ヒト腎細胞癌の異質性 (Heterogeneity) に関する研究

II: 培養細胞株 KU-2 の腫瘍形成能について

防衛医科大学校泌尿器科学教室 長 倉 和 彦
(主任: 中村 宏教授)HETEROGENEITY OF RENAL CELL CARCINOMA II: STUDIES ON
TUMORIGENICITY OF CULTURED CELL LINE KU-2

Kazuhiko Nagakura

Department of Urology, National Defense Medical College

(Director: Prof. H. Nakamura)

The heterogeneity in tumorigenicity of cell line KU-2 derived from human renal cell carcinoma was studied utilizing ten clone cell lines (N-2, 3, 5-11 and 13) of KU-2.

As an in vitro study on tumorigenicity, clonogenicity of the clones was determined in a soft agar culture. Single separated cells were inoculated 10^4 per ml in concentration. The plating efficiency (PE) of KU-2 was 45.7%, while the clones showed variety of PE, ranging from 6.8% to 54.9%. Of these clones, 4 clones, N-7 (PE=21.7%), N-8 (40.0%), N-10 (22.1%), N-13 (6.8%), and KU-2 were studied on their tumorigenicity in vivo. Twenty to fifty million cells of each clone were subcutaneously inoculated in 5-6 nude mice. KU-2, N-8 and N-10 formed visible tumors in 3/5, 2/6 and 3/6 of nude mice within 1-4 months after cell inoculation. However, no tumors grew in the nude mice in which N-7 or N-13 was inoculated. Histological examination of the tumors in nude mice showed some difference in differentiation of adenocarcinoma among 2 clones and KU-2. N-10 was less differentiated in glandular formation than N-8 and KU-2. Finally, to analyze the interaction between tumorigenicity and susceptibility to natural killer (NK) activity, lysis of the clones and KU-2 mediated by NK cells in human peripheral blood lymphocytes (PBL) were determined by ^{51}Cr -releasing assay. In experiments using PBL of 3 young men activated by 1000 IU/ml Interferon- α , N-8 was always most resistant to NK activity, followed by N-10, KU-2, N-7 and N-13. The average total lytic units of PBL against N-8 was about 1/3 of that against N-7.

The results of this study indicate that KU-2 cell line consists of heterogeneous cell populations with different degrees of tumorigenicity and of susceptibility to NK cell mediated cytotoxicity. The clones tumorigenic in nude mice were resistant to NK activity, which suggests acquisition of resistibility to NK activity is required of the cells to be tumorigenic in vivo. In addition, the presence of less tumorigenic and highly NK-sensitive clones in highly tumorigenic and less NK-sensitive cell line indicates that cell differentiation always occurs in a part of the tumor cells.

要旨: ヒト腎癌細胞由来培養株 KU-2 の heterogeneity 解析の一環として, KU-2 とクローン株 N-2, 3, 5-11, 13 の腫瘍形成能および natural killer (NK) 細胞に対する感受性について検討した。

In vitro における clonogenicity, 即ち軟寒天中のコロニー形成をみると, 10^4 コ/ml の細胞濃度において KU-2 は 45.7% と高い plating efficiency (PE) を示したが, クローン株では 6.8%~54.9% と, クローンにより差がある事が判明した。そこで, これらより N-7 (PE=21.7%), N-8 (40.0%), N-10 (22.1%), N-13 (6.8%) を選び, KU-2 と共にヌードマウスでの腫瘍形成能について検討した。2~5 $\times 10^7$ コの細胞を側腹部に皮下注した結果, KU-2, N-8, N-10 では各々 3/5, 2/6, 3/6 に腫瘍形成を認めたが, N-7, N-13 では全く腫瘍形成を認めなかった。次いで, 腫瘍形成能と NK 感受性との関連について解析するため, ヒト PBL 中の NK 細胞による細胞障害作用を ^{51}Cr -releasing assay により検討した。その結果, NK 細胞による障害に対して最も抵抗性を示したのは N-8 で, 次いで N-10, KU-2, N-13, N-7 の順であった。

以上, KU-2が異なる腫瘍形成能を持つ細胞より成ること, 腫瘍形成能はin vitroにおけるclonogenicityとNK抵抗性に正の相関を示すことが判明した。更にparent cellであるKU-2は高い腫瘍形成能を示しており, これからN-7, N-13の様な腫瘍形成能の低いクローンが分離されたことは, 腫瘍細胞の一部はより分化型へと移行する可能性があると考えられた。

結 言

腫瘍は多くの場合, 単一のクローンより発生するが, 発育に伴いmutationとクローン選択を繰り返す, 結果として, 臨床的な腫瘍では, 組織レベルあるいは細胞レベルのheterogeneityを獲得すると考えられる¹⁾²⁾。この様な腫瘍のheterogeneityの存在は, 実に多岐に汎っており, 形態³⁾, 悪性度^{4)~7)}, 機能⁸⁾⁹⁾, 抗原性¹⁰⁾, 薬剤感受性¹¹⁾, natural killer細胞(以下NK細胞)に対する感受性¹²⁾など, あらゆる点に差異が見い出されると考えても過言ではない。これらの研究は, これまでも, 結果として診断, 治療に大きく貢献していることは言うまでもないが, 近年の細胞培養の技術の向上に伴い, 培養レベルでの解析が行われ, 急速な進歩をとげている。今回対象として用いた腎細胞癌は, 泌尿器科領域の重要腫瘍の一つであるが, その特徴として, 比較的増殖がゆるやかで, エリスロポエチンを産生することがあり, 有効な化学療法剤がなく, インターフェロンや性ホルモンが有効であることなどが挙げられる。しかしながら, これらの特徴がすべての腎細胞癌に, あるいはすべての細胞に共通なのではなく, 個々の細胞レベルでは異なると予想される。そこで, 腎細胞癌においても, heterogeneityの存在を解析し, 癌の進展形式の解明をはじめ, 診断, 治療に有用な情報の収集が必要であろう。著者は, 腎細胞癌のheterogeneityの研究の一環として培養腎癌細胞株であるKU-2より13のクローンを分離し, 細胞の形態, 染色体, 細胞周期がクローンによって異なり, 長期培養株においても細胞レベルでのheterogeneityが存在することをすでに報告したが¹³⁾, 今回, それらのクローンの腫瘍形成能および腫瘍形成能とNK細胞感受性との関連について検討した。その結果, クローンにより腫瘍形成能が異なること, また腫瘍形成能はNK細胞感受性と逆相関を示すことが判明したので報告する。

材料および方法

今回用いたのは, ヒト腎細胞癌細胞株KU-2と, そのクローンN-2, 3, 5~11, 13で, それらの分離過程および染色体, 細胞周期, 形態についてはすでに報告¹³⁾した。KU-2クローン株は分離後, 初期の段階で液体室素にて冷凍保存したものを解凍し用いた。培養液および

培養条件は前回と同様で, Eagle's MEM(日水製薬, 東京)に10%牛胎児血清(FCS, GIBCO, New York)および100 μ g/ml ストレプトマイシン, 100U/ml ペニシリンGを加えた培地を用い, 5%CO₂存在下に37℃にて培養した。

1) 軟寒天培地

KU-2およびクローンN-2, 3, 5~11, 13について, アガロース内でのコロニー形成率を算定した。予め滅菌後, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺-free Dulbecco PBS(以下PBS)にて5% W/Vとしたアガロース(生化学工業, 東京)を, ゆっくり加熱し, 溶解したところで約50℃に加温した培養液を9倍量加え, 0.5%アガロースとし, 数回ピペティングののち直ちに ϕ 35mm ペトリ皿(Lux 5217, Miles Laboratory Inc., Illinois)に1mlずつ分注, 室温に放置しfeeder layerとした。細胞は, 0.25%トリプシンおよび0.01% EDTAにて剥離および単離し, 予め3 $\times$ 10⁴cells/mlとなる様, 細胞濃度を調整しておく。尚, 単離細胞率90%以下のものは除外し, 再検の対象とした。feeder layerとして用いた0.5%アガロースの一部を, 50℃恒温槽に保温しておき, その3mlを, スピッツに分注した1.5mlの細胞浮遊液と混和, 数回ピペティングを行ったのち, その1mlずつをすでに固型化したfeeder layerの上に重層した。以後, CO₂インキュベーター内にて培養, 14日後, 20コ以上の細胞より成るcolonyを数え, controlで除してコロニー形成率を算定した。尚, 本実験はtriplicateで, 2回ずつ行った。

2) ノードマウスへの移植

175cm²のフラスコ(Falcon 3028, B.D., California)で培養したクローンおよびKU-2細胞に対し, 2日毎培養液交換を行い, ほぼconfluentとなったところでPBSにて洗浄, 約5mlの0.25%トリプシン(千葉血清, 千葉)を加え, リンスしたのち吸収除去する。約1分間室温に放置したのち, 先述の培養液を約5ml加えて酵素活性を停止させ, ラバーポリスマンにて細胞を剥離し, 1,000rpm 5分間遠沈したのち, 約0.2mlの細胞浮遊液として, 3~5週齢のノードマウスの側腹部に皮下注した。尚, 細胞数は, 2~5 $\times$ 10⁷コ/匹とした。経過観察期間は6カ月とし, そののち腫瘍を摘出, 組

織学的な検討を行った。

同時に行った doubling time の測定は、24well の multidish (Nunc, Denmark) の各 well に 1×10^4 コずつの細胞を 1ml の培養液と共に分注し、48hr 以降、24 hr 毎カウントし、48hr から 120hr までの平均の doubling time として算定した。

3) Natural Killer 細胞による細胞障害解析

3 人の正常人より採取した末梢血の NK 細胞に対する KU-2 およびクローンの感受性を、 ^{51}Cr -releasing assay にて検討した。Ficoll-Rampacon (Lymphoprep[®], Nyegaard and Co., Oslo) による比重遠心法¹⁴⁾により分離した末梢血リンパ球 (以下 PBL) を effector cell (EC) とした。分離した EC はヘパリン化ハンクス液にて洗浄、10% FCS 添加 RPMI 1640 (GIBCO, New York) に 10^7 コ/ml となるよう浮遊させ、15 時間培養した。その際、EC の活性化のため、 10^3 IU/ml の α -インターフェロン (Wellferon[®], 住友化学, 東京) を加えた。

標的細胞 (TC) である KU-2 およびクローンはそれぞれ $1.0 \sim 1.5 \times 10^6$ コずつペトリ皿 ($\phi 60\text{mm}$) にとり、 $100\mu\text{Ci}$ の放射性クロム酸ナトリウム (第一化学薬品, 東京) を含む培養液にて 2 時間静置培養して標識した。標識後、TC をトリプシンにて単離し、培養液にて 3 回洗浄、free- ^{51}Cr を除去したのち、最終的に 10^5 cells/ml となる様培養液にて調整した。これを、 $100\mu\text{l}$ (10^4 cells) ずつ 96well マイクロテストプレート (Falcon, California) の各 well に分注した。EC は 5×10^6 cells/ml のものを、 $100\mu\text{l}$, $50\mu\text{l}$, $24\mu\text{l}$ のいずれか加え、更に培養液にて総量 $200\mu\text{l}$ となる様調節、EC:TC を、50:1, 25:1, 12:1 とした。EC を含まない TC のみの well に、培養液又は 2% Triton-X を加えて $200\mu\text{l}$ とし、TC からの ^{51}Cr 自然放出および最大放出を測定した。マイクロテストプレートを 37°C にて 4 時間培養し、この上清 $100\mu\text{l}$ をプラスチックチューブに分注、ガンマカウンターにて放射活性を測定した。% cytotoxicity は以下の如く算定した。

$$\% \text{cytotoxicity} = \frac{\text{実験放出} - \text{自然放出}}{\text{最大放出} - \text{自然放出}} \times 100$$

更に、 10^4 コ TC に対して 30% cytotoxicity を得るのに必要な EC を 1 lytic unit (LU) とし、更に以下の如く total lytic unit (TLU)¹⁵⁾ を求め、KU-2 およびクローンの各 PBL に対する感受性を比較した。

$$1 \text{ TLU} = \frac{10^6 \text{ EC}}{1 \text{ LU of EC}}$$

結 果

1) 軟寒天培地中の clonogenicity

KU-2 クローンの軟寒天中の clonogenicity をみると、parent cell である KU-2 とほぼ同様の高いコロニー形成率を示したのは、N-8, N-11 で、他のクローンは KU-2 よりコロニー形成率が低く、特に N-5 や N-13 は著明な低値を示した。以上より、腫瘍形成能の実験対象として KU-2 とともに N-7, 8, 10, 13 を選択した (Table 1)。

2) ノードマウスにおける腫瘍形成能

生後 3 ~ 5 週齢のノードマウスの皮下に、 $2 \sim 5 \times 10^7$ cells の KU-2, N-7, N-8, N-10, N-13 を皮下注したところ、KU-2 では 5 匹中 3 匹で腫瘍の形成がみられ、その他、N-8 では 3/6, N-10 で 2/6 の腫瘍形成率であったが、N-7 あるいは N-13 では全く腫瘍形成はみられなかった。また N-8 では皮下腫瘍と同時に、腫瘍の腹腔内への

Table 1 Clonogenicity of KU-2 and its clones in soft agar culture

cell lines	*colonies/cells plated mean $\pm$ S.D.(%)
KU-2	47.5 $\pm$ 8.9
N-2	24.4 $\pm$ 3.1
N-3	29.5 $\pm$ 4.2
N-5	7.5 $\pm$ 0.8
N-6	30.4 $\pm$ 3.1
N-7	21.7 $\pm$ 6.6
N-8	54.9 $\pm$ 3.9
N-9	12.6 $\pm$ 2.5
N-10	22.1 $\pm$ 2.7
N-11	40.0 $\pm$ 0.8
N-13	6.8 $\pm$ 1.3

* 10^4 cells were plated with 1 ml of 0.33% agarose onto feeder layer in 35 mm petri dish.
Colonies including 20 cells or more were counted. (n=8)

Table 2 Tumorigenicity of KU-2 and its clones in nude mice

cell lines	doubling time (hr)	tumor potential (* a / b)
KU-2	23.3	3 / 5
N-7	27.6	0 / 6
N-8	24.0	2 / 6
N-10	27.9	3 / 6
N-13	28.2	0 / 7

* a = number of mice with visible tumor
b = number of experimented mice had subcutaneous inoculation of $2 \sim 5 \times 10^7$ cells

浸潤，および癌性腹水を認めた (Table 2, Fig. 1, 2). 腫瘍の長径が1cm となるのに要した時間は，KU-2で1～4カ月，N-8, N-10では2～3カ月と差はなかった. 同時に測定した doubling time は，KU-2およびN-8がやや短い傾向を示したが，有意差はなかった.

3) インターフェロン刺激 NK 細胞に対する感受性
1,000IU/ml の α -インターフェロンで刺激した正常人 PBL の KU-2およびクローンに対する cytotoxicity をみると，EC:TC=12:1では11～58%，25:1では20～84%，50:1では31～97%であった. これを TLU により比較すると，N-7が最も NK 感受性が高く，平均10.3，次いで N-13の7.7, KU-2の7.1で，N-10, N-8は NK に対し感受性が低く5.2，および3.7であった. さらにこれを各個人の PBL について比較すると，各々N-13>N-7>N-10>KU-2>N-8, N-7>KU-2>

N-13>N-10>N-8および N-13>N-7>KU-2>N-10>N-8であり，いずれの PBL の NK 活性に対しても N-8, N-10がより抵抗性であることが示された (Table 3).

Table 3 Comparative sensitivity of KU-2 and its clones to natural killer activity of normal human PBL

cell lines	*total lytic unit (TLU)			
	exp. 1	exp. 2	exp. 3	mean $\pm$ SE
KU-2	2.9	11.5	7.0	7.1 $\pm$ 2.0
N - 7	4.5	15.9	10.4	10.3 $\pm$ 2.7
N - 8	2.1	3.4	5.1	3.7 $\pm$ 0.8
N -10	3.3	6.3	6.1	5.2 $\pm$ 0.8
N -13	5.3	6.6	11.1	7.7 $\pm$ 1.4

*TLU =
$$\frac{10^6(\text{EC})}{\text{1 lytic unit (number of EC necessary for 30\% lysis of } 10^4 \text{ TC)}}$$

Fig. 1 Photograph of a nude mouse bearing N-8 cells, showing abdominal distension due to carcinomatous ascites.

Fig. 2 Photograph of a nude mouse bearing KU-2 cells (5 months after cell inoculation).

Fig. 3 Microscopic view of the tumor of KU-2 cells in nude mouse (reduced from $\times 200$, H.E. stain).

Fig. 4 Microscopic view of the tumor of N-8 cells in nude mouse (reduced from $\times 200$, H.E. stain).

Fig. 5 Microscopic view of the tumor of N-10 cells in nude mouse (reduced from $\times 100$, H.E. stain).

4) ノードマウス移植腫瘍の組織学的所見

ノードマウスに移植された KU-2 および クローン N-8, N-10 の固形腫瘍組織所見では、基本的にいずれも granular cell が密に配列する solid な腫瘍であったが、KU-2 では一部に、N-8 には腫瘍の大部分に腺腔様構造が認められ、組織学的所見上、N-8 は KU-2 や N-10 に比べ、やや分化度が高い傾向を示した (Fig. 3, 4, 5).

考 察

腫瘍細胞の腫瘍形成能や転移性における heterogeneity については、これまでも多くの報告がみられ、腫瘍としての potential に細胞レベルの差があることが認められている^{4)~9)}。今回の結果は、腎癌培養株においてもこの様な heterogeneity が存在することを示した。軟寒天培地中のコロニー形成能、すなわち anchorage independency (以下⁺AI) は、in vitro における腫瘍 potential の指標として用いられている。Danielson ら⁴⁾は、マウス乳癌細胞 WAZ-2T を用いて、⁺AI のクローンと、⁻AI (anchorage dependent) のクローンを分離し、⁺AI 細胞の方がノードマウスでの皮下腫瘍形成能および肺へのコロニー形成率のいずれも ⁻AI 細胞より高いことを示した。また、Thomassen ら⁷⁾は、⁻AI で non-tumorigenic なマウス CAK 細胞を用いて、それらより ⁺AI 細胞が出現し、更に ⁺AI 細胞の中から腫瘍形成能を有する細胞が出現することを観察し、腫瘍形成能の出現には ⁺AI であることが必要であり、また ⁻AI から ⁺AI、更に tumorigenic となる過程が一連のものであると述べている。今回の我々の結果は、培養株より無作為に分離したクローン株が異なったコロニー形成能を示し、その腫瘍 potential の異なることを示唆した。そこで、それらより high

potential クローンとして N-10, low potential クローンとして N-13, 更に平均的なクローンとして N-7, N-10 をえらび KU-2 とともにノードマウスでの腫瘍形成能について検討した。その結果、コロニー形成能の低いクローン N-13 と N-7 では腫瘍形成を認めなかった。これは Thomassen ら⁷⁾の結果とほぼ一致するものであるが、⁻AI であっても、あるいはコロニー形成率が低い場合も、能力は低いが腫瘍形成能は存在するとの報告もあり⁵⁾⁶⁾、今回の結果のみをもって N-7, N-13 に腫瘍形成能が全く存在しないとは言えない。しかしながら、現時点においては、N-8, N-10 に比較して、N-7, N-13 の腫瘍としての potential は著明に低いことは明らかである。N-8, 10 のような高い腫瘍形成能を持つ細胞と、N-7, 13 のような低い腫瘍形成能の細胞が一つの細胞株に共存するということは、腫瘍の進展や転移の形成を考える上で一つの theory を示していると考えられるが、low potential 細胞と high potential 細胞の発生ないしは移行がどの様に行われるか、その解明は今後の課題である。通常、腫瘍の発生、進展を考えると、悪性度はより高度なものへと移行してゆくとの考え方が一般的であろう²⁾。すなわち、クローン選択により、より浸潤性の高い細胞、ないしは、より増殖の早い細胞のみが生き残り、増殖のゆるやかな、悪性度の低い細胞は淘汰される可能性が高い。すでに報告した KU-2 細胞の heterogeneity に関する第 1 報¹³⁾において、これらのクローンのいずれも染色体は異数体であり、正常細胞に比し染色体所見上最も悪性度の高い細胞となっていることを述べた。更に、マーカー染色体の所見を比較すると、クローンはそれぞれ異なるパターンを示したが、同時に多くの共通染色体を有し、これらがいずれも単一のクローンから発生したものであると考えられた。今回の結果では、KU-2 はそのクローンと比較して clonogenicity, 腫瘍形成能の最も高度なクローンとほぼ一致した傾向を示した。すなわち KU-2 においては、クローン分離後、N-8 や N-10 の様な high potential なクローンが選択され、N-13 の様な low potential クローンは、淘汰されたものと考えて良いであろう。これは、KU-2 が、この間不変であったと仮定すると、KU-2 から N-13 の様な low potential クローンを常に生まれては消滅していることを示すものであり、これを利用して、外部刺激により high potential な細胞から low potential あるいは分化度の高い細胞を誘導することが現実に可能であることを示唆している。

一方、ヌードマウスは、胸腺という細胞免疫中枢の欠如ゆえ腫瘍移植のモデルとして広く応用されているが、すべての細胞免疫能が欠如しているのではなく、正常マウスに比べNK細胞活性はむしろ高いことが知られている¹⁶⁾¹⁷⁾。NK細胞の腫瘍発生および発育における作用については多くの研究がなされているが^{12)16)~21)}、いわゆる免疫監視機構の重要な一員として、特に腫瘍発生初期、または転移の段階での抗腫瘍作用が認められている¹⁸⁾¹⁹⁾。それゆえ、ヌードマウスに移植された腫瘍細胞の全てが腫瘍を形成するわけではなく、また、ヌードマウスにおいてはほとんど転移巣を認めないことなども、NK細胞の関与が考えられている。そのため、今回の結果においても、クローン間にみられた差が、各々の持つ腫瘍形成能単独によるものか、あるいはホスト側の免疫因子が関与しているのか、検討が必要であろう。そこで、腫瘍形成能に差の認められたクローンに対し、ヒトPBL中のNK活性に対する感受性解析を試みた。その結果、腫瘍形成を認めたKU-2および2つのクローンは、腫瘍形成を認めなかった2つのクローンに比べ、NK細胞活性に対する感受性が低く、NK細胞に抵抗性を獲得することが腫瘍形成能における重要な因子であることを強く示唆した。しかしながら、今回の結果はヒトNK細胞に対するものであり、より機能の低いヌードマウスのNK細胞においても同様とは限らず²²⁾²³⁾、今後更なる検討が必要である。

担癌状態におけるNK細胞は、多くの場合、自己癌細胞に対して殆んど細胞障害を示さず²⁴⁾²⁵⁾、また自己癌細胞以外に対してもNK活性が低く、それは何らかの原因により、NK細胞の成熟ないしは機能が障害されたことによると言われており、NK細胞の機能低下が腫瘍の進展の大きな要因の一つと考えられている²¹⁾。しかしながら、今回の結果が非特異的なNK細胞の作用発現により得られたものとする、NK細胞による免疫監視機構からのがれ得るということは、NK細胞の機能低下のみでなく、癌細胞が自らNK活性に対する抵抗性を獲得する事が重要であると考えられる。この様に、高い腫瘍形成能を示す細胞がNK活性に対して抵抗性であるとの報告は、これまでも散見されるが¹²⁾²⁰⁾、今回の結果は、NK感受性の低いKU-2細胞から、より感受性の高いクローンが得られており、これらのクローンを更に詳細に検討することにより、NK活性に感受性となるメカニズムが解明され、腫瘍の治療における有用なデータを供するものと考えら

れた。

稿を終わるにあたり、本研究について御援助、御協力いただいた琉球大学泌尿器科学教室、早川正道助教授ならびに防衛医科大学校泌尿器科学教室諸兄に深謝するとともに、終始御指導、御校閲を賜った防衛医科大学校泌尿器科学教室、中村 宏教授、慶応義塾大学泌尿器科学教室、田崎 寛教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Fialkow, P.J.: Clonal origin and stem cell evolution of human tumors. *Genetics of human cancer*, p. 439, Raven Press, New York, 1977.
- 2) Nowell, P.C.: The clonal evolution of tumor cell population. *Science*, 194, 23—28, 1976.
- 3) Shapilo, J.R., Yung, W.A. and Shapilo, W.R.: Isolation, karyotype and clonal cells from heterogenous subpopulation of human malignant gliomas. *Cancer Res.*, 41, 2349—2359, 1981.
- 4) Danielson, K.G., Anderson, L.W. and Hosick, H. L.: Selection and characterization in culture of mammary tumor cell with distinctive growth properties in vivo. *Cancer Res.*, 40, 1812—1817, 1980.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
 - 12) Kawase, I., Urdal, D.L., Brooks, C.G. and Henney, C.S.: Selective depletion of NK cell activity in vivo and its effect on the growth of NK-sensitive and NK-resistant tumor cell variants. *Int. J. Cancer*, 29, 567—574, 1982.
 - 13) 長倉和彦: 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. *日泌尿会誌*, 75, 431—439, 1984.
 - 14) Boyum, A.: Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21, 77—89, 1968.
 - 15) Ortaldo, J.R., Bonnard, G.B. and Herbermann, R.B.: Cytotoxic reactivity of human lymphocytes cultures in vitro. *J. Immunol.*, 119, 1351—1357, 1977.
 - 16) Riesenfeld, I., Orn, A., Gidlund, M., Axberg, I., Alm, G.V. and Wigzell, H.: Positive correlation between in vitro NK activity and in vivo resistance towards AKR lymphoma cells. *Int. J. Cancer*, 25, 399—403, 1980.
 - 17) Gorelik, E., Wiltrout, R.H., Okumura, K., Habu, S. and Herberman, R.B.: Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer*, 30, 107—112, 1982.
 - 18) Richie, J.P., McDonald, J. and Gittes, R.F.: Resistance to intravenous tumor metastases in the athymic nude mouse: A paradoxical response. *Surgery*, 90, 214—220, 1981.
 - 19) Hanna, N. and Fidler, I.J.: Expression of metastatic potential of allogenic and xenogenic neoplasms in young nude mice. *Cancer Res.*, 41, 438—444, 1981.
 - 20) Cook, J.L., Hibbs, J.B. Jr. and Lewis, A.M. Jr.: DNA virus-transformed hamster cell-host effector cell interactions: Level of resistance to cytolysis correlated with tumorigenicity. *Int. J. Cancer*, 30, 795—803, 1982.
 - 21) Sibbitt, W.L. Jr., Bankhurst, A.D., Jumonville, A.J., Saiki, J.H., Saiers, J.H. and Doberneck, R. C.: Defects in natural killer cell activity and interferon response in human lung carcinoma and malignant melanoma. *Cancer Res.*, 44, 852—856, 1984.
 - 22) Hansson, M., Bakacs, K.K.T., Kiessling, R. and Klein, G.: Intra- and interspecies reactivity of human and mouse natural killer (NK) cells. *J. Immunol.*, 121, 6—12, 1978.
 - 23) Nunn, M.E. and Herberman, R.B.: Natural cytotoxicity of mouse, rat and human lymphocytes against heterologous target cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 765—771, 1979.
 - 24) Vanky, F., Argov, S.A., Einhorn, S.A. and Klein, E.: Role of alloantigens in natural killing. *J. Exp. Med.*, 151, 1151—1165, 1980.
 - 25) Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z. and Rosenberg, S.A.: Lymphokine-activated killer cell phenomenon. *J. Exp. Med.*, 155, 1823—1841, 1982.

(1984年8月18日受付)