軟寒天培地を用いた膀胱剝離細胞の培養の検討

石 橋 克 夫
 横浜市立大学泌尿器科学教室 桜 本 敏 夫
 (主任: 大島 博幸教授) 三 浦 猛
 窪 田 吉 信

CULTURE OF EXFOLIATED BLADDER CANCER CELLS WITH SOFT AGAROSE

Yoshi Ishibashi, Toshio Sakuramoto, Takeshi Miura and Yoshinobu Kubota
 Department of Urology, Yokohama City University, School of Medicine, Yokohama, Japan
 (Director: Prof. H. Ohshima)

The soft agar culture of exfoliated cells obtained by bladder washing was studied to establish a sensitivity test of bladder carcinoma to anticancer drugs.

Exfoliated cells were plated on the two-layer soft agarose dishes, and incubated for 3 to 4 weeks to observe colony formation.

Twenty-four and ten cultures were performed for 20 patients with bladder carcinoma and 10 controls with benign urological diseases, respectively. The number of exfoliated cells obtained was $2 \times 10^4 - 4 \times 10^7$ in the former group and $4 \times 10^4 - 2.5 \times 10^7$ in the latter group. There was no significant difference between these two values. Thirteen specimens from the bladder carcinoma patients, and 9 from the control patients were cultured without contamination of bacteria for 3 to 4 weeks. The colony formation was observed in 7 out of the 13 specimens, and the plating efficiency was 0.1 - 0.0015%. The control specimens did not form any colonies. There were no definite relations between colony formation and cytologic malignancy or grade of tumors.

These results indicate that the sensitivity test of anticancer drugs with exfoliated cells of bladder carcinoma is possible by utilizing soft agarose culture techniques with some further technical improvements.

要旨: 膀胱癌患者の制癌剤感受性試験の確立を目的として, 膀胱癌患者20例, 良性疾患患者10例より得た膀胱剝離細胞を用いて, 軟寒天培養を検討した。

2層の軟寒天培地に膀胱洗浄により採取した細胞を播種し, 3~4週間培養し形成されたコロニーを算定した。

膀胱癌については24回の, 対照については10回の培養を行った。採取細胞数は, 前者では $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$ 個, 後者では $4 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^7$ 個であったが有意差はなかった。前者24回培養中13回, 後者10回培養中9回が培養維持可能であった。膀胱癌症例で培養維持可能だった13例中7例にコロニー形成が観察され, コロニー形成率は0.1~0.0015%であった。対照群ではコロニーは認められなかった。コロニー形成と細胞診, gradeとの関係ははっきりしなかった。

これらより, 膀胱剝離細胞の軟寒天培地を用いた, 制癌剤の感受性試験が可能と思われたが, この方法を実際に行うには, さらに採取細胞数を増加させることと, 細菌汚染を防ぎコロニー形成率を高めることについて, より一層検討を重ねる必要がある。

結 言

軟寒天培地は, 腫瘍細胞をほぼ特異的に増殖させるという特徴がある。HamburgerとSalmon¹⁾がstem cell assay法と呼んでいるのは, この培地を用い個々

の患者から採取した癌細胞の制癌剤に対する感受性試験を検討する方法である。泌尿器科領域では膀胱癌, 腎癌について手術的に摘出した腫瘍組織を用いて, このstem cell assay法が応用されており, 実際桜本ら²⁾

は患者から採取した腎癌組織を用いて、16例中13例にコロニーの形成を認め、これを応用して腎癌の制癌剤に対する感受性試験を行っている。

しかしながら手術操作による検体採取は、その機会が手術時に限られるために、臨床的な必要性に応じて検体を採取検索することは不可能であり、また得られた組織片を個々の細胞にまで分離するのに、酵素処理等の操作が必要である。そこで膀胱癌については剝離細胞を用いて同様な検索ができれば、この stem cell assay 法を必要に応じて行い、その実用性を高めることができる。そこためには膀胱洗浄によって得られる剝離細胞を、有効に用いることが考えられるが、Stanisic と Buick³⁾および Niell ら⁴⁾はすでにこの膀胱洗浄法を用いた stem cell assay 法について検討を加え、この方法の臨床応用が可能であると述べている。そこで我々も膀胱剝離細胞を用いた軟寒天培養法を、制癌剤の感受性試験のみならず、膀胱癌細胞の生物学的活性をさぐる方法とすべく、Stanisic と Buick の方法に準じて、膀胱剝離細胞の軟寒天培養の基礎的条件を検討した。すなわち制癌剤の感受性試験を行うのに充分な数だけの細胞を集め得るか否か、またこうして集めた細胞の軟寒天培地での培養が確実にい行い得るか否かを検討したので、その成績を報告する。

被検対象

横浜市立大学泌尿器科に入院した患者を被検対象とした。膀胱癌患者は20例で男性15例、女性 5 例を含み、年齢は33～89歳、平均65.5歳であった。対照とした患者は良性疾病患者10例で、男性 8 例、女性 2 例を含み、年齢は29～79歳、平均49.2歳であった（表 1、2）。

方 法

(1) 検体の採取：50ml の生理食塩水を用いて、できるだけ無菌的に力強く膀胱洗浄を10回行い、細胞浮遊

表 2 対照症例（良性疾病）

患者	年齢	性別	疾患名	採取細胞数	コロニー形成
①	45	男	尿管結石	3.1×10 ⁵	—
②	29	男	睾丸壊死	5×10 ⁴	—（細菌汚染）
③	79	男	前立腺肥大症	1.4×10 ⁶	—
④	30	男	UPJ狭窄症	5×10 ⁴	—
⑤	52	男	尿道断裂	8×10 ⁴	—
⑥	53	男	尿管結石	2×10 ⁵	—
⑦	40	男	膀胱結石	2.5×10 ⁷	—
⑧	53	男	腎嚢胞	4×10 ⁴	— [※]
⑨	54	女	尿道脱	5×10 ⁴	— [※]
⑩	57	女	尿管結石	9×10 ⁶	—

※：クラスター形成を認めた。

液を得た。これを1,100rpm、5分間遠心し、細胞を沈渣として集め、さらに Hank's 液（Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free：GIBCO 社）中に拡散後再び同様に遠心して、沈殿した細胞に後述の培養液を加えて細胞浮遊液を作った。その一部を用い、全細胞数ならびに0.4%trypan blue 液（GIBCO 社）による生体染色で生細胞数を各々算定した。

(2) 培養：培養液としては Ham's F-12培地（GIBCO 社）に 8%牛胎児血清（FCS：Reheis 社）と 1%カナマイシンと50ng/ml の epidermal growth factor とを加えたものを使用した。軟寒天培地は桜本らの方法²⁾と同一のものを用いた。すなわち、この培養液に agarose（Type I：Sigma 社）を0.4%加えて basal layer として、同じく agarose を0.24%加えた culture layer との 2 層培地にした。culture layer には各 plastic dish（LUX 社）あたり、採取できた細胞数に応じて、1×10⁴～10⁵個の生細胞をまき、5%CO₂-95%air incubator の中で培養し、3～4 週後に軟寒天培地中に増殖してくるコロニーを観察、算定した（図 1）。尚、我々は30個以上の細胞集塊をコロニーと判定し、さらにこれをババニコロ染色し、コロニーを形成している個々の細胞についても観察した。

成 績

(1) 採取細胞数：採取できた細胞数は、膀胱癌症例

表 1 膀胱癌症例（培養維持可能だったもの）

患者	年令	性別	細胞診	Grade	採取細胞数	コロニー形成(形成率)	
①	72	男	Ⅳ	G3	4×10 ⁵	+	0.0025%
②	33	男	I	G2	1.3×10 ⁷	+	0.0015%
③	56	男	I	G2	4×10 ⁴	—	
④	74	男	V	G3	3×10 ⁵	+	不明
⑤	63	男	I	G1	5×10 ⁴	— [※]	
⑥	43	男	I	G2	3×10 ⁵	+	0.1%
⑦	78	男	Ⅱ	G2	8×10 ⁵	+	0.04%
⑧	56	男	I	G1	8×10 ⁴	—	
⑨	79	男	Ⅱ	G2	2×10 ⁴	—	
⑩	45	男	I	G2	1×10 ⁵	+	0.057%
⑪	72	女	Ⅲ	G3	4×10 ⁷	—	
⑫	68	女	V	G3	1.4×10 ⁷	—	
⑬	82	女	Ⅳ	G2	1.5×10 ⁵	+	0.024%

※：クラスター形成を認めた。

図 1 軟寒天培養の方法

については24回施行中、 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$ 個(平均 4.5×10^5 個)であり、対照症例で10回施行中、 $4 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^7$ 個(平均 2.5×10^5 個)であった。マン・ホイットニーの検定によれば、2群の採取細胞数の間に有意差は認められなかった(表3)。

(2) 培養の維持：コロニーの算定に必要な3週間以上培養を維持できたものは、膀胱癌症例24培養中13培養(54%)、対照症例10培養中9培養(90%)であった。維持できなかった理由は全て細菌汚染によるものであり、膀胱癌症例では細菌汚染が多いという傾向が認められた(表4)。

(3) コロニーの形成：軟寒天培養中のコロニーの形成は、膀胱癌症例で培養が維持できた13例中7例(54%)に見られた。対照群ではコロニー形成は認められなかったが、前述したコロニーの基準よりはるかにサイズの小さい細胞集塊(クラスター)を2例において観察した。図2は軟寒天中に形成された代表的なコロニーを示す(図2)。

表3 細胞採取

症例	培養回数	採取細胞数	
		範囲	平均
膀胱癌	24	$2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$ 個	4.5×10^5 個
対 照	10	$4 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^7$ 個	2.5×10^5 個

表4 培養回数とその維持成功率

症例	培養回数		
	総数	細菌汚染	維持(%)
膀胱癌	24	11	13 (54)
対 照	10	1	9 (90)
総 計	34	12	22 (62)

図2 軟寒天培地中に形成されたコロニー(×40)

播種細胞数に対するコロニーの形成数、すなわちコロニー形成率は、膀胱癌症例6例で0.1~0.0015%であった(表5)。

(4) grade とコロニー形成との関係：検討した膀胱癌患者の腫瘍の組織学的悪性度とコロニー形成との関係では、G1は2例中0、G2は7例中5例(71%)、G3は4例中2例(50%)に、コロニー形成が認められた(表6)。

(5) 細胞診とコロニー形成との関係：同じく膀胱癌患者の細胞診とコロニー形成との関係では、細胞診I、IIの群は8例中4例(50%)に、III、IV、Vの群は5例中3例(60%)に、コロニー形成が認められた(表7)。

考 案

ヒト腫瘍組織より採取した細胞で所謂 stem cell assay 法を行う際には、培養する細胞は集簇しておらず、単細胞に解離していることが必要である。そのため、腫瘍組織に対する機械的細切や酵素処理等が必要となるが、これらの操作が細胞に傷害をおよぼし、コロニー形成を低下させている可能性もあり、また手技として時間がかかる等の欠点が考えられる。軟寒天培養が固形腫瘍細胞の培養より、血液細胞で先んじて用いられたのは、そのような細胞解離の処理が必要でなく、手技上の問題がなかったから、という経緯がある。したがって膀胱癌の剝離細胞の培養は、このような意味においても、また膀胱洗浄という非観血的な方法で

表5 コロニーの形成

症例	培養維持数	コロニー形成		
		有(%)	無	形成率(%) [※]
膀胱癌	13	7 (54)	6	0.1~0.0015 (6症例)
対 照	9	0 (0)	9	0

※コロニー形成率(%)=コロニー数/播種細胞数×100

表6 組織学的悪性度とコロニー形成の関係

悪性度	培養維持数	コロニー形成(%)
G1	2	0 (0)
G2	7	5 (71)
G3	4	2 (50)

表7 細胞診とコロニー形成の関係

細胞診	培養維持数	コロニー形成(%)
I・II	8	4 (50)
III・IV・V	5	3 (60)

検体を得られるという意味においても、きわめて合目的なものといえよう。

今回、我々が膀胱癌症例に対して、膀胱洗浄により得られた細胞数は、 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^7$ 個（平均 4.5×10^5 個）であった。同じ様な方法で、Stanisic と Buick³⁾ は平均 7.1×10^6 個の細胞を、Niell ら⁴⁾ は平均 9.8×10^6 個の細胞を集めることができたと報告しており、我々の結果は彼等の1/10以下であった。我々の印象では、腫瘍の大きな症例採取可能な細胞数も多い傾向があるように思われた。それ故、彼等の検討した症例の腫瘍の大きさと我々の症例との間に違いがあるのかもしれない。

ところで仮に5種類の制癌剤に対する感受性試験を行うとすると、最低 4×10^5 個程度の生細胞が必要であるが²⁾、我々の症例では約半数がこの条件を満たしているにすぎなかった。したがって、膀胱剝離細胞を用いた stem cell assay 法を膀胱癌症例に対し実際に応用するには、採取細胞数を増やすために、ある程度症例の選択が必要であると思われた。

培養の維持では、膀胱癌症例が対照症例に比較して、細菌汚染による中断が目立った。腫瘍表層の壊死組織が細菌増殖の温床となっている可能性がある。我々は細胞採取に際し特に前処置を行わなかったが、採取前の抗生剤投与による尿の無菌化とか、カテーテル留置患者からの検体採取は避ける等の対策が、培養の維持成績を向上させるために、必要であると思われた。

コロニー形成は、我々の成績では膀胱癌症例の54%に認められ、対照群では認められなかった。Stanisic と Buick³⁾ は膀胱癌症例の78%に、Niell ら⁴⁾ は同じく35%にコロニー形成を認め、対照群では、どちらもコロニー形成を認めなかったと報告し、我々の成績とほぼ一致している。軟寒天培地では一般的に、正常細胞でもコロニーを形成しうる可能もあると言われているが⁵⁾、上記の実験成績からおおよび、コロニーを形成した細胞のパバニコロ染色による所見から見て、コロニーを形成した細胞は膀胱癌由来の細胞とほぼ考えてよいと思われた。

播種細胞数に対するコロニー形成率については、膀胱癌症例6例で0.1~0.0015%であり、Stanisic と Buick の報告(0.084~0.0002%)より若干良好な結果であった。他臓器の癌と比較しても、乳癌(0.9~0.004%)、胃癌(0.02~0.001%)など⁶⁾とほぼ同率であったが、桜本ら²⁾の腎癌の成績には及ばなかった。いずれにしても、通常の癌細胞株を用いたコロニー形成

率と比較すると低率であり、現時点では採取細胞数が極めて少いという先述の結果等より、コロニー形成率を増加させるための工夫も今後、必要であると思われる。

膀胱癌の grade コロニー形成との関係ははっきりしなかった。Stanisic と Buick³⁾ および Niell ら⁴⁾ も膀胱癌のコロニー形成能と stage, grade とは関連なしと言っている一方、癌性腹膜炎時の腹水細胞や、転移巣より採取した細胞の方が、より高いコロニー形成率を示すという報告もある⁷⁾。grade, stage, 細胞診とコロニー形成能との間に相関性があるか否かは、今後の検討に待たねばならない。

結 語

本実験では、膀胱剝離細胞の軟寒天培養が可能であることが確認できた。しかし、非侵襲性、簡便性という利点がある一方、採取細胞数が少く、細菌汚染の機会が多いというような問題点も明らかとなった。細胞採取方法や培地の組成等に、さらに改善が必要と思われた。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を頂いた大島博幸教授に感謝いたします。

本論文の内容は第71回日本泌尿器科学会総会において発表した。

本研究の一部は、昭和57年度文部省奨励研究の援助により行われた。

文 献

- 1) Hamburger, A.W. and Salmon, S.E.: Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197, 461—463, 1977.
- 2) 桜本敏夫, 三浦 猛, 窪田吉信: Stem cell assay による制癌剤感受性試験. 第1報. 軟寒天培地を用いた腎細胞癌の初代培養について. *日泌尿会誌*, 74, 1081—1085, 1983.
- 3) Stanisic, T.H. and Buick, R.N.: An in vitro clonal assay for bladder cancer: Clinical correlation with the status of the urothelium in 33 patients. *J. Urol.*, 124, 30—33, 1980.
- 4) Niell, H.B., Soloway, M.S. and Nissenkorn, I.: The clonogenic growth of cells derived from bladder barbotage in patients with transitional cell carcinoma of the bladder: A preliminary report. *J. Urol.*, 127, 668—670, 1982.
- 5) Sikic, B.I. and Taber, R.L.: Human tumor clonogenic assays, an overview: *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 6, 201—203, 1981.
- 6) 井上雄弘, 荒川昌亭, 小川一誠: Human tumor stem cell assay. 癌と化学療法, 9, 599—605, 1982.
- 7) Salmon, S.E.: Cloning of human tumor stem cells: Alan R. Liss, Inc., New York, 1980.

(1983年12月24日受付, 特別掲載)