著明な角化傾向をもつ上顎扁平上皮癌由来株化細胞の樹立

小松 正隆・浦出 雅 裕*

Establishment of human tumor cell line with remarkable keratinization
derived from squamous cell carcinoma of maxilla

Masataka KOMATSU・Masahiro URADE*

緒 言

近年人癌由来の株化細胞が、癌細胞の増殖機構やそれに伴う分化・異分化の解明、またある種のリンパ腫などではウイルスによる腫瘍発生のメカニズムを究明するため数多く樹立されている¹⁾。特にホルモン産生などの臓器特異性をもつものや^{2,3)}、 α -フェトプロテイン⁴⁾やCEA^{5,6)}のような癌特異的蛋白を産生する腫瘍細胞株は癌特異的マーカーを有するという点で有用性が高い。

原発腫瘍の特徴を失わず保持する細胞株を得るには、原発腫瘍材料からの株化がのぞましいと考えられる。なぜならばリンパ節転移あるいはヌードマウス移植後に得られた細胞株のなかには原発腫瘍細胞になんらかの修飾が加わり、性状を異にするものも報告されているからである⁷⁾。

一方、口腔領域の悪性腫瘍の大部分は扁平上皮癌であり、その分化度の指標である角化は、本腫瘍の悪性度を決定し、さらに治療法を選択するうえでも重要なパラメーターとなると考えられる。ゆえに、角化傾向を有するヒト扁平上皮癌細胞を樹立し、角化と腫瘍増殖能、悪性度との関連性を解析することは必須の課題であると思われる。しかしながら、一般に分化度の高い癌細胞の培養は、その増殖速度が遅いこと⁸⁾、さらに口腔領域からの初代細胞培養は、口腔内細菌の混入をきたしやすいため、株化細胞の樹立は困難なことが多い。

今回われわれは上顎洞原発扁平上皮癌摘出材料より、初代培養を行い、著明な角化傾向を示す扁平上皮癌株化細胞を樹立することができたので、その性状を報告する。

実験材料および実験方法

1) 細胞培養法ならびに培養液

癌細胞の初代培養は、右側上顎洞原発扁平上皮癌と診断された患者(54歳、男性)の上顎洞開窓手術時に採取した材料を用いて、以下の方法で行った。

腫瘍組織を採取後ただちにペニシリンGとストレプトマイシンをそれぞれ50 u/mlと50 μ g/mlの濃度で含むイーグルの最少必須培養液(MEM)で3回洗浄し、ハサミにて細切した。小組織片をペトリ皿に4°C 30分間静置した後、MEMに20%仔牛血清と2 mM グルタミンを加えた増殖培養液を静かに添加し、37°C 5%炭酸ガス培養装置(Forma Scientific, Inc., U.S.A.)中で培養した。1週間に1回の割合で培養液の交換を行い、増殖した上皮細胞コロニーを、最終濃度0.08%トリプシンおよび0.15%エチレンジアミン四酢酸ナトリウム(EDTA)を含むCa²⁺、Mg²⁺ 脱リン酸緩衝液(PBS(-)) (以下EDTA-トリプシンと略す)により処理することにより、細胞を分離した。その後2 $\times$ 10⁵個/mlの細胞浮遊液を調製し、その15 mlを100 mm 径プラスチックペトリ皿に入れ、培養した。

扁平上皮癌由来の株化細胞としては、口腔底癌由来のKB細胞⁹⁾、子宮頸癌由来のHeLa細胞¹⁰⁾、舌癌由来のHepd細胞¹¹⁾を用い、それぞれMEMに10%ないし20%の仔牛血清、2 mM グルタミンを加えた増殖培養液で継代培養した。

なお細胞浮遊液の調製に際して生細胞数はニグロシン排除テスト¹²⁾により算定した。

2) 軟寒天中コロニー形成法

増殖培養液に寒天を最終濃度0.5%の割合に含む寒天培養液を55 mm 径プラスチックペトリ皿に5 ml 入れ硬化させた。ついで同じ増殖培養液に寒天を最終濃度

松本歯科大学口腔外科学第2講座

(主任: 待田順治教授)

* 大阪大学歯学部口腔外科学第1講座

(主任: 宮崎 正教授)

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Matsumoto Dental College.
(Chief: Prof. Junji Machida)

* The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka University Dental School.
(Chief: Prof. Tadashi Miyazaki)

受付日: 昭和58年3月24日

0.33%の割合に含む寒天培養液を調製し、その2ml中に 1×10^3 個および 1×10^4 個の単離した細胞を混入し、すでに硬化している寒天培地上に重層した。5%炭酸ガス培養装置内で37°C 30日間培養した後、形成されたコロニー数を顕微鏡下で算定した。

3) 培養細胞の染色体分析法

染色体標本はRothfels¹³⁾の方法に準じて作製した。すなわち、細胞を増殖培養液に 1×10^5 個/mlの割合に浮遊させ、その5mlをカバーグラスを入れた55mm径プラスチックペトリ皿に入れ3日間培養した。その後、最終濃度 1×10^{-6} Mのコルヒチンを含むMEMで37°C 2時間処理し、次いで0.7%から0.2%の濃度の塩化ナトリウム水溶液で、順次細胞の低張処理を行った。細胞の固定はカルノア固定液を使用し、100倍希釈液で1分間、10倍希釈液で1分間、原液で20分間行った。固定後火炎にて、すみやかに乾燥した。試料はギムザ染色を施し、油浸レンズにて1,000倍で鏡検および写真撮影を行い、染色体数を算定した。

4) ノードマウスへの移植

Specific pathogen free (SPF) の条件下で滅菌飼料(オリエンタル酵母社製、放射線滅菌飼料)と滅菌水をあたえ飼育したノードマウス(Balb/c nu/nu ♀, 日本クレア)に 1×10^7 個の細胞を背部皮下に接種した。接種部位における腫瘍形成の有無を3か月間観察した。

5) 角化指数の測定法

増殖培養液に 1×10^5 個/mlの割合に調製した細胞浮遊液をカバーグラスを入れた55mm径のプラスチックペトリ皿に5ml入れ、37°C 5日間培養した。カバーグラス上に単層培養された細胞をDulbeccoのPBS¹⁴⁾にて2回洗浄後、95%アルコール・エーテル等量混合液にて30分間固定した。固定後通法に従いPapanicolaou染色¹⁵⁾を施した。標本をキシレン・バルサムにて透徹封入し、Kawamuraら¹⁶⁾の方法に準じ、コンピューティングデンスイター(アトー社製、DCD-16型)にて波長475nmおよび525nmの吸光度を測定した。測定後そのピークの面積比より角化指数を算定した。

6) 電子顕微鏡試料作製法

電子顕微鏡試料は下記のように調製した。100mm径ペトリ皿に密に増殖した単層培養細胞を、0.2Mリン酸緩衝液(pH 7.4)にて最終濃度2.5%に調製したグルタルアルデヒド(Taab, England)溶液で、4°C、1時間固定した。同緩衝液で数回洗浄後、ラバーポリスマンにてペトリ皿表面より細胞を剝し、緩衝液中に集めた。

この細胞浮遊液を遠心管にとり800×gで10分間遠沈した。細胞沈査はさらに0.14M酢酸ペロナル緩衝液(pH 7.4)にて最終濃度1%に調製した四酸化オスミウム液(Poly Science Inc., U.S.A.)で4°C、1時間、後固定した。細胞沈査はエタノール脱水後n-Butyl Glycidyl ether (QY-1 応研商事社製)にて置換し、Luft法に準

じてエポン包埋を行った。

腫瘍組織片試料は培養細胞と同様に試料作製を行ったが、グルタルアルデヒド固定は同濃度で4°C、2時間、四酸化オスミウム酸固定は最終濃度2%のもので4°C、2時間行った。

このようにして作製した包埋ブロックはLKB-8800ウルトロトームで200Å~500Åの超薄切片とした後、酢酸ウラニルと佐藤の鉛染色液¹⁷⁾による二重染色を施し、JEM-100B型電子顕微鏡(日本電子社製)にて観察および写真撮影を行った。

実験結果

1) 扁平上皮癌細胞(K-44細胞)の分離

初代培養細胞を得た腫瘍組織は上顎洞原発で、その組織像は写真1に示すように細胞および核の異型性が強く、随所に核分裂像がみられた。角質球などの角化像はみられず、未分化扁平上皮癌と診断された。この腫瘍の電子顕微鏡像は写真2に示すように核は不正形で細胞質

写真1 上顎扁平上皮癌の組織像(×50)

写真2 上顎扁平上皮癌の超微構造(スケールは3μを示す)

写真 3a K-44 細胞の島状増殖
継代数 4 代目, 1 週間に一度の割で培養液を交換し, 3 週間目の状態を示す。

写真 3b K-44 細胞の光学顕微鏡像 (×200)

の大部分をしめており, 癌細胞の特徴である核膜の輪郭の不規則さ, クロマチンの配列の不正がみられた。細胞内小器官は発達し, 細胞間にはデスモゾームにより結合されていた。しかし細胞質内にトノフィラメント, ケラトヒアリン顆粒はみられず, 角化の様相は認められなかった。

この組織を無菌的に取り出し, 前記のごとく初代培養を行った。上皮様細胞の増殖する集団が培養 3 か月目頃より現れはじめたので, 線維芽細胞集団より離れたコロニーを EDTA-トリプシン処理することにより分離した。継代初期の上皮様細胞は写真 3 a, b に示すように多角形の細胞が敷石状に配列し, 島状コロニーを形成した。ところどころに 4~5 層の重層増殖を示した。

この上皮様細胞を K-44 細胞と命名した。

2) K-44 細胞の性状

K-44 細胞の成長曲線を図 1 に示した。55 mm 径プラスチックペトリ皿に 8×10^5 個細胞をまくと, 2 日目には 2×10^5 個と細胞数が減少し, 細胞生着率は低かった

図 1 K-44 細胞の成長曲線

図 2 K-44 細胞の染色体数分布

が 6 日目以降には対数増殖を示し, 倍加時間は約 34 時間であった。

次に腫瘍細胞のもつ *in vitro* での重要な特性の 1 つである軟寒天中コロニー形成能について検討した。表 1 に

表 1 K-44 細胞の軟寒天中コロニー形成率

細胞種	接種細胞数	コロニー数	コロニー形成率
K-44	10 ³	3, 2, 2	0.23%
	10 ⁴	25, 20, 25	0.23%

K-44 細胞は継代数 10 代目のものを用い、37°C 30 日間培養後形成されたコロニーを顕微鏡下で算定した。

写真 4 ヌードマウスに形成された腫瘍組織像 (×100)

写真 5 ヌードマウスに形成された腫瘍の超微構造 (スケールは 1 μ を示す)

示すようにコロニー形成率は接種細胞数 1×10³ 個および 1×10⁴ 個ともに 0.23% を示した。

この細胞の染色体数は図 2 に示すように、50～54 の範囲に 50% 以上の集積がみられ、モードは 53 で、分散の少ない高 2 倍体型を示した。なお特徴的な核型異常は観察されなかった。

次にヌードマウスに移植することにより *in vivo* での造腫瘍性を検討した。1×10⁷ 個の細胞をヌードマウス背部皮下に接種した場合、3 か月後に 10×7 mm の腫瘍が形成された。腫瘍の組織像は写真 4 に示すように細

表 2 培養細胞の角化指数

細胞種	角化指数
K-44	550
KB	183
Hepd	139
HeLa	153

K-44 細胞は継代数 40 代前後のものを用いた。各細胞をカバーガラスに単層培養した後、Papanicolaou 染色を施し、コンピューティングデンストメーターにて吸収波長 475 nm と 525 nm での吸収を測定し、指数を算定した。

写真 6 K-44 細胞の超微構造

矢印はケラトヒアリン顆粒を示す。スケール 1 μ はを示す。

胞および核の異型性の強い扁平上皮癌で、Papanicolaou 染色で角化傾向を示すものの、角質球などの角化像は観察されなかった。しかし電子顕微鏡所見では、原腫瘍のそれと異なり、細胞質中に多数のトノフィラメント束が観察され、分化した細胞であることが示唆された (写真 5)。

一方、K-44 細胞は培養初期より培養液中に細胞片様浮遊物を顕著に生じ、増殖速度が緩徐であった。そこでこの細胞の分化度を検索するために Papanicolaou 染色を施し、keratohyalin を染色することにより角化の有無を調べた。対照群として用いた KB 細胞、Hepd 細胞、HeLa 細胞に比べこの細胞は特にコロニー中央部の重層部分がオレンジ G に強染され、明らかな角化傾向を認めた。この角化を定量化するため Kawamura ら¹⁰⁾の方法に準じて角化指数を算定した。表 2 がその結果で、この細胞の角化指数は、対照として用いた KB 細胞、Hepd 細胞、HeLa 細胞の約 3 倍の値を示した。

さらに K-44 培養細胞の電子顕微鏡所見でも、ヌードマウスに形成された腫瘍のそれと同様に細胞質内に著しい量のトノフィラメントとケラトヒアリン顆粒の存在が確認された (写真 6)。

考 察

人癌由来の株化細胞を得るには、Oboshi ら¹⁸⁾は腫瘍細胞のみを分離できる点から転移リンパ節よりの株化細胞樹立がのぞましいと述べている。しかし転移リンパ節やヌードマウス移植後に得られた株化細胞が原発腫瘍と形態および性状に差異を生じることも報告されており⁷⁾、下に示す植竹ら¹⁹⁾の腫瘍株化細胞の同定条件を満たす細胞株が原発腫瘍より得られればよりのぞましいと考える。

腫瘍株化細胞の同定条件は、(1) 正常細胞と異なり、老化せず無限に増殖しつづける。(2) 形態が変わる(トランスフォーメーション)。(3) 細胞を単離化したとき生着率が高い。(4) 細胞表面性状の変化として、① 正常細胞より陰性荷電が高い ② 正常細胞より付着性が低い ③ 免疫学的に正常細胞と異なる。(5) 接触阻止がかからない。(6) 軟寒天中でコロニーをつくる。(7) 動物への移植によって腫瘍を形成する、などである。

われわれが上顎洞扁平上皮癌より得た K-44 細胞についてこの条件に照らしてみると、この細胞は細胞生着効率が低く、継代培養 6 日目まで増殖を示さなかったが、それ以後対数増殖を示し、倍加時間は 34 時間で他の株化細胞と同等の増殖力を示した^{9,20)}。

ちなみに正常ヒト培養細胞の増殖能は継代を重ねるにしたがって低下し、50 代前後で死滅することが知られている。K-44 細胞はすでに 60 代をこえて継代維持されており、このことは Hayflick ら²¹⁾の株化細胞の定義を満たしている。

増殖様式は写真 3 a, b に示すように、島状の重層増殖を示し、接触阻止がかからなかった。

Macpherson²²⁾により提唱された軟寒天中コロニー形成能は、*in vitro* においてトランスフォームした細胞がもつ重要な特性で正常細胞との鑑別に簡便でよい方法である。K-44 細胞はコロニー形成率が 0.23% と低率ではあるが確実なコロニー形成能をもつことが示された。

染色体数のモードは 53 で高 2 倍体型を示し、他のリンパ節転移巣より得られた口腔癌株化細胞が低 3 倍体から高 3 倍体を示す^{20,23)}のに比べ低かった。

さらに植竹らが、癌細胞の同定に最も高い評価をあたえている移植による腫瘍形成能をヌードマウスで検討した結果、細胞接種後 3 か月目に接種部位に扁平上皮癌を形成した。

以上の事実から K-44 細胞は明らかに腫瘍株化細胞としての条件を備えていた。

口腔扁平上皮癌株化細胞としては Moore ら²⁴⁾による Hepd 細胞にはじまり、Eagle ら⁹⁾の KB 細胞、日本では堀越ら²⁵⁾の歯肉癌由来の細胞、石田²⁵⁾の上顎癌由来の OKK-1 細胞などがあるが、角化を示すものは小池ら^{20,26)}

の MK-1 細胞のほかには、ほとんど報告がない。

われわれが株化した K-44 細胞は、培養初期より無核細胞片を培養液中に多量に遊離したため、著明な角化が推測された。そこで Papanicolaou 染色を施し、ほかの口腔癌由来の株化細胞と比較した結果、K-44 細胞はオレンジ G・エオジンに強染し、これら色素の吸光度より得た角化指数は KB 細胞、Hepd 細胞、HeLa 細胞の 3 倍以上の値を示した。さらにこの角化傾向は電子顕微鏡所見においても著しい量のトノフィラメントとケラトヒアリン顆粒の存在によって明らかとなった。この角化傾向はヌードマウスに移植されても保持されており、形成された腫瘍の電子顕微鏡所見でも明らかなトノフィラメント束が多数観察された。

これらの事実より、上顎洞扁平上皮癌組織より、著明な角化を示す扁平上皮癌株化細胞(K-44 細胞)が樹立されたと考える。しかしながら、K-44 細胞は、原発腫瘍組織より分離した細胞であるにもかかわらず、原発腫瘍組織には認められなかった角化傾向を有していた。一般に、分化した細胞を長期間培養していると、増殖能の増大とともに、しだいに分化傾向を喪失し、未分化になることはよく知られているが、本来未分化な細胞も分化能を有しており、培養条件によっては分化が発現することを示しているのかもしれない。

この細胞を分離する過程で、特別な条件や薬剤を施していないので、正確な理由は不明であるが、興味ある事実である。

口腔領域以外でも、肺²⁷⁾、気管支²⁸⁾、皮膚²⁹⁾、膀胱¹⁶⁾などから分離された扁平上皮細胞や扁平上皮癌細胞において、角化の研究がなされている。それらの研究においても示されるように、ケラチン蛋白の分離、同定、各種薬剤の角化に及ぼす影響などを細胞生物学的、生化学的に今後検討する必要があるが、K-44 細胞はそれに対して有用な細胞になりうると考えられる。

結 論

上顎洞扁平上皮癌組織の初代培養を行い、以下の性質をもつ株化細胞(K-44 細胞)を樹立した。

1) 形態は多角形で、敷石状配列を示し、接触阻止のかからない重層増殖を示した。

2) 成長曲線は細胞生着効率が低いため培養 6 日目まで遅滞期であったが、それ以後は対数増殖を示した。倍加時間は 34 時間であった。

3) 軟寒天中コロニー形成率は 0.23% であった。

4) 染色体数はモードが 53 の高 2 倍体型を示した。

5) ヌードマウスへの移植が可能であり、形成された腫瘍は角化傾向をもつ扁平上皮癌であった。

6) Papanicolaou 染色で顕著な角化傾向を示し、角化指数は KB 細胞、Hepd 細胞、HeLa 細胞の約 3 倍

を示した。さらに電子顕微鏡所見でも多数のトノフィラメントとケラトヒアリン顆粒を認めたため、著明な角化が確認された。

稿を終えるにあたり、移植腫瘍の組織診断に際しご指示いただいた本学生物学川原一裕教授に深謝致します。

本論文の要旨は、昭和57年10月1日、第27回日本口腔外科学会総会において発表した。

引用文献

- 1) 関口守正, 他: わが国で培養樹立, 維持されている人癌由来細胞株. 組織培養 6: 527 1980.
- 2) 平郡昭義, 他: ACTH 産生肺癌細胞株の樹立. 医学のあゆみ 97: 853 1976.
- 3) 辻 啓次郎, 他: 組織培養による異所性ホルモン産生腫瘍の研究. 最新医学 28: 1861 1973.
- 4) Yamamoto, T., et al.: *In vitro* cultivation of human testicular embryonal carcinoma and establishment of a new cell line. Gann 70: 677: 1979.
- 5) 佐藤正典, 他: ヒト CEA 産生結腸癌由来細胞株 (C-1 株) の樹立とその性状. 医学のあゆみ 96: 876 1976.
- 6) 渡辺信一郎, 他: ヒト癌培養細胞株のCarcino-embryonic antigen (CEA) 産生の研究. 医学のあゆみ 97: 398 1976.
- 7) Easty, D.M., et al.: Five human tumour cell lines derived from a primary squamous carcinoma of the tongue two subsequent local recurrences and two nodal metastases. Br J Cancer 44: 363 1981.
- 8) 中井準之助, 他: 組織培養. 第1版, 朝倉書店, 東京, 1982, 243頁.
- 9) Eagle, H.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB. Proc Soc Exp Biol Med 89: 362 1955.
- 10) Gay, G., et al.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res 12: 264 1952.
- 11) 濱田 傑: 無血清培地で増殖するヒトメラノーマ細胞の樹立とその特性. 阪大歯学誌 27: 62 1982.
- 12) Kaltenbach, J.P., et al.: Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. Exp Cell Res 15: 112 1958.
- 13) Rothfels, K.H., et al.: An air-drying technique for flattening chromosome in mammalian cell growth *in vitro*. Stain Technol 33: 73 1958.
- 14) Dulbecco, R., et al.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis virus. J Exp Med 99: 167 1954.
- 15) 影山圭三, 他: 病理組織標本の作り方. 第5版, 医学書院, 東京, 1981, 295頁.
- 16) Kawamura, H., et al.: Inhibitory effect of 5-halogenated deoxyuridines on *in vitro* keratinization of a transformed rat urinary bladder epithelial cell line. Gann 72: 264 1981.
- 17) 水平敏知: 電子顕微鏡——医学生物学への応用——. 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1974, 128頁.
- 18) Oboshi, S., et al.: *In vitro* culture of human cancer cells for cancer chemotherapy. I. A long-term cultured suspended cell line established from lymph node with metastasis from gastric cancer. Gann 60: 205 1965.
- 19) 植竹久雄, 他: 腫瘍ウイルスⅡ. 第1版, 朝倉書店, 東京, 1969, 571頁.
- 20) 小池正夫, 他: ヒト骨肉癌由来の細胞株 (MK-1) の樹立とその性状. 日口外誌 26: 1481 1980.
- 21) Hayflick, L., et al.: The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 25: 585 1961.
- 22) Macpherson, I.: Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. Virology 23: 291 1964.
- 23) 堀越 勝, 他: 人の骨肉癌由来の細胞株の樹立 (第1報). 日口外誌 20: 100 1974.
- 24) Moore, A.E., et al.: Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. Cancer Res 15: 598 1955.
- 25) 石田 稔: 人癌細胞の培養——上顎癌由来の細胞株について——. 日耳鼻 81: 588 1978.
- 26) 小池正夫, 他: ヒト骨肉扁平上皮癌由来の培養細胞におけるケラチン polypeptide について. 日口外誌 28: 992 1982.
- 27) Gusterson, B., et al.: Immunohistochemical localization of keratin in human lung tumours. Virchows Arch [Pathol Anat] 394: 269 1982.
- 28) Stoner, G.D., et al.: Cultured human bronchial epithelial cells: blood group antigens, keratin, collagens, and fibronectin. *In vitro* 17: 577 1981.
- 29) Sun, T.T., et al.: keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. Proc Natl Acad Proc Natl Sci USA 76: 2813 1979.