Nude mouse 移植と培養細胞系を応用した ヒト腎細胞癌の機能と形態に関する研究

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 勝 岡 洋 治

(主任: 田 崎 寛 教授)

FUNCTIONAL AND MORPHOLOGICAL OBSERVATION OF HUMAN RENAL CELL CARCINOMA UTILIZING NUDE MOUSE AND CELL CULTURE SYSTEM

Yoji Katsuoka

Department of Urology, School of Medicine, Keio University

(Director: Prof. Hiroshi Tazaki)

Various clinical manifestations of human renal cell carcinoma have been reported by many authors and it is currently maintained that different functional and morphological characteristics of individual tumor are responsible for this.

An attempt to establish cell line has been made for suitable in vitro experimental system. Attempts have also been made to transplant human renal cell carcinoma to nude mouse for further functional and morphological study.

Materials and methods:

Thirty-six surgical specimens of renal cell carcinoma obtained at Keio University and its affiliated hospitals from September '73 through March '77 were used. Those specimens, after being cultured, transplanted to nude mouse, were examined from different points of view including light and electron microscopic observation, cell growth, chromosomal analysis and determination of erythropoietin activity.

Results:

1) Thirtysix cases of direct cell culture were performed in which primary culture and successive culture were successful in 11 and 2 cases, respectively.

2) Six out of 12 transplanted tumors to nude mouse were successful, and 4 of the 6 transplanted tumors were still in growth at present time. Among them included is a tumor capable of producing erythropoietin, which was originally derived from metastatic foci in the lung from renal cell carcinoma.

3) Histopathological findings of the transplanted tumor and original tumor were basically identical, and that of tumors successively cultured also carried the similar characteristics.

4) Indirect culture through nude mouse also succeeded, and among them included was a cell line established and named KU-2 in November 1976.

5) Histopathological characteristics of the established cell line, even after being transplanted back to nude mouse remains unchanged.

6) Presence of brush-border like structure in the transplanted tumor and radially arranged microvilli in cultured cells observed under electron microscopy is a proof for the current thought that renal cell carcinoma is originated in proximal tubular cell.

7) Erythrocytosis transferred to tumor bearing nude mouse as well as determination of erythropoietin activity in the tumor tissue raised the possibility that the tumor per se was capable of producing erythropoietin.

Development of hepatomegaly in the nude mouse with this particular tumor, in addition to the above observation, can explain the unique functional characteristics of this tumor.

緒 言

癌の特性は自律性増殖とされているが、必ずしも宿主側の条件を無視した無制限の増殖とは言えない。とく

にヒトの腎細胞癌についてみると古くから、自然退縮 (spontaneous regression)¹⁾²⁾ や、原発巣を外科的に切除すると転移巣が消失する例があること³⁾⁴⁾、腎摘後、長

い年月を経て、再発・転移がみられる例があること^{5)~7)}、**testosterone** や **progesterone**により腫瘍の縮小することがある^{8)~10)}、などの事実、腫瘍の発育条件として、宿主の免疫学的あるいは内分泌的影響をうけていることが考慮されなければならない。

また、赤沈の亢進、蛋白分画、免疫グロブリンの異常などは、担癌患者の一般的傾向であるが、腎細胞癌患者においては、その増殖態度により特徴的であり¹¹⁾、さらには、赤血球増多症^{12)~15)}や、高カルシウム血症^{16)~19)}、発熱物質の遊離²⁰⁾²¹⁾を想定される熱型、可逆性の肝障害^{2)22)~24)}などの全身症状を示し、この腫瘍が機能的な性格を持ち合わせているといわれるゆえんである。

他面、腎細胞癌の構築上の特性は癌細胞が毛細血管と直かに接していることである。この毛細血管は明らかに腫瘍細胞の増殖に伴って新生されたものであり、**nor adrenaline** (**vasoconstrictor**)による収縮能を欠くなどの性格をもっているが、その詳細は明らかではない。しかし、この事実が臨床的に薬理学的動脈撮影 (**pharmacoaangiography**) の応用となつている²⁵⁾。

また、腎細胞癌の多くが近位尿管上皮に由来するであろうことは電子顕微鏡による観察で細胞間結合部に **brush border** 様の構造をみとめることで証明されているが^{26)~30)}癌細胞としてこの構造のもつ意味は明らかになつていない。

光顕上の特長として透明細胞型 (**clear cell type**) と顆粒細胞型 (**granular cell type**) の区別があるが、両者の間に予後以外に明確な相違を見出ししていない^{31)~35)}。以上述べたようなきわめて多岐にわたる腎細胞癌の表現型は癌細胞自身の性質とそれを取り巻く宿主側の条件とによつて決められるものである。

したがって、この癌に関する研究へのアプローチの仕方は単純化した系での研究と、合わせて **host-tumor relationship** (宿主-腫瘍間の関連性) をより簡潔に研究する系の開発が必要である。

そこで著者はまずヒト腎細胞癌の細胞株の樹立を第1の目標として細胞培養を行ない、その機能と形態を詳細に観察することとした。同時に先天性胸腺欠損マウス (**nude mouse**) がヒト癌を移植すると容易に生着し増殖することから、異種移植を行ない、累代系を樹立することを試みた。この移植癌についても機能と形態上の特性を検討した。

その結果 **in vitro** と **in vivo** の両面からの研究が可能となり、若干の興味ある知見を得たので報告する。

Table 1 Materials and clinical data on patients with renal cell carcinoma

Case	Sex	Age	Side	Pathology		Therapy	Prognosis
				cell type	stage		
1 M.N.	M	40	L	Clear	I	nephrectomy irradiation	recurrence 2.5ys later
2 T.M.	M	60	L	Clear	I	nephrectomy chemot therapy hormone	stationary
3 S.T.	M	78	R	Granular	I	nephrectomy	died by apoplexy 2ys later
4 K.H.	M	49	R	Clear	IV in brain	nephrectomy irradiation	worsening untill death
5 H.K.	M	62	R	Mixed	II	nephrectomy	lost follow up
6 F.T.	F	73	R	Clear	II in media-stinum	nephrectomy	lost follow up
7 A.W.	M	45	R	Clear	II	nephrectomy	metastasis to brain 3M later
8 F.A.	M	58	R	Mixed	in brain	nephrectomy	died 1y later
9 K.S.	F	51	L	Clear	I	nephrectomy irradiation	stationary
10 N.N.	M	57	R	Clear	II	nephrectomy chemot therapy hormone	symptom-free oesophagus ca associated
11 Y.K.	F	76	L	Clear	III	nephrectomy irradiation chemot therapy hormone	stationary
12 I.H.	M	56	L	Mixed	I	nephrectomy	stationary
13 T.F.	M	38	L	Granular	IV in brain	nephrectomy hormone	worsening untill
14 I.H.	M	65	R	Clear	III	nephrectomy	symptom-free during 1.5ys metastasis to lung and died
15 J.Y.	M	72	L	Clear	I	nephrectomy chemot therapy	metastasis to skin and died
16 J.Y.	F	31	R	Clear	I	nephrectomy chemot therapy	stationary
17 S.T.	F	54	R	Clear	I	nephrectomy chemot therapy	stationary
18 S.T.	M	69	L	Granular	III	nephrectomy	symptom-free during 6M recently died
19 T.N.	M	67	L	Clear	IV in lung	nephrectomy partial resection of lung chemotherapy	worsening untill death
20 M.O.	M	71	L	Clear	III	nephrectomy chemot therapy irradiation	stationary
21 K.Y.	M	54	L	Clear	I	nephrectomy	stationary
22 K.S.	M	54	L	Clear	I	nephrectomy	stationary
23 N.O.	M	67	L	Clear	II	nephrectomy	stationary
24 S.S.	M	55	R	Clear	I	nephrectomy irradiation	stationary
25 J.K.	M	60	L	Clear	III	nephrectomy chemot therapy	stationary
26 U.O.	M	63	R	Clear	IV in lung	nephrectomy	lost follow up
27 E.M.	M	53	R	Clear	IV in lung	nephrectomy tumor excision in lung	lost follow up
28 F.S.	M	56	R	Clear	I	nephrectomy	stationary
29 K.S.	M	44	L	Clear	I	nephrectomy chemot therapy	stationary
30 S.S.	F	43	L	Clear	I	nephrectomy	stationary
31 I.I.	M	41	L	Clear	II	nephrectomy	metastasis to bil lung, died 1y later
32 S.S.	F	62	L	Clear	III	nephrectomy chemot therapy	stationary
33 T.H.	M	65	L	Clear	III	nephrectomy chemot therapy	metastasis to bone and lung, died 4M later
34 H.O.	M	49	L	Clear	II	partial nephrectomy	metastasis to lung
35 U.A.	F	63	R	Clear	III	nephrectomy	metastasis to brain 8M later
36 T.K.	F	81	R	Clear	IV in brain	nephrectomy	stationary

研究材料並びに研究方法

昭和48年9月より昭和52年3月までの間に慶応義塾大学病院とその関連病院において手術的に摘出された材料36例を Table 1に示す。

病型分類 (staging) は Flocks & Kadesky³⁶⁾ の分類法に準拠した。但し、IA 被膜内期 intra capsular, IB 被膜外期 extra は腎内 intra renal として一括した。

性別でみると、男27例、女9例であつた。年齢は31歳から81歳にわたり、平均57.8歳であり、患側別では、右側16例、左側20例であつた。

また、cell type では透明細胞型30例、顆粒細胞型3例、混合型3例であつた。

staging の内訳は stage I は14例、stage II は6例、stage III は8例、stage IV は8例が集計された。

摘出部位は原発巣が大半で34例、転移巣より得られたものは、肺より2例であつた。

これらの臨床例の治療内容、予後の概略は Table I に示す通りである。

移植に用いられた nude mouse (BALB/c, nu/nu) は正常 (nu/F, nu 遺伝子をもつヘテロ型) メスとノード (nu/nu) オスの交配により実験動物中央研究所で生産された5~8週のものを使用した。飼育条件は、SPF (specific pathogen free) 環境下とした。

(1) 細胞培養法

無菌的に得られた組織片を細切し、トリプシン処理 (0.25%液、千葉血清、室温で30分間) をして cell suspension と一部の explant を培養瓶 (TD 15, TD 40) に培養液とともに入れた。培養液は Eagle' MEM (千葉血清) に10%仔牛血清 (千葉血清)、または牛胎児血清 (GIBCO) を加えたものを用いた。

pH は7.2~7.4に調整し、感染予防には、Penicillin 100u/dl, Streptomycin 100mg/dl を添加した。その上で37°C, 5% CO₂ incubator (細胞培養恒温器A型、池本理化k.k) に入れ、静置単層培養を行なつた。

培養液の交換は原則として週2回とした。

継代に際しては、ガラス面に一面に増殖した状態 (confluent, full sheet) を確認した上で0.25%トリプシン0.5~1.0ml を加え、室温にて5分間静置の上で軽く振盪する。培養液で稀釈の上、遠沈し、細胞数10⁵個/ml 相当を継代した。ガラス面より細胞を剥離する場合にはトリプシン消化、分散法が一般的であるが別な方法として、線維芽細胞の排除できたものには柔かい良質のコム片 (swab) でこすり取る方法を用いた。

(2) 観察方法

観察対象は、摘出標本、直接培養細胞、移植腫瘍、間接培養細胞、もどし移植腫瘍に対して行ない、それぞれの目的に応じて、(a) 光顕的、(b) 電顕的、(c) 生長度測定-増殖曲線 (growth curve) とコロニー形成率 (plating efficiency, PE)、(d) 染色体分析、(e) Erythropoietin (Ep 活性) の測定を行なつた。

培養細胞の日常的観察は培養基の pH が細胞増殖に伴って一般に酸性に変ずることから、呈色反応を増殖の指標とした。形態学的には NIKON MDS 倒立顕微鏡を使用し、位相差照明法で観察した。写真撮影には NIKON AFM 自動露出撮影装置を用いた。

(a) 光顕材料は10%フォルマリンに固定し、paraffin 包埋して、Minot 型シンクロトームにより連続切片を作製し、H-E 染色を行なつた。培養細胞はメタノールに固定後、ギムザ染色を行なつた。

(b) 電顕材料は2%グルタルと1%オスミウムの2重固定とし、脱水後 Luft 法により Epon 812樹脂にて包埋、LKB 4800型 ultra microtome により超薄片とし、uranyl acetate lead citrate で2重染色し、日立電子顕微鏡 HU 12A にて超微細構造を検討した。

(c) 生長度測定として増殖曲線の作製には重複培養法 (replicate culture) にしたがつた。

直径35mm のプラスチックシャーレを多数用意し、同一細胞浮遊液から10⁴個/ml の細胞をシャーレに植込み、全く同じ条件下で培養した。一定日数ごとに3個づつ抜き出し、それぞれの細胞数を算定し、平均し、その値を片対数グラフにプロットして曲線を描写した。

コロニー形成率は、ガラス面に一面に増殖した細胞を0.1%トリプシンと0.01% EDTA 液により単離し、5×10²、2×10³個の細胞数に合わせ、直径60mm のプラスチックに各々2枚ずつ播き、5% CO₂ incubator で10日間培養したのち、ギムザ染色し、倒立顕微鏡下にコロニーを数え、コロニー形成率を植込み数と比較して百分率で表わした。

(d) 染色体標本の作製は、まず2~3日前にあらかじめ継代培養を行なつた上で細胞浮遊液をカバーガラスの上にのせ培養液を加えて培養する。その際培地3ml に対してコルセミッド (GIBCO) を1滴の割合で加えた。6~9時間後、低張処理、固定、乾燥、染色、封入の順で標本作製を行なつた。

低張処理—培養液をのぞき、紙片を伝わせて0.2% NaCl を静かに3ml 加え、室温に放置した。

固定—Carnoy 原液（純アルコール 3 容＋氷酢酸 1 容）の 0.2% NaCl で 10 倍稀釈したものを静かに加え、5 分後に再び新しく原液を変えて 30 分間固定した。

乾燥—ジャーレ内の原液を除去し、ピンセットでカバーグラスをはさんで原液を充分に振り落とす。そして手早く火焰乾燥をする。

染色—10% ギムザ液 (pH 6.8) で染色、水洗いをした上で乾燥させた。

封入—封入剤カナダバルサム（和光純薬）をスライドグラスに 1 滴つけて染色体標本に重ねた。

(e) Ep 活性の測定は当大学内科血液学外山博士に依頼した。その測定法を略記する。測定法は多血症マウス法 (exhypoxic polycythemic bioassay)³⁷⁾ で行なつた。あらかじめ Fe 0.5mg をマウスの皮下に注射したのち、このマウスをケースに入れたまま低圧室（トキワ科学製）に 1/2 気圧下に 2 週間入れ、正常圧に戻したマウスに、同種のマウスより採血した血液 (Ht 70% 以上のもの) 0.7ml を尾静脈に輸血し多血症マウスを作成させた。

被検体は 5 日目に 1ml/マウス あたり投与、7 日目に ⁵⁹Fe citrate, 0.5Ci/マウスを注射し、9 日目に採血し血液の ⁵⁹Fe radioactivity をカウントした。対照には同量の生食水を用いた。

組織中 Ep 活性測定のためには、臓器抽出物を作製した。

臓器は -20°C に保存し、抽出液作製にあたって、一晚臓器を 4°C において融解し、4°C の生食水で洗い、組織 1g 宛 1ml の 4°C に冷却した 0.02M phosphate buffer の pH 6.8 を加えて、4°C で homogenizer で 2～4 分間 homogenize した。これを 4°C、10 分間 12,000g で遠沈した上清を Ep 測定まで -20°C に保存した。

⁵⁹Fe 取込み率は次式にて算出し、コントロール群との間に有意差をみとめた時に、活性が detect されたと判定した。単位は組織は g あたり、血清は ml あたりで表示した。

$$^{59}\text{Fe 取込み率}(\%) = \frac{\text{血液 1ml のカウント} \times \text{体重(g)} \times 0.07}{\text{注射}^{59}\text{Fe 総カウント}} \times 100$$

なお、1 検体に 5～6 匹の多血症マウスを使用し、Ht 55% 以下のものは除外した。

(3) Nude mouse への癌組織移植

外科的摘出材料を培養液に入れ、on ice で可及的、速やかに実験動物中央研究所まで搬送した。その材料をビニール isolator（日本クレア k.k.）の中で細切し、2

mm³ の角片、細胞数にして約 5×10^6 個を径 3mm または 3.5mm のトラカール針の中に充填し、nude mouse の皮下に植込んだ。1 回使用マウスは 3～5 尾であつた。

(4) 培養細胞の Nude mouse へのもどし移植

移植予定日の 3 日前に KU-2 株（後述）を継代し、目的とする細胞数 ($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$) を得るために比較的大型の培養瓶 (TD₄₀, あるいは中角) 5 本に分けて培養し、fullsheet を形成後の細胞を型のごとく単離し、培養液に浮遊させ、注射針にて皮下に papula をつくつた。

nude mouse は 5～6 週のメス、8 週のオスを用い、一回の実験に 3 尾を使用した。

生着の有無は肉眼的観察により明らかに隆起性に発達したものを take されたと判定した。同時に、nude mouse の皮膚の色調の変化を観察した。

研究結果

1) 摘出標本の形態学的所見

前述のとおり摘出された 36 例はすべて腺癌であり、cell type の内訳は透明細胞型 30 例、顆粒細胞型 3 例、混合型 3 例であつた。

浸潤度からみると stage I 14 例、stage II 6 例、stage III 8 例、stage IV 8 例であつた。

電顕所見：核は球状に近く、核質に富み、胞体内には多数の糸粒体 (m) とグリコーゲン顆粒 (Gg) が認められる。特徴的な所見は細胞膜の構造にある。すなわち、極めて複雑な interdigitation を示すうちに近位尿管の刷子縁 (brush border) に類似の構造 (BB) が認められる。しかも、この構造には非常に variety があり、primitive な部分では unit membrane による微細なじゅう玉状の突起が、胞体に延長してゆく像が、認められる。細胞膜に於けるこのような特徴が近位尿管上皮の形態的特性を継承していると理解されるが、はたして機能的特性にも関係しているか否かは明らかでない (Fig. 1)。

2) 直接培養成績

培養を試みたヒト腎細胞癌組織は 36 例である (table 2)。初代単層培養の成功は、11 例で 30%、そのうち継代可能であつたものは、2 例であつた。これらの培養日数

Table 2 Results of direct cell culture

	Number of Specimens	Number Cultured Successfully	Average Time in Culture	Average Number of Subcultured
RCC	36	11 (30%)	104 days 32—198 days	2 (1—5) ^a

^a: Range

は最長198日、最短32日であった。

初代培養成功例では24~36時間後には、既に細胞は散在してガラス面に付着してくる。そして次第にガラス面を這うように伸展、膨化するが、小型の紡錘形または線維芽細胞 (fibroblastic) と上皮性細胞 (epithelial) の混在するもの、上皮性細胞の均一の細胞集団 (homogenous population) のものがみられた (Fig. 2~5)。

7日間経ても定着しない細胞は肥大せず浮遊し、一部は凝集塊となり生着は不可能と判断された。

Full sheet に生着したものは継代されたが、ガラス面への付着能は初代培養と差異は認めなかつた。しかし、継代を重ねるにつれて形態学的に膨張を増し、細胞質は扁平化し、グリコーゲン顆粒と思われる顆粒が細胞質全体に出現し、空胞も多く、核は縮小し増殖は急速に衰え、さらに培養を続けると細胞は浮遊しはじめ、この浮遊状態でも細胞増殖はみられず、これら一連の現象は退行変性と考えられた (Fig. 6)。

初代培養成功の中には細菌感染 contamination により破棄されたものがあるが、培養操作中の混入と思われた。cell type と培養成績に直接の関係はみられなかつた。また、癌の進行度と培養成績にも同様な結果であつた。]

直接培養の成績が思わしくなかつたので培養細胞の光顕、電顕材料まで作製できなかつた。

3) Nude mouse 移植結果

12例に移植し、その結果6例に移植可能であつた (Fig. 7, Table 3)。摘出してから植込み inoculation までの時間はできる限り短縮するよう努めたが、平均4.5時間であつた。植込までの時間と可移植性との間に

は密接な関係はみられなかつた。担癌 nude mouse における腫瘍の進行速度の測定は精密には行い得なかつたが、植込みより着床増殖の確認までには4~8週を要し、累代を可能にするまでには早いもので4~8週、遅いものでは12週以上を必要とした。

1977年7月現在、6例の累代数の内訳は No. 1が15代 No. 2, 3が4代で消失, No. 4が16代, No. 5が5代, No. 6, 4代であり、4つの移植系が維持されている。

組織学的には光顕レベルでみると nude mouse の皮下に周囲と明らかに境界を別にした腫瘍塊がみられ、その腫瘍は原腫瘍と酷似した組織像である。腫瘍内には毛細血管新生がみられるが、この血管は腫瘍の被膜外の nude mouse との結合織から連続していることが明らかであつた (Fig. 8, 9)。

この所見は累代を重ねても形態学的に変化はみられなかつた (Fig. 10~15)。

但し、1例 (No. 13) は部分的に sarcomatous な変化をみたが全体像としては原腫瘍と同一であつた。

電顕的に観察すると明らかに2種類の異なつた細胞が認められる。1つは明るい細胞で胞体内には大小の空胞と小器官が散在している。他は比較的 density の高い物体を含む細胞である。その細胞間結合は直線的である。その一部には Fig. 17のような dense な物質を容れた柵状構造物 (幅 0.2μ , 長さ $2\sim 3\mu$) が一定の方向性をもつて密に並んで認められることがある。この構造は非常に特徴的で放射状あるいは求心状に配列することもあり、その中心部には更に dense な物質が蓄積されたかのように認められる場合もある。この構造は腎の近位尿細管上皮の内面に於ける brush border に類似している。

この構造に接して多数の不規則な小空胞を含む非常に電子密度の高い部分と大型の空胞が混在した部分がある。

一方、大型の核 (n) を有し細胞質の面積が小さく、発達した小胞体 (rer), 糸粒体 (m), グリコーゲン顆粒 (Gg) を有せる細胞がある。

この2種類の細胞の比は、ところによつては前者の方が多いが、後者の優勢な部分もある (Fig. 16, 17)。

移植腫瘍組織の機能に関する研究結果:

赤血球増多症を合併した腎細胞癌患者の肺転移巣を摘出し、nude mouse に移植したところ赤血球増多症の再現をみた。

本症例の臨床経過を略記する (Table 1より症例番号19)。

Table 3 Transplantation to nude mice

Cases	Age	Sex	Original histology	Time before inoculation (Hours)	Take	Number of transfer	Histology of transplants
13 T. F.	38	M	Granular	4.0	+	16	Granular*
14 I. H.	65	M	Clear	4.0	+	4 (disappearance)	Clear
15 J. Y.	72	M	Clear	3.2	—	—	—
16 J. Y.	31	F	Clear	1.0	—	—	—
17 S. T.	54	F	Clear	4.0	—	—	—
18 S. T.	69	M	Granular	3.5	+	4 (disappearance)	Granular
19 T. N.	67	M	Clear**	4.5	+	16	Clear
20 M. O.	71	M	Clear	3.0	+	5	Clear
21 K. Y.	54	M	Clear	4.5	—	—	—
22 K. S.	54	M	Clear	7.0	—	—	—
23 N. O.	67	M	Clear***	3.5	—	—	—
36 T. K.	81	F	Clear	3.0	+	4	Clear

* Sarcomatous in part

** Pulmonary metastasis/erythrocytosis

*** Erythrocytosis

中○豊○64歳，男，会社役員（カルテ番号泌200017）
主訴：心窩部痛，背部痛
既往歴：胃潰瘍
家族歴：妻・子供2名健在

現病歴：1962年心窩部痛を訴え胃潰瘍の診断で内科入院，当時より胸部レ線上左肺内部に異常陰影を指摘された。その後胃潰瘍に関しては年1回の胃透視により経過観察中であったが精査目的で1972年外科入院後，内視鏡検査，生検で手術適応となつたが，赤血球増多症と腹部の石灰化陰影を発見され，腎細胞癌を疑われて泌尿器科転科。

血管造影で腫瘍が確認され腎全摘出術施行。1ヵ月後には胃切除術が行なわれた。以後外来にて経過観察中であったが，右下肺野の円形陰影の増大が確認され，肺内の異常陰影も増強したため，1974年転移性肺腫瘍の診断で再入院，腫瘍を含めて右肺下葉部分切除が行なわれた。その後の経過は1975年4月に入り，腫瘍の全身転移により一般状態が悪化し，同年8月死亡した。

検査成績（Table 4）で示すように腎全摘前に赤血球

Table 4 Laboratory findings

(1) Peripheral blood					
	1972 Jan/10	1972 Jan/17	1972 Mar/24	1974 Aug/6	1975 Apr/16
WBC 10^3	4.9				
RBC 10^4	630	547	426	495	297
Hb g/dl	19.6	17.4	13.6	14.9	11.1
Ht %	62.9	54.6	40.7	46.3	32.1
MCV μ^3	9.6				
MCH μug	30.7				
MCHC %	32.6				
Platelet 10^4	13.0				
% WBC					
Stab	5				
Seg	47				
Eosino	3				
Lymph	44				
Baso					
Mono	1				
Reticulo %	4		4	9	

(2) Bone marrow
Dec.25.1971 NNN (slight hyperplasia), Myeloblast 2.8, Promyelo 4.0, Myelo N 5.4, B 0.2, Meta N 5.0, B 0.6, Stab N 9.4, Seg N 10.0, B 1.2, Lymphocyte 17.4, Mono 2.6, Plasma cells 3.0, Pronormoblast 0.2, Normoblast poly 22.2, Megaloblast 0, Mitotic cells 0.6, Megakaryocyte (+), M:E ratio 1.6
Aug.1.1975 M:E 1.63

増多症（Hb 19.6g/dl, Ht 62.9%）が認められ，術後には消失（Hb 13.6g/dl, Ht 40.7%）した。又，肺転移巣の増大に伴つて再び赤血球増多症（Hb 14.9g/dl, Ht 46.3%）が観察された。

担癌 nude mouse に於ける血液像および Erythropo-

ietin 活性値について：

転移巣より得られた癌組織が生着した nude mouse において，皮膚に赤紅色調を呈し，nude mouse に毛が生えていない利点から，1見して赤血球増多症の再現を推定することができた。

Table 5 にその結果を示している。表中 RCC-2P,

Table 5 Erythropoietin activity of transplanted renal cell carcinoma

	Strain	Passage number	No. animals	HT	Reticulocyte	EP activity (I.U)
Exp 1	RCC-2P	5	1	64.5	164%	0.9/gm, tumor
	RCC-2P	5	1	46.0	112	0.25/gm, tumor
	RCC-2N	6	1	24.7	35	Not detectable
Exp 2	RCC-2P	7	3	63.0 $\pm$ 3.5	77.3 $\pm$ 17.6	0.67ml, plasma
	RCC-2N	8	3	44.0 $\pm$ 21.5	84.3 $\pm$ 9.0	0.18ml, plasma
	Control	—	3	48.3 $\pm$ 0.62	51.7 $\pm$ 2.1	Not detectable

RCC-2N と略称してあるものは上述の転移巣より得られた癌組織が生着した担癌 nude mouse の名称であり，赤血球増多症系（P）と非赤血球増多症系（N）を示している。

実験1では累代数5～6代のもの，実験2では7～8代のものを使用している。

実験1に於いて，Ht 値，網状赤血球数は，RCC-2P 系（赤血球増多症系）では上昇を示し，腫瘍組織中にも Ep 活性が証明できた。

実験2では3尾の平均値をみると RCC-2P 系は対照とした nude mouse 群，RCC-2N 系との間に Ht 値に多少の差がみられ，網状赤血球数ではコントロール群との間に差があるが，RCC-2N 系には差をみなかつた。

Ep 活性は三尾のプールされた血液により測定されたものであるが，RCC-2P 系では高値を示しているが，RCC-2N 系でも Ep 活性が証明された。

この結果より，担癌 nude mouse で赤血球増多症が再現されたこと，RCC 株には赤血球増多症を有する系と非赤血球増多症あるいは貧血に傾く系に分離する傾向をもつことが判明した。

また，脾臓は赤芽球の増生がみられ，いわゆる erythroid の所見であつた（Fig. 18）。

さらに担癌 nude mouse に於いて肝腫大と肝類洞の血管様拡張がみられた。

4) Nude mouse 移植癌より行なつた間接培養成績
nude mouse 移植系を経由した組織の細胞培養は10例に行なつた。この中には nude mouse 移植系の累代毎に反復して培養系に移されたものが含まれている（Table 6）。

Table 6 Results of indirect cell culture

	Number of Specimens	Number Cultured Successfully	Average Time in Culture	Average Number of Subcultures
RCC-1 ^{a)} -1 ^{b)}				
RCC-1 -2				
RCC-1 -3				
RCC-2 -2			162 days	
RCC-2 -3	10	9 (90%)		13 (2-85) ^{c)}
RCC-2 -4			55-677 days	
RCC-3 -3				
RCC-3 -4				
RCC-4 -4				
RCC-4 -5				

a) Strain and its original tumor bearing patients.
RCC-1, I.H. RCC-2, T.F. RCC-3, T.N.

b) Passage number in nude mouse.

c) Range.

移植株の初代培養は9例(90%)に成功することができた。これらの培養日数は最長677日, 最短55日で, 平均培養日数は162日である。このうち継代数は平均13回であつた。

これらの細胞は直接培養細胞と同様に3日以内にはガラス面を這うように伸展, 発育を示し, 上皮性細胞の敷石状配列 (pavement) が観察された。形の整つた上皮性細胞の集簇が細胞形態の特徴で, 線維芽細胞の混在を認めないこと, ガラス面への付着能は極めて良好で培養液中に浮遊細胞や凝集塊が少ない点が直接培養細胞との主な相違点であつた。

一方, 類似点としては多角形の細胞で, 細胞質内のグリコーゲン顆粒の出現すること, 退行変性として細胞質内に空胞が目立つようになり, 細胞の膨張, 核の縮小 (N/C 比の減少) などの特徴は同じく持ち合わせている。

初代培養成績は良好であつたが, その後の継代は思わしくなく, 頻回の継代が可能であつたものは1例に過ぎない。すなわち前述の赤血球増多症を合併した症例の肺転移巣より得られた組織の nude mouse 移植株5代ものから著者は細胞株 (established cell line) を樹立した。

1975年9月23日摘出後1時間以内に細胞培養を行ない, 3日以内に上皮性細胞の発育を観察した。以後, 週2回の培養液交換のみ継続していたところ, 1976年3月2日(初代培養より162日目)に増殖がやや早くなり, full sheet になつたので第1回の継代を行なつた。その後もなお発育は緩徐にすすみ, 48日後の4月19日, 第2回の継代ができた。これを機会に発育は急に好転し, 3回, 4回と継代を重ね, 安定した発育を示すようになった。

た。その後は3~5日毎に継代を重ね, 40代以降は週1回の割合で継代可能となつた。

1976年11月細胞株樹立と認め KU-2と命名した。

KU-2株の性状:

a. 形態

継代培養後2代目の細胞は多角形と三角形を呈しており, 細胞質内に多数の顆粒が認められる。核は楕円形ないし円形で N/C 比は大きい。核内には数個の核小体が見られる。

4代目では基本的な形態は変わらないが, 細胞質内の顆粒が増加している。

6代目の特徴として細胞間隙が広がっているが, その後継代数を重ねると細胞形態は一定となり, 顆粒の減少が見られる (Fig. 19, 20)。

電顕所見では, 培養細胞は概ね多角形を呈し細胞間接合は普通 tight で interdigitation による結合も見られるが desmosome は認められない。ところにより著しい微絨毛 (microvilli) が放射状にガラス表面に向つて発育しているのがみられる。この microvilli の発育には方位性 (polarity) があるようにも見えるが屈曲しているものも多く, 幅は0.1 μ , 長さは3~5 μ におよぶ。細胞内にはやや大型の核を有し細胞質内に小胞体の発育が良好, 糸粒体 (m) は細く萎縮したものが多く。不規則な形の空胞 (v) も散在しており, グリコーゲン顆粒 (Gg) も認められる。microvilli の発達に乏しいものもある。しかし, 継代を重ねた培養細胞では microvilli は消失してきている (Fig. 21, 22)。

b. 増殖曲線とコロニー形成率

1日の増殖遅延期 (lag phase) から, 対数増殖期 (logarithmic growth phase), そしてプラトーに達し定常期 (stationary phase) となり, やがて対数死滅期 (logarithmic death phase) に至る経過を示した。対数増殖期に, 2倍となるに要する時間をグラフより測定すると, 細胞グループの増加時間 (population doubling time) 26~29時間が得られた (Fig. 23)。

1×10^3 個の細胞数におけるコロニー形成率は, 5×10^2 個で, 44%, 2×10^2 個では42%であつた。

この結果からクローン分離, 特にコロニー性クローン (clonal clone) の可能性が大きいことが期待できる。

c. 染色体分析 (Fig. 24)

Hypertriploid に mode を有し, 核型分析では各グループの不規則な増減と, 正常とは形態を異にする変異染色体が散在し, 多数の標識染色体 marker chromosome

Fig. 23-1

Fig. 23-2

の出現をみた。

d. もどし移植

5回にわたり、もどし移植が施行された。7日以内に papula の消失をみたもの、縮小はみられたが30日まで papula を残し、間もなく消失したものまで、増殖経過はさまざまになつたが、移植後、2カ月を経て、3尾中1尾に約1cm 角大の腫瘍の形成をみた。

組織学的に原腫瘍、nude mouse 移植腫瘍の可移植系一 (PCC-2P) と類似の腺癌で主として透明細胞癌であつた (Fig. 25)。

電顕学的には大型の細胞で核が大きく、核小体 (nu) も明瞭で細胞質には糸粒体 (m) 粗面小胞体 (rer) な

Fig. 24 KU-2 株の染色体分析の結果を示す。
Hypertriploid に mode をもつ。

どが豊富にみられ、グリコーゲン顆粒 (Gg), Golgi 器管 (g) も認められる。特徴的な brush border 様の構造 (BB) が細胞内に認められる。この構造は原腫瘍、nude mouse 可移植系 (RCC-2P) に再現されたものと方位性を欠く以外には基本的に同一構造を示した (Fig. 26)。

考 按

1) ヒト腎細胞癌の研究の歴史

ヒトの悪性腫瘍を体外で培養しようとする試みは1911年 Carrel³⁹⁾ の線維軟骨肉腫の培養に始まつた。その後細胞培養法は急速に発達して今日のように隆盛を極めることになつたが、その原動力となつたのは培養技術の進歩、血清、培養液組成の改良に負うところが大きく、結果として数多くの細胞株が樹立された。

これらの培養細胞を使ってその形態、増殖態度、生化学的、免疫学的な検討が可能であり、また逆に発癌機序に対する追求や治療面にまでおよぶ幅広い研究分野が開拓されているが、常に議論的となるのは、培養し、実験に供している細胞が果してヒト悪性腫瘍の特徴を維持し続けているか否か、いるとすれば何によつてそれを証明しうるかということである。

さて、腎細胞癌の組織培養の試みはいままでも非常に少ない。1957年 Richter & Akin³⁹⁾ が5日間の初代培養を報告している。その後1961年には Bregman⁴⁰⁾ らが5カ月の培養日数を経て1つの細胞株 cell line を維持できたことを報告している。1967年 Jones⁴¹⁾ らにより11カ月の培養期間中17回の継代に成功し安定した細

Fig. 1 摘出腎細胞癌組織の電顕像；

核は球状に近く核質に富み，胞体内に多数の糸粒体（m）とグリコーゲン顆粒（Gg）が認められる．特徴的な所見は細胞膜の構造にある．きわめて複雑な interdigitation（矢印）を示すうちに近位尿管の刷子縁（brush border）に類似の構造（BB）が認められる．（ $\times 5000$ ）

Fig. 2 初代培養細胞の倒立顕微鏡像；

24—36時間後にすでに細胞は散在してガラス面に付着している．（ $\times 4$ ）

Fig. 3 初代培養細胞の倒立顕微鏡像；

次第にガラス面を這うように伸展，膨化してくる（7日目）．（ $\times 10$ ）

Fig. 4 初代培養細胞の倒立顕微鏡像；

線維芽細胞と上皮性細胞が混在して増殖している（7日目）．（ $\times 10$ ）

Fig. 5 初代培養細胞の倒立顕微鏡像；

上皮性の均一の細胞集団（homogenous population）がガラス面全体に広がっている（14日目）．（ $\times 10$ ）

Fig. 6 継代培養細胞の倒立顕微鏡像；

細胞質は巨大扁平化し，核は萎縮し，増殖は衰えてきている．（ $\times 10$ ）

Fig. 7 移植された nude mouse の全体像；
皮下に移植腫瘍の発育，増殖を示す。

Fig. 8 case 14移植腫瘍の組織像；
nude mouse の皮下に周囲と明らかに境界を別にした腫瘍塊がみられ，腫瘍内には毛細血管の新生がみられる．（H-E 染色×4）

Fig. 9 case 14の起源腫瘍の組織像；
透明細胞型の線癌である．Fig. 8 と対比してみると，相互に酷似した組織像である．（染色 H-E×10）

Fig. 10 case 13における起源腫瘍の組織像；
（H-E 染色×25）

Fig. 11 case 13の可移植系5代の移植腫瘍の組織像；（染色 H-E×25）

Fig. 12 case 13の可移植系15代の移植腫瘍の組織像；

Fig. 10, Fig. 11, Fig. 12 の間に基本的構造に変化を認めない．（H-E 染色×25）

Fig. 13 case 19における起源腫瘍の組織像；
(H-E 染色×25)

Fig. 14 case 19の可移植系5代の移植腫瘍の組織像；
5代のは起源腫瘍に比べて顆粒細胞型が強くなっているように思えるが基本的構造に差はない。
(H-E 染色×40)

Fig. 15 case 19の可移植系15代の移植腫瘍の組織像；
起源腫瘍の組織像に酷似している。

Fig. 16 case 19における移植腫瘍の電顕像；
2種類の異なった細胞がみられる。一つは明るい細胞で胞体内には大小の空胞と小器官が散在している。他は比較的 density の高い物質を含む細胞である。これらの細胞間にbrush border様構造がある(*)
(×3600)

Fig. 17 case 19における移植腫瘍の電顕像；
dense な物質を容れた棚状構造物が一定の方向性をもって密に並んで認められる。この構造は放射状或いは求心状に配列している(*)。(×4200)

Fig. 18 赤血球増多症を呈した担癌 nude mouse における脾臓の組織像；
赤芽球の著明な増生がみられる．（H-E 染色×10）

Fig. 19 KU-2 株 6 代目の培養細胞の位相差顕微鏡像；
多角形と三角形（コンマ状）を呈した細胞であり、細胞質内に多数の顆粒を含み、核は楕円形ないしは円形で N/C は大きい．（×10）

Fig. 20 KU-2 株 37 代目の培養細胞の位相差顕微鏡像；
形態状の変化はないが、細胞質内の顆粒の減少がみられる．（×10）

Fig. 21-(1) KU-2 株 2 代目の培養細胞の電顕像；
細胞は概ね多角形を呈し、細胞間接合は普通 tight である．所により著しい microvilli が噴射状にガラス面に向って発育している．（×3600）

Fig. 22-(2) KU-2 株 30 代目の培養細胞の電顕像；
継代を重ねた培養細胞では microvilli は消失してきている．（×3600）

Fig. 25 KU-2 株のもどし移植腫瘍の組織像；可移植系 (RCC-2P) と類似の線癌で、主として透明細胞型である。(H-E 染色×4)

Fig. 26 KU-2 株のもどし移植腫瘍の電顕像；大型の細胞で核 (n) が大きく、核小体 (nu) も明瞭で、細胞質には糸粒体 (m) 小胞体 (rer) などが豊富にみられる。グリコーゲン顆粒 (Gg), Golgi 器官 (g) も認められる。特徴的な brush border 様構造 (BB) が細胞内にみられる。(×7800)

胞株の樹立をみている。1970年 Shore⁴²⁾ らは13例から平均して28週間の初代単層培養に成功している。また1974年 Daly⁴³⁾ らは3つの細胞株、1つ目は皮膚転移巣より、2つ目は原発巣から、3つ目は転移リンパ節より得られた材料から樹立したというのがその後の報告は見当らない。

最新の報告では、1976年 Williams⁴⁴⁾ らによる2つの established cell line がある。6カ月以上培養され、その間27回と18回の継代を行っており、現在も安定した増殖をつづけているという。この中で、培養のコツは、① 培養のための組織は出来るだけ速やかに、望ましいのは1時間以内のものであること、② 細切しただけでは不十分であり、トリプシン処理は必要である。③ 初代培養の際には、培養瓶の表面を被うのに充分な量だけの培養液にとどめるべきであり、過剰の培地は細胞が浮遊し、ガラス面への付着を遅らせたり、障害を起こす原因となる。④ 赤血球および tissue debris は最少限にすることを挙げている。

以上の点は、著者も初代培養の際には充分留意したことであるが、Williams も述べているように、このことが、初代培養の成功の機会を増す経験的な要点であつても、確実な保証とはならない。

本邦に於ては腎細胞癌の疑いの組織より得た細胞株名 Saito⁴⁵⁾ として単層培養の報告をみるがその詳細については未発表であり、細胞の性状は明らかでない。その他には小松原⁴⁶⁾、田谷ら⁴⁷⁾の報告を散見するにすぎない。

ヒト癌の組織培養の成功は、極めて有利かつ魅力的であるが、その際留意しておかねばならない点は、正確な用語の適用と後述する細胞同定の根拠についてである。

用語上の混乱から、1961年、1964年、1966年の3回にわたり用語委員会が催され、“Proposed Usage of Animal Tissue Culture Terms” としてまとめられた⁴⁸⁾。この中では cell line とは細胞の subculture (一つの培養瓶より他の培養瓶に移すこと) より始まり、初代培養細胞が連続性をもっていることである。そして、この cell line が “establish” されたものとして認められるためには in vitro で確実に subculture される能力を持っていることが示された場合であると定義されている。

従来より細胞同定法には、① 光顕レベルでの細胞形態学的観察、② 組織化学的観察、③ 電顕的観察、④ 染色体分析、⑤ 動物への異種移植性と組織構築の再現性などが行なわれているが、それでもなお困難な例が多い。

光顕レベルにおいては上皮性細胞と非上皮性細胞の鑑別は比較的容易であるが、腫瘍細胞か否かの判定はある特性が見い出された場合を除いては不可能に近い。また生体より取り出された組織には必ず結合織、血管などが混在しており、真に起源に由来する腫瘍細胞だけが培養されているとは限らない。しかし潜在的に機能を持つ可能性のある腫瘍を多数例培養しているとその腫瘍の特性が培養系に維持されることがありうる。

著者の観察した培養細胞は、培養日数を経て細胞内にグリコーゲン顆粒と思わせる多数の顆粒が出現した。さらに Daly⁴³⁾ らの培養株にみられるような丸く膨化した多角形の輪廓で、時に細胞質内の空胞化と、大きく不正なそして豊富な核をもつ細胞と類似しており、配列の不規則性と個々の細胞の無制限の膨張が増殖の衰退に結びつくことが考えられた。

組織化学的には腺癌細胞やメラニン細胞のように粘液や色素を産生するものではその特性を利用できるが、腎細胞癌では脂肪、糖原を多量に含有することから特殊染色で識別が可能であり、また酵素組織学的にも証明が可能と思われる。

さらに後述する電顕的観察による超微形態、染色体分析、nude mouse への異種移植により細胞同定は確定的なものになる。また赤血球増多症を呈するものでは、移植動物における赤血球増多症の証明、培養細胞あるいは培養液中で Ep 産生物質の証明ができれば細胞同定は勿論のこと、Ep 産生機序の解明にも役に立つであろう。

著者は本実験において、Ep 産生機序については十分な検討はできなかつたが、上記の一連の項目を検討し、細胞同定の根拠を確実なものにすることができた。

以上より、著者の樹立した細胞株 KU-2 (established cell line, KU-2) は、terminology と細胞同定の上からそれらの条件を十分に完備している。

2) 超微形態よりヒト腎細胞癌の母細胞に関して

腎細胞癌の微細構造の中で、最も重要な点は古くから使われている hypernephroma (副腎腫) という名称が、その組織像の類似性から副腎組織の迷入によつて発生するという考え方に反論する根拠についてである

Lucke⁴⁹⁾ (1957), Allen⁵⁰⁾ (1962) らにより、透明細胞は近位尿細管上皮に由来するであろうことが推定され、1965~6年^{27)~29)} Selijelid, Ericsson は電顕的に正常腎における近位尿細管と癌細胞の類似性として、① microvilli and brushborder like elements ② membrane associated vesicles apparently involved in pinocytosis

③ membrane coating ④ infolding of the plasma membrane ⑤ intercellular junctions を上げ、その中で特徴的なものは microvilli と brush border であることにより近位尿細管起源を結論付けている。

さらに腎細胞癌細胞は accumulation of glycogen, cytoplasmic vacuoles, numerous pleomorphic で性格づけられ、癌細胞の物質代謝により mitochondria の構造の変化を来すことが指摘された。

著者は原発巣組織、nude mouse への移植組織、直接・間接培養細胞、もどし移植腫瘍について電顕的観察を行ない、いずれかの材料においても異常な mitochondria と胞体内のグリコーゲン、microvilli と brush border がみられ、近位尿細管起源も証明した。しかし、著者がこの実験モデルを通じて観察できたのはいずれも、透明細胞型であり、顆粒細胞型については後腎組織遺存の未分化細胞由来ともいわれ、腎細胞癌の母細胞について、今後の検討を必要とする。

3) ヒト腎細胞癌の発生と染色体について

悪性腫瘍細胞が異常な染色体構造を示すことは明らかにされている。しかも宿主の体細胞にはこのような所見が観察されないところから、直接発癌につながる基本的な変化は体細胞の突然変異であつて、これは生物学的に宿主のものと異なる生物単位が宿主の体内に発生し増殖を続けるものと理解される。

ところが悪性腫瘍の中には染色体レベルでその異常と識別し得ないような場合もあり、これらの細胞としても、累代移植すると核型に変化をきたし、染色の数に変化を起こしたり、あるいは標識染色体 (marker chromosome) の出現をみたりする場合があります。染色体の異数化と細胞の悪性化との間に密接な関係が考えられている。

著者は染色体分析を移植癌を間接培養に移した際の初代培養細胞、継代培養細胞に応用した。細胞同定の目的で利用されたので腫瘍の性状と染色体の関連性については論述は避けるが、3つの系の染色体分析結果は、102 (hypertetraploid)—No. 13, 61 (hypotriploid)—No. 18, 72 (hypertriploid)—No. 19にそれぞれモード (mode) を示した。No. 13と No. 19には標識染色体の出現をみた。

4) ヒト腎細胞癌とホルモンについて

動物の腎癌 (ヒト腎細胞癌と区別して表現する) の自然発癌の報告^{51) 52)} は多数みられる: ラット, 雌牛, 豚, ラビット, 猿, 犬, 馬, 羊, 鳥, 魚, マウス, かえるなどに観察されている。

1940年 Lucke⁵³⁾ はかえるに自然発生した移植可能な腎癌の発生を報告している。そしてこれらの腫瘍が組織学的、組織化学的にもヒト腎細胞癌と類似していることが確認された。

実験的発癌の歴史も古く、1963年 Bloom⁵⁴⁾ が雄の syrian golden hamster に diethylstilbestrol を与え、ヒトに酷似の腎癌を作り出し、ホルモン依存性腫瘍の性格から拮抗するホルモン療法の臨床的応用⁵⁵⁾の糸口となった。その他にも化学的物質、物理的作用、virus による実験発癌が^{56)~58)}研究されている。

1973年には Soloway⁵⁹⁾ が Claude⁵²⁾ の自然発癌動物についてホルモン療法の影響を検討し、自然発癌の方が実験発癌に較べてヒト腎細胞癌に類似の反応を示すことを報告している。

また Kirman⁶⁰⁾ は、estrogen 投与による腎癌でホルモン依存から脱却した自律性発育を示すものと、自然発癌との比較検討を行なつたが、receptor, stroma-epithelium relationship, viral genomes immunogenicity, antigenic difference などの役割の差についてまだ明解な答えは得られていない。

しかし、これらの実験腫瘍は、ヒト癌とは発癌機序、特に遺伝的、免疫学的背景に相当の差があると考えなければならない。

そこで、ヒト癌細胞をそのままの性格で動物に維持できればこれに勝る実験手段はない。従来、各種の動物に免疫学的処置を行ない、免疫学的寛容状態を作り出してきたが、nude mouse の出現により極めて容易に異種移植が可能となつた。

本実験では nude mouse 移植を最大限応用して腎細胞癌の病態生理の理解の助けとした。

5) 癌研究における Nude mouse の応用

nude mouse の発見と歴史、一般的性質については、江崎⁶¹⁾、大沢⁶²⁾らの総括的な紹介がある。

nude mouse は Scotland の virus laboratory, Ruchill Hospital の N.R. Grist によつて非近交系の albino mouse の colony の中に発見された毛のない新しい突然変異のマウスで1962年 Issacson⁶³⁾ らによつて最初に報告された。その後 Flanagan⁶⁴⁾ は詳細な実験を行い、この毛のない形質が第Ⅲリンケージグループ(第Ⅱ染色体)に属する1個の劣性遺伝によつて支配されていることを確認し、nude (nu) 遺伝子と命名した。

この時点では nude mouse は単に毛がなく飼育がきわめて困難なマウスとして一部の遺伝研究者の興味をひい

たにすぎなかつた。ところが1968年に Pantelouris⁶⁵⁾ がわずか1頁足らずの論文“Absence of thymus in a mouse mutant”を発表してから、にわかに注目を集めるようになった。そして De Sousa⁶⁶⁾ が nude mouse のリンパ節は胸腺由来のリンパ球(T細胞)を欠除していることを報告し、免疫学の分野でこのマウスが重要視されるようになった。ところがこの動物の繁殖力が低く、生存中も弱いことから研究に使用するためには、質量ともに不満足なものであつた。

しかし、1969年に Rygaard & Friss⁶⁹⁾ が nude mouse を SPF 環境で飼育すると、雌・雄ともに生殖能力はほぼ完全で、生存日数も長くなることを見出し、このマウスの量産方法を確立して以来、多くの研究者が nude mouse を使用できるようになった。そして nu 遺伝子を種々の近交系マウスに導入する試みがなされ遺伝的背景の明確な動物が作り出された。

ヒト癌の nude mouse への移植は Rygaard & Povsen⁶⁸⁾⁶⁹⁾ により試みられ、各種の悪性腫瘍の移植に成功し、長期の果代が行なわれている。移植方法は培養ヒト癌細胞、組織片いづれでも可能である。

過去の報告から nude mouse に移植されたヒトの悪性腫瘍の性質は、① 移植された腫瘍がその組織学的構造、あるいは種々の機能の上でも起源腫瘍の性質を維持しつづけること② ヒト癌の組織培養された組織をnude mouse 移植すると培養中失なわれた生物学的活性が再び出現してくること、③ nude mouse に移植された腫瘍は移植部位に局限して転移はほとんどみられないことである。

ヒト腎細胞癌組織の Nude mouse 移植:

著者は1975年7月11日に第1例目の植込みを行なつて以来、合計12例の移植を行なつた。その結果、6例の移植に成功し、うち2例が消失、現在4例の株が維持されている。最長果代数は16代になっている。

ヒト腎細胞癌の nude mouse 移植成功例は、1976年著者らが世界に先がけて発表した⁷⁰⁾。

理論的に nude mouse への異種移植は可能であるが、実際には比較的容易な腫瘍と、そうでないものがある。前述の如く著者が行なつた移植では、12例のうち半数6例が生着したが、その中で5例は臨床的に進行癌であつた。このことは腫瘍の増殖態度との関連を推定させる。

それには、細胞単位の世界交代 (generation time) と可移植性動物における進行速度の関連が明らかにならねばならない。

腫瘍学にとつて理想的とも思える nude mouse でさえもヒトとは異なつた体液性、細胞性 immune factor または、内分泌的影響をうけていることは確かであるが、起源腫瘍と移植腫瘍の近似性は累代しても変化のないことが本実験で立証された。

昨今, nude mouse の免疫学的背景が判明するにつれ^{71) 72)} T 細胞, B 細胞の機能, 自己認識, 免疫学的監視機構 (immunosurveillance), その他数多くの研究分野が開かれようとしている。発癌, 増殖機転の基礎研究面のみならず, 臨床面でも免疫療法, 化学療法への応用が期待できる。

6) ヒト腎細胞癌の全身効果, とくに肝障害と Ep 産生について

腎細胞癌症例の随伴所見の1つに肝機能障害が報告^{22) ~ 24)}されている。この場合の肝機能異常は, alkaline phosphatase の上昇, globulin の上昇, BSP の停滞, プロトロビン時間の延長が特徴的であるとされ, その場合の肝障害は可逆性で, 腎摘すると正常化するとされている。さらには不定の肝腫大の報告²⁴⁾もある。

著者は担癌 nude mouse において著るしい肝腫大と肝類洞の血管様拡張をきたすが髓外造血によるものであつて, 循環血量の増大を伴つていること, また肝機能は不定の軽度の障害を示し, 肝実質にはグリコーゲン減少以外には変化はみられないことを観察した。

さらに, 特徴的な随伴所見に赤血球増多症の合併があるが, その頻度は報告者により異なり, 1.3%から4.4%までの幅がある。

近年, 腫瘍に伴う赤血球増多症では血清あるいは尿中における Ep 活性の上昇, さらに腫瘍組織からの Ep 活性の証明により Ep 産生腫瘍として脚光を浴びている^{73) ~ 76)}。

高久⁷⁶⁾によれば Ep 産生腫瘍の診断根拠には, ① 腫瘍患者に赤血球増多症の合併, ② 腫瘍摘出による赤血球増多症の軽快, ③ 血漿中尿中 Ep 活性の上昇, ④ 腫瘍組織抽出液, 囊腫液中における Ep 活性の上昇, ⑤ 抽出液, 囊腫液における活性物質が Ep であることの同定, ⑥ 腫瘍細胞が Ep を産生していることの直接証明, の6項目を挙げている。

また, 外山⁷⁸⁾は臨床的診断法として, i) 赤血球増多症が腫瘍とともにあり, ii) 腫瘍摘出により赤血球増多症が消失し(但し, 出血の影響を除く), iii) 血漿 Ep あるいは1日の尿中 Ep 排泄が増加しており, 腫瘍摘出後減少する, iv) 腫瘍組織抽出物あるいは囊腫液中に Ep あるいは Ep 産生に関係する物質の増加, v) 他に

赤血球増多症の原因(動脈血 O_2 飽和度の低下)がない—以上5項目のうちで, i), ii), iii), v), あるいは, iv), v) を満足すれば, Ep 産生腫瘍としている。

しかし, Ep 産生の機序の解釈となると, 現在でも一定の見解は存在しない。1つには腎より Renal erythropoietin factor (REF) が出て血清基質を活性型 Ep とする説, 他には Ep 自身が腎より分泌される説などがある。

腎組織は古くから Ep 産生に密接に関係のある組織として知られており^{12) ~ 15)}, その腎組織に発生する腫瘍より赤血球増多症が惹起されることが想像されている。事実, Hewlett⁷⁹⁾(1960)以来, 腎の腫瘍抽出液中に活性が検出された例が報告⁷⁹⁾されている。一方 Peschle⁸⁰⁾らは赤血球増多症を伴う腎細胞癌症例で腫瘍抽出液中には Ep 活性の上昇は極めて少なく, むしろ, 腫瘍の light mitochondrial fraction 抽出液と EDTA 透析正常人血清と孵置した後の方が, 著明な Ep 活性を示すことから, 腎細胞癌に伴う赤血球増多症は Ep よりも REF の分泌上昇により起ることを発表した。

外山⁷⁹⁾は, 赤血球増多症を伴う腎細胞癌症例の術前血漿と摘出組織抽出液に Ep 活性の上昇を認め, 組織中の Ep 活性は非透析性で, むしろ heat stable であるという成績を発表している。この結果は Erslev⁸¹⁾らの血清成分がなくとも腎より Ep そのものが生成されることを証明した事実と付合して, 腎が Ep または, REF の両者を分泌する可能性を示唆している。さらに彼は赤血球増多症を伴う腎細胞癌では組織中に Ep inhibitor は消失しており, これが Ep 分泌上昇の一因と考えているが, 因果関係を証明できないものもあり, inhibitor の消失が赤血球増多症の本質でないことを示している。

著者の自験例は, 上昇していた血漿 Ep 値, 全血球量が, 腎摘出後消失し, 2年5ヵ月を経て, 肺転移が明らかになるにつれて血漿 Ep 値が上昇した。摘出した肺転移巣は組織学的に原発巣と同一であり, 組織抽出液からも有意の Ep 活性上昇を認め, Ep inhibitor が認められなかつたことが, 外山らにより証明されている。

著者は赤血球増多症を伴うヒト腎細胞癌組織の nude mouse 移植によつて赤血球増多症を再現できることをはじめて実証した。

玉置, 田島らの私信⁸²⁾によれば, 著者と同一起源の移植癌由来の細胞株をもどし移植したところ, 再び赤血球増多症が証明できたと言う。このことは著者の樹立した細胞株でも, 同一の結果がでることが期待できることを

裏付けている。また、同時にヒトとは異なつた環境下 (hetero-genous) において赤血球増多症のみられたことから腫瘍組織中、あるいはその細胞には、あるいは Ep 産生に関係する物質の存在を示すものである。

結 語

ヒト腎細胞癌の摘出組織の直接培養、摘出組織の nude mouse 移植、nude mouse で発育増殖した腫瘍組織の間接培養、培養系に移された細胞株の nude mouse もどし移植の一連の実験系により、形態学的・機能的研究を行ない、下記のような結果を得た。

1. 直接培養は36例に施行され、初代培養の成功は11例で、うち継代可能なものは2例であつた。これらの培養日数は最長198日、最短32日であつた。

2. 摘出組織の nude mouse 移植は12例に行なわれ、6例に移植可能であつた。全例に累代移植され、現在、16代、15代、5代が各1例、4代が3例あるが、うち2例は消失している。これらの中で、赤血球増多症を合併した症例より得られた肺転移巣組織の nude mouse への初代移植において赤血球増多症の発現をみた。腫瘍組織中にも Ep 活性が証明できた。

3. 担癌 nude mouse における移植腫瘍組織について病理組織学および超微形態の検討が行なわれ起源腫瘍と基本的に同一構造を示していることが証明された。さらに累代を重ねても移植組織に基本構造に変化がないことが確かめられた。

4. nude mouse 移植を経由しての間接細胞培養を行ない、良好な成績を得た。

その中から1例は6カ月を経て急速に発育が活発となり、その後、順調に継代され、1976年11月、細胞株樹立と認め、KU-2と命名した。以来順調に継代され、現在100代を超えている。

5. この細胞株は再び nude mouse へ移植され、生長をみ、組織学的・電顕的に原腫瘍および nude mouse 可移植系 (RCC-2P) と基本的に同様の構造を示した。

6. 培養細胞の同定は光顕、電顕、染色体分析、異種移植により、ヒト腎細胞癌由来であることが立証された。

7. 特に、電顕像では移植腫瘍において、brush border 様構造がみられ、培養細胞でも著しい microvilli が放射状に発育しているのが観察され、腎細胞癌の母細胞は近位尿管と推定する根拠が認められ、異種移植系とその間の培養系を通じてこの特徴が伝承されることが示された。

8. 担癌 nude mouse において赤血球増多症の再現をみたこと、加えて腫瘍組織中に Ep 活性が認められたことより、腫瘍自身に Ep 産生能が存在することが予見された。また、肝腫大が観察されたことと合わせて腎細胞癌には、機能的腫瘍の性格を持ち合わせていることが認められ、この事実は、臨床像の多様さを反映するものと考えられた。

本論文の要旨は、第63回日本泌尿器科学会総会、第17、19回日本腎臓学会、および 70th Annual Meeting of American Urological Association (AUA) において発表した。

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師田崎寛教授に衷心より感謝の意を表わします。また nude mouse を譲与下された実験動物中央研究所野村達次所長、上山義人先生、病理組織標本で御教示載いた東海大学玉置憲一教授、血液学的検討並びに Ep 測定を願った本学外山圭助講師、種々御協力載いた晶亮講師、吉田淑子嬢、臨床材料を御提供下さった本学関連病院の諸先生方に深謝致します。

最後に、本研究の完遂にあたり、御協力載いた東海大学大越正秋教授に深謝致します。

なお、本研究の一部は厚生省班研究費および文部省科学研究費昭和50年度課題番号 0774081、昭和52年度課題番号248294によって行なわれた。

文 献

- 1) Everson, T.C. and Cole, W.E.: Spontaneous regression of cancer, p. 11—87, W.B. Saunders, Co., Philadelphia, 1966.
- 2) Goodwin, W.D.: J.A.M.A., **204**, 609, 1968.
- 3) Jenkins, G.D.: J. Urol., **94**, 99, 1965.
- 4) Hagan, K., Trapp, J.D., Rhamy, R.K. and Reynolds, V.H.: Southern Med. J., **67**, 1175, 1974.
- 5) Starr, A. and Miller, G.M.: New Engl. J. Med., **246**, 250, 1952.
- 6) Walter, C.W. and Gillespie, D.R.: Minnesota Med., **43**, 123, 1960.
- 7) Kradjian, R.M. and Bennington, J.L.: Arch. Surg., **90**, 192, 1965.
- 8) Riches, E.W.: Tumours of the Kidney and Ureter. London, Livingstone, p. 311—338, 1964.
- 9) Wage, D.G. and Murphy, G.P.: Cancer, **28**, 318, 1971.
- 10) Peterson, L.J., Grimes, J.H., Dees, J.E. and Anderson, E.E.: Urology, **4**, 669, 1974.
- 11) 里見佳昭: 日泌尿会誌, **64**, 195, 1973.
- 12) Conlly, C.C., Kowal, J. and Antonio, J.: Bull. Hopkins, Hosp., **101**, 63, 1957.
- 13) Damon, A., Holub, D.A., Melicow, M.M. and

- Uson, A.C.: *J. Med.*, **25**, 182, 1958.
- 14) Brandt, P.W.T., Dacie, J.V., Steiner, R.E. and Sznur, L.: *Brit. Med. J.*, **ii**, 468, 1963.
 - 15) Thorling, E.B.: *Areview. Scand J. Haemat. Suppl.*, **17**, 1, 1972.
 - 16) Thomson, W.H. and Karat, A.B.: *Brit. Med. J.*, **2**, 745, 1966.
 - 17) Warren, M.M., Kelalis, P.P. and Utz, D.C.: *J. Urol.*, **104**, 376, 1970.
 - 18) Brereton, H.D., Halushka, P.V., Alexander, R.W. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **291**, 83, 1974.
 - 19) Seyberth, H.W., Segre, G.V., Morgan, J.L. et al.: *N. Engl. J. Med.*, **18**, 1278, 1975.
 - 20) Bennington, J.L. and Kradjian, R.M.: *Renal carcinoma*, p. 184-186, Saunders. Co., Philadelphia, 1967.
 - 21) Cranston, W., Luff, R.H., Owen, D. and Rawlins, M.D.: *Clin. Sci. Mol. Med.*, **45**, 459, 1973.
 - 22) Mohamed, S.D.: *Lancet*, **2**, 621, 1965.
 - 23) Lemmon, W.T. Jr., Holland, P.V. and Holland, J.M.: *Amer. J. Surg.*, **110**, 487, 1965.
 - 24) Utz, D.C., Warren, M.M., Gregg, J.A., Ludwig, J.A. and Kelalis, P.P.: *Mayo clinic proceedings*, **45**, 161, 1970.
 - 25) Abrams, H.L., Boiisen, E. and Borgström, K-E.: *Radiology*, **79**, 1962.
 - 26) Oberling, C., Riviere, M. and Haguenu, F.: *Nature*, **186**, 402, 1960.
 - 27) Seljelid, R. and Ericsson, J.L.E.: *Lab. Invest.*, **14**, 435, 1965.
 - 28) Seljelid, R. and Ericsson, J.L.E.: *J. Microscopic*, **4**, 759, 1965.
 - 29) Ericsson, J.L.E., Seljelid, R. and Orrenius, S.: *Virchows. Arch. (Pathol Anat)* **341**, 204, 1966.
 - 30) Hruban, Z., Mochizuki, Y., Morris, H.P. and Slesers.: *J. Nat. Can. Inst.*, **50**, 1487, 1973.
 - 31) Böttiger, L.E., Blanck, C. and Schreeb, T.: *Acta. Med. Scand.*, **180**, 329, 1966.
 - 32) Murphy, G.P. and Mostofi, F.K.: *J. Urol.*, **94**, 48, 1965.
 - 33) Skinner, D.G., Colvin, R.B., Vermillion, C.D., Pfister, R.C. and Leadbetter, W.F.: *Cancer*, **28**, 1165, 1971.
 - 34) Bennington, J.L.: *Cancer*, **32**, 1017, 1973.
 - 35) Böttiger, L.E. and Ivermark.: *J. Urol.*, **81**, 512, 1959.
 - 36) Flocks, R.H. and Kadesky, M.C.: *J. Urol.*, **79**, 196, 1958.
 - 37) 外山圭助: *慶応医学*, **54**, 15, 1977.
 - 38) 大星章一, 菅野晴夫編集: “*人癌細胞の培養*” p 8, 1975.
 - 39) Richter, K.M. and Akin, R.H.: *South central sect. Amer. Urol. Ass.*, p. 67, October, 1956.
 - 40) Bregman, R.V. and Bregman, E.T.: *J. Urol.*, **86**, 642, 1961.
 - 41) Jones, G.W.: *Cancer*, **20**, 1893, 1967.
 - 42) Shore, B., Wise, G.J., McBride, R.A. and Brendler, H.: *J. Urol.*, **103**, 554, 1970.
 - 43) Daly, J.J., Prout, G.R., Ahl, C.A. and Lin, J.C.: *J. Urol.*, **111**, 448, 1974.
 - 44) Williams, R.D., Elliott, A.Y., Stein, N. and Fraley, E.E.: *In vitro.*, **12**, 623, 1976.
 - 45) 大星章一, 日沼頼夫, 日野茂男, 三井宏美, 宮本包厚: *医学のあゆみ*, **90**, 150, 1974.
 - 46) 小松原秀一, 坂田安之輔, 浜路政博: *日泌尿会誌*, **66**, 180, 1975.
 - 47) 田谷 正, 小林徹治, 塚原健治, 打林忠雄, 内藤克輔, 久住治男, 黒田恭一: *日泌尿会誌*, **68**, 1003, 1977.
 - 48) Federof, S.: *J. Nat. can. Inst.*, **38**, 607, 1967.
 - 49) Lucké, B. and Schiumberger, H.G.: *Washington, D.C., Armed forces institute of pathology*, 1957.
 - 50) Allen, A.: *In the kidney, Medical and surgical disease*, Ed. 2, New York, Grune and stratton, Inc., 1962.
 - 51) Guerin, M., Chouroulinkow, i. and Riviere, M.R.: *New York, Academic press*, P. 199-268, 1969.
 - 52) Claude, A.: *J. Ultrastr. Res.*, **6**, 1, 1962.
 - 53) Lucké, B. and Schlumberger, H.: *J. Exp. Med.*, **72**, 311, 1940.
 - 54) Bloom, H.J.G., Dukes, C.E. and Mitchley, B.C.: *Brit. J. Cancer*, **17**, 611, 1963.
 - 55) Bloom, H.J.G.: *Brit. J. Cancer*, **25**, 250, 1971.
 - 56) Hard, G.C. and Butler, W.H.: *Cancer Res.*, **30**, 2796, 1970.
 - 57) Hard, G.C. and Butler, W.H.: *ibid*, **30**, 2806, 1970.
 - 58) Morris, H.P. and Meranze, D.R.: *Cancer Res.*, **30**, 1362, 1970.
 - 59) Soloway, M.S. and Myers, G.H. Jr.: *J. Urol.*, **190**, 356, 1973.
 - 60) Kirman, H. and Banon, R.L.: *Cancer Res.*, **34**, 2728, 1974.
 - 61) 江崎孝三郎: *癌と化学療法*, **2**, 343, 1975.
 - 62) 大沢仲昭: *代謝*, **2**, 763, 1974.
 - 63) Issacson, J.H. and Cattnach, B.M.: *Report, Mouse news letter*, **27**, 31, 1962.
 - 64) Flanagan, S.P.: *Genet Res. (Comb.)*, **8**, 295, 1966.
 - 65) Pantelouris, E.M.: *Nature.*, **217**, 370, 1968.
 - 66) De Sousa, M.A.B., Parrott, D.M.V. and Pantelouris, E.M.: *Clin. Exp. Immunol.*, **4**, 637, 1969.
 - 67) Rygaard, J. and Friis, C.W.: *Z. Versuchstierk*, **9**, 10, 1973.
 - 68) Rygaard, J. and Povlsen, C.O.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **77**, 758, 1969.
 - 69) Rygaard, J. and Povlsen, C.O.: *Gustav Fischer Verlag. Stuttgart*, 1974.

- 70) Katsuoka, Y., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: *J. Urol.*, **115**, 373, 1976.
- 71) Raff, M.C. and Wortis, H.H.: *Immunol.*, **18**, 931, 1972.
- 72) Raff, M.C.: *Transpl. Rev.*, **6**, 52, 1972.
- 73) Murphy, G.P., Kenny, G.M. and Mirand, E.A.: *Cancer*, **26**, 191, 1970.
- 74) Sufrin, G., Mirand, E.A., Moore, R.H., Chu, T.M. and Murphy, G.P.: *J. Urol.*, **117**, 433, 1977.
- 75) Murphy, G.P., Brendler, H. and Mirand, E.A.: *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **1**, 761, 1970.
- 76) Kvarstein, B., Lindemann, R. and Mathiesen, W.: *Scand J. Urol. Nephrol.*, **7**, 173, 1973.
- 77) 高久史磨: *日本臨床*, **29**, 36, 1971.
- 78) 外山圭助: *臨床血液*, **15**, 249, 1974.
- 79) Gordon, A.S. and Zanjani, E.D.: *Regulation of erythropoiesis*, vol. 1. Appleton-Century-Crofts. N.Y. p. 413, 1970.
- 80) Peshle, C.: *Regulation of erythropoiesis*. IL. Ponte. Milano. p. 343, 1972.
- 81) Eslev, A.J.: *Blood*, **44**, 77, 1974.
- 82) 玉置憲一, 田島智行: personal communication. (1977年11月10日受付, 特別掲載)
-