	0	0	—	
	7	+	4	3	3	223	
	8	+	2	2	4	364	
	9	+	2	2	1	241	
	10	+	2	1	25	1,565	
細	11	+	4	2	0	112	剖検時肺転移巣
	12	—	1	0	0	—	転移リンパ節
	13	—	1	0	0	—	
	14	—	2	0	0	—	
	15	+	2	2	26	1,164	
胞	16	+	2	2	27	1,005	(移植継続中)
	17	—	2	0	0	—	
	18	+	3	2	1	187	
	19	—	1	0	0	—	
癌	20	—	3	0	0	—	
	21	—	1	0	0	—	
	22	—	2	0	0	—	
	23	+	2	2	1	151	(移植継続中)
	24	—	2	0	0	—	
	25	+	2	1	4	134	(移植継続中)
	26	—	2	0	0	—	
	27	+	2	1	1	62	
	28	—	3	0	0	—	
		28	14(50%)	64	26(41%)		
他の腎腫瘍	W-1	+	2	2	6	486	ウィルス腫瘍
	2	+	2	1	1	80	
	3	+	6	6	3	1,020	
	NB-1	—	6	0	0	—	神経芽細胞腫
		4	3(75%)	16	9(56%)		
計		32	17(53%)	80	35(44%)		

(アンダーラインは59.3.31.現在継代数)

継代移植は不可能で、移植片の維持は一代に限定された。したがって生着期間はマウスの life span に左右され、最短39日、最長249日におよび、平均127日であった (Table 3, Fig. 1).

2. 腎腫瘍

現在までに表に示すごとく32種の腎原発の悪性腫瘍の移植を試み、17種 (53%) に移植された。初代移植をおこなったヌードマウスは80匹で、うち35匹 (44%) で生着し、増殖した (Table 4).

32の腎腫瘍のうち、ウイルス腫瘍3, 神経芽細胞腫1で、残る28腫瘍は腎細胞癌であった。神経芽細胞腫は移植に成功しなかったが (0/6), ウイルス腫

瘍は3腫瘍すべて移植可能で、90%のマウス (10) に生着し継代された。また28の腎癌のうち14腫瘍 (50%) が移植され、41%のマウス (26/64) に生着した。また移植に成功した17腫瘍のうち、8種の腫瘍が長期継代株 (1年以上継代移植されたか、それ未満で現在移植継続中のもの) となった (うち1例はウイルス腫瘍)。このように腎腫瘍は移植率も高く、容易に継代移植されるので、ことに治療法の乏しい現状では臨床的に有用性の高い *in vivo* 実験系と考える。継代移植された腎癌の組織型をみても、淡明細胞型から、紡錘形細胞を混じた悪性度の高いものまでさまざまであり、後述の他臓器の悪性腫瘍と同様に、長期間移植



Fig. 1. 前立腺肥大症組織 (PA-2), ヌードマウス移植後100日目の移植片の組織像。著明な扁平上皮化生を来した腺組織とともに、原型を保つ腺組織も散見される。HE 染色×100.

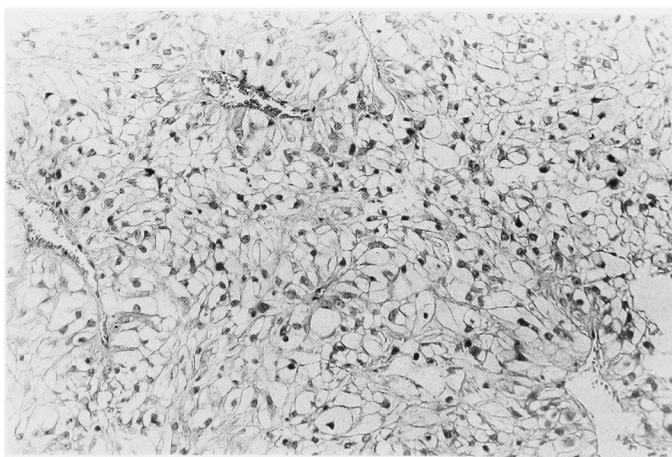


Fig. 2. 腎細胞癌 (NT-10), ヌードマウス3代継代移植終了時 (初代移植時より281日後, 以下同じ) の病理組織像。典型的な淡明細胞癌である, HE×100.

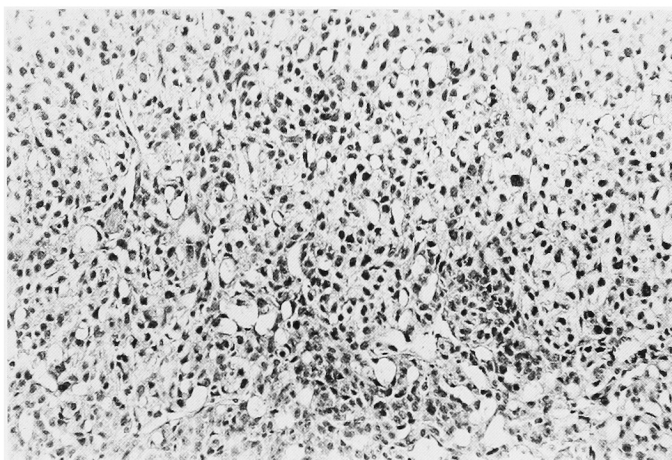


Fig. 3. 腎細胞癌 (NT-16) 8 代継代後 (1 年半後) の病理組織像.
異型性の強いいわゆる顆粒細胞から成る, HE×100.

Table 5. 尿路上皮腫瘍の移植成績

#	Take	初代マウス数	Takeマウス数	継代数	移植期間 (日)	備考
BT-1	—	3	0	0	—	膀胱癌
2	+	2	1	0	98	◇
3	+	2	1	1	77	◇
4	+	3	1	0	79	◇
5	+	2	1	0	41	尿管癌
6	—	5	0	0	—	膀胱癌(TUR)
7	+	4	2	1	91	◇
8	+	2	2	68	2,196	◇, 継代移植中
9	+	4	1	67	1,653	腎盂癌, 継代移植中
10	+	4	2	1	70	膀胱癌
11	+	2	2	44	1,299	◇, 継代移植中
12	—	1	0	0	—	◇
13	—	2	0	0	—	◇
計	13	9(69%)	36	13(36%)		

後も原型はよく特長を残していた (Fig. 2, 3).

3. 尿路上皮腫瘍

尿管腫瘍, 腎盂腫瘍各 1 例を含め, 尿路上皮(膀胱)腫瘍 13 種を 36 匹のヌードマウスに移植し, 9 腫瘍 (69%) が 13 匹 (36%) に生着した. またこのうち 3 腫瘍 (腎盂腫瘍 1, 膀胱腫瘍 2) は, 3 年 6 カ月～5 年 10 カ月の長期間にわたって継代移植されている (Table 5).

4. 睪丸腫瘍

30 種類の睪丸腫瘍を 82 匹のヌードマウスに移植し, 17 腫瘍 (57%) が 30 匹 (37%) に生着した. このうち 1 種は傍睪丸肉腫ではかはすべて胚細胞腫瘍で, 11 腫瘍は精上皮腫, 18 腫瘍は非精上皮腫であった (Table 6).

精上皮腫は 3 腫瘍 (27%), 22 匹中 5 匹 (23%) に移

植可能であったのに対し, 非精上皮腫は 18 腫瘍中 13 (72%), また 55 匹中 23 匹 (43%) に移植され, 前者にくらべ移植率は高かった. また胚細胞腫瘍の長期継代株 9 株のうち, 前者は atypical seminoma 1 例のみであったのに対し, 後者 8 例であった. また傍睪丸肉腫 1 例も長期継代中である.

以上のことから, 睪丸腫瘍の移植にあたっては, 腫瘍の悪性度～腫瘍細胞の増殖能が移植の可否を左右する大きな因子であることが推測された.

表に掲げる継代株のほか, シスプラチンおよび PVB 療法耐性株 (HT-7 & 10), ビンクリスチン, ブレオマイシン耐性株 (HT-4 & 10) などを樹立, 実験に供している.

Table 6. 睪丸腫瘍の移植成績

腫瘍の 種類	#	Take	初代マ ウス数	Take マウス数	継代数	移植期間 (日)	備 考
精 上 皮 腫	HT-2	+	2	2	0	66	
	3	+	2	1	0	不詳	
	5	—	2	0	0	—	
	9	—	2	0	0	—	
	13	—	2	0	0	—	
	14	+	2	2	32	1,897	atypical seminoma
	18	—	2	0	0	—	
	20	—	2	0	0	—	
	22	—	2	0	0	—	
	27	—	3	0	0	—	
	29	—	1	0	0	—	
	11	3 (27%)	22	5 (23%)			
非 精 上 腫	HT-1	+	4	2	0	118	胎児癌(E)
	4	+	3	1	94	2,622	E, 絨毛癌(C), 精上皮腫(S)
	6	—	2	0	0	—	C
	7	+	5	2	42	2,206	E
	8	+	7	1	30	1,069	C
	10	+	3	1	52	2,053	奇形癌(T), E, C
	11	+	3	1	2	252	E
	12	+	3	3	1	191	T
	16	+	3	3	12	891	E, C
	17	+	2	2	3	249	E
	19	—	6	0	0	—	E, S, C
	21	+	1	1	15	534	E
	23	+	3	2	2	214	T
	24	+	2	2	3	212	E, C
	25	+	2	2	1	40	E, T, C
	26	—	2	0	0	—	E, S
	28	—	2	0	0	—	E, T, C
	30	—	2	0	0	—	T, E, C
	18	13 (72%)	55	23 (42%)			
小計	29	16 (55%)	77	28 (36%)			
その他	HT-15	+	5	2	23	987	傍睪丸肉腫
合計	30	17 (57%)	82	30 (37%)			

(下線を附した腫瘍株は現在移植継統中)

Table 7. 尿路性器以外の悪性腫瘍, 培養細胞, 実験動物腫瘍の可移植株一覧

名称	継代数	移植期間(日)	起源
PTT-1	1	238	副甲状腺腫
THR-1	1	80	甲状腺癌
COL-1	1	145	S状結腸癌
92EB33	13	735	ヒト前立腺癌細胞
20PC93	11	458	〃
27NC65	9	316	ヒト腎癌細胞
I ₂₀	4	275	BALB/C(+nu), 自然発生 線維肉腫
MMK-1	26	1160	同上, 自然発生乳癌
MMK-2	14	494	〃
MMK-4	4	95	〃
BBN	16	647	BALB/C(+nu), BBN 誘発膀胱癌

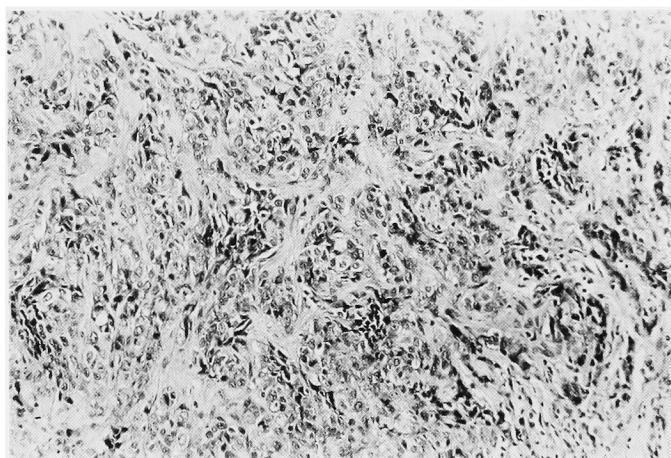


Fig. 4. BBN 誘発可移植マウス膀胱癌の病理組織像で、細胞の異型性が強い移行上皮由来をうかがわせる。ヌードマウス5代継代(148日)後、HE×100.

Table 8. 尿路性器悪性腫瘍のまとめ

腫瘍	生着腫瘍数/ 移植腫瘍数(%)	生着マウス数/移植マウス数		継代腫瘍 (%)
		全体(%)	生着時(%)	
前立腺癌 ¹⁾	3/7 (43)	5/18 (28)	5/9 (56)	1 (14)
腎腫瘍	17/32 (53)	35/80 (44)	35/48 (73)	15 (47)
尿路上皮癌	9/13 (69)	13/36 (36)	13/25 (52)	5 (38)
睾丸腫瘍 ²⁾	17/30 (57)	30/82 (37)	30/52 (58)	14 (47)
計	46/82 (56)	83/216 (38)	83/134 (62)	35 (43)

1) 第11代から継代した前立腺癌(PC-NCC)は除外した。

2) 傍睾丸肉腫(HT-15)1例を含む。

5. その他

以上の尿路性器悪性腫瘍組織のほか、それらの培養細胞株、他臓器の悪性腫瘍、また自然発生あるいは薬剤誘発マウス実験腫瘍など、多岐にわたって同種あるいは異種移植を試みた。生着し継代されたもののみ表に一括する (Table 7). このうち BBN 腫瘍は有用な実験モデルと考えるので、簡単に紹介する。

生後6週齢の BALB/C (nu/+) 雌マウスに 0.05% BBN を約20週間摂取させた後、2匹のマウス膀胱を取り出し、mince した後雄ヌードマウス背部皮下に移植、4か月後に生じた腫瘍を継代移植して可移植株を樹立した。この腫瘍は図に見るように移行上皮癌の特長をもった増殖能の盛んな腫瘍で、ヌードマウスのみでなく、heterozygote にも100%移植可能で、両系の間で増殖速度に差は見られない (Fig. 4).

6. 尿路性器悪性腫瘍移植成績のまとめ

前述の移植結果から、尿路性器悪性腫瘍に限って成績をまとめると表のごとくである (Table 8).

移植を試みた82腫瘍中生着したのは46 (56%) であ

るが、このうち継代が可能であったのは35 (43%) であった。尿路上皮癌、睾丸腫瘍、腎腫瘍は比較的高率に移植可能で、初代移植で生着した腫瘍の80%は継代された。前立腺癌は移植が困難で、いったん生着した腫瘍も増殖はほとんど見られず、PC-NCC を除いて1回継代されたものが1例あるのみである。

移植されたヌードマウス別に生着の有無をみると、82腫瘍の初代移植で216匹中83匹 (38%) に、また生着した46腫瘍に限ると62%のマウスに生着したことがわかる。

長期継代株は23腫瘍で、表にみるごとく腎腫瘍、睾丸腫瘍に多くみられ、移植期間が7年以上におよぶ腫瘍株も存在する (Table 9).

移植組織の性状

長期間継代移植された腫瘍について、基本的な性格がどのように保持されるか、形態学的にまた腫瘍マーカーの面から経時的に検討した。

1 前立腺組織

移植した前立腺癌および肥大症組織が長期間ヌード

Table 9. 継代中または長期継代移植された尿路性器悪性腫瘍株一覧 (1976年4月～1984年3月31日)

名称	起源腫瘍	継代数	移植期間(日)
PC-NCC	前立腺癌転移リンパ節	72	2,702
BT-8	膀胱癌	69	2,196
BT-9	腎盂癌	68	1,653
BT-11	膀胱癌	45	1,299
W-1	ウィルムス腫瘍	7	486
W-3	〃	4	1,020
NT-10	腎細胞癌	26	1,565
NT-12	〃	5	364
NT-15	〃	27	1,164
NT-16	〃	28	1,005
NT-23	〃	2	151
NT-25	〃	5	154
HT-4	睾丸胎児癌(E), 絨毛癌(C), 精上皮腫(S)	95	2,622
HT-4VCR	同上ビンクリスチン耐性株	60	1,993
HT-7	E	43	2,206
HT-8	C	30	1,069
HT-10	同奇形腫(T), E, C	53	2,053
HT-15	傍睾丸横紋筋肉腫	24	987
HT-16	睾丸E, C	12	891
HT-21	E	15	534
HT-23	T	3	214
HT-24	E, C	4	212
HT-25	E, T, C	1	40

注) 継代数に下線を付した腫瘍株は、現在継代されていない。

マウスに生着することはすでにあきらかにしたが²⁾, 組織学的のみでなく, 細胞の生化学的な特質もよく保存された. 図5は, 移植41日後の癌と共存する肥大症組織の酸フォスファターゼ染色⁹⁾であるが, 腺上皮細胞に一致して強い酵素活性を証明した. 同時に染色した宿主マウスの肝, 腎組織では活性は殆んど見られなかったことから, ヒト前立腺由来であることはあきらかである (Fig. 5).

長期継代株である PC-NCC は組織学的には未分化腺癌ないしは未分化癌であり (Fig. 6), スードマウスの性差, ホルモン負荷によっても増殖速度に差のないことから, アンドロジェン非依存性と考えている. しかし, Gomori 法¹⁰⁾により腫瘍の酸フォスファターゼ染色をおこなったところ, 胞体が褐色に濃染する酵素活性の高い細胞集団を認めた. 担癌スードマウスの血中酸フォスファターゼ値も, 酵素法, RIA 法によって特異的に高いことも証明されている⁹⁾.

2. 腎腫瘍

前述のとおり, さまざまな組織型を示す腫瘍が比較的高率にかつ長期間移植可能である.

Fig. 7は淡明細胞型の腎細胞癌 NT-10の移植前,

および移植2年7か月後, 17代継代後の同一腫瘍の病理組織像であるが, ほぼ同一の組織像を示す (Fig. 7(a)(b), および Fig. 1参照).

3. 尿路上皮腫瘍

長期継代3株のうち, BT-8, BT-9の original tumor はもともと悪性度が高かったが, 移植を重ねるにしたがって基本的性状に変わりはないものの細胞の悪性度はなお一層高くなる傾向がみられた (Fig. 8(a)(b), 9(a)(b)).

いっぽう BT-11は, 移植後4年近くを経ても移行上皮癌の特長をよく保存していた. しかし継代移植初期(9カ月経過)では, Fig. 10に見るような扁平上皮化生の傾向が移植前と同様に見られたが, 長期継代後にはこのような所見はなく, ほぼ一般的な移行上皮癌であった (Fig. 10(a)~(c)).

4. 睾丸腫瘍

長期継代株のうちから, 基本組織型である精上皮腫, および胎児癌, 絨毛癌の3腫瘍について移植株の組織所見を見ると, Fig. 11~14のごとくいずれも原型の特長をよく保存している (Fig. 11(a)(b)~14(a)(b)).

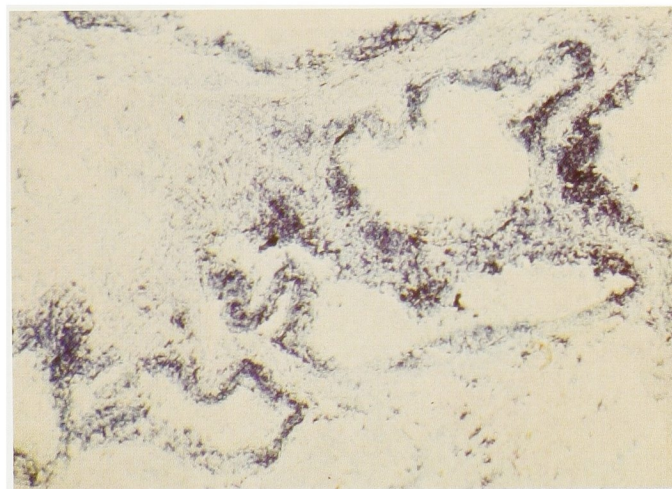


Fig. 5. スードマウス移植41日後の前立腺組織の酸フォスファターゼ染色, 癌と共存する良性腺組織の腺上皮に限局して強い酵素活性の存在を見る. Sigma キットによる酸フォスファターゼ組織化学染色 $\times 40$.

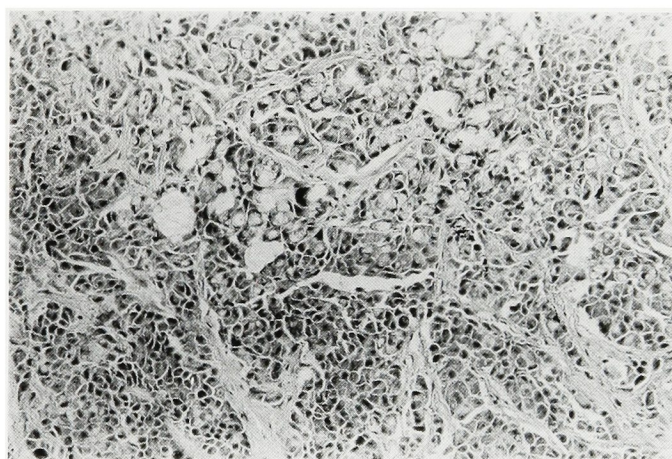


Fig. 6. 前立腺癌 (PC-NCC) の11代継代移植後, 異型性の強い細胞から成る未分化腺癌ないしは未分化癌, HE $\times 100$.

Table 10. 非セミノーム睾丸腫瘍移植ヌードマウスの血中 AFP 値 (ng/ml; RIA)

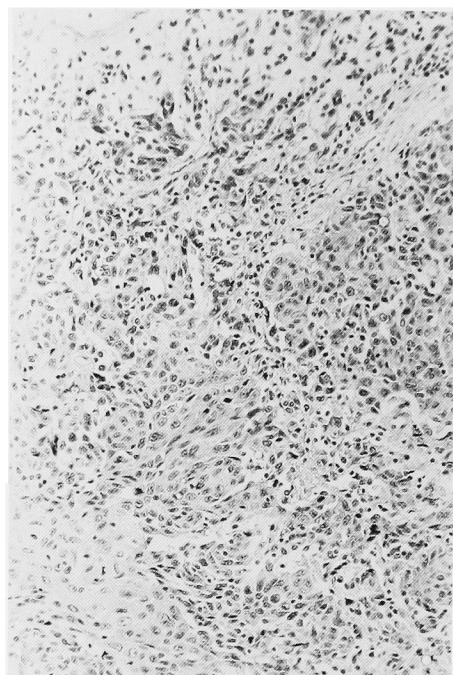
	マウス数	<5ng	>320ng
HT-4 担癌マウス			
>0.5cm ¹⁾	8	0	8 ²⁾
<0.03cm ¹⁾	4	4	0
対照群	6	6	0

1) 腫瘍の大きさ 2) 最高値 6380ng/ml

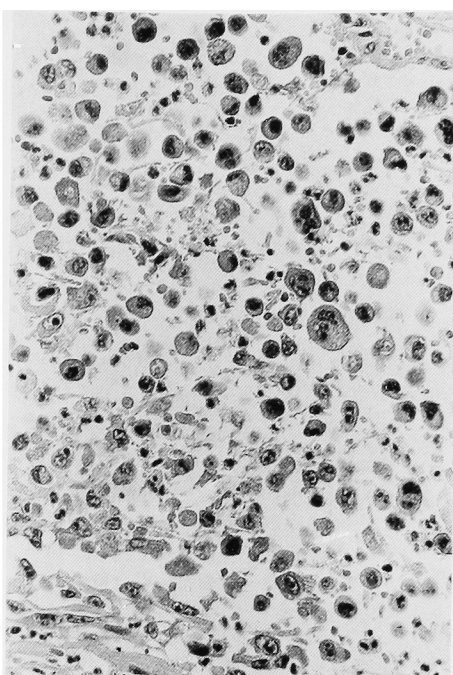
形態学的にのみでなく, これらの腫瘍は機能的にも移植によっても変化を受けないことが確められた.

Fig. 15 は上記組織型の混合腫瘍である HT-4 株の 8 代移植後の AFP 蛍光抗体染色であるが, 胞体に強い蛍光を発する AFP 産生細胞が多数認められた. 同時に, 担癌マウスの血中 AFP 値は, 腫瘍の大きさに応じて高値になることが示された (Fig. 15, Table 10).

しかし同様な混合組織型の非セミノーム腫瘍である HT-10 は, 移植後 5 年 8 カ月の現在にいたるも担癌ヌードマウス血中 AFP は高値で, 免疫組織化学的に,

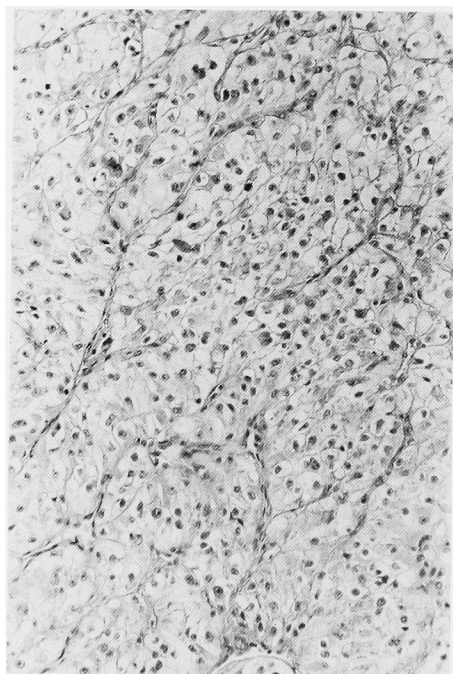


(a)

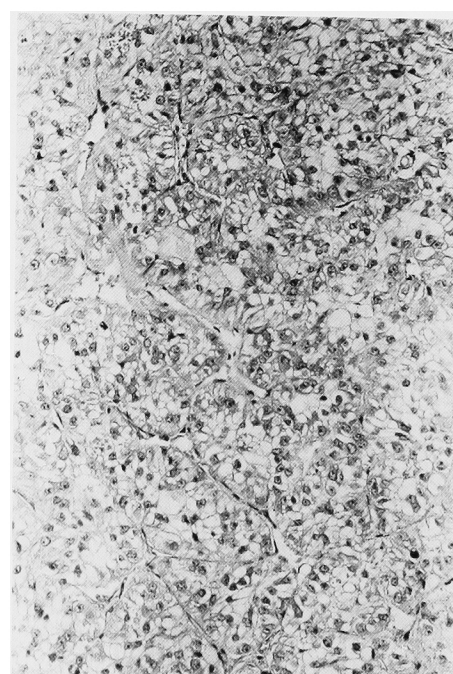


(b)

Fig. 8 (a)~(d). 腎盂癌 (BT-9) の移植前後の組織学的所見の推移. 移植前では扁平上皮化生をともなった細胞集団と未分化型腺癌を思わせる細胞集団がみられ (a), 一部では粘液産生能を持つ大小不同の細胞が粘液中に浮遊する像がみられる (b).

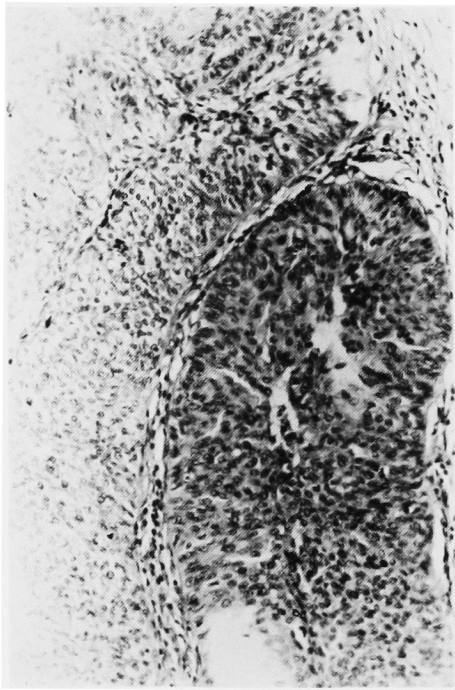


(a)

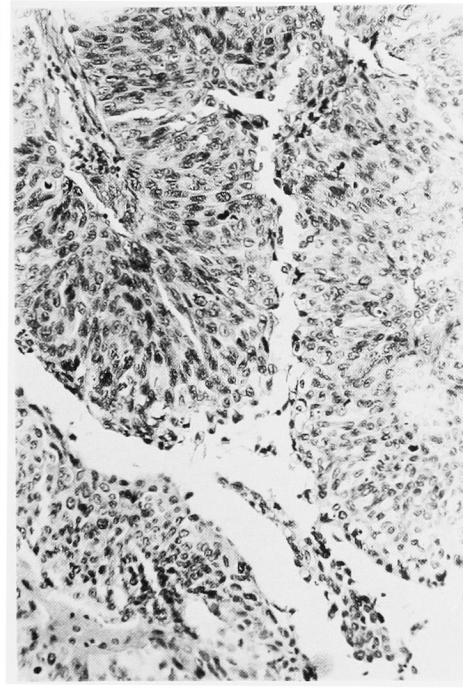


(b)

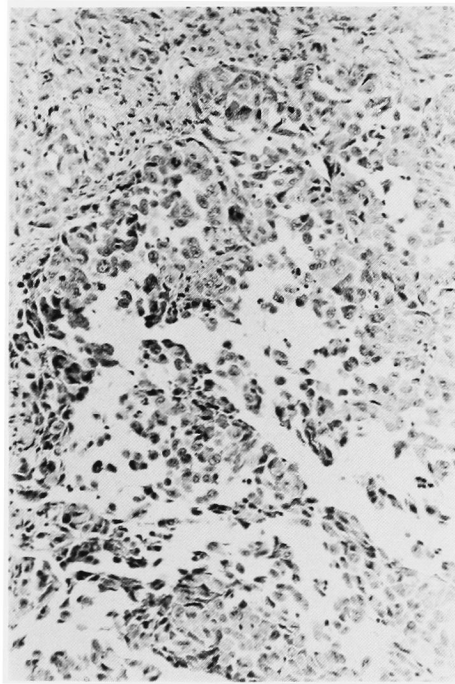
Fig. 7 (a) and (b). 腎癌 (NT-10) の移植前 (a), および移植2年7ヵ月後 (b) の病理組織像. いずれも淡明細胞より成り継代にともなう形態上の変化はほとんどない. いずれも HE×100 (Fig. 1 参照).



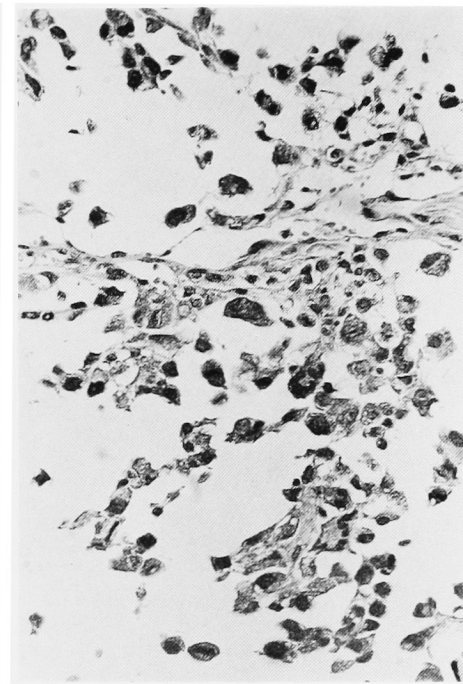
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 9 (a) and (b). 膀胱癌 (BT-8) の移植前 (a) と、66代継代後 (5年9ヵ月後) (b) の組織像。長期間の移植によって細胞の異型性は若干増すが、細胞の乳頭状配列、移行上皮の特性に変わりはない。HE 染色 × 100 (a) と × 200 (b).

60代継代後 (4年後) にも、扁平上皮化生の所見はないものの (a) と同様の所見がえられ (c), 異型性の強い粘液産生能を有する細胞もみられる。ただし粘液産生は移植前、あるいる移植早期にくらべ減じている (d), いずれも HE 染色, 弱拡大 × 100 (a), (c) と強拡大 × 200, (b), (d).

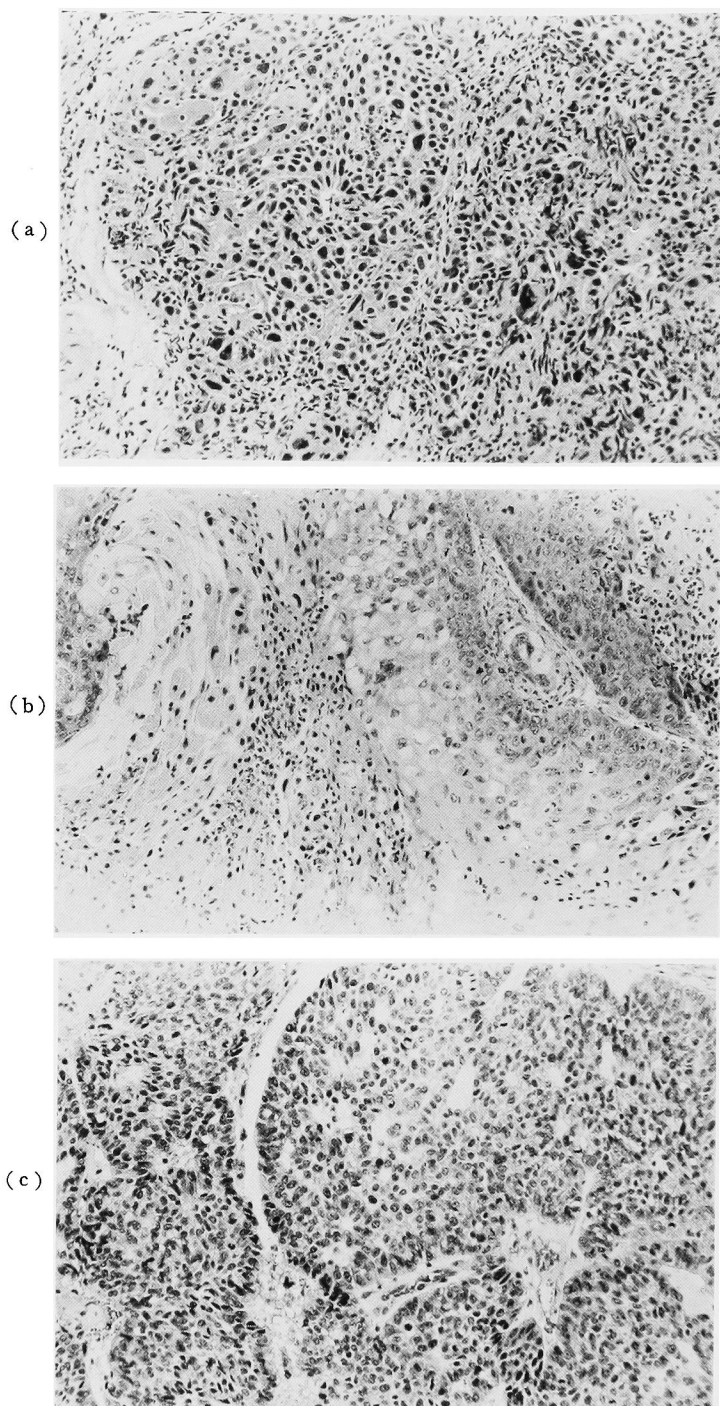
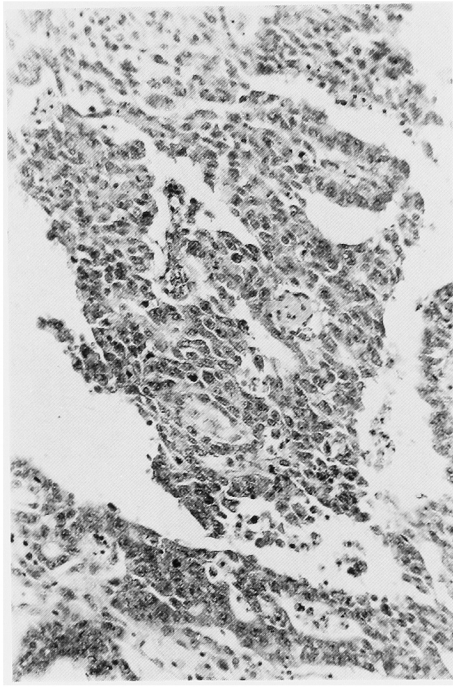
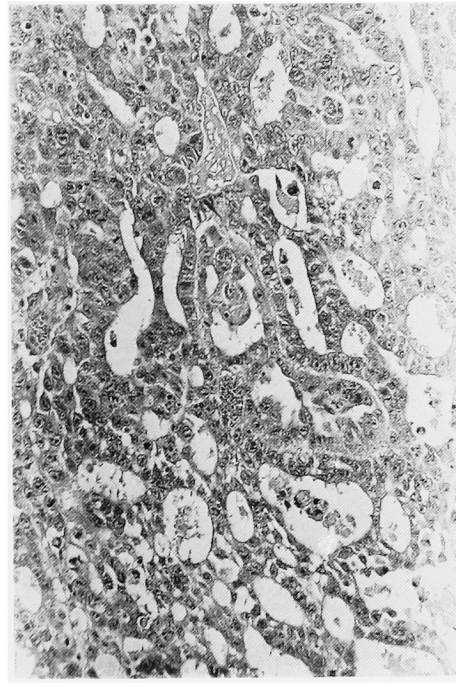


Fig. 10 (a)~(c). 膀胱癌 (BT-11) の移植前 (a), 4代継代後(276日後) (b), および41代継代後(3年4ヵ月後) (c) の組織像. 移植前および移植後比較的早期にみられた扁平上皮化生や異型性に富んだ細胞集団はみられず, ほぼ均一な移行上皮癌の所見を示す. いずれも, HE $\times 100$.

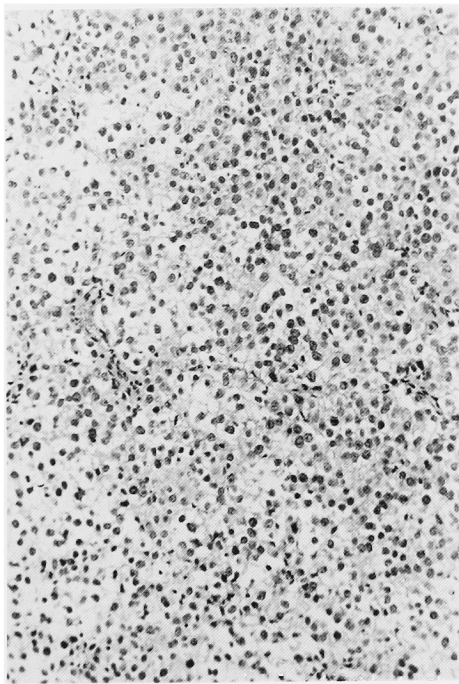


(a)

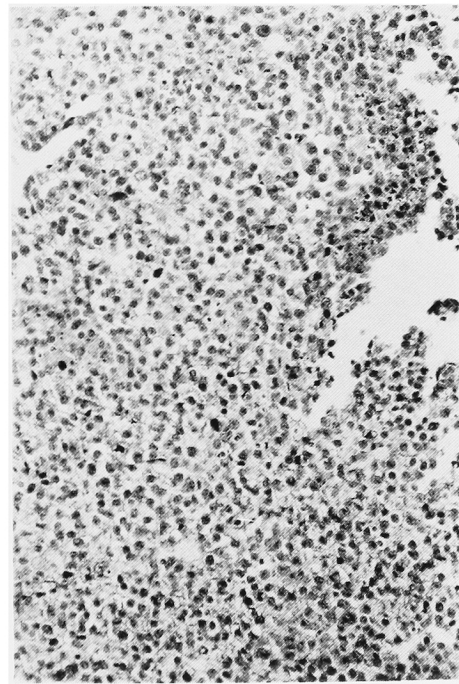


(b)

Fig. 12 (a) and (b). 睾丸胎児癌 (HT-7) の移植前 (a), 3 代継代後 (358 日後) の組織像 (b). 移植後組織構築は均一化され, 胎児癌の典型的な組織学的所見を示す. いずれも HE×100.



(a)



(b)

Fig. 11 (a) and (b). 精上皮腫 (HT-14) の移植前 (a), 32 代継代後 (5 年 2 ヶ月後) (b) の組織像. 長期移植によっても組織学的所見にほとんど変化はみられない. いずれも HE×100.

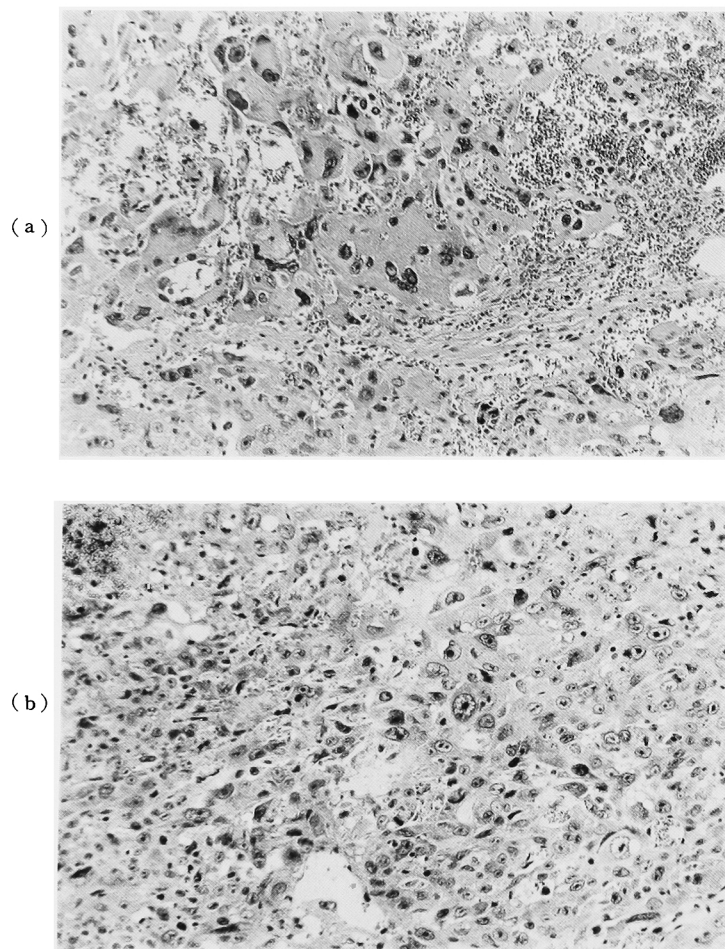


Fig. 13 (a) and (b). 辜丸絨毛癌 (HT-8) の移植前 (a), 5代継代後 (264日後) (b) の組織像. ラングハンス細胞, 合胞体細胞の存在など移植前後で組織学的所見に変化はない. いずれも HE $\times 100$.

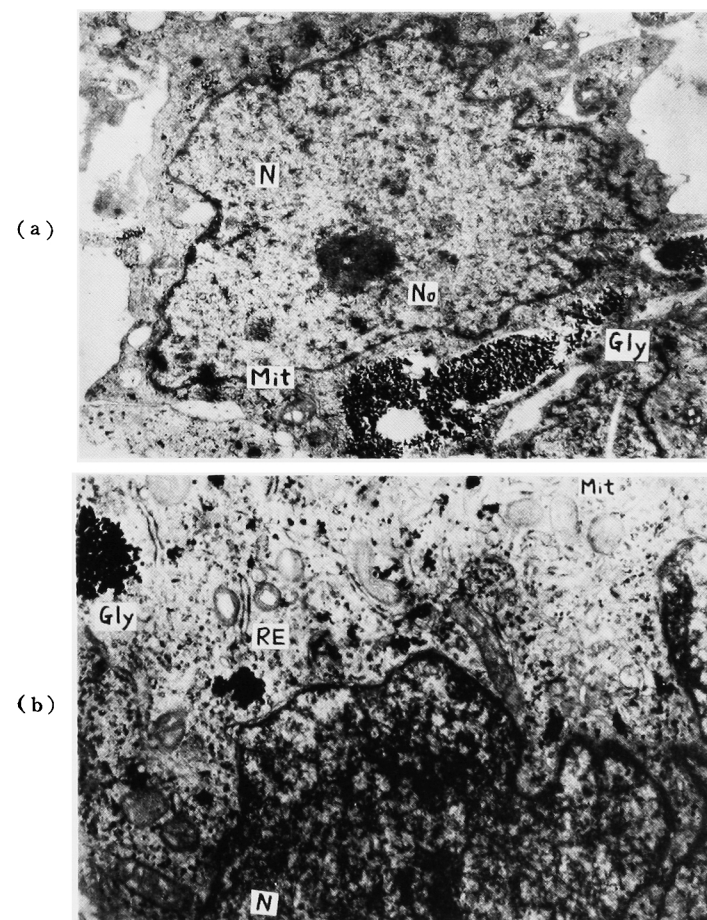


Fig. 14 (a) and (b). 混合型非セミノーム 辜丸腫瘍 (HT-4) の8代継代後 (1年後) の胎児癌組織の電顕像. 豊富な glycogen 顆粒 (Gly), mitochondria (Mit) の存在がみられ, endoplasmic reticulum (RE) および desmosome の存在は上皮性細胞 (胎児癌細胞) であることを示す. N: 核, No: 核小体. (a), (b) とも $\times 5,000$.

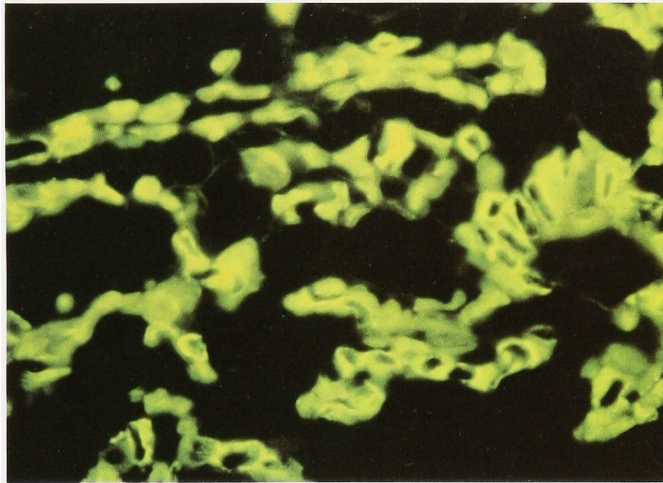


Fig. 15. 前図と同一腫瘍の AFP 蛍光抗体染色. 胞体に強い蛍光を発する細胞集団が多数認められる. 抗ヒト AFP 羊血清, FITC 処理による, $\times 400$. (担癌ヌードマウス血中 AFP 値は 1,680 ng/ml であった).

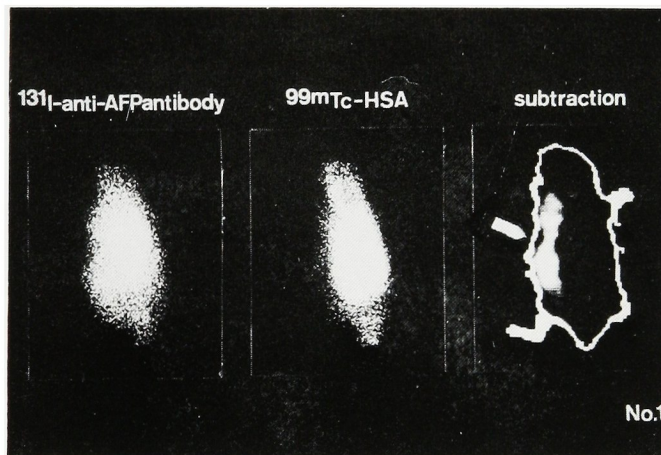


Fig. 16. 第 44 代継代の胎児癌+奇形腫 (HT-10) 担癌マウスの ^{131}I -抗 AFP 抗体による腫瘍シンチグラム. 腫瘍移植部位に一致して RI 取り込みの増加がみられた. 右端は $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -標識ヒト血清アルブミンのイメージで減算したものの. 矢印は腫瘍存在部位を示す (阪原ら¹¹⁾ (1984) による)

また ^{131}I 標識 AFP ポリクローナル抗体によるシンチグラフィーによっても集積が認められるが¹¹⁾ (Fig. 16), 移植初期に高値であったマウス血中 hCG は, 継代を重ねるにしたがって陰性となった. これは, 組織学的にも合体様巨細胞 (STGC) が消失し, 酵素抗体法によっても証明されなくなったことと一致する (Fig. 17(a) (b), 18).

このように, 長期継代に際しては, 基本的性状が不

変である一方で, ある種の細胞集団の脱落や優位, すなわち移植によるクローン選択が起こりうることが推定される.

考 察

ヌードマウスへのヒト悪性腫瘍の移植実験で臨床的にもっとも期待されるのは, 薬剤や放射線の治療効果の検討と, これを通じてより有効な治療法を開拓する

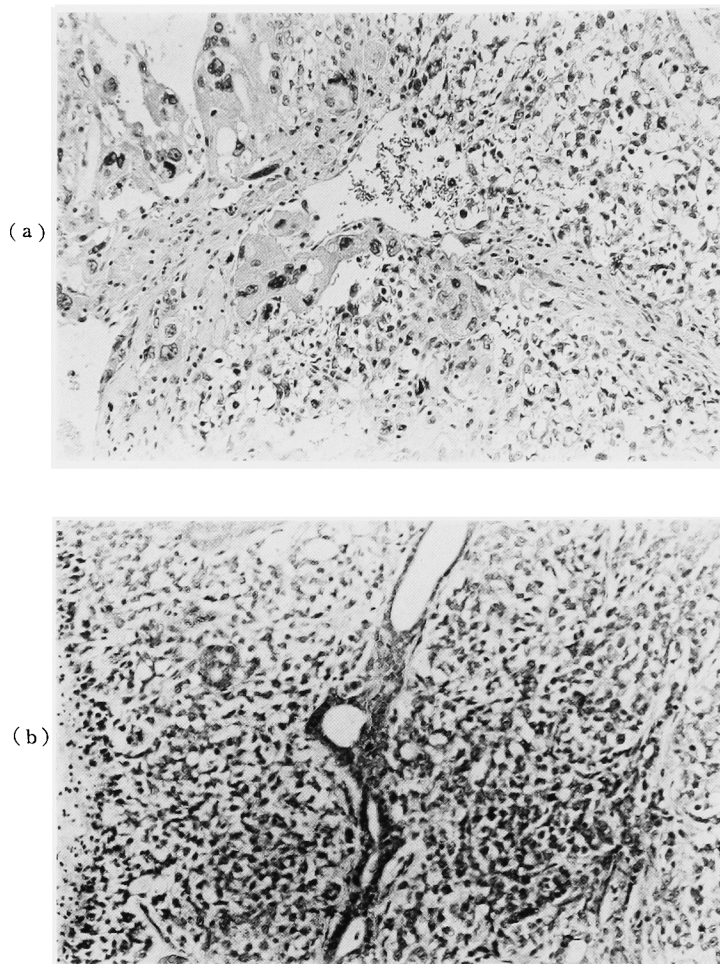


Fig. 17 (a) and (b). HT-10 腫瘍の3代継代後(278日後)(a), および28代継代後(2年5か月後)(b)の組織像. 移植早期には合胞体様巨細胞が多数認められるが(a), 継代にともなうに数を減じ, 長期移植後には ほぼ一様に胎児癌の組織所見を示す(b). いずれも HE $\times$ 100.

ことであろう。そのためには、腫瘍組織が高率にかつ長期に継代移植されることが必要で、また移植組織の性状が原腫瘍のそれとほぼ同一でなければならない。

著者は、永年にわたって尿路性器腫瘍を中心にヌードマウスへの異種移植を試みてきたが、悪性腫瘍に限ると、移植率は56% (82腫瘍中46腫瘍が生着) で、35腫瘍(全体の43%, 生着した腫瘍の76%)が継代移植可能であり、そのうち22腫瘍(全体の27%, 継代腫瘍の63%, ただし HT-4 ビンクリスチン耐性株を除く)が1年以上にわたって継代移植されたか または進行中である。これは他機関の、あるいはほかの領域でのヌードマウス移植成績よりも優れており、玉置・上山¹²⁾

(1976), 大沢・上山¹³⁾ (1981)の実験動物中央研究所での移植成績のまとめでは、140腫瘍の移植率は25%, 癌腫に限っても35.7%であったとしている。Shimosato et al.⁸⁾ (1976)も、91腫瘍中22腫瘍(24%)が可移植株で、うち14株(15%)が継代可能であったとし、谷ら¹⁴⁾ (1977)は消化器癌64腫瘍で17腫瘍(27%)が肉眼的に生着したと報告している。また泌尿器科領域では、川井ら¹⁵⁾ (1978)が、26腫瘍の移植で12腫瘍(46%)に生着し、6腫瘍(23%)に継代可能であったとし、塚本・熊本¹⁶⁾ (1983)は61腫瘍中、21%に生着し、13%に継代されたと述べている。

上記に比べ、われわれの尿路性器悪性腫瘍の移植成

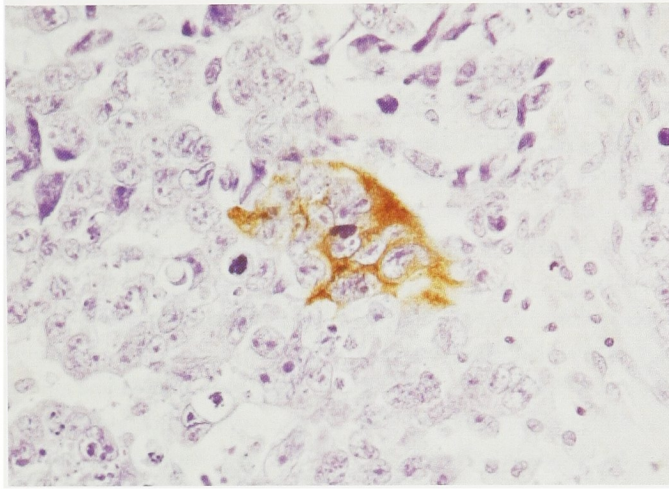


Fig. 18. HT-10 腫瘍10代継代後の腫瘍組織にみられる合胞体様巨細胞 (STGC), 酵素抗体染色による. $\times 200$.

績は優れており、この実験系は泌尿器科領域における癌研究においてもほかの領域にとらず重要な役割を果たしうると考える。

移植をできるかぎり高率に成功させるには、後述の組織固有の条件は別として、一般的に、新鮮でかつ細菌感染のない組織を用いることは無論のこと、背部皮下で移植組織の移動が少ない部位を選び、また創切開口はできるだけ離れたところに設けるのが、組織の逸脱や感染を防止するうえからも望ましい。また移植組織は、前述のとおり前立腺癌では薄い切片とする方がよいが、ほかの腫瘍では著者はやや粗い細切をおこなったものを移植針にて挿入している。また使用するヌードマウスは、移植に成功した腫瘍においても62%のマウスにしか着生しない事実から、最低2匹は必要である。著者は、平均2.6匹 (216/83) 使用している。

このような努力にもかかわらず、前立腺癌の移植、ことに継代株の樹立は困難で、著者の知る限りではPC-NCCのほかは2例を数えるにすぎない^{17,18)}。新鮮な組織を充分に得る機会が乏しいことも理由のひとつであろうが、前立腺癌が、もともと移植に適さない腫瘍であることがおもな原因と考えられる。ヌードマウスにtakeする条件として、睾丸腫瘍の移植に際してみられたように、まず増殖能の大きいことが必要とされ、またヌードマウスからの血管新生を促すたとえばangiogenetic factorのごとき因子が豊富であることがあげられる¹²⁾。一般に細胞周期が長く、結合織の比較的多い前立腺癌は、移植に適さない腫瘍であるといえる。これと比較的類似した組織構築を示す乳癌の移植率が、おしなべて低いこと^{7,12,14)}は興味深い。

腫瘍の増殖能が移植の可否を左右する重要な因子であるから、抗癌剤や放射線は無論のこと、手術に際して長時間の阻血や温熱が加わると移植率は極度に低下する。教室では、膀胱腫瘍の治療はTURが術前照射+膀胱全摘によることが圧倒的に多いため、移植例自体も少なく、かつ継代株への成功率がさほど高くないものと考ええる。

腎癌の移植率は高く、53%の移植率が得られたが、ほかの報告でも比較的良好な成績が得られている^{9,13,14)}。この腫瘍に限っては、移植の可否は組織型や細胞の悪性度に左右されることが少ないようで、腎癌が豊富な血管新生をとまなう腫瘍であることと関係があるかもしれない。ヌードマウス移植腎癌は、治療薬剤の乏しい現状で有用性の高い実験モデルであり、著者は現在インターフェロンの効果を検討中である。また治療の面ばかりでなく、異所性ホルモン産生の頻度の高い腫瘍も多く、臨床的にも高血圧、多血症、高カルシウム血症をとまなう症例が報告されており、ヌードマウス移植腫瘍はかかる症例の基礎的研究にも有用な実験系である。著者の保有する腎癌株にも、エリスロポエチン産生が亢進していることが証明されたが、Tamaoki et al¹⁹⁾ (1976) は、多血症をとまなう腎癌移植ヌードマウスを用い、実験的に発症のメカニズムの解明を試みている。

同様に、hCGやAFP産生能をもつ睾丸腫瘍の移植実験は臨床的にも基礎研究の上からも使途の広い実験系である。hCGやAFPのモノクローナル抗体を用いた診断・治療の試みは今後の新しい研究分野のひとつであろう。

さて 移植にともなう、基本的な組織パターンや腫瘍の生物学的特性が長期間ほぼ不変であることはすでにあきらかにしたとおりで、文献的にもいずれの報告もその点が強調されている。いっぽう著者の経験では、移植腫瘍の一部で、構築腫瘍細胞の均一化～おおむね悪性を増しているが～あるいは特定の細胞集団が欠落する現象がみられた。非セミノーム睾丸腫瘍で、合胞体様巨細胞 (STGC) が移植経過中に見られなくなったのはその1例である。

このような現象は、移植に際しての技術的操作にもとづくのではなく、増殖能の異った培養細胞を移植した実験¹³⁾が示唆するように、移植されやすい細胞集団～自律増殖能が大きく、着床し易い因子を放出する細胞群～へと淘汰されることによると考える。

薬剤の感受性試験をおこなうにあたっては、一応このことを念頭において解釈する必要がある。したがって、実験にあたっては、対照群の腫瘍増殖速度を常にチェックし、かつ組織学的に吟味する必要がある。このかぎりにおいては、ヌードマウス移植腫瘍は癌治療の研究にあたって重要な武器であり、今後ますます新しい分野が開かれるものと考えられる。

ま と め

尿路性器腫瘍のヌードマウスへの異種移植8年間の成績をまとめた。移植を試みた82悪性腫瘍中46腫瘍(56%)が生着し、35腫瘍(43%)が継代株となった。マウス別にみると、初代移植で全体の38%に生着した。この成績は、他の機関からの泌尿器科領域、および他臓器悪性腫瘍の移植成績にくらべ良好であった。しかし、生着した腫瘍株においても、62%のマウスに生着したにすぎないことから、移植にあたっては少なくとも2匹以上のマウスにおこなうべきである。

移植組織の経時的変化を組織学的に検討したところ、基本的には original character は良く保存され、これは腫瘍マーカーの検索においても実証された。しかし継代を重ねるにつれ、組織構築が均一化し、一般的に悪性度の高いものへとクローン選択がおこる傾向もみられた。

このような制約はあるものの、尿路性器悪性腫瘍のヌードマウス移植成績は良好で、長期間その特質が保存されるところから、泌尿器科癌の診断、治療の研究に、すぐれた実験モデルであると考えられる。

稿を終えるにあたり、睾丸腫瘍の AFP 蛍光抗体染色をおこなうにあたって直接の御指導を賜った京都大学病理学教室第2講座浜島義博教授、同じく hCG 酵素抗体染色に御助力頂いた鷹巣晃昌、大月均両博士(現京都市立病院病理部)に

謝意を表す。また永年にわたりヌードマウスの飼育および移植に助力してくれた平井多美子、青木希久子両氏にも感謝する。

文 献

- 1) Rygaard J and Povlsen CO: Heterotransplantation of a malignant tumor to "nude" mice. *Acta Microbiol Scand* 77: 758~760, 1969
- 2) Okada K, Schroeder FH, Jellinghaus W, Wullstein HK and Heinemeyer HM: Human prostatic adenoma and carcinoma. Transplantation of cultured cells and primary tissue fragments in "nude" mice. *Invest Urol* 13: 395~403, 1976
- 3) 吉田 修・岡田謙一郎・町田修三・添田朝樹: cis-Diamminedichloride platinum (CDDP) による非セミノーム睾丸腫瘍の化学療法: 症例とヌードマウスを用いた抗癌剤感受性試験について。泌尿紀要 25: 21~29, 1979
- 4) 岡田謙一郎・吉田 修: ヌードマウスを用いた非ホルモン性抗癌剤による前立腺化学療法に関する研究。泌尿紀要 25: 993~1007, 1979
- 5) 岡田謙一郎・山内民男・神波照男・吉田 修: 前立腺癌に対する Estramustine phosphate disodium (Estarcyt) の治療効果について—臨床成績とヌードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討—。泌尿紀要 27: 565~575, 1981
- 6) Okada K, Yamauchi T, Oishi K and Yoshida O: Evaluation of chemotherapy of prostatic cancer in nude mice. *The Prostate suppl* 1: 85~93, 1981
- 7) 永井完治・下里幸雄・亀谷 徹・小出 勉・広橋 説雄・林 博厚・野村達次: 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
- 8) Shimosato Y, Kameya T, Nagai K, Hirohashi S, Koide T, Hayashi H and Nomura T: Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 56: 1251~1260, 1976
- 9) The histochemical demonstration of acid and alkaline phosphatase. *Sigma Technical Bulletin*, No.85, St. Louis, 1969
- 10) Serrano JA, Shannon WA Jr, Sternberger NJ, Wasserkrug HL, Serrano AA and Seligman AM: The cytochemical determination

- of prostatic acid phosphatase using a new substance, phosphorylcholine. *J Histochem Biochem* **24**: 1046~1056, 1976
- 11) 阪原晴海・遠藤啓吾・中島鉄夫・太田仁八・鳥塚完爾・岡田謙一郎・吉田 修・平井秀松：標識抗ヒト α -fetoprotein 抗体を用いる腫瘍イメージングの基礎的検討：第1編 ヨード標識による抗体活性の変化. *核医学* **21** : 805~813, 1984
- 12) 玉置憲一・上山義人：ヌードマウス移植ヒト腫瘍の発育形式と宿主反応. *癌の臨床* **22** : 694~698, 1976
- 13) 大沢仲昭・上山義人：ヌードマウスに移植された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
- 14) 谷 忠憲・新本 稔・服部孝雄：ヌードマウスを応用した制がん剤感受性試験のこころみ. *最新医学* **32** : 1428~1430, 1977
- 15) 川井 博・秋元成太・由井康雄・中島 均・大場修司・高橋茂喜：尿路悪性腫瘍の移植に関する研究. *日泌尿会誌* **69** : 1127~1132, 1978
- 16) 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
- 17) Reid L, Leav I, Mark F, Albert J and Gellner J: Androgen-dependent human prostatic carcinoma in nude mice. *Proc AACR ASCO*, AACR abstract **19**: 151, 1978
- 18) Hoen W, Schroeder FH, Riemann AC, Jobsis AC and Hermanek P: Human prostatic adenocarcinoma: Some characteristics of a serially transplantable line in nude mice (PC 82). *The Prostate* **1**: 95~104, 1980
- 19) Tamaoki N, Hata J, Izumi J, Ueyama Y and Toyama K: Systemic effect of human renal cell carcinoma on nude mice: polycythemia, anemia, hypervolemia, and hepatomegaly. In *Proceedings of Second International Workshop on Nude Mice*, Nomura T, Ohsawa N and Fujiwara K eds, pp 417~426, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977

(1984年7月17日迅速掲載受付)