ヒト口底癌を用いた実験的化学療法

第1報：ヒト口底癌の移植・継代

富屋 栄祐・望月 在秀・林 升・本田 武司

古本 克磨

Experimental chemotherapy using a human oral floor cancer
transplanted to nude mice

1. Establishment of a oral cancer cell line in nude mice

Eisuke TOMIYA・Arihide MOCHIZUKI・Noboru HAYASHI

Takeshi HONDA・Katsuma KOMOTO

Abstract: A human oral cancer/nude mice system has been established for an anticancer agent screening system, which is expected to have higher predictability of clinical effect. In this preliminary report, the method of successive transplantation of human cancer in nude mice and the histological characteristics of the tumor were reported.

1) 8- to 10-week-old male BALB/cA-nu mice kept in vinyl isolater were used.

2) Human cancer in this experiment was derived from an oral floor tumor histologically diagnosed as squamous cell carcinoma in a 58-year-old man.

3) The tumor tissue which was minced in sterilized penicilline-streptomycin PBS (—) solution (PC: 100 u/ml, SM: 100 γ /ml) was sectioned in small pieces approximately 1 mm 3 in volume. 2 to 3 pieces were injected into subcutaneous tissue of the back of each animal.

4) After the fifth generation of serial transplantation, the tumors became stable, showed stable growth curves and maintained the histological features of moderately differentiated squamous cell carcinomas.

Key words: human oral cancer, nude mice, chemotherapy

緒 言

1969年, Rygaard および Povlsen^{1,2)} が初めてヌードマウスへのヒト癌移植に成功したことは、その後の実験的化学療法や一連の癌研究に飛躍的な発展をもたらした。

なかでも、癌治療研究における抗癌剤のスクリーニング、抗腫瘍活性の検討、併用化学療法等を *in vivo* で行

えることは画期的であるといえる。

先に、本教室の中島ら³⁾ が各種制癌剤の効果判定を行うために必要なスクリーニングテスト系を確立するために、各種臓器ヒト癌および家兎 VX₂ 癌をヌードマウスに移植したが、VX₂ 癌以外移植効率は得られなかったことを報告した。しかしながら、今回われわれは手術により得られたヒト口底癌を、ヌードマウス背部皮下に移植しヒト口底癌・ヌードマウス系を確立し得たので、その移植および継代方法と腫瘍性状についての概要を報告する。

実験材料ならびに移植・継代方法

1. 実験動物および飼育方法

実験動物は、実験動物中央研究所由来の 8～10週齢・

福岡歯科大学口腔外科学第2講座

(主任：古本克磨教授)

The Second Department of Oral Surgery, Fukuoka Dental College (Chief: Prof. Katsuma Komoto)

受付日：昭和62年1月21日

図 1 継代3代目の腫瘍増殖曲線

図 2 継代10代目の腫瘍増殖曲線 (1)

雄・BALB/cA-nu マウスを用いて、原則的に10匹を1群として実験に供した。

飼育は、本学アニマルセンター内の入室を制限し24°Cに調節された空調飼育室内に置かれたビニールアイソレータ内で、1つのプラスチック製ケージに1匹ずつ収容して行った。飼育管理は、可及的無菌状態に行い、飼料は日本クレア社製CL-2の固型飼料、飲料水は水道水を、いずれも、オートクレーブにて高圧蒸気滅菌したもので飼育した。

2. 移植材料および継代方法

扁平上皮癌と診断され、手術により採取した口底癌をペニシリン、PC (100 u/ml) およびストレプトマイシン、SM (100 γ/ml) を混入したPBS (-) 液 (Phosphate Buffered Saline without Ca^{2+} Mg^{2+}) に浮遊させ、約1 mm³ に細切し、2～3ブロックを0.3 mlのHank's液とともに18ゲージの注射針を用いて、各ヌードマウスの背部皮下に刺入し、皮下に沿って刺入点から遠隔した位置まで針先を進めて注入・移植した。

その後の継代については、移植腫瘍の長径が約20 mmに達した時点で、腫瘍を摘出し、壊死部を避けて、腫瘍組織片を細切し、原腫瘍移植の操作と同様に行った。

3. 形成腫瘍測定法

形成腫瘍計測は隔日に行い、腫瘍の長径、短径、高径

を計測し、N.C.I. の Battle Columbus Laboratories Protocol に準じて、① 長径×短径²×1/2を算出する方法、② 長径×短径²×1/2の自然対数値を求める方法、③ 長径×短径×高径を求める方法、④ 長径×短径×高径の自然対数値を求める方法の4法の計測学的方法を試み、増殖曲線求めて腫瘍の変動を経日的に回帰分析し、その一致性を検討した。

実験結果

本移植腫瘍は、初代から継代4代目まで、移植生着率が20～30%と不安定で低く、増殖も緩慢で、長径が5 mmに達するまでに約2か月を要したが、継代5代目以後、全例に生着を認め、ほぼ一定した増殖傾向を示し、倍加時間も、継代5代目以後、約9.5日と安定していた。図1は、継代3代目、図2は、継代10代目の腫瘍増殖曲線を表したものである。

ここで、本腫瘍の性格を明確にするため、幾つかの計測学的方法を試み、腫瘍の変動を経日的に回帰分析し、その一致性、信頼性を検討した。図3は、継代10代目の長径×短径×高径により、腫瘍のVolumeを表したもので、回帰式は、 $Y=61.797X-164.861$, r (相関係数) は、0.9712であった。図4は、同じく10代目の腫瘍の長

図3 継代10代目の腫瘍増殖曲線(2)

図5 継代10代目の腫瘍増殖曲線(4)

図4 継代10代目の腫瘍増殖曲線(3)

径×短径×高径を測定し、その自然対数値で増殖曲線を表したものであり、回帰式は、 $Y=0.0604X+5.267$ 、 r は、0.9827であった。図5は、Battle Columbus Laboratories Protocolに準じ、長径×短径²×1/2を求めたもので、回帰式は、 $Y=58.615X-33.0506$ 、 r は、0.9709であった。図6は、長径×短径²×1/2を算出し、その自然対数値にて表したものであり、回帰式は、 $Y=0.0531X+5.6583$ 、 r は、0.9761であった。

以上、4種の方法により得られた腫瘍増殖曲線のうち、長径×短径×高径の自然対数値により表したものの相関係数 r が0.9827で、本腫瘍増殖に関して得られる一次回帰式の信頼性が最も高く、一般的腫瘍増殖傾向と言われる Gompertz function に一致したものであると考えられる。

次に、本腫瘍の病理組織像について、原腫瘍と継代7代目の腫瘍を比較して検討した。原腫瘍は、間質が豊富で、間質中にはリンパ球を主体とした細胞浸潤が著明に認められ、腫瘍実質は、胞巣形成傾向が強く、胞巣中心部では、明らかな角化傾向が認められる(写真1)。また、原腫瘍の辺縁部では、簇状性、浸潤性の増殖傾向が著明に認められる(写真2)。原腫瘍の強拡大像では、腫瘍細胞は大小不同の多角形を呈し、数石状に配列しており、比較的明瞭な細胞間橋を認める。また、細胞核は、おおむね類円形を呈し、1～数個の明瞭な核小体を有し、核クロマチンは比較的少なく、核内全体に散在ま

図 6 継代10代目の腫瘍増殖曲線 (5)

写真 2 原腫瘍の病理組織像 (2)

写真 3 原腫瘍の病理組織像 (3)

写真 1 原腫瘍の病理組織像 (1)

写真 4 原腫瘍の病理組織像 (4)

たは、核周辺部に集積して存在している (写真3)。また、一部には有糸分裂像も散見される (写真4)。継代7代目の組織所見では、原腫瘍に比較して間質が少なく、中心部の角化壊死が著明で、腫瘍周辺部ではリンパ球、好中球を主体とした細胞浸潤が著明である (写真5)。さらに、その辺縁部では原腫瘍辺縁部とはほぼ同様の所見を呈している (写真6)。また、強拡大像では腫瘍細胞には、核クロマチンがやや多いものの、他の組織

形態学的所見は、おおむね原腫瘍に酷似している (写真7)。

考 察

ヌードマウスは、1966年 S.P. Flanagan¹⁾, Pantelouris (1968)²⁾ により突然変異種のマウスとして紹介されて以来、多くの分野の研究対象として利用されてきた。特に

写真 5 継代7代目腫瘍の病理組織像 (1)

写真 6 継代7代目腫瘍の病理組織像 (2)

写真 7 継代7代目腫瘍の病理組織像 (3)

ヌードマウスがT細胞をほとんど有さず、ほぼ理想的なB細胞依存性の動物で、腫瘍の移植が容易であることなど、免疫学的、腫瘍学的な研究における重要性、有用性が明らかにされている⁶⁾。また、腫瘍学的研究の中で、多くのヒト癌移植が試みられ、それらを用いての抗癌剤の抗腫瘍活性の検討、スクリーニングテスト、および併用実験化学療法についての検討等が報告されてきた。

ヒト癌・ヌードマウス系の確立は、多くの癌研究を飛

躍させるために、多大な影響をもたらすという意味で、その移植、継代の方法論、その後の移植腫瘍性格の確実な把握が重要であることはいうまでもない。

そこでヌードマウスへのヒト癌移植の方法論についてヌードマウスの飼育法と移植・継代法に分けて考察を加える。飼育法について、鈴木ら(1976)⁷⁾は、飼育室を専用としポリカーボネイト製ケージおよび給水瓶、床敷を滅菌し、飼料や飲料水としての水道水は、未滅菌で自由摂取とすると述べており、飼育は全て、Laminar flow Iso-Rack 内で行うとしている。阪本ら(1980)⁸⁾は、人の出入りを制限した専用飼育室を設け、飼育室内をヒビテングリコネート溶液で噴霧を行い、filter cap を用いて conventional state での飼育を行い、ヌードマウスは、日本クレア社由来の BALB/c-nu/nu マウス、雄、5～6週齢を使用し、オートクレーブにて滅菌した固型飼料(CL-2)、飲料水、床敷、ケージを用いたとし、三宅ら(1980)⁹⁾は、日本クレア社由来の、BALB/c-nu/nu マウスの5～6週齢の雄を用い、飼育には、専用飼育室で、ビニールアイソレーター内にて、SPF (Specific Pathogen Free) を条件とし、飼料は日本クレア社製 CL-2 を用い、飼料、水は自由摂取としたと報告している。内野ら(1978)¹⁰⁾、大沢ら(1976)¹¹⁾もほぼ同様の報告を行っている。自験例においては、人の出入りを制限し、室温、湿度を一定とした専用飼育室を設け、室内をグルコン酸クロールヘキシジンの0.02%水溶液にて掃拭した環境にビニールアイソレーターを置き、アイソレーター内にて、SPF として飼育した。飼料(日本クレア社製 CL-2)、飲料水、プラスチック製ケージ、床敷は全て滅菌し、摂取については、自由摂取とした。また、アイソレーターは、移植操作を行う実験用アイソレーターと移植後の飼育を行う飼育用アイソレーターの2種類を使用した。

T細胞機能欠如のヌードマウス飼育では、mouse hepatitis, mycoplasma, 緑膿菌等の感染が問題とされてきた。しかし、これらの感染は、実験者、器具、飼料、空調を介してひきおこされることが多いので、SPF を保つためのバリアシシステムの確立が必要となる。したがって、これらの実験のための一連の操作は、全て可及的無菌状態を保つべきであり、また、床敷の交換についても、床敷中の尿素窒素濃度の上昇が必然であるので、ヌードマウスにかかるストレスなどを考慮して、週1回の交換が妥当と考え実践している。

また、移植について藤田(1980)¹²⁾は、1例を除き、全て治療前の患者から採取した腫瘍株を用い、トロカル針にて、2mm 径の小片をマウス背部皮下に移植したと述べており、阪本ら(1980)⁸⁾は、試切および手術により採取した腫瘍を、ただちに硫酸カナマイシン(200 u/ml)を含む培養液 RPMI-1640 に浸し、2～3mm 角の小ブロックとした後、エーテル麻酔下のヌードマウス

側腹部皮下にトロカール針を用いて移植を行ったと報告している。自験例においては、口底癌と診断された腫瘍に、宮本ら (1977)¹³⁾により報告された BM 療法を 1 クール行った後、手術により切除したものを移植に供した。即ち切除した腫瘍を、ただちに PC (100 u/ml), SM (100 γ /ml) 混入の PBS 液に浸し、シャーレ内で 1 mm 角の小ブロックに細切し、2~3 ブロックを 0.3 ml Hank's 液とともに、18 ゲージ注射針を用いて、ヌードマウス背部皮下に注入し、移植した。当教室におけるヒト癌のヌードマウス移植操作は、全て同一条件下に行っている、本症例を含めて、過去の症例における術前の化学療法に対する感受性には、かなりの差異があり、比較的抗腫瘍剤に対して感受性が低く、腫瘍細胞自身の viability が旺盛であった本症例にのみ移植成立をみた。

移植成立後の継代は、移植腫瘍が長径 20 mm に達した時点で、腫瘍の壊死部を避け、腫瘍組織片を採取し、クリーンベンチ内で細切し、原腫瘍移植操作と同様に行った。この方法は、三宅ら (1980)⁹⁾、井上ら (1980)¹⁴⁾の報告に見るものとほぼ同様のものである。

原腫瘍移植から継代 4 代目までは、生着率が低く、不安定かつ緩慢な増殖を示したが、5 代目以降は、全例に生着を認め、一定した増殖曲線を示した。一般に腫瘍の増殖は、いわゆる Gompertz function をとるとされているが^{15,16)}、本腫瘍のヌードマウス背部皮下における増殖も同様であった。また、本腫瘍のヌードマウスにおける倍加時間は、移植 5 代目で 9.5 日と安定したため、各種の実験に供するための一つの基準を確立し得たものと考えられる。

病理組織学的に、原腫瘍は、間質が豊富で、間質中には、リンパ球を主体とした細胞浸潤が著明で、腫瘍実質は胞巣形成傾向が強く、中心部では、著明な角化傾向を認めた。また腫瘍辺縁部では簇出性、浸潤性増殖が著明であった。原腫瘍細胞は、数石状に配列した大小不同の多角形を呈し、核は類円形で核内には数個の明瞭な核小体を有し、比較的少ない核クロマチンが核内全体に散在または、核周辺部に集積して存在していた。これに比較して継代 7 代目では、間質が少なく中心部の角化壊死が著明で、周辺部では原腫瘍と同じく、リンパ球、好中球を主体とした細胞浸潤を認め、腫瘍辺縁部の簇出性、浸潤性増殖は原腫瘍とほぼ同様であった。また、腫瘍細胞の核クロマチンは、やや原腫瘍のそれよりも多いものの、他の形態学的所見では、原腫瘍と酷似していた。このことは、諸家の報告にあるヌードマウス移植後の組織形態の保存性に合致し、いわゆるヒト癌ヌードマウス系を確立し得たものと考えられ、さらに、腫瘍増殖曲線の安定とともに今後の実験的化学療法を進める上で有用な腫瘍であると考えられる。

ま と め

われわれは、扁平上皮癌と診断されたヒト口底癌を BALB/cA-nu マウスに移植し、継代 5 代を経て、安定した増殖曲線と腫瘍組織性状を有し、ヒト癌ヌードマウス系の確立を見たと思われ、今後の実験的化学療法を行う上で大変有用であると考えられる。

引 用 文 献

- 1) Rygaard, J. and Povlsen, C.O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Path Microbiol Scand* 77: 758-760 1969.
- 2) Povlsen, C.O. and Rygaard, J.: Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Path Microbiol Scand* 79 A: 159-169 1971.
- 3) 中島嘉助, 下川恭天, 他: *in vivo* level (Nude mouse) における各種制癌剤の効果判定に関する実験的研究. 第 1 報 Nude mouse に対する各種悪性腫瘍移植実験に関する成績. *日口外誌* 24: 460-464 1978.
- 4) Flanagan, S.P.: "Nude" a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res Comb* 8: 295-309 1968.
- 5) Pantelouris, E.M.: Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217: 370-371 1968.
- 6) 田口鐵男: 癌化学療法におけるヌードマウス、癌と化学療法 8: 1309-1318 1981.
- 7) 鈴木 潔, 須藤カツ子, 他: ヌードマウスの繁殖・生産ならびにヒト胃癌の異種移植と継代胃癌に対する制癌剤の影響. *医学のあゆみ* 96: 288-295 1976.
- 8) 阪本知二, 越智章二, 他: 第 1 報 ヒト口腔領域腫瘍のヌードマウスへの移植成績とその性状について. *日口外誌* 26: 263-269 1980.
- 9) 三宅浩郷, 藤井一省, 他: ヌードマウスに移植された上顎癌を用いての化学療法の研究 (第 1 報). *癌と化学療法* 7: 41-47 1980.
- 10) 内野純一, 桑原武彦, 他: ヒト肝癌のヌードマウス肝への移植. *医学のあゆみ* 104: 31-33 1978.
- 11) 大沢仲昭, 上山義人: ヌードマウスに移植されたヒト悪性腫瘍を用いる制癌剤研究について. *医学のあゆみ* 96: 278-287 1976.
- 12) 藤田昌英: ヌードマウス移植ヒト消化器癌にみる研究. *癌と化学療法* 7: 949-956 1980.
- 13) 宮本忠昭, 高部吉庸, 他: ブレオマイシンとマイトマイシンの連続的併用 (B-M) 療法による

- 末期子宮頸癌の治療成績について, 癌と化学療法 4: 75-93 1977.
- 14) 井上雄弘, 藤木修一, 他: ノードマウス移植ヒト乳癌による研究, 癌と化学療法 7: 942-948 1980.
- 15) Lloyd, H.H.: Estimation of tumor cell kill from Gompertz growth curves. cancer chemotherapy Rep 59: 267-277 1975.
- 16) Spang-Thomsen, M. and Visfeldt, J.: Growth curve and Radiation-induced synchronization of a human malignant melanoma Transplanted to nude mice, Proceeding of the Second International Workshop on nude mice, 327-336 1977.
-