膀胱腫瘍の器官培養

(2) 高圧下器官培養法の臨床的応用

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 尾 関 全 彦*
(主任: 大越正秋教授)

ORGAN CULTURE ON TUMOR OF THE URINARY BLADDER (2) CLINICAL APPLICATION OF HYPERBARIC ORGAN CULTURES

Takehiko Ozeki

Department of Urology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

(Director: Prof. M. Ohkoshi)

The method of organ culture under hyper-baric oxygen was applied in the present report for the determination of in vitro effects of several anticancer agents onto human bladder carcinomas. Anticancer agents currently being used on clinical cases of bladder carcinoma, such as Mitomycin C, Thio-Tepa and saccharolactone were added to the culture medium at each concentration to be tested. Tissues of transitional cell carcinoma grade 1 to 3 from 21 cases were cultured under 2 atmospheres for 48 hours, temperature at 37°C and pH at 7.2 to 7.4. Cultured tissues were studied histologically, electronmicroscopically and also studied with autoradiography. The autoradiographs were made by ³H-thymidine added to the medium at the last 2 hours of culture period.

In control cultures, tissues from grade 2 of transitional cell carcinoma were well maintained under 2 atmospheres for 48 hours and autoradiographs revealed that the labeling indices of the superficial zone of the explants were higher than the deeper zone where cancer cells were still synthesizing DNA. In cultures with Mitomycin C 1.0 mcg per ml, cancer cells near the surface of explants were markedly degenerated, while the cells in deeper zones partly survived and the labeled cells were seen. In cultures with Thio-Tepa 1.0 mcg per ml cancer cells of the entire specimen were degenerated. The DNA synthesizing cells were not recognized so far with ³H-thymidine autoradiography of Thio-Tepa group. In cultures with saccharolactone 1.0 mcg per ml, the degenerated foci were seen in entire specimens but the degree of degeneration was slight.

By electronmicroscopy, cancer cells near the basement membrane showed deformities of nuclei and nucleoli with a minimum dosis of Thio-Tepa, while the cytoplasmic organellae were affected with Mitomycin C.

The different modes of action of each anticancer agents can be studied with this hyperbaric organ culture system. The results are applicable for the local instillation therapy of carcinoma of the urinary bladder.

I 緒 言

著者は膀胱腫瘍の器官培養を試み、2気圧空気、あるいは40%酸素含有の気相下で最も良好な結果を得たことを発表した。

今回は、in vitro における各種制癌剤の効果をみるためにこの方法を応用し、培養組織を病理組織学的、

in vitro autoradiography および電子顕微鏡的に検討したので報告する。

II 研究材料並びに研究方法

研究材料は前回と同じく21症例から手術時無菌的に剔出した膀胱腫瘍組織でその病理組織学的診断は第1表に示すごとくである。すなわち、全例移行上皮癌で、Broders の分類による悪性度では Grade I 1例, Grade-

* 助 手

Table 1

Case	Age	Sex	Stage	Grade	Operation	Anticancer agents and concentrations				
						Cont.	Thio TEPA	MMC	SLNA	Others
1	60	m.	B-2	2	partial cystectomy	0	1	1	—	1E 10
2	48	m.	B-2	2	〃	0	1 5	1	—	1E 10
3	51	m.	B-2	2	〃	0	1 10	1 10	—	1E 10
4	58	f.	B-1	2	〃	0	1 10	1 10	—	1C 10
5	48	m.	B-1	2	〃	0	1 10	1 10	—	1C 10
6	50	m.	B-1	2	〃	0	1 10	1 10	—	1C 10
7	64	m.	B-2	3	〃	0	1 10	1 10	—	1C 10
8	72	f.	B-2	2	total cystectomy	0	1 10	1 10	—	1C 10
9	60	m.	B-2	3	partial cystectomy	0	1 10	1 10	—	1C 10
10	50	m.	C	3	〃	0	250	500	—	500
11	59	m.	B-2	2	〃	0	1	1	—	1C
12	72	f.	B-2	2	total cystectomy	0	1 10 100	1 10 100	—	1C 10 100
13	56	m.	B-2	3	〃	0	1 10 100	1 10 100	—	1C 10 100
14	51	m.	B-2	3	〃	—	1 10	—	—	—
15	50	m.	B-1	2	partial cystectomy	0	1 5	1 2	—	1C
16	67	m.	C	3	〃	0	1	1	—	1M
17	52	m.	B-1	1	〃	0	1 5	1 5	—	1M 5
18	56	m.	B-1	2	〃	0	1 5	1 2	—	1M 25
19	52	m.	B-2	2	total cystectomy	0	1 5	1 2	—	1 25M
20	61	m.	B-1	2	〃	0	1 5	1 2	1 10	1 25M
21	52	m.	B-2	2	〃	0	1	—	10	1M

E: Endoxan, C: Chromomycin, M: Merphirin.

Ⅱ14例, Grade Ⅲ 6例, Grade IVなしであつた。一方 Jewett の分類による浸潤度ではAに属するものなし, B₁に属するもの7例, B₂に属するもの12例, Cに属するもの2例であつた。

材料採取の方法としては, 膀胱部分切除術によつて採取したもの14例, 膀胱全剝術によつて採取したもの7例であつた。

いずれの場合も採取した材料は一部を10%フォルマリ

ン固定し, 一部を4℃に冷却した Eagle 液内に浸し, 無菌的に保存し, 採取後1時間から2時間の間に器官培養を開始した。高圧下器官培養の方法は前回報告の方法と全く同様であるが, 気相条件としては原則として前回培養成績の最も良好であつた空気2気圧に約5%の炭酸ガスを加えた状態で行なつた。

培養液は前回と同様10%仔牛血清を加えた Eagle 液(千葉血清)を使用した。培養液のpHは7.2~7.4に調

節した。培養液には感染防止のため Penicillin 100 unit/dl, Streptomycin 100mg/dlを加えて使用した。

培養液中には第1表のごとく、Mitomycin C Thio-TEPA, Endoxan, Chromomycin, Merphylin, Saccurolacton などの抗腫瘍性を有する薬剤を各濃度に混入させて培養した。培養液中の濃度は原則として1 μ /mlを基本として表に示した各濃度を検討した。培養は原則として48時間で打ち切り、10%フォルマリンに固定し型のごとく、Paraffin 包埋、薄切して病理組織切片として鏡検した。

³H-Thymidine による 器官培養 autoradio-graphy の方法：

³H-Thymidine (Nuclear Chicago 製) 250 μ Ci/ml より希釈液を作り、高圧下器官培養の開始後46時間にて各材料の培養液中に 1.0 μ Ci/ml の濃度に加えた。この際、³H-Thymidine が培養液中に充分拡散する様、raft としてのシリコンガーゼを培養材料を載せたまま一時挙上し、上記核酸前駆物質を加えて振盪後に、raft を戻し、さらに軽く振盪後、培養器に入れ元の状態に復せしめた。³H-Thymidine を加えて後、正確に2時間培養し、直ちに10%中性フォルマリンに固定した。その後は型のごとく、パラフィン包埋、薄切し、脱パラフィン後に乳剤 NTB-3、46℃に 0.5秒 dip-in して、乾燥、21日間 4℃の冷蔵庫の暗箱内で露出を行なつた。

現象、固定後は Harris のヘマトキシリンで染色、顕微鏡で観察したが倍率 600で制限視野10 μ ×10 μ の正方形の区画について、Labeling Index (L.I) と Grain counting とを行ない、一応20grain 以上のものを高度 (high) それ以下を低度 (low) として各濃度の各薬剤の効果を検討した。部位による測定誤差をできる限り少なくするため、表層（表面より細胞数にして約15列迄の層）と深層（細胞数にして約25列より深い部位）より各々 5箇所を無作為に抽出して平均値で表現した。

なお、結果の判定については1培養器中で培養された約10個の組織片をすべて観察し、それを1単位として判定した。

電子顕微鏡の観察：

48時間高圧下器官培養を行なつた一部の膀胱腫瘍組織を直ちにオスmium酸に固定、脱水後 Epon 樹脂に包埋、LKB 型ミクロトームにより、超薄切片として、日立電子顕微鏡 HS 7 S 型にて超微細構造を観察した。

III 研究結果

A 病理組織学的所見。

Table 2 Histological summary of cultured transitional cell carcinoma of the bladder, Grade I-III, 21 cases.

	SUPERFICIAL ZONE	INTERMEDIATE ZONE	CENTRAL AREA
CONTROLS	□~▨	□~□	□~▨
<hr/>			
ThioTEPA	1 μ g/ml ▨	▨	▨
	10 μ g/ml ▨	▨	▨
<hr/>			
Mitomycin C	1 μ g/ml ▨	□	▨
	10 μ g/ml ▨	▨	▨
<hr/>			
SLNA	1 μ g/ml □~▨	□~▨	▨
	10 μ g/ml ▨	□~▨	▨~▨

□ excellent □ fairly good ▨ degenerating ▨ necrotic

(1) 対照群：乳頭状癌 (Stage 2, Grade 2) の10例では第1図のごとく、空気2気圧の気相下で、48時間きわめて良好組織像を維持した。前回の報告と同様、間質に近接した基底層では細胞は整然と放射状配列を示し、核は大型楕円形で本来の形態をよく保つものが多く、Karyorrhexis はほとんどみられない。細胞質も正常に近く顆粒は余り認められない (第2図、第3図)。しかしながら基底層から遠く離れるにつれて細胞間隙がやや拡大し、核は小型化、不正円形を示すものが多くなると共に胞体内に濃染する大小不同の顆粒の出現が著明となる (第4図)。

正常膀胱粘膜：(前立腺肥大症症例の膀胱粘膜5例、膀胱腫瘍症例の肉眼的正常部分10例) 空気2気圧の気相下で48時間培養した結果は前回の報告と同様、移行上皮細胞に可成りの変性を認めた。すなわち第5図に示す様に移行上皮の最表層より中間層にかけての細胞は核の濃縮せるもの、不正形を呈するものも多く胞体は空胞変性を示すものが見られる。しかし、基底層の細胞は比較的本来の形態を保存しているが強拡大でみると一般的にはやはり核が濃縮する傾向を示した (第6図)。

(2) Thio TEPA 添加群

対照の乳頭状癌に対し、Thio TEPA 1 μ g/ml を培養液に加え、対照と全く同様の条件で培養すると第7図のごとく、表層の数層の細胞は核の濃縮、胞体の縮小濃度化を来して明らかな変性を示す。これに連続した部

分すなわち中間層では比較的良好な発育を呈する層を認めるが、さらに深部となると腫瘍細胞の核は小型円形で濃縮し、胞体は淡明で凝固壊死の傾向が見られる。強拡大（第8図～第11図）でみるとこの3層の存在はより明らかである。すなわち変性を示す表層では核は不正形に濃縮し、胞体は好塩基性で縮小している。中間層では核は円形ないし楕円形を呈し、比較的良好に本来の形態を保っているが、その間に淡明化した核も混在して認められる。胞体内あるいは細胞間隙には大小の円形顆粒が多数認められる。

第11図ではさらに深層の壊死傾向を呈する細胞群とこれに近接しながら良好に維持されている細胞群を対照的に示す。前者は核が円形で著しく小さくなり胞体は明るく均一化して顆粒や胞体内小器官の存在が明らかでない。これに対し後者では核は一般に大型で楕円形ないし紡錘形を呈し細胞活性の存在を伺わせるが胞体内には大小の空胞が認められ細胞間隙が確然としない部分も多い。

Thio-TEPA 10 μ g/ml を添加した場合は第12図のごとく、組織片は全体として著明な崩壊を示す。これを強拡大で観察すると第13図に示す様に多くの細胞核は変形し、濃縮したもの、Karyorrhexis を呈するものの融解しつつあるものなどが混在し、正常の形態を維持している核は全く見られない。細胞膜は消失し、胞体は著明な空胞変性を示すものや、空胞変性の結果と思われる広い空間が認められる一方、均一にエオジンに濃染する部分が混在している。胞体内外と顆粒はほとんど認められない。

(3) MMC 添加群

対照の乳頭状癌に対し、Mitomycin C, 1 μ g/ml を培養液に加え、他の条件は対照と全く同様にして培養すると第14図のごとくである。著明な組織片の崩壊には至らず、全体として比較的良好に本来の構造を保存している。表層より核の濃縮と共に胞体の縮小、細胞間隙の拡大が見られ、多数の顆粒を認めるが中間層では楕円形大型核を有し胞体も大きく明るい細胞群が認められる（第15図）。

さらに強拡大で表層の細胞群をみると第16図のごとく、胞体内細顆粒の出現、不規則化と共に細胞膜の消失している部分、細胞間隙の拡大などの変化がみられる。しかし間質に近い基底層では第17図のごとく、大型楕円形核を有する細胞が規則的に配列し、変性や壊死はほとんど認められない。

Mitomycin C 10 μ g/ml 添加では、組織の崩壊は著しく、表層はもとより深層にまでおよんでいる（第18図）。核の崩壊は一般に表層に顕著で、中間層では変形した比較的大きい核を有する変性細胞も散在しているが、腫瘍細胞の細胞膜が失なわれ胞体は融解し、僅かに膠原線維と思われる結合組織が有形の組織として認められるに過ぎない（第19, 20図）。

(4) SLNA 添加群

Sodium D-Glucaro-(1 $\rightarrow$ 4)-lactone (以下 SLNA)

1 μ g/ml では第21図に示すごとく、表層から深層まで、腫瘍細胞の核は比較的良好に保存されている。最表層ではやや濃縮の傾向にあり、一方中間層では Karyorrhexis を呈するものが見られるがいずれも他の群と比較すると変化は軽微である。強拡大でみると、核は楕円形、大型で変性はほとんど見られないがこれに比較して胞体は一般に萎縮性である。しかし空胞変性は著明ではない（第22図）。

SLNA 10 μ g/ml では第23図のごとく、表層よりもむしろ中間層、深層の細胞に変性が著明で、腫瘍細胞は脱落消失し、大小の空間を形成する傾向が認められる。これを強拡大でみると第24図のごとくで、組織間隙の広い部分と胞体の空胞変性を示す腫瘍細胞との間に移行がある。しかし部分的に比較的大型の楕円形核を有する腫瘍細胞集団が認められ、これらの細胞では胞体は萎縮性ではあるが、空胞化は軽微である。

以上の病理組織学的所見は一括して第2表に示した。

B Autoradiograph 所見

(1) 対照群：乳頭状癌

乳頭状癌の表層では、第25図に示すごとく ^3H -Thymidine の取り込みは顕著に認められる。Grain 数か

Table 3 Autoradiographic labeling index (L.I.) from cultured transitional cell carcinoma of the bladder, grade 2,5 cases.

L.I. (%)	Superficial zone		Intermediate zone	
	high	low	high	low
Controls	7.2 $\pm$ 3.4	10.0 $\pm$ 4.2	3.4 $\pm$ 2.7	8.0 $\pm$ 3.1
Thio TEPA 1 μ g/ml	0.0 $\pm$ 0	0.8 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0	1.6 $\pm$ 0.9
Mitomycin C 1 μ g/ml	0.0 $\pm$ 0	2.9 $\pm$ 1.3	3.1 $\pm$ 1.8	3.9 $\pm$ 2.0
SLNA 1 μ g/ml	2.3 $\pm$ 1.2	6.7 $\pm$ 2.6	0.7 $\pm$ 0.2	3.8 $\pm$ 1.2

第1図 対照群. 乳頭状癌48時間培養, 乳頭状構造は維持されている. 弱拡大. 10×10 . H.E.

第2図 対照群, 同上, 中間層, 25×10 . H.E.,

第3図 対照群, 同上, stroma に近い部分の強拡大. 40×10 . H.E.

第4図 対照群, 同上, 中心に近い部分, 胞体内外に多数の顆粒を認める. 40×10 . H.E.

第5図 対照群, 正常膀胱粘膜, 中間部の空胞化著明. 25×10 . H.E.

第6図 対照群, 正常膀胱粘膜, 移行上皮中間部の空胞変性に比較して 基底部では濃縮した核が多数みられる. 40×10 . H.E.

第7図 Thio TEPA 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の乳頭状癌、
表層・中間層、中心部の三層が区別され
る。10 $\times$ 10. H.E.

第9図 Thio TEPA 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の乳頭状癌。
中間層の深部は比較的良好に維持されて
いるが中心部の細胞群は、細胞質は淡明
化し、核は濃縮している。25 $\times$ 10. H.E.

第11図 Thio TEPA 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の乳頭状癌。
中間層の深部は良好に維持されているが、
中心部の細胞群は脱落し、壊死の傾向に
ある。40 $\times$ 10. H.E.

第8図 Thio TEPA 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の乳頭状癌、
表層は核・細胞質共に濃縮し、変性が強い、
中間層は比較的良く保存されている
が、胞体内外の顆粒の出現著明。25 $\times$ 10.
H.E.

第10図 Thio TEPA 1 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の乳頭状癌。
表層の細胞群は核・胞体共濃縮、中間層
は核は大きく、変性軽度だが、胞体内外
に顆粒の出現著明。40 $\times$ 10. H.E.

第12図 Thio TEPA 10 $\mu\text{g/ml}$ 添加群の乳頭状癌。
表層から深層まで、壊死の傾向が強い。
10 $\times$ 10. H.E.

第13図 Thio TEPA 10 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。中間層，核の変形，萎縮著明，胞体の外形が不明瞭となり，空胞変性が見られる。40 $\times$ 10, H.E.

第14図 Mitomycin C 1 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。全体として乳頭状構造は維持されているように見える。10 $\times$ 10, H.E.

第15図 Mitomycin C 1 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。表層の細胞群では核の濃縮，胞体内顆粒の出現著明。中間層では，核，胞体共に良好に維持されている。25 $\times$ 10, H.E.

第16図 Mitomycin C 1 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。表層の細胞群では細胞間隙が開き，顆粒が多数出現している。40 $\times$ 10, H.E.

第17図 Mitomycin C 1 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。stroma に近い中間層の細胞は，核，胞体，配列共に良好に維持されている。40 $\times$ 10, H.E.

第18図 Mitomycin C 10 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。表層から深層まで，著明な壊死傾向を認める。10 $\times$ 10, H.E.

第19図 Mitomycin C 10 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。表層の細胞は核の変形，断裂，濃縮著明で胞体も全く本来の形態を残していない。25 $\times$ 10, H.E.

第20図 Mitomycin C 10 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。強拡大では核の変形・断裂・濃縮がより明瞭であるが，顆粒は認められない。40 $\times$ 10, H.E.

第21図 SLNA 1 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。表層から中間層まで細胞は比較的良好に維持されている。25 $\times$ 10, H.E.

第22図 SLNA 1 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。中間層の細胞群の核は楕円形，大型で変性は殆んど見られない。所々に核の濃縮，断裂を示すものもある。40 $\times$ 10, H.E.

第23図 SLNA 10 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。表層よりもむしろ中間層から中心部にかけての変性が強い。10 $\times$ 10, H.E.

第24図 SLNA 10 μ g/ml 添加群の乳頭状癌。中間層の細胞は所により可成り良好に維持されている部と空胞変性，核の濃縮などが著明な部が混在する。40 $\times$ 10, H.E.

第25図 対照群 ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌, 48時間培養. 表層では可成りの取り込みが認められる. (以下培養条件は同じ)

第26図 対照群, ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌中間層での高度取り込みは減少している.

第27図 対照群 ^3H -Thymidine autoradiography 浸潤性癌表層 では高度取り込みを示す細胞が見られる.

第28図 対照群 ^3H -Thymidine autoradiography 浸潤性癌層 では軽度取り込み (矢印) も認められる.

第29図 Thio TEPA $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 添加群, ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌. 表層部は変性が著しく取り込みは殆んど認められない.

第30図 Thio TEPA $1\mu\text{g/ml}$ 添加群 ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌, 中間層でも変性のため取り込みは僅かにのみ(矢印)認められる。

第31図 Mitomycin C $1\mu\text{g/ml}$ 添加群, ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌表層では殆んど取り込みは見られない。

第32図 Mitomycin C. $1\mu\text{g/ml}$ 添加群, ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌中間層での取り込みは可成り認められる。

第33図 SLNA $1\mu\text{g/ml}$ 添加群, ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌表層では高度取り込みも認められる。

第34図 SLNA $1\mu\text{g/ml}$ 添加群 ^3H -Thymidine autoradiography 乳頭状癌中間層では軽度の取り込みが認められる。

第35図 対照群。乳頭状癌48時間培養の中間層の細胞の電子顕微鏡所見。核(N)は大型、表面は円滑で核膜の2重構造もみられる。核仁にも著明な変化はなく、胞体内の糸粒体(M), ゴルジ装置(G)などの発達は良好、細胞間の結合は入り組んだ小突起による。6300×

第36図 Thio TEPA 0.5 μ g/ml 添加群の乳頭状癌の電子顕微鏡所見。核(N)の変形が著明で核膜の2重構造にも乱れがある。核仁は大きく電子密度が高く顆粒状となっている。糸粒体(M)は腫大し球形に近いものが多い。胞体内外に電子密度の高い顆粒(GR)が出現している。6300 $\times$

第37図 Mitomycin C 0.2 μ g/ml 添加群の乳頭状癌の電子顕微鏡的所見。胞体内に空胞（V）の出現が著しいが核の変形は著明ではない。核仁（NI）の変形が所により見られる。細胞間隙に大小の電子密度の高い顆粒（GR）が出現している。6300 $\times$

ら高度 (high) の labeling index は 7.2 ± 3.4 低度 (low) は 10.0 ± 4.2 であった。また深部では high が 3.4 ± 2.7 , low が 8.0 ± 3.1 であった。high についてのみ比較すれば、表層の方が深層に比較して萎縮性である。

(附浸潤性癌)

Grade III で浸潤性の発育を示す癌 (第27, 28図) では labeling index はそのばらつきが大きく算出は困難であったが、一般に high は乳頭状癌よりも低値であるが、per cell の Grain Count は高値 (第27図のものでは50以上と推定される) を示した。一方中間層でもばらつき大きく、特に結合組織の間隙に向かつて nest を形成している場合などは labeling index の算定は不可能と思われた。しかし第28図のごとく濃縮せる核に label されている像も認められた。

(2) Thio TEPA 添加群

Thio TEPA $1 \mu\text{g/ml}$ の使用により、表層に近い部分は第29図のごとく、強い変性を示す。high の labeling index は 0.0 であり、また low は 0.8 ± 0.3 であった。一方中間層においては、第30図のごとくほとんど label を認めず、high は 0.0, low は 1.6 ± 0.9 であった。

(3) MMC 添加群

MMC $1 \mu\text{g/ml}$ の使用により、表層の細胞による取り込みはきわめて低下している。すなわち high は 0.0 ~, low は 2.9 ± 1.3 となるが中間層では Thio TEPA と異なり第32図のごとく取り込んでいる細胞がかなり認められ、labeling index で表現すれば high で 3.1 ± 1.8 low は 3.9 ± 2.0 であった。

(4) SLNA 添加群

SLNA $1 \mu\text{g/ml}$ の使用で表層の細胞は第33図のごとく high labeling を示すものが 2.3 ± 1.2 と認められ、low も 6.7 ± 2.6 と高値を示した。これに対して中間層においては high labeling の index は 0.7 ± 0.2 と低下するが、low は 3.8 ± 1.2 とかなりの高値を維持した。

C 電子顕微鏡所見

(1) 対照群

乳頭状癌 (Grade 2) : 第35図は48時間器官培養した組織片のうち光学顕微鏡的に最も良く本来の構造を維持していた部分の電子顕微鏡写真である。腫瘍細胞の基本的形態は概ね培養前の状態と差はない。すなわち、細胞の大きさは、transitional cell carcinoma Grade II

としては大体揃っており、細胞間は loose な結合で、間隔が広く desmosome はほとんど認められない。多数の microvilli が間隙に向かつて突出している。写真は基底膜 (Bm) に近い部分であるが、核は円形で表面は平滑、核膜は2重構造を示す。核小体は明瞭でない場合が多い。糸粒体 (M) は球形に近く、cristae も明瞭である。Gorgi 装置 (G), endoplasmic reticulum (E.R) の発達は良好である。所により粗面小胞体も、vesicle のも多数認められるが tonofilament はほとんど認められない。

以上の所見は培養前の移行上皮癌と大差を認めない。

(2) Thio TEPA 添加群 : Thio TEPA $0.5 \mu\text{g/ml}$ を培養液に加えて48時間培養した場合の電子顕微鏡所見は第36図のごとくである。すなわち、核 (N) は著明な変形が認められ、核仁は明瞭で電子密度が高く球形に近く顆粒状に見えるものが多い。表面は凹凸不平、切れ込みが非常に多い。基底膜には著変を認めない。細胞間の結合は対照と同様に loose で、microvilli 多数が認められる。糸粒体は対照よりもさらに球形のものが多く、cristae は細く弧状を呈する。その他の胞体内の小器官は対照と大差を認めないが、所々に電子密度の非常に高い lipid 様顆粒を認める。

以上 Thio TEPA $0.5 \mu\text{g/ml}$ による影響として基底膜に近い細胞の核および核仁の変形その他、胞体内に電子密度の高い顆粒の出現に集約される。

(3) Mitomycin C 添加群 : Mitomycin C $0.2 \mu\text{g/ml}$ を培養液に加えて48時間培養した場合の電子顕微鏡所見は第37図のごとくである。すなわち、核は比較的表面が平滑で切れ込みは少ない。核仁 (NI) は粗糙である。糸球体は一般に数を減じている傾向がある。胞体内の変化は著明で、大小の vesicles (V) の出現、電子密度の高い大小の顆粒が認められる。細胞間の結合は、対照と同様に入り組んだ microvilli によるごとく見えるが、細胞間隙は大小の球形の顆粒 (GR) で充満し、microvilli はこれらの顆粒に圧排されて認められる。粗面小胞体の発達は一般に良好であるが胞体内には金平糖状の脂肪滴の出現をみる。

以上、Mitomycin C $0.2 \mu\text{g/ml}$ による変化は主として細胞間隙の顆粒の沈着と胞体内の空胞の出現で核に対する変化は軽度であった。

IV 考 案

著者は膀胱腫瘍組織を in vitro で実験するための方法の一つとして、高圧酸素下培養装置を考案し、諸気相

下における腫瘍組織の反応を検討した。その結果乳頭状膀胱腫瘍は空気の気圧および40%酸素含有空気中の気相下で最も良く、これに対し浸潤性発育を示す腫瘍では気相条件の変動に影響され易いこと、また、組織学的所見はLDHの組織化学的活性度と並行することを認めた。

今回は以上の器官培養法を膀胱腫瘍の研究における確立した一研究方法として、その臨床的応用の有義を検討した。近年高圧酸素室内での放射線療法や制癌剤の大量療法が臨床的に行なわれているが、その効果を判定するに足る客観的データは動物実験や株化した培養細胞の実験を除いてはきわめて乏しい。一方膀胱腫瘍に限っては、制癌剤の膀胱内注入療法として盛んに行なわれているが、その作用機序、効果の判定については未だ定説がない状態であり、注入薬剤の投与量も一定の規準がない現状である。

著者はこれらの観点から、高圧酸素下器官培養法を臨床的に応用することはきわめて意義深いと考える。

すべての腫瘍について制癌剤の効果判定は現在の医学の段階では未だ確立していないが制癌剤の適応を何らかの形で決めようとする試みは古くから行なわれている。すなわち、McFadyen¹⁾らは薬剤を作用させた腫瘍細胞を動物に移植し、移植成立の有無で効果を判定しようとした。Cohen²⁾はハツカネズミの自然発生癌またはBrown Pearce 癌組織を酸素および炭酸ガスの存在下で37℃、24時間培養して組織学的に判定した。Eagle³⁾ら⁴⁾は人癌組織、ハツカネズミ肉腫などの組織培養を行なつて、*in vitro*で各種薬剤の影響を観察し、また、正常人肝とKB人悪性腫瘍細胞に対する多数の化合物の作用をみている。

これらの研究は腫瘍組織を宿主以外の場所に置いて実験するという点では画期的であつたが、効果判定の方法が問題であつた。そこで登場したのが癌細胞のコハク酸脱水素酵素活性をテトラゾリウム系酸化置換元素を利用して測定することで、Black⁵⁾はこれを応用して試験管内での各種薬剤の効果と臨床的效果の相関を認めて報告している。

一方、新制癌剤が次々と発見されるにおよんで癌細胞の薬剤感受性の差が問題となり、細胞寒天法が行なわれる様になつた。すなわち、宮村⁶⁾は寒天平板中に浮遊細胞を包埋しdichlorophenol indophenolで細胞の生存を測定した。これを応用してINK法⁷⁾が試みられ、近年SH基活性をみるKnock法⁸⁾も登場した。

しかしながら癌細胞の活性測定の細胞化学的方法には

ある限界が存在することから、放射性同位元素摂取量を細胞活性の指標とすることが試みられる様になり、Bickis⁹⁾はC¹⁴で標識したadenine, leucine, glycine, glucoseなどが癌細胞のDNA, RNA, 蛋白の生合成におよぼす影響を測定した。またWolberg¹⁰⁾は, thymidine, uridineなどの癌細胞における摂取をオートラジオグラフィーによつて観察し、制癌剤の効果を測定している。

放射性同位元素を応用した細胞活性の測定法はこの分野に著しい進歩をもたらしたが、一方、癌細胞を*in vitro*に理想的に生存せしめるための組織培養の技術の発達はやや遅れる傾向にあつた。人癌細胞を組織培養することが容易でないことが問題で、さらに初代培養が成功したとしても、その細胞が果して癌細胞であるか否か決めるのにきわめて慎重を必要とする。

Cobb¹¹⁾, Wright¹²⁾は腫瘍から短期初代培養細胞を得て、それに各種制癌剤を作用させて細胞学的変化を観察した。

McDonaldら¹⁰⁾¹³⁾も血漿包埋法により人癌をカバースリップ上に発育せしめ、51例のうち18例(35%)に制癌剤を作用させているが、明らかな結論を導くには至らなかつた。Ambroseら¹⁴⁾もトリプシン処理した人癌を15%患者血清加NCTC-109培養液中で培養し、得られた単層培養細胞に制癌剤を各濃度に作用せしめているが、症例が少なく明確な結論を得るには至っていない。

Hurdeyら¹⁵⁾も同様血漿包埋法でカバースリップ上に細胞発育を得て、373例中184例(50%)に薬剤の効果を判定するに足る変化を認めている。

一方Wolffら⁶⁾はメワトリのmesonephrosで人癌組織を被覆して長期間の培養に成功しているが、何分にも症例が少なく、薬剤の効果を判定する目的には適当でないと思われる。

Folkmanら¹⁷⁾はマウスの黒色腫を組織塊として灌流装置の中で発育せしめ12例中9例は1週間の維持に成功しているが、多数の人癌症例に行なうためには技術が煩雑に過ぎるように思われる。Robin¹⁸⁾は、人癌の器官培養に炭酸ガスを気相に混入せしめ、合成液体培養液を用いた。すなわち、気相に空気を用いた場合、10例の培養で1例の黒色腫は7日間生存したが、その他は2~3日で死滅した。ところが気相に炭酸ガスを加えると成績は著明に好転し10例中5例が少なくとも5日間は生存した。CooperおよびGoldring¹⁹⁾は30例の人癌の器官培養を行なつて7日以上生存はなく、患者自身の

血清の方が、馬血清使用群より劣っていたと報告している。Yarnell ら²⁰⁾は、各種薬剤と共に人体材料を器官培養し、³²P の腫瘍組織取込みを測定した。Röller ら²¹⁾は91例に上る多数の人癌について、Eagle's MEM に馬血清、embryo extract、患者血清などを加え、4日、7日、11日後に生存の程度を組織学的に判定した。全体の43%に良好な結果を得たが、患者血清を加えた群に最も好結果を認めている。

著者の前回の報告²²⁾では同様 Eagle の MEM に10%仔牛血清を加えて培養液とし、気相に炭酸ガスを混入せしめた。著者は膀胱の正常粘膜、乳頭状癌、浸潤性癌について、各々酸素分圧に対する態度が異なり、乳頭状癌については空気2気圧が40%酸素1気圧と同様に最適であることを認めた。これは Macdougall および Coupland²³⁾も報告している様に、組織によつて酸素に対する反応態度が異なると解され、従つて器官培養の条件をあらゆる腫瘍に普遍的に規定することはできず、特に薬剤の効果を判定しようとする為には、膀胱腫瘍なら乳頭状癌に限つて対照の条件を決めることが、重要であると考えられる。

次に、培養結果の判定方法については、組織学的に十分な検討を行なうことは是非必要であるが、或る程度定量的に薬剤の効果を云々するためには今回行なつたオートラジオグラフィは1つの有力な手段である²⁴⁾。体外標識によるオートラジオグラフは生理的環境から引き離された細胞が生体内と同様の状態に保たれるか否かが、その成績の評価にとつて決定的であるが、実際に報告されている *in vitro* の条件は多種多様である²⁵⁾。特に *in vitro* 法では通常、incubation の時間が一定であつても、核酸前駆物質は組織の表面から深部に浸透して行くので浸透性の問題が、labeling index に大きく影響する。更に表層、中間層中心部とでは培養されている細胞の生理的条件が著しく異なると考えられ、又、培養細胞が癌であれば、個々の細胞による差が大きいために、僅かな培養条件の変動によつても、labeling index および grain count に大きな影響を与えられとされる。

著者はこの点を考慮して、組織片の表層と中間層の2カ所から各5カ所を10 μ^2 の正方形の区画の中で、labeling index と grain count を行ない、各培養条件の資料を比較検討した。しかしながら、*in vitro* labeling は通常組織の slice を短時間 incubate しており、著者の行なつたごとく器官培養で最後の2時間に labeling のため incubation をした例はなく、この点では著者の

行なつた方法は全く新しい。膀胱腫瘍組織に限つていえば、Veenema²⁶⁾らが同様 ³H-Thymidine を使用して行なっている。この場合取り込みを助長させるために培養中の気相に酸素を吹込んでゐる。最近、寺島²⁷⁾は ³H-nucleosides による *in vitro* autoradiography で膀胱腫瘍の研究を報告しているが、培養時間は30分、60分、120分の3段階について検討しており、この間に labeling index, grain count に差を認めていない。又気相については特に言及していないが、2mm³ の大きさの slice で、アイソトープに label されるのは表層から100M程度に限られると述べている。著者は空気2気圧の気相下で48時間の培養時間のうち最後の2時間にアイソトープを培養液中に加えたが、約200Mの深部まで取り込みを認めた。しかし、表層の方が中間層に比較して、grain count でも labeling index でも共に明らかな低値を示したことは、³H-Thymidine 自体の組織内への側にも浸透し易い構造と浸透を妨げる様な構造とが混在しており、決して均一ではない点を考慮しなければならない。

組織内へ培養液の成分が如何に浸透するかは、器官培養の場合 *in vitro* とは全く異なっている。細胞への栄養補給自体が、血管を介さず、表面からの浸透のみによつて行なわれている。この場合高圧酸素の環境では益々状態は複雑化する。従つて、培養液内に混入せしめた制癌剤がどの様に浸透して作用するかは疑問の点が多いが、少なくとも培養中の分解がないものと仮定すれば、各薬剤の分子量は膜透過性をきめる大きな因子であろうと考えられる。現に分子量の小さい Thio-TEPA では表層の細胞に対する破壊の程度は、同濃度で Mitomycin C に劣るが、中間層の細胞の変化は明らかに強く現われている。この物質は膀胱腫瘍患者に対し最近頻繁に行なわれている局所注入療法の薬剤選択について応用されうであろう。

高圧下において細胞が増殖という面で如何に変化するかは未だ明確でない。Cooper ら²⁸⁾が兔胎児腎で行なつた実験では1気圧で25~30%の酸素は細胞毒となると報告しており、又、Ruecent²⁹⁾は HeLa 細胞の細胞分裂は高圧酸素によつて阻害され、これは DNA, RNA の生合成の障害によるとしている。著者の実験では前回の報告²²⁾³⁰⁾および今回の結果を総合して、移行上皮癌に限つては、空気2気圧の状態では組織の最表層は必ずしも良好な結果ではなかつたが、中間層は一般に正常に近い組織像を維持し、これを control として充分役に立つ

ものと考えた。

又、臨床的に制癌剤の使用量をきめることは極めて困難と云われているが、著者の方法によつて、最小の細胞の発育阻止濃度を推定することは可能である。しかしこの場合も単層培養や浮遊細胞と異なり、その判定を定量的に行なうことは困難である。その場合もやはり、薬剤の組織への浸透性の差が問題となる。この観点からすれば、薬剤の分子量の大きさが1つの重要な factor であると推定される。即ち、Thio TEPA は分子量 189 に対し、Mitomycin C は分子量 349.34 である。当然この2者間には培養液から細胞内への浸透性の差が考えられる。しかし、両者の薬理作用の差、培養条件に与える影響の差を考慮する必要がある。この点から制癌剤の最小細胞発育阻止濃度を判定することは必ずしも容易ではない。この意味で両薬剤についてより低濃度で細胞に与える初期の damage を電子顕微鏡的に観察することを試みた。

酒徳ら³¹⁾³²⁾は移行上皮癌の電子顕微鏡的観察を行ない、悪性度の進行に従つて核の不正楕円形化、細胞間隙を micro villi の消失を認めている。著者は48時間 in vitro で培養した乳頭状癌を電子顕微鏡的に観察し、Thio TEPA, Mitomycin C 両薬剤の影響も併せて検討した。この様な培養組織の電子顕微鏡的観察は未だ報告をみないので、更に詳細な検討を要するが、Thio TEPA では低濃度で核の変形、切れ込みの増加、核小体の変化を認め、Mitomycin C では低濃度で、深層の細胞には核よりも胞体の変性が先行することを認めた。この差は両薬剤の浸透性の相異も1つの要因として考慮する必要がある。

V 結 語

高圧下器官培養法の応用として各種制癌剤の培養細胞に対する作用を、病理組織学的並びに ^3H -Thymidine autoradiography により検討した結果次のごとき結論を得た。

1. 高圧下器官培養法により培養された膀胱乳頭状癌のうち、対照群で組織表層と深層を比較すると組織学的には表層よりも深層がより正常に近く維持され、組織片の中心部では変性の傾向を認め、autoradiography では、labeling index は表層に高かつたが、深層でも可成りの高値を示した。

2. Thio TEPA 添加群では $1\mu\text{g/ml}$ の濃度で組織学的に表層、深層共に変性を示し、中心部は壊死性で labeling index は、著しく低下した。 $10\mu\text{g/ml}$ の濃

度では組織片全体が殆んど壊死を示した。

3. Mitomycin C 添加群では $1\mu\text{g/ml}$ の濃度で表層は組織学的に可成りの変性を示したが、深層は良好な組織像を呈し中心部は再び変性の傾向を示した。labeling index では組織学的所見に一致して表層では著しく低下し、深層では対照群に近い値を示した。 $10\mu\text{g/ml}$ の濃度では表層と中心部は組織学的に著しい変性を示したが、中間層は変性を示す程度であつた。

4. SLNA 添加群では、 $1\mu\text{g/ml}$ の濃度では表層、中間層ともに変化は軽微であつたが labeling index でみると両者共に可成りの低下を示した。しかし $10\mu\text{g/ml}$ の濃度においても組織学的に変性の程度は Thio TEPA, Mitomycin C よりも著しく軽微であつた。

5. 以上の結果から直ちに in vitro における薬剤の抗腫瘍作用の程度に言及することはできない。むしろ各種薬剤の組織内への浸透性の差が結果に大きな影響を与えと考えられる。

6. SLNA の in vitro における抗腫瘍性は他の薬剤と異なり核酸合成過程は余り障害されず、細胞質からの変性が主であると推定される。

7. Thio TEPA, Mitomycin C の両薬剤の超微細構造に対する影響を電子顕微鏡的に観察した。前者は基底膜に近い細胞に対して核および核小体に対する影響が先ず出現するのに比較して後者では胞体内の変性が先行した。

8. 以上の結果は膀胱腫瘍に対する薬剤の局所注入療法に際し、使用薬剤の組織内浸透性の重要性を示唆するものである。

稿を終るにあたり、御校閲を賜つた大越正秋教授および御指導下さいました田崎寛講師に深謝します。また、御協力戴いた松永重昂、矢島暎夫、木村茂三諸兄に感謝の意を表します。

尚、本研究に御援助戴いた飾磨慈恵会並びに故原武三氏に感謝致します。

電子顕微鏡技術の御協力を戴いた小松達至氏に感謝致します。

本研究費の一部は厚生省癌研究費による。

文 献

- 1) McFadyen, D.A. and Murphy, J.B.: J. Exp. Med., **70**, 461, 1939.
- 2) Cohen, A.L., et al.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **66**, 440, 1947.
- 3) Eagle, H., et al.: Am. J. Med., **21**, 739, 1956.
- 4) Eagle, H., et al.: Cancer Res., **18**, 1017,

- 1958.
 - 5) Black, M.M., et al.: Surg. Gyn. & Obst., **102**, 420, 1956.
 - 6) Miyamura, S.: Antibiotics & Chemother., **6**, 280, 1956.
 - 7) 西岡久寿弥, 他: 日本臨床, **15**, 1937, 1957.
 - 8) Knock, F.E.: Arch. Surg., **91**, 376, 1965.
 - 9) Bickis, I.J., et al.: Cancer, **19**, 103, 1966.
 - 10) Wohlberg, W.H., et al.: Cancer Res., **22**, 1113, 1962.
 - 11) Cobb, J.P., et al.: Cancer Res., **21**, 583, 1961.
 - 12) Wright, J.C., et al.: Cancer, **15**, 284, 1962.
 - 13) McDonald, G.O. and Cole, W.H.: Surg. Forum, **10**, 67, 1960.
 - 14) Ambrose, E.J., Andrews, R.D., Easty, D.M., Field, E.O. and Wylie, J.A.H.: Lancet, **99**, 24—25, 1962.
 - 15) Hurley, J.D. and Yount, L.J.: Am. J. Surg., **109**, 39, 1965.
 - 16) Wolff, E.: Symposium on Organ culture Natl. Cancer Inst. Monograph No. **11**, 99, 180—95, 1963.
 - 17) Folkman, J., Long, D.M. Jr. and Becker, F.F.: Cancer, **16**, 453—67, 1967.
 - 18) Rovin, S.: Cancer Res., **22**, 384—87, 1962.
 - 19) Cooper, P. and Goldring, I.P.: Acta Unio. Intern. Contra Cancrum, **20**, 1288—91, 1964.
 - 20) Yarnell, M., Ambrose, E.J., Shepley, K. and Jchao, R.: Brit. Med. J., **99**, 490—91, 1964.
 - 21) Roller, M., Owen, S.P. and Heidelberger, C.: Cancer Res., **26**, 626—637, 1966.
 - 22) 尾関全彦: 日泌尿会誌, **59**, 425, 1968.
 - 23) Macdougall, J.D.B. and Coupland, R.E.: Exper. Cell Res., **45**, 385, 1967.
 - 24) Ochler, W. and Lesch, R.: Dtsch. Med. Wschr., **91**, 1940, 1966.
 - 25) Joftes, D.L.: J. Nucl. Med., **4**, 143, 1943.
 - 26) Veenema, R.J., Fingerhut, B. and Platts, M.D.: Surgical Forum, **13**, 510, 1962.
 - 27) 寺島和光: 日泌尿会誌, **60**, 181, 1969.
 - 28) Cooper, P.D., A.M. Burt, and J.N. Wilson: Nature, **182**, 1508, 1958.
 - 29) Ruecert, R.R. and G.C. Muller: Cancer Res., **20**, 944, 1960.
 - 30) Tazaki, H., Ozeki, T., Matsunaga, J., Yajima, T., Ohkoshi, M.: Keio. J. Med., **17**, 263, 1968.
 - 31) 酒徳治三郎, 桐山畜夫: 日本癌学会総会記事 **211**, 第27総会 (東京), 昭和43年10月.
 - 32) 酒徳治三郎: 西日本泌尿器科, **31**, 145, 1969.
(昭和44年10月3日受付)
-