ヒト腎細胞癌の異質性 (Heterogeneity) に関する研究

I: 培養細胞株 KU-2 の形態, 染色体および細胞周期について

慶応義塾大学医学部泌尿器科学教室 長 倉 和 彦*
(主任: 田崎 寛教授)

HETEROGENEITY OF HUMAN RENAL CELL CARCINOMA

I: Studies on Morphology, Karyotype and Cell Kinetics
of Cultured Cell Line KU-2

Kazuhiko Nagakura*

Department of Urology, Keio University School of Medicine
(Director: Prof. H. Tazaki)*Present address: Department of Urology, National Defense Medical College, Namiki 3-2, Tokorozawa,
Saitama 359, Japan (Director: Prof. H. Nakamura)

The heterogeneity of cell line KU-2 derived from human renal cell carcinoma was studied utilizing single cell cloning method. Thirteen sublines were yielded and named N-1—N-13. Observed morphologically as time lapsed, N-13 was different from other sublines in that it was a group of cells, spindle in shape maintained throughout, with a lower nuclear to cytoplasmic ratio and did not tend to pile up, with lower saturation density. Ultrastructure studies showed different characteristics of each subline in the degree of development of cell surface microvilli and the amount of glycogen granules and lipid droplets in cytoplasm. Karyotype analysis of the sublines showed 6 different modal chromosome numbers, but all of the sublines had common marker chromosomes, while clone N-5 had a proper giant metacentric marker chromosome. Generation time determined by the fraction of labeled mitosis method ranged from 18.7 hr to 25.6 hr. T_{G1} ranged from 7.7 hr to 14.8 hr. These results disclosed that KU-2 consists of heterogenous cell populations, and subsequent separation of individual subline with different biological properties would provide clues to clarification of the role of these phenotypes of cancer cells.

要旨: ヒト腎細胞癌由来培養株 KU-2 の heterogeneity について解析するため, single cell cloning 法により13のクローン株 (N-1~N-13) を分離し, それらの形態, 染色体, 細胞周期について比較検討した。

形態学的観察では, N-13は他のクローンと異なり, 紡錘形細胞が辺縁不整のコロニーを形成し, 低い N/C 比, 低い saturation density を示し, また pile up して培養液中に遊離する細胞はみられなかった。電子顕微鏡の観察では, クローンにより, microvilli の発達程度, グリコーゲン顆粒や lipid droplet の量に差がみられた。染色体分析では, 13のクローンは6つの異ったモード数を示し, N-5には他のクローンにみられない個有のマーカー染色体がみられたが, 同時に多くの共通マーカー染色体が存在した。FLM 法による細胞周期解析では, 世代時間は18.7から25.6時間と差がみられ, これは主に G1期の長さの差によるものであった。

以上より, KU-2は異なる生物学的性状を有する細胞より成ることが判明した。そして, これらの異った性質を有する細胞を分離することは, 癌細胞の種々の表現型を解析する上で非常に有用と考えられた。

結 言

現在, 多くのヒト癌由来細胞株が樹立され, 安定した癌の実験モデルとして広く研究に应用されているが, その原組織である腫瘍が生物学的に性質の異なる

* 現 防衛医科大学校泌尿器科学教室
(主任: 中村 宏教授)

細胞より成るとされるのに対し¹¹⁻¹⁷⁾, 培養細胞株は一般に均一な細胞集団として取り扱われている。その理由として, 培養細胞株は, 原組織より樹立される際, クローン選択が行われ, 比較的早期に限られたクローンのみとなる事が挙げられる。そして, その結果, 生体中で持っていたいくつかの特徴的機能を失うこともあると考えられる。しかしながら, 培養細胞であっても遺伝子構造を失わない限り, 潜在的には原組織細胞の性質あるいは機能を保っているはずである。そして, 生体の腫瘍がクローン増殖により発生し⁸⁾, かつ mutation をくり返し, クローン選択を行いながら, 最終的に種々の malignant phenotype と heterogeneity を獲得する様に⁹⁾¹⁰⁾, 培養細胞株にも種々の性質を持った細胞が混在すると考えられる。

KU-2細胞株は, 赤血球増多症を伴った腎細胞癌患者より樹立されたものであるが, ノードマウスに再移植され, そのエリスロポエチン産生が明らかにされており, また形態学的にも, 刷子縁様 microvilli といった腎細胞癌に特徴的な所見が認められている¹¹⁾。そこで今回, それらの特徴的機能あるいは形態を持った細胞を分離することを目標に, その第一として, 現在の KU-2株の heterogeneity について検討を加え, KU-2が複数の細胞学的に性質の異った細胞より成ることが判明したので報告する。

材料および方法

今回用いた細胞株 KU-2は, 赤血球増多症を伴った 67歳の腎細胞癌患者の肺転移巣より, ノードマウスを経て, 1976年勝岡ら¹¹⁾により樹立されたものである。KU-2およびクローンは 10% FBS (牛胎児血清, Flow Laboratories, Virginia), および 0.15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ カルベニシリン添加 Eagle's MEM 培養液 (千葉血清) を用い, CO_2 インキュベーター内で, 5% CO_2 , 95% air, 37°C の条件下で培養した。

KU-2細胞のクローニングには細胞稀釈液による single cell cloning 法を用いた。単層培養の KU-2細胞を 0.02% EDTA (和光純薬), 0.25% トリプシン (千葉血清) にて剥離, 単離したのち, 10~20 cells/ml となる様, 細胞濃度を調整した浮遊液を 0.1ml づつ 96well のマイクロテストプレート (Falcon 3072, Becton, Dickinson and Co., California) に分注する。培養開始後, 位相差顕微鏡下にて一コの細胞を含む well をマークし, 連日観察を行い, 一コの細胞が徐々に一コのコロニーとなる過程を確認する。培養液は, 4日後に 0.1ml を加え, 以後 4 日毎の半量交換を行った。マー

クした well に形成されたコロニーは徐々に大きな培養ビンに継代し, 25cm² フラスコ (Falcon 3013) に移した時を, クローン株の第一代とした。その結果, 13 のクローン株が得られ, それらに対して以下の実験を行った。尚, 分離したクローン株の一部は, 10% DMSO 存在下に液体窒素にて冷凍保存した。

1) saturation density の測定

クローン株の単層培養における saturation density の測定のため, 2×10^4 コの各クローン細胞を 24well multidish (Nunc, Denmark) の各 well に分注し, 3 日毎の培養液交換を行いながら, 5 日目より連日生細胞数を数え, 増殖曲線を作成, その最大数を saturation density とした。尚, 本実験は, triplicate とし, それを計 3 回行った。

2) 形態学的観察

継代 3~5 代目のクローン株細胞を位相差顕微鏡および電子顕微鏡 (透過型) にて観察した。電子顕微鏡標本には, クローン株細胞を Lab-Tek[®] チェンバー (Miles Labo. Inc., Illinois) で培養し, confluent となったところでリン酸緩衝液 pH 7.4 (以下 PBS) で洗浄したのち, 2.5% glutar aldehyde と 1% オスミウム酸で 2 重固定し, 段階濃度のエタノールで脱水, エポン 812 に包埋した。薄切標本に対して, ウランおよびクエン酸鉛により二重染色し, 日立 HS-9 電子顕微鏡にて観察した。

3) 染色体分析

継代 3 代目のクローン株細胞, 5×10^4 コを Lab-Tek[®] チェンバーにて培養し, 48 時間後 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のコルセミド (GIBCO, New York) を加え, 4 時間培養したのち, 直ちに 0.075M の KCl にて低張処理を行い, カルノア液 (75% メタノール, 25% 酢酸) にて固定した。チェンバーのマウントを取り除き, 火焰乾燥させたのち, 10 倍希釈ギムザ液にて 5 分間染色, 光学顕微鏡にて観察した。各クローン毎約 70 コの metaphase 細胞を写真撮影し, 染色体分析を行った。

4) 細胞周期解析

継代 3 代目のクローン株の細胞周期を fraction of labeled mitosis method (FLM 法) にて解析した。培養ビンより剥離, 単離した細胞を, 培養液で 2×10^4 cells/ml となる様濃度を調整し, その 5ml づつをあらかじめ 30 $\times$ 12mm のカバーガラスを 2 枚づつ入れた 10 枚のベトリ皿 (6cm in diameter, Falcon 3002) に分注, 培養を開始した。72 時間後, 0.1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ³H-thymidine (specific activity 25Ci/mmol, RCC Amer-

sham, England)を含む37℃の新しい培養液と交換し、標識を行った。30分後ただちに 4×10^{-6} Mの cold thymidineを含む培養液で2回洗浄し、 ^3H -thymidineの取り込みを停止したのち、同じ培養液にて継続して培養した。標識直後より2時間毎、38時間に亘ってカバーガラスを1枚ずつ取り出し、PBSで洗浄、カルノア液で固定ののち、70%エタノールおよび0.2N 過塩素酸で処理を行い、アルコール、酸可溶性分の抽出を計った。蒸留水で洗浄し、室温で乾燥させたカバースリップに対し、ディッピング法によりオートラジオグラフィを行った。乳剤には、55℃加温、2倍稀釈のサクラ NR-M2 (小西写真工業)を使用し、露出時間は14日間とした。現象、固定は、各々コンドール X (小

西写真工業)、フジフィックス (富士写真フィルム)を用い、5分間行った。自然乾燥させた標本は、0.1% ケルンエヒテロートにて核染色を施し、バルサムにてスライドグラフに固定、光学顕微鏡にて観察した。

Table 1 Saturation density of KU-2 clones

clones	mean $\pm$ S.D.($\times 10^5$ cells/cm ²)
N-1	2.1 $\pm$ 0.26
N-2	2.4 $\pm$ 0.36
N-3	2.1 $\pm$ 0.08
N-4	2.2 $\pm$ 0.22
N-5	2.4 $\pm$ 0.17
N-6	2.2 $\pm$ 0.34
N-7	2.2 $\pm$ 0.22
N-8	not determined
N-9	2.2 $\pm$ 0.29
N-10	2.3 $\pm$ 0.13
N-11	2.2 $\pm$ 0.29
N-12	2.1 $\pm$ 0.22
N-13	1.3 $\pm$ 0.33

Fig. 1 Serial phase contrast microscopic view of N-9 cells on day 2 and 9 (a, b) after passage, and of N-13 cells on day 2 and 9 (c, d). reduced from $\times 100$

各標本毎, 100コ of 分裂期細胞を観察, 5コ以上の grain のあるものを標識細胞と判定し, 標識率を算定した。2時間毎の標識率より標識率曲線 (FLM 曲線) を作成し, Takahashi and Mendelsohn¹²⁾による Asymmetry 法により細胞周期の各パラメーターを算出した。

結 果

1) Saturation density

プラスチック製24 well multidish を用いた単層培養細胞の saturation density は, 13のクローン株の内, N-13が他のクローンに比べ著明に低い値を示したものの, 他のクローンは $2.1 \sim 2.4 \times 10^5$ cells/cm²とほぼ均一の値を示した (Table 1)。

Fig. 2 Ultrastructure of N-2 cells showing oval nuclei (N), moderately developed mitochondria (M) and endoplasmic reticulum (ER), microvilli (MV) and a few desmosomes (D). $\times 2,000$

2) 形態学的観察

位相差顕微鏡により, 単層培養クローン株細胞の経時的な形態の変化をみると, 多くのクローンは2~4コの核小体を持つ, ほぼ円形の核を有する多角形の細胞よりなり, 拡張性に増殖する円形のコロニーを作る傾向がみられる。そして細胞シートが confluent となったのちも増殖を続け, 細胞の N/C 比や密度が著名に上昇し, ついには pile up して培養液中に遊離してくる細胞もみられる (Fig. 1a, b)。N-13以外のクローンは, 培養条件や継代数により多少の差はみられるものの, ほぼ同様な傾向を示すのに対し, N-13は主に紡錘形をした細胞よりなり, 増殖速度はゆるやかで, コロニーの形態は辺縁不整である。そして confluent

Fig. 3 Ultrastructure of N-10 cells showing abundant glycogen granules (GL), a cluster of lipid droplets (L) and relatively small number of organelles. $\times 2,000$

Fig. 4 Ultrastructure of N-3 (a) and N-6 (b) cells showing well developed microvilli. $\times 2,000$

となったのちは、増殖は非常に緩徐となり、細胞密度やN/C比の著名な上昇もみられず、また pile up する細胞も認められなかった (Fig. 1c, d).

電子顕微鏡による単層培養クローン株の観察によれば、いずれのクローンも核はほぼ類円形で、ところどころにグリコーゲン顆粒や lipid droplets がみられ、細胞間には数コのデスモゾームが存在し、細胞膜には培養液中に放射状に配列する microvilli が認められたが、多量のミトコンドリア、細胞膜の infolding といった他の腎細胞癌の特徴的所見は認められなかった。一方クローン間でそれらを比較すると、N-1, 3, 6, 10, 12では豊富なグリコーゲン顆粒が、また N-1, 8, 9では lipid droplets の集塊が観察され、更に N-3, 6, 13では近位尿管細胞の刷子縁構造に似た、密生した microvilli が認められたが、他のクローンではそれらの所見に乏しかった (Fig. 2, 3, 4).

3) 染色体分析

13のクローン株の染色体数は56から67で、各クローンのモード数は60から66と、クローン間で差がみられたが、共通のモード数を持つクローンも認められた (Table 2). マーカー染色体を比較すると、その多くは13のクローンに共通であったが (Fig. 5), N-5には他のクローンにはみられない巨大マーカー染色体が観察された (Fig. 6).

4) 細胞周期解析

FLM 法によるクローン株の細胞周期の比較では、世代時間を示すパラメーター (Tc) asym., corr. は、最も短いもので N-10の18.7時間、最も長いもので N-3

Table 2 Chromosome numbers of KU-2 clones

clones	mode	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
N-1	63				3	4	8	4	22				
N-2	62			5	3	4	6	16					
N-3	63							6	17	4	2		
N-4	63				2	4	3	9	21				
N-5	64					2	2	6	6	18			
N-6	63					1	2	4	19				
N-7	65						4	4	1	6	23	7	
N-8	65				5	1	2	2	1	2	13		
N-9	66									3	7	16	2
N-10	65								5	5	19	4	
N-11	60		3		1	17	3	2	2				
N-12	60	5	2	7	6	22	5	1					
N-13	63				3	3	7	11	19				

の25.6時間であった。一方 DNA 合成期のパラメーター (Ts) area, corr は6.7~7.9時間、DNA 合成後期 (TG 2+0.7M) est. level は3.8~4.8時間とほぼ一定の値を示し、クローン間の細胞周期の差は、DNA 合成前期すなわち TG1+0.3M の長さの差が主体であった (Table 3).

考 察

培養細胞株 KU-2は、赤血球増多症を伴う腎細胞癌患者の肺転移巣よりヌードマウスを経て樹立されたものであるが¹¹⁾、ヌードマウスにおいても赤血球増多症が出現し、その血中および腫瘍中エリスロポエチンの上昇が認められており¹²⁾、培養化ののちもこの様な機能が維持されている事は十分に期待できる。しかしながら、その様な特徴的形質がすべての細胞に潜在的に保たれているのか、あるいは、一部の細胞のみであるかは不明である。そこで、それらの特徴を持つ細胞を選択分離することを一つの目的として、KU-2細胞に対しクローニングを行い、個々の細胞の生物学的特徴を解析することを試みた。その結果、13のクローン株(N-

Fig. 5 Karyotype of N-13 (mode=63)

Fig. 6 Karyotype of N-5 (mode=64)

Table 3 Cell cycle parameters of KU-2 clones

clones	$T_{G1+0.3M}^*$	$(T_s)_{area,corr.}$	$(T_{G2+0.7M})_{est. level}$	$(T_c)_{asym. corr.}$	$(CV)_{est.}$
N-1	7.7hr	7.0hr	4.5hr	19.2hr	37.4%
N-2	11.1	7.1	4.4	22.6	45.8
N-3	13.8	7.4	4.4	25.6	45.1
N-4	10.4	6.8	4.5	21.7	43.3
N-5	11.1	6.5	4.2	21.8	42.8
N-6	8.6	7.9	4.1	20.6	33.6
N-7	14.8	6.2	4.2	25.2	34.3
N-8	10.4	7.2	3.8	21.4	37.8
N-9	10.0	7.4	4.4	21.8	42.8
N-10	7.7	6.4	4.6	18.7	31.6
N-11	11.8	7.7	4.3	23.8	38.5
N-12	11.5	7.3	4.3	23.1	41.0
N-13	14.5	6.2	4.8	25.5	46.8

*values calculated by extracting $T_{G2+0.7M}$ and T_s from T_c

1~N-13) が得られ、それらに対し、継代3代目から8代目の間に形態学的観察、染色体分析、細胞周期解析を行った。

単層培養におけるクローン株の形態をみると、N-13は個々の細胞の形態と共にコロニーの形態、更に細胞密度も他のクローンと比べ大きく異り、他のクローンにみられた培養液中に pile up する細胞もみられなかった。これは Brattain ら³⁾による結腸癌細胞株に関する報告にみられる低いコロニー形成能と腫瘍形成能を持つ細胞の形態的特徴と良く一致している。また N-13の形態は分化誘導剤である DMF (N, N-dimethyl folmamide) で処理した結腸癌細胞の形態¹⁴⁾にも類似しており、形態学的には、N-13は他のクローンより高い分化度を示したものと考えられた。

電子顕微鏡的な腎細胞癌の特徴は、密集した microvilli で表わされる尿細管の刷子縁構造様所見、細胞膜の infolding, 多くの腫大した mitochondria, 更に多量のグリコーゲン顆粒や lipid droplets などである^{15)~17)}。今回のクローンの電顕的所見を比較すると、クローンによりグリコーゲン顆粒や lipid droplets の量的な差がみられた他、N-3, 6, 13には良く発達した micro-villi が観察され、KU-2の原腫瘍でみられた刷子縁構造様所見が現在も維持されていることが判明した。

染色体所見でのクローン株の差をみると、染色体数が N-5にみられたマーカー染色体などから KU-2が heterogenous な細胞集団から成ることが明らかになったが、同時に各々のクローンは多くの共通マ

カーを有しており、これらが一つの stem cell から生じたものであることを示した。KU-2 クローンモード染色体数は60~66で、KU-2 樹立時のモード数72からやや減少がみられ、培養過程において変化したものと考えられた。腫瘍細胞の染色体数は多くの場合、2 倍体から4 倍体や3 倍体、更に異数体になるに従い悪性度が高まる^{18)~20)}との考えに基けば、KU-2 のクローンは、いずれも染色体上見上、低分化型と考えられた。

培養細胞の増殖周期については、これまで多くの報告がみられ、それらの世代時間は、およそ15~40時間と言われている^{21)~25)}。細胞周期解析法は、今回用いた FLM 法、持続標識法、³H-¹⁴C 二重標識法などのオートラジオグラフィによる方法の他、近年では flow microflowmetry など用いられているが、FLM 法の解析理論として1971年 Mendelsohn ら¹²⁾により Asymmetry 法が発表されて以来、最も普遍的な解析法として用いられており、またその誤差も5%以内とされていることから本法を用いた。尚、解析法の詳細な理論、および他の方法との比較については原著¹²⁾を参考にされたい。これまで報告された細胞周期を、各相の長さで各々比較すると、その長さの差の主体となるのは TG1 で、Ts や TG2、TM には大きな差はみられないとされており^{21)~22)}、今回のクローン株の比較でも同様であった。一方体内においては、世代時間24~48時間と言われる腸上皮細胞から非常に長い世代時間を持つものまで、あらゆる長さの細胞が存在する²⁶⁾。これは、細胞周期の測定法による差もあり、一概に比較できない点もあるが、in vitro の細胞は、in vivo の細胞系に比べ、短く、かつ比較的均一な細胞周期を持っていると言える。

腫瘍細胞とその発生母地となった正常細胞の増殖周期を比較すると、通常、前者の方が長いことが知られている^{21)~27)}、更に悪性化あるいは未分化に移行する過程では、ほとんどの場合、増殖速度の上昇を伴ってくる^{20)~28)~30)}。同様の現象は in vitro でも認められており、Danielson ら¹⁾はマウスの mammary tumor から2つの細胞系を培養化し、短い世代時間を持つ方がより高いコロニー形成能および腫瘍形成能を示したと述べている。また、分化誘導剤 DMF の処理によって結腸癌細胞が形態的に分化傾向を示すと、増殖速度が低下し、腫瘍形成能が低下するとの報告もある¹⁴⁾。更に Suzuki ら³¹⁾はマウスの fibrosarcoma 細胞を使い、細胞周期の各相の細胞をその cell size の違いによって遠心分離し、各々の lung colony 形成率を調べたとこ

ろ、S 期に相当する細胞の tumorigenicity が最も高く、G1 期に相当する細胞が最も低いと述べている。この差が、単に増殖能力や growth fraction によるものなのか、あるいは S 期細胞の特有の内部条件によるものであるかは不明であるが、いずれにしても細胞周期が腫瘍形成能あるいは悪性度において非常に重要な意味を持っている事は明らかであろう。一方、一部には、世代時間の短いことが、必ずしも高い腫瘍形成能に帰着しないとの報告^{23)~24)~32)}もあるが、他の諸条件が同一であるならば、より世代時間の短い細胞の方が、より高い腫瘍形成能を持つと考えて良いであろう。

腫瘍の細胞周期の理解は、白血病の治療³³⁾に代表される様に、これまで癌化療法を中心とした抗腫瘍療法の開発に多大の貢献をして来た。この様に、より優れた腫瘍治療効果を上げるためには、標的となる癌細胞の増殖周期は必ず考慮されなければならない重要な要素であり、今回分離したクローン株の様に、同じ stem cell から生れ、かつ異った細胞周期を持つ細胞を解析することは、この理解を一層深めるものと期待された。

結 語

1. ヒト腎細胞癌由来細胞株 KU-2 に対して single cell cloning を行い、13 のクローン株を得、その heterogeneity について検討を加えた。

2. 単層培養中の生細胞の形態では、N-13 は他のクローンと異り、かつゆるやかな増殖と低い細胞密度を示した。また電子顕微鏡的には、腎細胞癌の特徴を比較的良く保っているクローンと、そうでないクローンとがみられた。

3. 染色体分析では、クローン間に数的な差がみられ、また N-5 には特徴的なマーカー染色体もみられた。

4. FLM 法による細胞周期解析では、クローン株の世代時間は18.7から25.6時間で、その差の主体は TG1 の長さによるものであった。

以上より、KU-2 は形態、染色体、細胞周期上、異った細胞よりなることが判明したが、N-13 では各々の所見が一致して低い増殖能を示したものの、他のクローンでは必ずしも一致はみられず、今後、更に詳細な検討を要すると考えられた。

稿を終るに臨み、終校御指導、御校閲を賜った恩師田崎寛教授に深甚なる謝意を表するとともに、直接御指導、御協力いただいた泌尿器科教室諸兄に深謝いたします。

なお本稿の一部は、第71回日本泌尿器科学会総会、および第78回 Annual Meeting of American Urological Associ-

ation において発表した。

文 献

- 1) Danielson, K.G., Anderson, L.W. and Hosick, H. L.: Selection and characterization in culture of mammary tumor cells with distinctive growth properties in vivo. *Cancer Res.*, **40**, 1812—1817, 1980.
- 2) Dexter, D.L., Kowalsky, H.M., Blaza, B.A., Fligial, Z., Vogel, R. and Heppner, G.H.: Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.*, **38**, 3174—3181, 1978.
- 3) Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J. and Brattain, D.E.: Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.*, **41**, 1751—1756, 1981.
- 4) Shapilo, J.R., Young, W.A. and Shapilo, W.R.: Isolation, karyotype and clonal cells from of heterogenous subpopulation of human malignant gliomas. *Cancer Res.*, **41**, 2349—2359, 1981.
- 5) Raz, A., MacLellan, W.L., Hert, I.R., Bucana, C. D., Hoyer, L.C., Sela, B.-A., Dragsten, P. and Filder, I.J.: Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential. *Cancer Res.*, **40**, 1645—1651, 1980.
- 6) Barranco, S.C., Haenelt, B.R. and Gee, E.L.: Differential sensitivities of five rat hepatoma cell lines to anti-cancer drugs. *Cancer Res.*, **38**, 656—660, 1978.
- 7) Byers, V.S. and Johnston, J.O.: Antigenic differences among osteogenic sarcoma cells taken from different location in human tumors. *Cancer Res.*, **37**, 3173—3183, 1977.
- 8) Sandberg, A.A.: Chromosomes and cancer. The chromosomes and human cancer and leukemia, p. 426, Elsevier, New York, 1980.
- 9) Fialkow, P.J.: Clonal origin and stem cell evolution of human tumors. *Genetics of human cancer*, p. 439, Raven Press, New York, 1977.
- 10) Nowell, P.C.: The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, **194**, 23—28, 1976.
- 11) Katsuoka, Y., Baba, S., Hata, M. and Tazaki, H.: Transplantation of human renal cell carcinoma to the nude mice: As an intermediate of in vivo and in vitro. *J. Urol.*, **115**, 373—376, 1976.
- 12) Mendelsohn, M.L. and Takahashi, M.: A critical evaluation of the fraction of labeled mitosis method as applied to the analysis of tumor and other cell cycles. *The Cell Cycle and Cancer*, p. 58, Marcel Dekker Inc., New York, 1971.
- 13) 勝岡洋治: 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. *日泌尿会誌*, **69**, 285—303, 1978.
- 14) Dexter, D.L., Barbasa, J.A. and Calabresi, P.: N,N-Dimethylformamide induced alteration of cell culture characteristics and loss of tumorigenicity in cultured human colon carcinoma cells. *Cancer Res.*, **39**, 1020—1025, 1979.
- 15) Yokoyama, M.: Ultracytochemical and morphological studies of human renal cell carcinoma. *J. Urol.*, **108**, 62—69, 1972.
- 16) Sun, C.N., Bissada, N.K. and White, H.J.: Spectrum of ultrastructural patterns of renal cell carcinoma. *Urol.*, **2**, 195—200, 1977.
- 17) Bannayan, G.A. and Lamm, D.L.: Renal cell tumors. *Pathol. Ann.*, **15**, 271—308, 1980.
- 18) Sandberg, A.A.: Chromosome markers and progression in bladder cancer. *Cancer Res.*, **37**, 2950—2956, 1977.
- 19) Javadpour, N., Roy, J.B., Bottomley, R. and Dagg, K.: Combined cell surface antigens and chromosomal studies in bladder cancer. *Urology*, **19**, 29—32, 1982.
- 20) Wake, N., Isaacs, J. and Sandberg, A.A.: Chromosomal changes associated with progression of the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. *Cancer Res.*, **42**, 4131—4142, 1982.
- 21) Cleaver, J.E.: Interphase replication of DNA and the cell cycle. Thymidine metabolism and cell kinetics. p. 104, North Holland Pub. Co., Amsterdam, 1967.
- 22) 加藤哲郎: 膀胱癌の cell kinetics に関する研究. I. 培養ヒト膀胱癌細胞の細胞周期解析. *日泌尿会誌*, **67**, 491—496, 1976.
- 23) Stiles, C.D., Desmond, W., Chuman, L.M., Sato, G. and Saier, M.H. Jr.: Relationship of cell growth behavior in vitro to tumorigenicity in athymic nude mice. *Cancer Res.*, **36**, 3300—3305, 1976.
- 24) Butel, J.S., Dudley, P. and Medina, D.: Comparison on the growth properties in vitro and transplantability of continuous mouse mammary tumor cell lines and clonal derivatives. *Cancer Res.*, **37**, 1892—1900, 1977.
- 25) 田崎 寛: 泌尿器科領域における細胞培養の基礎と臨床応用. *日泌尿会誌*, **71**, 1132—1146, 1980.
- 26) 藤田哲也: オートラジオグラフィーによる細胞の増殖と分化の分析. *新細胞学*, p. 605, 朝倉書店, 東京, 1965.
- 27) Buehling, G.C. and Williams, R.R.: Growth

- rates of normal and abnormal human mammary epithelia in cell culture. *Cancer Res.*, **36**, 3742—3747, 1976.
- 28) Gray, J.M. and Pierce, G.B.: Relationship between growth rate and differentiation of melanoma in vivo. *J. Natl. Cancer Inst.*, **32**, 1201—1210, 1964.
- 29) Fulker, M.J., Cooper, E.H. and Tanaka, T.: Proliferation and ultrastructure of papillary transitional cell carcinoma of the human bladder. *Cancer*, **27**, 71—82, 1971.
- 30) Seibert, K., Shafie, S.M., Triche, T.J., Whang-Peng, J.J., O'Brien, S.J., Toney, J.H., Huff, K. K. and Lippman, M.E.: Clonal variation of MCF-7 breast cancer cells in vitro and in athymic nude mice. *Cancer Res.*, **43**, 2223—2239, 1983.
- 31) Suzuki, N., Frapart, M., Grdina, D.J., Meistrich, M.L. and Withers, H.R.: Cell cycle dependency of metastatic lung colony formation. *Cancer Res.*, **37**, 3690—3693, 1977.
- 32) Thomassen, D.G. and DeMars, R.: Clonal analysis of the stepwise appearance of anchorage independence and tumorigenicity in CAK, a permanent line of mouse cells. *Cancer Res.*, **42**, 4054—4063, 1982.
- 33) Lampkin, B.C., Nagao, T. and Mauer, A.M.: Synchronization and recruitment in acute leukemia. *J. Clin. Invest.*, **50**, 2204—2214, 1978.

(1983年9月7日受付)