

人癌組織の器官培養に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4624

人癌組織の器官培養に関する実験的研究

金沢大学医学部第2外科学講座 (主任: 宮崎逸夫教授)

野 口 昌 邦

(昭和50年8月22日受付)

本論文の一部は、第33回日本癌学会総会 (1974)で発表した。

人癌の組織培養として、単層培養による継代培養法が広く活用されているが、このような継代培養では、その細胞を取り出したもとの組織の特性は細胞の増殖過程で急激に変化したり、あるいは最初の細胞集団中から特定の細胞の選択淘汰が行われたりすることにより消失するが、器官培養はもとの組織の特性を保持させながら、もとの生体内におけると同様な増殖をおこさせることができるとされている¹⁾。したがって、人癌の組織培養による臨床的並びに実験的研究に器官培養を用いることは極めて有意義なことと思われ、既に、一部の悪性腫瘍の制癌剤感受性試験及び内分泌系腫瘍に対するホルモン感受性試験等に臨床的に応用されるようになってきた²⁾。しかし人癌組織の培養は全ての癌について十分な期間、良好な状態で行うことはいまだ困難であって、歴史的にも数多くの器官培養法が考案され試みられてはいるが、いまだ満足すべき方法は確立されていないのが現状である。器官培養法は培養器内における組織片の配置様式及び培養液の種類により分類されているが、組織片の配置様式から見ると、組織片を気相と液相の間におく培養方法 (Culture at gas-liquid interface) が最も優れているとされている³⁾。組織片を気相と液相の間に置く方法の一つとして、Leighton^{4)~7)}は、セルロース・スポンジを基質として用いて、培養組織の三次元的培養を可能にした。しかし、このセルロース・スポンジを用いる方法は、スポンジの複雑な処置を必要とする難点がある。Kalus^{8)~11)}らは、組織片を培養液の上に支える基質として Human Fibrin Foam (以下、H.F.F. と略す)を用いた。H.F.F. はヒトのフィブリノーゲン溶液を凍結乾燥して作られたスポンジ状の物質で、手術の際の局所止血剤として使用されているものであるが、これを器官培養に用いると、セルロース

・スポンジとは違って培養に使用するための前処置が簡単であり、生物学的にも培養組織によく適合し、培養液の浸透性が良好で、培養中ゲラチン・スポンジのように自己溶解することもなく、更に培養組織は H.F.F. 内へよく浸潤して三次元的培養が可能であって、組織標本の作製も H.F.F. と共にできるなどの優れた利点があるとされている。

著者は、Kalus^{8)~11)}らの H.F.F. を用いた静置器官培養法をヒト胃癌組織を用いて追試検討し、次いで、基質としての H.F.F. の優秀性を生かすと共に、回転による洗滌作用により速やかな培養組織老廃物の除去、酸素供給をはかる回転器官培養法を考案し、各種の人癌組織の培養を行い、更に、高圧酸素の人癌組織培養に及ぼす影響について検討を加え、二、三の知見をえたので報告する。

実験方法及び実験結果

実験 I. H.F.F. を用いた静置器官培養

Kalus^{8)~11)}の静置器官培養法に準じた方法により、胃癌を主とする人癌組織の培養を行い、器官培養における基質としての H.F.F. に検討を加える。

1. 実験方法

1) 培養液の調合 Eagle's MEM 培地ニッサン① (日水製薬) の3.76g を再蒸留水380ml に溶かし、高圧滅菌器 (Model s-90N, 富永製作所) にて滅菌 (圧力1 kg/cm², 120°C, 15分間) した。L-グルタミン (協和醗酵) の0.117g を再蒸留水20ml に溶かし、孔径0.45 μ のミリポアフィルターにて陰圧濾過滅菌した。Eagle's MEM 培養液にL-グルタミン溶液、仔牛血清 (千葉血清) 100ml 及び AB-PC (ピクシリン, 明治製菓) 2.5mg を添加し、更に重炭酸ナトリウム (メイロン, 大塚製薬) を添加して、pH を

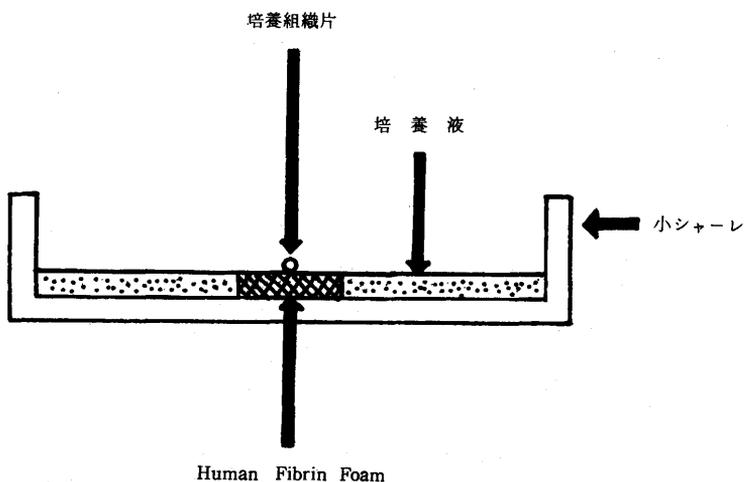


図1 静置器官培養法

7.2に調整し、培養液500mlを調合した。

2) 基質 "Sevac" の H.F.F. (Institute of Sera and Vaccines, Messrs. Sevac, Šarišské Michalany, Czechoslovakia より直接輸入) を用いた。H.F.F. をカミソリにて1.0×1.0×0.3cmの切片に作製し、乾熱滅菌器 (Type ES-4, ヤマト科学器械) にて150°C、3時間、滅菌したものを使用した。

3) 培養組織手術時に摘出された人癌組織を眼科用ハサミあるいはカミソリで無菌的に線維組織及び壊死組織を取り除き、肉眼的に癌組織と思われる部位から約1立方mmの組織片を作製し、培養組織とした。残りの人癌組織は対照として、10%ホルマリンに固定した。尚、本実験では癌細胞の同定が比較的容易であり、且つ、無菌状態の組織をえるため、主に肉眼的に転移の明らかな領域リンパ節を使用した。

4) 培養方法 培養液約5mlを直径5cm、深さ1cmの小シャーレの中に入れ、これにH.F.F.切片を浸して、手術時より可及的速やかに作製した組織片をH.F.F.の上に置く。組織片は気相と液相の中間に位置するように留意した(図1)。次いでこの小シャーレを培養器(トキワの炭酸ガス細胞培養装置、CO-MINI)内の培養棚の上に移す。培養器内は空気95%、炭酸ガス5%からなる混合ガスを流し、温度37°C、湿度95%以上に保持した。培養中、pHメーター(M7、日立堀場)の監視下に培養液がpH7.2及至7.4になるように炭酸ガス流量を調節した。培養期間は、1、2、3、4日である。

5) 培養状態の判定 培養終了後、組織はH.F.F.と共に、10%ホルマリンで固定し、パラフィンで包埋

表1 培養組織の判定基準

(I) Good (G)	1) 細胞分裂像を認める場合。 2) 培養前の組織に極めて類似した組織形態を示す場合*。
(II) Fair (F)	1) 核および細胞質が完全に保存され、ことに核小体が保存されている場合。 2) 細胞の生長能を支持する細胞質の好塩基性が保たれている場合。
(III) Poor (P)	1) 細胞質が顕著に顆粒性であり空胞化を示す場合。 2) 通常好塩基性である細胞の細胞質が好エオジン性である場合。 3) 機械的外傷によらない細胞質の崩壊を認める場合。
(IV) Dead (D)	1) 核の濃縮・崩壊をとまなう場合。 2) クロマチン顆粒の消失をとまなう核の均質化を認める場合。 3) 核の空胞化を認める場合。

(*印以外はすべて Kosse ら¹²より引用した)

後、3及至4μに組織を薄切し、ヘマトキシレン・エオジン染色した。培養状態は、Kosse¹²⁾の「固定標本中における細胞活性および死の形態学的認識」を参考にした表1の判定基準に従って、組織形態学的に判定した。

2. 実験結果

胃癌10例の静置器官培養を行ったが、その培養結果は表2に示す如くであった。即ち、1日目でG.及びF.

表2 H.F.F. を用いた静置器官培養 (空気95%, 炭酸ガス5%)

Patient	Age	Sex	Primary tumor	Metastasis taken	Evaluation			
					1 day	2 days	3 days	4 days
1) T. T.	38	F	Stomach Adenocarc. simplex medullare	Lymphnode	P	D	D	D
2) T. N.	70	M	Adenocarc.	Lymphnode	D	D	D	D
3) M. S.	69	M	Adenocarc. tubulare papillare	Lymphnode	D	D	D	D
4) M. O.	55	M	Adenocarc. scirrhosum	Lymphnode	P	D	D	D
5) M. T.	59	F	Adenocarc. tubulare scirrhosum	Lymphnode	P	D	D	D
6) Y. S.	68	M	Adenocarc. tubulare scirrhosum	Lymphnode	P	D	D	D
7) M. H.	53	F	Adenocarc. mucocellulare muconodulare	Lymphnode	P	D	D	D
8) H. U.	29	M	Adenocarc.	Cranium	D	D	D	D
9) I. T.	47	M	Adenocarc. tubulare	Lymphnode	D	D	D	D
10) O. T.	49	M	Adenocarc. tubulare medullare	Lymphnode	P	D	D	D

と判定されたものはなく, Pが10例中6例, Dが10例中4例であり, 2, 3, 4日目では多くの癌細胞において細胞質の崩壊, 核の濃縮・崩壊, クロマチン顆粒の消失をともなう核の均質化の所見が認められ, その判定は全例Dであり, 総じて本法による培養成績は不良であった. しかし一部の培養組織片において癌細胞の Viability が不良で, Dと判定されたにもかかわらず, H.F.F. 内へ浸潤する如き組織像が認められ, 癌組織は H.F.F. の上で三次元的培養が可能であることを示した (図2).

3. 少 括

Kalus ら^{8)~11)}の方法に準じて, 硬性癌を含む胃癌10例の静置器官培養を行ったところ, その培養結果は

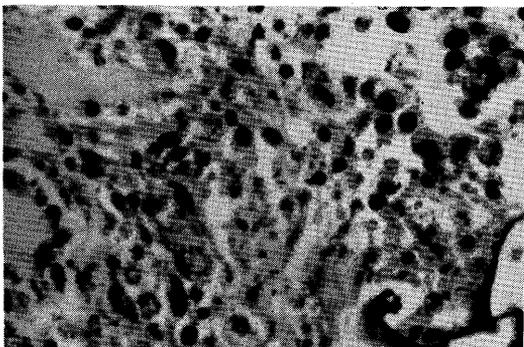


図2. 症例 H.U. (胃癌, 培養1日目)
癌細胞の Viability は不良であるが, H.F.F. (右下) への浸潤が認められる. (H. & E. 染色, ×300)

不良であった. しかし, 一部の培養組織片においては, 癌細胞の Viability が不良にもかかわらず, 癌細胞が H.F.F. 内へ浸潤する如き組織像が認められ, H.F.F. の上で組織片の三次元的培養が可能であることを確認しえた. したがって, H.F.F. は他の適当な培養液及び培養方法により, 器官培養における理想的な基質となりうる可能性が示唆された.

実験Ⅱ. H.F.F. を用いた回転器官培養

人癌組織の回転器官培養法の確立, 即ち器官培養における基質としての H.F.F. の優秀性を生かすと共に, 回転による洗濯作用により速やかな培養組織老廃物の除去, 酸素供給をはかる回転器官培養法を考案し¹²⁾, 人癌組織の培養を行う.

1. 実験方法

1) 培養液の調合 199培地ニッサン (日水製薬) の3.96g を再蒸留水400ml に溶かし, 孔径0.45 μ のミリポアフィルターにて陰性濾過滅菌した. 仔牛血清 (千葉血清) 100ml, インシュリン (イスジリン, 清水製薬) 60i.u., AB-PC (ピクシリン, 明治製薬) 2.5 mg を添加し, 更に重炭酸ナトリウム (メイロン, 大塚製薬) を添加して, pH を7.2に調整し, 培養液500 ml を調合した.

2) 基質 H.F.F. をカミソリにて 2.5×1.0×0.3 cm の切片に作製し, 150°C, 3時間, 乾熱滅菌した.

3) 培養組織 実験Ⅰと同様に, 手術時に摘出された人癌組織 (主に転移領域リンパ節) より約1立方mm の組織片を作製し, 培養組織とし, 残りの人癌組織

は対照として、10%ホルマリンに固定した。

4) 培養方法 培養試験管(トキワ科学器械)に約5mlの培養液を加え、これを約1°の傾斜角を有する培養器内の回転ドラム(トキワ科学器械)に挿入する。組織片をH.F.F.切片の上にのせ、培養試験管内の培養液に浸す。更に組織片が気相と液相の中間に位置するように、培養試験管内のH.F.F.の位置を調整する(図3)。回転ドラムは3分間に1回転する。組織片及びH.F.F.は、H.F.F.の吸着性、培養液の粘着

性、培養試験管の緩やかな傾斜角及び培養試験管の直径を越えるH.F.F.切片の長径等のため、回転により落下することはない。培養器内は、酸素95%、炭酸ガス5%からなる混合ガスを流し、温度37°C、湿度95%以上に保持する。培養中、pHメーターの監視下に培養液がpH7.2及至7.4になるように炭酸ガス流量を調節した。培養液は3及至4日目に更新した。培養期間は、1、2、3、4、5、6、7、8日である。

5) 培養状態の判定 培養終了後、組織片はH.F.

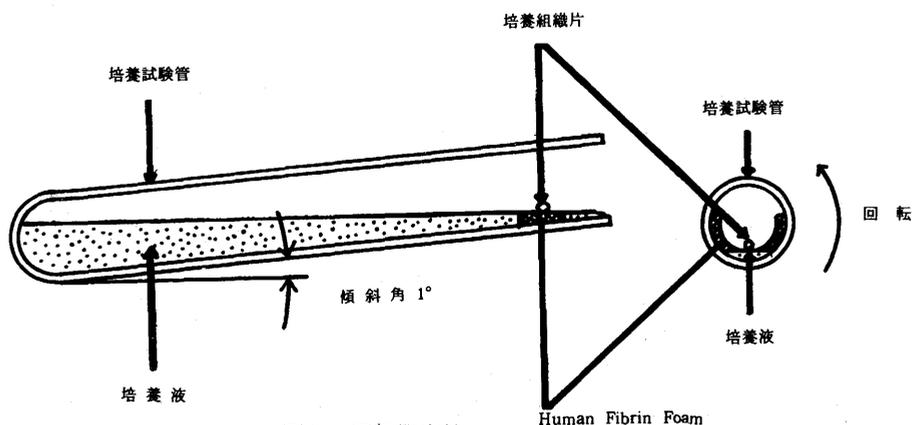


図3 回転器官培養法

表3 H.F.F.を用いた回転器官培養(酸素95%、炭酸ガス5%、1気圧)

Patient	Age	Sex	Primary tumor	Metastasis taken	Evaluation								
					1	2	3	4	5	6	7	8 days	
1) J. Y.	51	M	Stomach Adenocarc. simplex medullare	Lymphnode	F	F	F	F	F	F	F	F	F
2) S. O.	61	M	Adenocarc. tubulare	Lymphnode	F	P	D	D	D	D	D	D	D
3) N. T.	60	M	Adenocarc. papillare tubulare	Lymphnode	G	G	F	P	D	D	D	D	D
4) S. T.	43	F	Adenocarc. tubulare scirrhusum	Lymphnode	P	P	P	P	D	D	D	D	D
5) K. T.	64	M	Adenocarc. tubulare	Lymphnode	P	P	P	P	D	D	D	D	D
6) H. N.	45	M	Adenocarc. tubulare scirrhusum	Lymphnode	F	F	F	F	P	D	D	D	D
7) T. O.	70	M	Adenocarc. tubulare medullare	Lymphnode	P	P	P	P	D	D	D	D	D
8) S. K.	69	M	Adenocarc. tubulare	Lymphnode	P	P	P	P	D	D	D	D	D
9) Z. S.	65	M	Adenocarc.	Lymphnode	G	F	P	P	D	D	D	D	D
10) M. U.	39	F	Adenocarc. tubulare mucocellulare	Lymphnode	P	P	P	P	P	D	D	D	D
11) Y. N.	48	M	Adenocarc. tubulare mucocellulare	Lymphnode	G	P	P	P	D	D	D	D	D
12) N. T.	65	M	Carc. simplex solidum	Lymphnode			F	P	P	P	D		
13) S. M.	69	M	Adenocarc.	Lymphnode			D	D	D	D	D		
14) T. N.	47	M	Adenocarc. scirrhusum	Lymphnode			P	D	D				
15) S. S.	54	M	Adenocarc. papillare	Lymphnode	F	F	F	P	D	D			

表4 H.F.F. を用いた回転器官培養 (酸素95%, 炭酸ガス5%, 1気圧)

Patient	Age	Sex	Primary tumor	Metastasis taken	Evaluation									
					1	2	3	4	5	6	7	8 days		
1) M. T.	51	M	Colon Adenocarc. tubulare Rectum	Lymphnode	G	G	G	G						
2) S. Y.	49	F	Adenocarc. papillotubulare	Lymphnode	G	G	G	G	G					
3) T. Y.	69	F	Adenocarc. Lung	Lymphnode	G	G	G	F	P	G			D	
4) T. N.		M	Poorly differentiated epidermoid carc. Thyroid	Lymphnode	G	G	G	G	G	F				
5) H. K.	52	F	Adenocarc papillofolliculare	Lymphnode	G	G	G	G	G	G	G			
6) Y. B.	39	F	Adenocarc folliculare	Lymphnode	G	G	G	G						
7) T. T.	79	F	Adenocarc. Breast	Lymphnode	G	G	G	G	G	G				
8) T. K.	44	F	Adenocarc. tubulare medullare	Lymphnode	G	G	G	G	G	G	G			
9) K. A.	57	F	Adenocarc.	Lymphnode	G	G	G	G	G	F				
10) H. H.	76	F	Ovary Adenocarc. papillare	Peritoneal disseminated lesion	G	G	G	G						

F. と共に、実験 I と同様に、固定、包埋、薄切、染色した。培養状態の判定は実験 I と同様に、表 1 の判定基準に従って、組織形態学的に行った。

2. 実験結果

回転器官培養法により、胃癌15例、結腸癌1例、直腸癌2例、肺癌1例、甲状腺癌3例、乳癌2例及び卵巣癌1例の培養を行ったが、それらの培養状態は表3及び表4に示す如くである。即ち、回転器官培養法による胃癌15例の培養状態は、培養細胞の Viability があると思われる G. 及び F. と判定されたものは1日目 58.3% (7/12), 2日目 41.7% (5/12), 3日目 33.3% (5/15), 4日目 13.3% (2/15) でそれ以後の 5 及至 8 日目では 1 例のみ F. で、他はすべて D. 又は P. の状態と判定された (図4)。この成績は実験 I における静置器官培養法による胃癌10例のそれに比して、若干良好ではあるが、胃癌組織の器官培養の困難なことを示唆した。これに反し、結腸癌1例、直腸癌2例、肺癌1例、甲状腺癌3例、乳癌2例及び卵巣癌1例の計10例の培養状態は、同じ回転器官培養法による胃癌15例のそれに比して、明らかに良好であった (図5, 6, 7, 8, 9)。即ち、この種類の癌組織培養では、10例全例が3日目まで G. の状態であり、4日目でも 1 例のみ F. で、残り 9 例は G. であった。5, 6 日目で G. 又は F. であったものは各々 85.9% (6/7), 100% (6/6) であった。また胃癌1例、結腸癌1例、直腸癌1例、乳癌2例及び卵巣癌1例において、癌細胞が H.F.F. 内

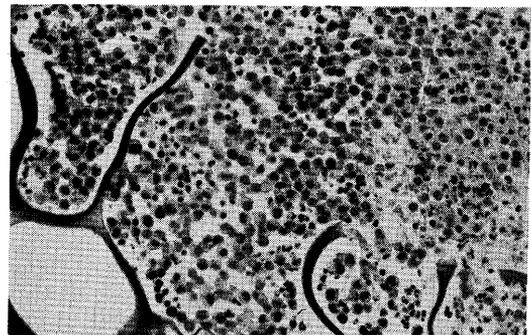


図4. 症例 J.Y. (胃癌, 培養4日目)
癌細胞の Viability は、F. と判定される。(H. & E. 染色, ×250)



図5. 症例 M.T. (結腸癌, 培養4日目)
癌細胞の Viability は、G. と判定される。H.F.F. (右下) は、癌細胞中に認められる。(H. & E. 染色, ×250)

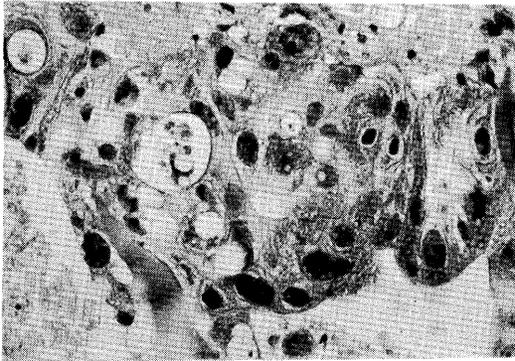


図6. 症例 S.Y. (直腸癌, 培養5日目)
癌細胞の Viability は G. と判定され, H.F.F. 内への浸潤が認められる. (H. & E. 染色, ×500)

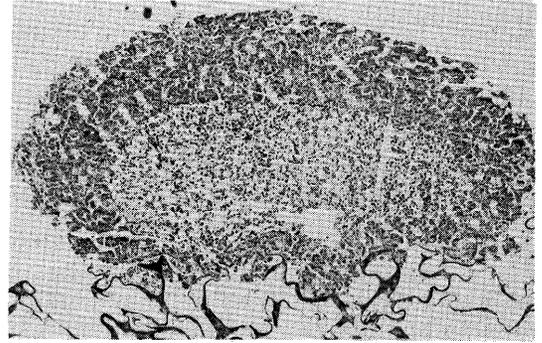


図9. 症例 H.H. (卵巣癌, 培養4日目)
癌細胞の Viability は, G. と判定され, H.F.F. 内への浸潤も認められるが, 組織片の中心部には, Anoxic cell が存在し, いわゆる Central necrosis が認められる. (H. & E. 染色, ×70)

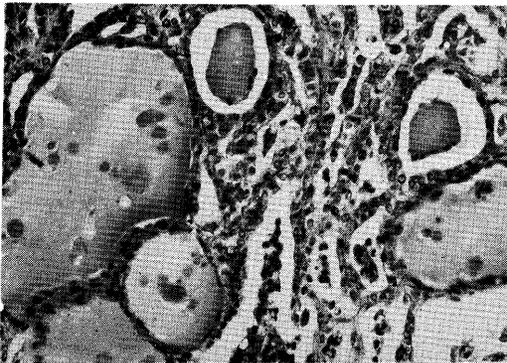


図7. 症例 H.K. (甲状腺癌, 7日目)
癌細胞の Viability は, G. と判定される. (H. & E. 染色, ×250)

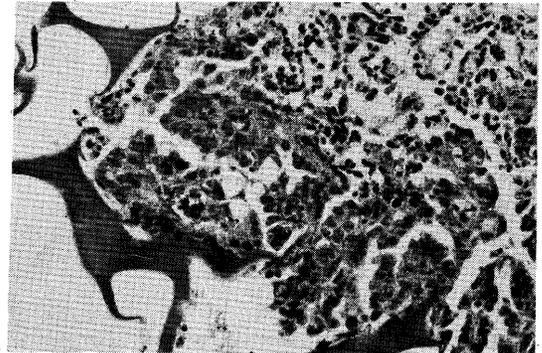


図10. 症例 H.H. (卵巣癌, 培養4日目)
(H. & E. 染色, ×250)

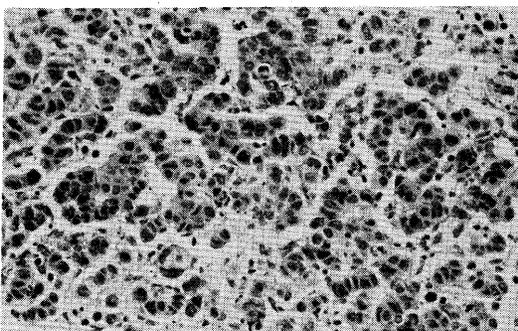


図8. 症例 T.K. (乳癌, 培養7日目)
癌細胞の Viability は, G. と判定される. (H. & G. 染色, ×250)

へ, 浸潤増殖 (Outgrowth) する像が認められた. (図4, 5, 6, 10).

3. 小 括

H.F.F. を基質として用いた回転器官培養法を考案し, 各種の人癌組織の培養を行った. 即ち, 回転器官培養法による胃癌15例の培養状態は, 実験Iにおける静置器官培養法による胃癌10例のそれに比して, 若干良好であるが, 胃癌組織の器官培養の困難なことを示唆した. これに反し, 結腸癌1例, 直腸癌2例, 肺癌1例, 甲状腺癌3例, 乳癌2例及び卵巣癌1例の計10例の培養状態は, 全例が3日目までGの状態であり, 4日目でも1例のみFで, 残りの9例はGであった. 5, 6日目でG.又はF.であったものは各々85.9%, 100%であって, 同じ回転器官培養法による胃癌15例のそれに比して, 明らかに良好であった.

実験Ⅲ. H.F.F. を用いた高压回転器官培養

培養組織片への酸素供給は、培養液中に溶解する酸素の物理的拡散による受動的なものであり、絶対圧1気圧の空気あるいは酸素によって養われる組織は、その表面より極めて限られた深さの組織までであるとされている¹⁰。また、回転による洗滌作用は培養組織片周囲における培養液のうっ滞防止を期待できるが、培養液中の溶解酸素及び培養組織中の酸素拡散は変化せず、培養組織片への酸素供給は、それほど増加しないものと考えられる。したがって、より多くの酸素を組織に供給するためには、培養器内の酸素分圧を高めることも必要と考えられる。そこで著者は、特殊高压容器を用い、絶対圧3気圧酸素下で実験Ⅱと同様のH.F.F.を基質とした回転器官培養法を行い、高压酸素の癌組織培養に及ぼす影響について検討した。

1. 実験方法

1) 培養液の調合 199培地ニッサン(日水製薬) 3.96g, AB-PC(ピクシリン, 明治製薬) 2.5mg, HEPES 緩衝液(1モル溶液)(大日本製薬) 10mlを再蒸留水400mlに溶かし、6規定の水酸化ナトリウムを添加し、pHを7.2に調整し、孔径0.45 μ のミリポアフィルターにより陰圧濾過滅菌した。仔牛血清(千葉血清) 100ml及びインシュリン(イヌジリン, 清水製薬) 60i.u.を添加し、培養液510mlを調合した。pHの調整は、密封した高压容器を使用するため重碳酸ナトリウムの代りに、炭酸ガスを流す必要のないHEPES 緩衝液を使用した。

2) 基質 実験Ⅱと同様にH.F.F.をカミソリにて2.5 \times 1.0 \times 0.3cmの切片に作製し、150 $^{\circ}$ C、3時間、乾熱滅菌した。

3) 培養組織 実験Ⅰ及びⅡと同様に、手術時に摘出された癌組織(主に転移領域リンパ節)より約1立方mmの組織片を作製し、培養組織とし、残りの人癌組織は対照として、10%ホルマリンに固定した。

4) 高压培養容器 絶対圧3気圧下に人癌組織を培養するために、特殊高压容器を考案した。高压容器は鉄製で、絶対圧4気圧までの耐圧性を有するように設計した。高压容器の内部は、同時に9本の培養試験管を挿入することができるように試験管固定盤を備えた。高压容器は、ゴム・パックを有する圧力蓋をはめ、ネジを締めることにより完全に密封することができる。高压容器の外部には、圧力ゲージ、高压ポンペと連結できるガス流入口及びバルブ、高压容器を支える2本の円形フレームが装着されている。高压容器を約1 $^{\circ}$ の傾斜角を有する回転器の上におくと、その回転は円形フレームにより高压容器に伝わる(図11)。

5) 培養方法 高压容器を培養器内の回転器の上に置く。培養試験管に約5mlの培養液を加え、これを1 $^{\circ}$ の傾斜角を有する高压容器内の試験管固定盤に挿入する。実験Ⅱと同様に組織片をH.F.F.切片の上にのせ、培養試験管内の培養液に浸す。組織片が気相と液相の中間に位置するように、培養試験管内におけるH.F.F.の位置を調整する。高压容器に圧力蓋をはめ、ネジを締め、高压容器を閉鎖する。酸素95%、炭

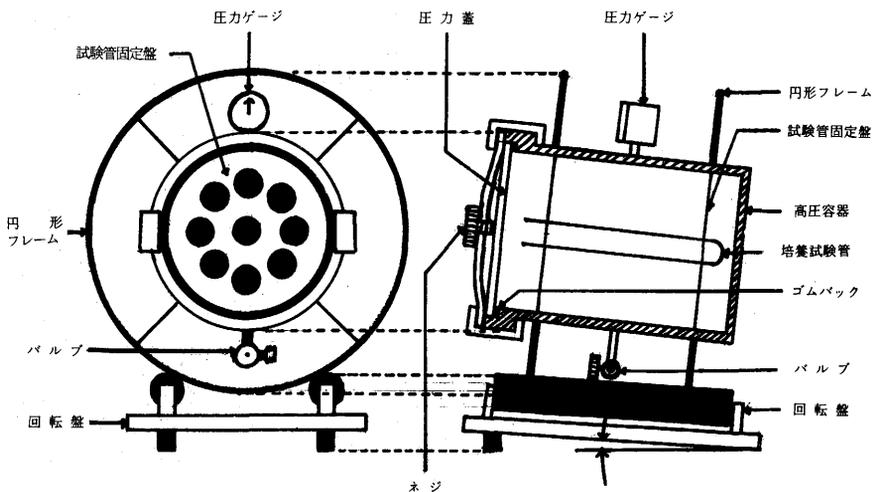


図11 高压培養容器

酸ガス5%を含む高圧混合ガスポンペを高圧容器のガス流入口に連結し、圧力ゲージの監視下に高圧容器内に混合ガスを流し、絶対圧3気圧にする。バルブを閉鎖し高圧容器を密封した上で、高圧ポンペとの連結を絶つ。高圧容器を実験Ⅱと同様に、3分間に1回転させる。培養液は実験Ⅱと同様に、3及至4日目に更新した。培養期間は、1、2、3、4、5、6、7、8日である。

6) 培養状態の判定 培養終了後、組織片は H.F.F. と共に、実験Ⅰ及びⅡと同様、固定、包埋、薄切、染色した。培養状態の判定は、実験Ⅰ及びⅡと同様、表1の判定基準に従い組織形態学的に行った。

2. 実験結果

絶対圧3気圧の高圧酸素条件の回転器官培養に及ぼす影響について検討した。胃癌8例、直腸癌3例、乳癌1例及び甲状腺癌1例の培養を行ったが、それらの培養状態は表5に示す如くであった。高圧回転器官培養法による胃癌8例の培養状態は、培養細胞の Viability があると思われるG及びFと判定されたものは、1日目62.5% (5/8)、2日目50% (4/8)、3日目37.5% (3/8)、4日目12.5% (1/8)で、それ以後の5及至8日目ではすべてD.又はP.の状態と判定された。この成績は実験Ⅱにおける胃癌15例のそれとほぼ同程度

度である。これに反し、直腸癌3例、乳癌1例及び甲状腺癌1例の培養状態は、実験Ⅱのそれらと比較すると、むしろ劣る傾向にあった。即ち、G.及びF.の状態と判定されたものは、1日目100% (5/5)、2日目80% (4/5)、3日目60% (3/5)、4日目40% (2/5)、5日目25% (1/4)で、それ以後の6及至8日目ではすべてD.の状態と判定された。

3. 小 括

H.F.F. を基質として用いた高圧回転器官培養法を考案し、各種の人癌組織の培養を行った。高圧回転器官培養法による胃癌8例の培養状態は、実験Ⅱにおける胃癌15例のそれとほぼ同程度であり、直腸癌3例、乳癌1例及び甲状腺癌1例の培養状態は、実験Ⅱのそれらと比較すると、むしろ劣る傾向にあった。

総括及び考察

生物体の組織を試験管内で培養する方法として、組織を化学的及び物理的方法により細胞を分散し培養する細胞培養法と、組織片を一塊のまま培養する器官培養法とがある。細胞培養法の中で、単層培養は培養細胞株の継代維持に優れているため、今日、広く各方面で活用されている。しかし、このような培養法では、細胞の増殖度が高く、その細胞を取り出したもと

表5 H.F.F. を用いた高圧回転器官培養 (酸素95%, 炭酸ガス5%, 3気圧)

Patient	Age	Sex	Primary tumor	Metastasis taken	Evaluation								
					1	2	3	4	5	6	7	8days	
1) Y. Y.	56	M	Stomach Adenocarc. tubulare	Lymphnode	P	P	P	D	D	D	D	D	D
2) H. K.	56	M	Adenocarc. papillare	Lymphnode	P	P	D	D	D	D	D	D	D
3) G. M.	61	M	Adenocarc. tubulare	Lymphnode	G	F	P	D	D	D	D	D	D
4) M. T.	46	M	Adenocarc. medullare	Lymphnode	F	D	D	D	D	D	D	D	D
5) Z. N.	65	M	Adenocarc. tubulare	Lymphnode	G	F	F	F	P	P	D	D	D
6) Y. K.	54	M	Poorly differentiated adenocarc.	Lymphnode	G	F	P	P	D	D	D	D	D
7) J. F.	60	M	Adenocarc. papillare	Lymphnode	G	F	F	P	D	D	D	D	D
8) T. K.	62	M	Poorly differentiated adenocarc.	Lymphnode	P	P	F	P					
9) K. M.	55	M	Rectum Adenocarc. papillotubulare	Lymphnode	G	G	G	G					
10) K. O.	54	F	Adenocarc. papillotubulare	Lymphnode	F	F	F	P	D	D	D	D	D
11) Y. O.	43	M	Adenocarc. papillare Breast	Lymphnode	G	F	P	P	P	D	P	D	D
12) K. O.	64	F	Adenocarc. scirrhusum Thyroid	Lymphnode	G	G	G	G	F				
13) F. M.	73	F	Adenocarc. papillofolliculare	Lymphnode	F	P	D	D	D	D	D	D	D

の組織の特性、たとえば、細胞の形態、酵素活性、代謝型、ウイルス感受性、ホルモン分泌能力、抗原性、分化能、染色体構成などが、その細胞の増殖過程で、急激に変化し、あるいは最初の細胞集団中から特定の細胞の選択淘汰がおこなわれて、もとの細胞や組織の特性が消失することがあるといわれている¹⁾。これに対して、器官培養法は組織または器官を体外に取り出して培養したのちも、もとの組織や器官の特性を保持させながら、もとの生体内におけると同様な成長や分化をおこなわせることが可能であるとされている¹⁾。細胞培養法の中の単層培養は、培養容器の一部面に細胞を付着させ、増殖させる二次元的培養法であるのに対して、器官培養法は、組織片を一塊のまま、培養する三次元的培養法である。このように器官培養法は、細胞培養法に比して、より生体に近い状態の組織及び器官の培養が可能であるという特長を有している。このため器官培養法は今日、悪性腫瘍の制癌剤感受性試験及び内分泌系腫瘍に対するホルモン感受性試験など、培養組織の特性が生体におけるのと同様であることを要求される研究に応用されている²⁾。しかし、器官培養法は、組織片の初代培養のみ可能であって継代培養はなされておらず、また生体内より取り出された各種の組織をすべて、十分な期間、良好な状態で培養することは難しく、その組織片の大きさも、酸素及び栄養供給の点から、限定されているというのが現状である。そこで著者は、癌研究の一環として、日常経験される人癌の器官培養法の確立を目的として本研究を行った。

器官培養法は、歴史的にも数多くの方法が考案され、試みられているが、それらは培養容器内における組織片の配置様式及び培養液の種類により分類されている²⁾。

培養容器内における組織片の配置様式から、組織片が培養液、寒天あるいは凝固血漿中に存在し、直接気相に接することのない Cultures not in contact with the gas phase 法、組織片を凝固血漿あるいは寒天などの上に置く Cultures on solid substrates 法、及び組織片が気相と液相の中間に位置するように置く Cultures at the gas-liquid interface 法の三つに大きく分けられる³⁾。これらの方法の中で Cultures at the gas-liquid interface 法は、培養液を用いるため組織片からの老廃物の拡散が円滑におこなわれ、培養液の化学的性状が明らかで、培養液の交換も可能であることなどから、培養中における培養液成分の変化などの分析に有利である。また組織片が気相に直接するため、酸素消費の高い組織の培養に適

するなどの利点があることから、最も優れた培養方法とされている³⁾。この組織片を気相と液相の中間で培養する Cultures at the gas-liquid interface 法にも、種々の方法がある。

Medawar⁴⁾は、組織片(皮膚スライス)を培養液上に浮かべて培養する Floating without additional support 法を行っている。しかし、この方法では広い皮膚スライスを培養液上に浮かべると、皮膚スライスはそり曲る傾向にあるといわれる。それ故に、Chen⁵⁾はレンズ・ペーパー、Shaffer¹⁷⁾はシリコンで破覆したセルロース・アセテート繊維を、時計皿中の培養液上に浮かべ、その上に組織片をのせて培養する Floating raft 法を行っている。この方法では、組織片のそり曲りは若干、防ぐことができる。しかし実際には、レンズ・ペーパーあるいはセルロース・アセテート繊維は、軽い振動あるいは培養液の交換などにより、培養液中に落下する危険があり、その維持はかなり難かしいといわれている³⁾。そこで、Trowell¹⁰⁾¹⁸⁾は、培養容器内に、多数の小孔及び両側に脚を有する金属板を置き、その上にレンズ・ペーパーをのせ、このレンズ・ペーパーがちょうど浸る位まで容器内に培養液を入れ、組織片をこのレンズ・ペーパー上で培養する Rigid platform 法を行っている。この方法は、培養容器内の培養液の量を増減することにより組織片の吸湿状態を適当に調節でき、また組織片は培養液中へ落下する危険性がないなどの利点があり、成人組織の培養などに広く活用されている。しかし、この方法では組織片を組織標本に作製する際、レンズ・ペーパーより離す必要がある。同じく Rigid platform 法の一として、Leighton⁹⁾²¹⁾は、培養容器内にコラーゲンで被覆したセルロース・スポンジを入れ、このセルロース・スポンジがちょうど浸る位まで容器に培養液を入れ、組織片をこのセルロース・スポンジ上で培養するスポンジ基質培養法を行っている。組織片は、セルロース・スポンジと共に、組織標本の作製が可能であり、組織片外への細胞増殖は組織標本作製時に失しなわれることはない。しかし、セルロース・スポンジを培養に使用するためには、蒸留水で1時間煮沸し、アセトン、エーテル及び無水アルコールに室温でそれぞれ30分ずつ漬けた後、再び蒸留水で煮沸し、乾燥後、コラーゲンで被覆するなどの複雑な前処置を必要とするという欠点がある。そこで、Kalusら^{8)~11)}は、培養容器内に Human Fibrin Foam (H.F.F.) を入れ、この H.F.F. がちょうど浸る位まで容器に培養液を入れ、組織片をこの H.F.F. の上で培養する方法を考案し、胎児組織、成

人正常及び腫瘍組織の培養を行った。H.F.F. は、ヒトのフィブリノーゲン溶液を凍結乾燥して作ったスポンジ状の物質である。H.F.F. は培養に使用するために特別な処置を必要としないし、また組織片を組織標本に作製する際に、H.F.F. はセルロース・スポンジと同様に組織片から離さずに作製できるなどの特長を有し、基質として理想的な物質であると考えられる。

次に、器官培養に用いられる培養液の種類についても歴史的に種々の発展が見られる。古来、細胞の栄養要求の複雑さのため、血清やニワトリ・エンブリオ抽出液あるいはそれらの成分による培養が長い間大勢を占めてきた。実際、Fell ら¹⁹⁾の plasma clot culture 法あるいは Leighton¹⁰⁻¹¹⁾のスポンジ基質培養法などにおいて、ニワトリ・エンブリオ抽出液や血漿などが使用されている。しかし近年、細胞の種々の栄養要求がかなり調べられており、適当なアミノ酸及びビタミンを含む合成培地が発達した。代表的な合成培養液として、Morgan ら²⁰⁾は各種のアミノ酸、ビタミン、核酸成分及び少数の中間代謝物を含む培養液199を発表した。一方、Eagle²¹⁾は、13種のアミノ酸及び8種のビタミンを含む Eagle's basal medium を発表し、その後、Eagle²²⁾はさらに検討を行い、アミノ酸、ビタミン濃度を総じて2倍とし、特に Arginine の濃度を5倍にあげ、ビタミンについては Biotin を除き、あらたに、*i*-inositol を加える Eagle's minimum essential medium (MEM) を発表した。しかし、今なお、細胞培養法における限られた数の細胞株²³⁾⁻²⁹⁾を除いて、多くの培養においては、これら合成培地に加えて生物からとったなんらかの天然培地の添加が必要である。特に器官培養法は、もとの組織の特性を保持させることを目的とする初代培養法であり、完全な合成培養液で培養することは現状では不可能である。血清はその際、合成培養液に添加される代表的な天然培地である。しかし、培養する組織と同種の血清を使う必要はなく、人癌組織の培養には、ヒト血清が必要であると考えられていた時期もあったが、現在では、大量に入手可能なウシあるいはウマの血清が広く使われている。

以上、器官培養の方法に関する歴史的な過程について述べてきたが、著者は、器官培養法における基質として種々の長所を有する H.F.F. を用い、且つ、培養液として血清20%を含む Eagle's MEM 培養液を用いる Kalus⁸⁾⁻¹¹⁾らの静置器官培養法を、実験 I において人胃癌組織を用いて追試検討した。癌組織の採取は、癌細胞の同定が比較的容易であり、且つ、無菌的

組織を得るため、転移リンパ節から行った。

ここで問題となるのは、器官培養の成功、不成功の判定基準を如何にするかである。器官培養組織の Viability は、通常、組織形態学的、組織化学的、生化学的方法及びオートラジオグラフィ法等により検索することができる²⁾とされている。しかし、培養組織片は一般に小さく、組織片に含まれる癌細胞数は各々の組織片によって異なっており均一性を欠いており、また多数の培養組織片を同時に検索する場合には、その方法は複雑であってはならないという条件が要求される。組織形態学的に培養組織の Viability を判定する方法は、培養組織を培養終了後、直ちに固定し、包埋、薄切、染色、鏡検し、細胞の微細構造の状態より、細胞が固定の時期に死んでいたか、あるいは生きていたかを認定するものである。即ち、細胞の核が濃縮性で、部分的には崩壊していたり、あるいは完全に均質化していることは、固定の時期に細胞がすでに死んでいたということをはほとんど確実に示す所見であるとされている¹²⁾。しかしながら、この逆は必ずしも真ではなく、核及び細胞質の微細構造は保存の条件がよければ細胞の生命が失われてからでもよく形態が保存されうるとされている¹²⁾。また、組織形態学的判定方法は、その判定に際して鏡検者の主観が入り易く、やや客観性を欠く傾向がある。このように組織形態学的方法により培養組織の Viability を判定することには難点もあるが、核及び細胞質の微細構造が満足に保存されることは細胞の生命維持にとって必要な条件であることは疑いなく、また多数の培養組織片を比較的、簡単に検索できることなどからして、組織形態学的方法は、培養組織の Viability を判定する手段として今日、広く用いられている。Röller ら³⁰⁾は器官培養組織をヘマトキシレン・エオジン染色して、培養前の組織に類似した組織形態を有するものを

Good、ヘマトキシレンに染まらないものを Dead とし、その中間に属するものを Fair と Poor に二分する判定基準をもうけ、更に二人の病理学者がその判定を行い、組織形態学的判定に客観性をもたせている。著者は、以上の事を考慮した上で培養状態の判定を組織形態学的に行うことにした。判定基準の作製においては、Kosse¹²⁾の「固定標本中における細胞活性および死の形態学的認識」を参考にしたが、人癌組織は生体内においても細胞分裂像に乏しいことがあり、培養組織という特殊性を考え、Röller ら³⁰⁾の判定基準と同様に、培養組織が培養前の組織に極めて類似した組織形態を示す場合、Good と判定するようにした。しかし著者の判定基準は、Röller ら³⁰⁾の

判定基準に比して、ヘマトキシレンに染まる細胞でも核の濃縮・崩壊あるいは完全な均質化が認められる場合、細胞は固定の時期にすでに死んでいたと考えられ、Dead と判定するなどの点から、若干厳しいものと考えられる(表1)。

実験Ⅰにおいて、胃癌10例の静置器官培養を行った。この培養1日目で組織が少なくとも生きていると考えられる G. 又は F. の所見を示したものはなく、P. が10例中6例、残り4例はすべて D. であった。それ以後の2, 3, 4日目の培養状態の判定はすべて D. であった。即ち、本法による培養成績は極めて不良であると判断せざるをえない。しかし、H.F.F. は器官培養における優れた組織支持基質であることが判明した。即ち、滅菌操作及び培養組織の組織標本の作製が極めて容易であった。また一部の培養組織片においては、癌細胞の Viability が不良にもかかわらず、癌細胞が H.F.F. 内へ浸潤している如き像も認められ、H.F.F. 上で組織片の三次元的増殖の可能性が示唆された。

実験Ⅰの培養成績の不良を改善するために実験Ⅱにおいては、実験Ⅰと同様に H.F.F. を基質として用いたが、培養液は Eagle's MEM 培地より栄養成分範囲が広く、初代培養に適していると考えられる 199 培地を用い、更に、培養液にインシュリンを添加して糖の細胞内利用を高めることを意図した^{10)32)~35)}。また、空気の代りに酸素を流し培養液中の酸素分圧を高め、且つ、回転作用による速やかな組織老廃物の除去、酸素供給をはかる回転器官培養法を考案するなどの改良を加えた¹³⁾。Gey³⁶⁾³⁷⁾ の Roller tube culture では、組織片は凝固血漿に包まれ培養試験管に付着しているのに対し、著者の回転器官培養法では、組織片は H.F.F. の吸着性により H.F.F. を介して培養試験管に付着している。著者は、胃癌15例、結腸癌1例、直腸癌2例、肺癌1例、甲状腺癌3例、乳癌2例及び卵巣癌1例の回転器官培養を行った。胃癌15例の培養状態は、G. 及び F. と判定されたものは1日目 58.3% (7/12)、2日目 41.7% (5/12)、3日目 33.3% (5/15)、4日目 13.3% (2/15)、でそれ以後の5及至8日目では1例のみ F. で、他はすべて D. 又は P. の状態と判定された。これに反し、胃癌以外の結腸癌1例、直腸癌2例、肺癌1例、甲状腺癌3例、乳癌2例及び卵巣癌1例の培養状態は、3日目まで10例全例が G. の状態であり、4日目でも1例のみ F. で残り9例は G. であった。5, 6日目で G. 又は F. であったものは各々 85.9% (6/7)、100% (6/6) であった。つまり、回転器官培養法による胃癌組織の培養状態は、

静置器官培養法によるそれに比して、若干良好であるが、いまだ満足すべき結果ではなかった。これに反して、結腸癌、直腸癌、肺癌、甲状腺癌、乳癌及び卵巣癌組織の培養状態は良好であって、胃癌のそれに比して明らかな差異が認められた。この差異の原因は、回転器官培養法によって胃癌組織の培養状態が若干改善された事を考慮すれば、胃癌組織への酸素供給に問題があるのではないかと推察された。培養組織片への酸素供給は、生体内と異なり、酸素と結合するヘモグロビン及びそのヘモグロビンを含有する赤血球を組織に運ぶ血流及び血管などが存在せず、あくまで培養液中に溶解する酸素の培養組織への物理的拡散による受動的なものである。回転器官培養法における回転作用は、培養組織片周囲の培養液のうっ滞による溶解酸素の局所的低下を防止することができるが、培養液中に溶解する酸素の割合は、それほど増加しない。培養液中に溶解する酸素の割合は、Henry の法則に従い、温度が一定ならば、その酸素分圧に比例する。したがって、より多くの酸素を培養組織片へ供給するためには、培養器内の酸素分圧を高め、培養液中に溶解する酸素の割合を多くする必要がある。Fabrikant ら³¹⁾ は、マウス組織片を特殊容器内で30分から6時間、培養した場合、酸素分圧760mmHgにおいて投与された³H-thymidine は組織表面より150 μ の深さまで取り込まれるのに対して、酸素分圧2280mmHgにおいては、500 μ の深さまで取り込まれることをオートラジオグラフィにより確認した。つまり、培養液中に溶解する酸素の割合が多くなれば、物理的拡散により培養組織片内部へ供給される酸素量も増加し、培養組織片表面の組織だけでなく、深層の組織をも培養しうることが期待できるわけである。

そこで、著者は、実験Ⅲにおいて絶対圧3気圧に充分、耐えうる特殊高压容器を考案、作製した。尚、培養液の至適 pH は、培養組織の維持、増殖に不可欠のものであり、緩衝剤として、実験Ⅰ及びⅡにおいて重炭酸ナトリウム、実験Ⅲにおいては密封された高压容器を用いるため、HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine N-2-ethansulphonic acid) を使用した。HEPHS は、Good ら³⁹⁾ によって開発されたアミノ酸誘導体による双性イオン緩衝剤の一つであり、pKa は7.31 (37°C) であり、2価の陽イオンと結合せず、炭酸ガスが存在しなくとも20mMの濃度で pH が保たれるなどの利点がある。Williamson³⁹⁾ らと Shipman⁴⁰⁾ によって組織培養へ応用され、更に Fisk⁴¹⁾ らによって下垂体の器官培養に使われており、重炭酸ナトリウムと同様、安全な緩衝剤と考えられ

る。著者は、高圧容器と HEPES を用い、実験 II と同様に H.F.F. を基質とした回転器官培養を人癌組織について行い、高圧酸素の人癌組織器官培養に及ぼす影響について検討した。即ち、胃癌 8 例、直腸癌 3 例、乳癌 1 例及び甲状腺癌 1 例の高圧回転器官培養を行った。胃癌 8 例の培養状態は、G. 及び F. と判定されたものは、1 日目 62.5% (5/8)、2 日目 50% (4/8)、3 日目 37.5% (3/8)、4 日目 12.5% (1/8) で、それ以後の 5 及至 8 日目はすべて D. 又は P. の状態と判定された。直腸癌 3 例、乳癌 1 例及び甲状腺癌 1 例の培養状態は、G. 及び F. と判定されたものは、1 日目 100% (5/5)、2 日目 80% (4/5)、3 日目 60% (3/5)、4 日目 40% (2/5) で、それ以後の 6 及至 8 日目はすべて D. の状態と判定された。即ち、培養器内の酸素分圧が相違する実験 II と III を比較すると、胃癌組織の培養状態は、ほぼ同程度であり、酸素分圧を高めても培養状態の改善は認められなかった。また胃癌以外の人癌組織の培養状態は、むしろ実験 III の方が劣るという傾向にあった (図 12)。このことは、人癌組織の器官培養では、必ずしも高圧酸素状態を要するものでなく、逆に、高圧酸素によるいわゆる酸素中

毒の可能性さえありうることを示唆するものとして興味深い。培養組織片が酸素中毒に至る酸素分圧は、組織の種類によって異なることが知られており、脳及び肝臓などの組織は、酸素中毒になり易いのに対して、筋肉、肺臓及び腎臓などの組織は、酸素中毒になり難いとされている⁽⁴²⁾⁽⁴³⁾。人癌組織の器官培養における酸素中毒に関する文献を渉猟してみたが、この点について論説したものは見あたらなかった。

人癌組織の器官培養に関する定量的研究は少なく、文献を渉猟する限り Röllner³⁰⁾ らの報告のみである。これを検討すると、4 日目で培養状態が良好と判定されるものは、直腸癌 5 例中 4 例 (80%)、甲状腺癌 3 例中 2 例 (66.7%)、結腸癌 19 例中 12 例 (63.1%) 及び乳癌 12 例中 6 例 (50%) であるのに比して、胃癌は 5 例中 2 例 (40%) である。培養状態の判定基準が、著者のものと異なり、また著者の実験結果と比較すると、その差は明瞭ではないが、やはり胃癌組織の培養率は低いという傾向にある。細胞培養法における胃癌組織の継代培養株が現存しないこと⁽⁴⁴⁾ を考慮すると、胃癌組織の培養には、他の人癌組織の培養にはない問題が介在しているように推察される。

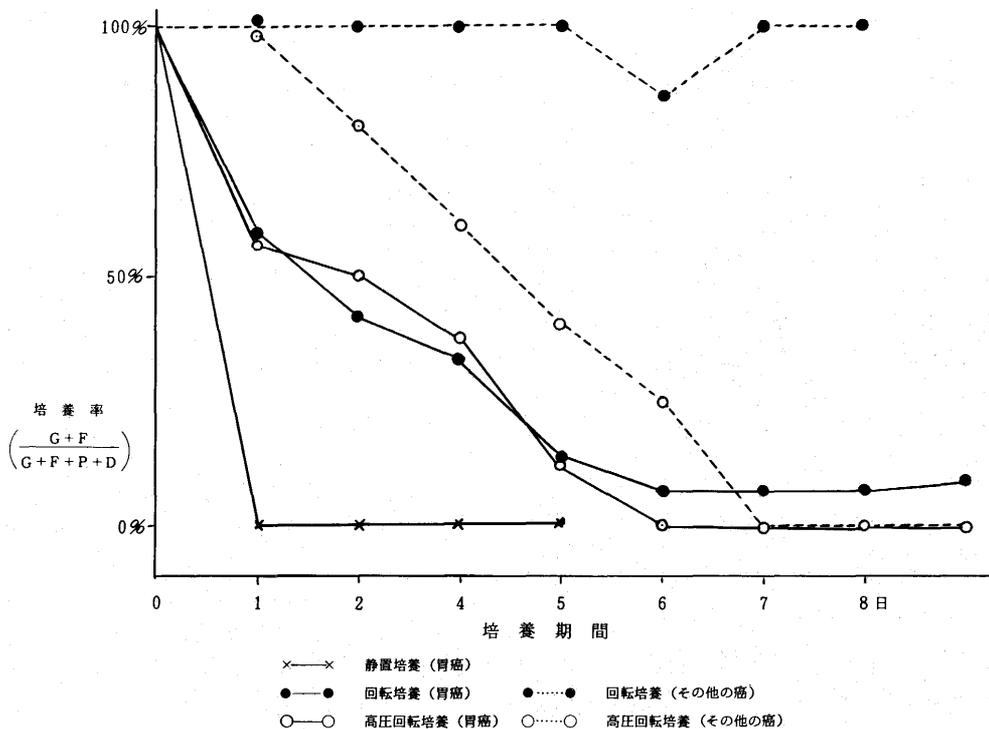


図 12

結 論

著者は、Human Fibrin Foam を基質として用いた種々の器官培養法により人癌組織の培養を検討し、以下の結果をえた。

1. H.F.F. を用いた静置器官培養

Kalus らの方法に準じて、胃癌10例の静置器官培養を行ったところ、その培養状態は不良であった。しかし、一部の培養組織片において、癌細胞の Viability が不良にもかかわらず、癌細胞が H.F.F. 内へ浸潤する如き像が認められ、H.F.F. の上で組織片の三次元的培養が可能であることが示唆された。

2. H.F.F. を用いた回転器官培養

H.F.F. を基質として用いた回転器官培養法を考案し、各種の人癌組織の培養を行った。この回転器官培養法による胃癌15例の培養状態は、静置器官培養法によるそれに比し、若干良好であるが、胃癌組織の器官培養の困難なることを示唆した。これに反し、結腸癌1例、直腸癌2例、肺癌1例、甲状腺癌3例、乳癌2例及び卵巣癌1例の培養状態は、同じ回転器官培養法による胃癌のそれに比して明らかに良好であった。

3. H.F.F. を用いた高圧回転器官培養

高圧酸素下で H.F.F. を基質として用いた高圧回転器官培養法による胃癌8例の培養状態は、実験Ⅱにおける胃癌のそれに比して改善されず、また直腸癌3例、乳癌1例及び甲状腺癌1例の培養状態は、実験Ⅱのそれらと比較すると、むしろ劣る傾向にあった。

以上の実験結果から、H.F.F. を用いた回転器官培養法は、Kalus らの静置器官培養法に比して、人癌組織の培養により有効であること、回転器官培養法において胃癌とそれ以外の人癌組織の間には、培養状態において明らかな差異が認められること、また高圧酸素状態は人癌組織の器官培養に必要ではなく、むしろ絶対圧3気圧の酸素下では酸素中毒の可能性がある。今後、H.F.F. を用いた回転器官培養法は、人癌組織への実験的及び臨床的研究への応用の可能性が期待される。

終りに、本研究に対し御指導、御校閲を賜りました、宮崎逸夫教授に深く感謝いたします。また御指導をいただきました教室の西尾功博士、三輪見一博士に感謝します

文 献

- 1) 黒田行昭：組織培養・基礎と応用（中井準之助ら編）、第8版、130頁、東京、朝倉書店、1970。
- 2) Matthias, M. : Arch. Geschwulstforsch., 41, 382 (1973).
- 3) Easty, G. C. : Methods in Cancer Research (H. Buschw ed), 5, 1, Academic press, New York, 1970.
- 4) Leighton, J. : J. Nat. Cancer Inst., 12, 545 (1951).
- 5) Leighton, J. : J. Nat. Cancer Inst., 15, 275 (1954).
- 6) Leighton, J., Justh, G. & Mark, R. : Natl. Cancer Inst. Monograph, 11, 147 (1963).
- 7) Leighton, J., Justh, G. & Esper, M. : Science, 155, 1259 (1967).
- 8) Kalus, M. & Klement, V. : Folia Biol. 12, 468 (1966).
- 9) Kalus, M. & O' Neal, R. M. : Arch. Pathol., 86, 52 (1968).
- 10) Kalus, M., Ghidoni, J. J. & O' Neal, R. M. : Cancer, 22, 507 (1968).
- 11) Kalus, M. : Cancer, 30, 972 (1972).
- 12) Kosse, L. G. : Diagnostic cytology and its histopathologic bases, 1st ed., p 16, Philadelphia & Montreal, J. B. Lippincott Company, 1961.
- 13) 野口昌邦, 西尾功：最新医学, 30, 155 (1975).
- 14) Trowell, O. A. : Exptl. Cell Res., 16, 118 (1959).
- 15) Medawar, P. B. : Quart. J. Microscop. Sci., 89, 187 (1948).
- 16) Chen, J. M. : Exptl. Cell Res., 7, 518 (1954).
- 17) Shaffer, B. M. : Exptl. Cell Res., 11, 244 (1956).
- 18) Trowell, O. A. : Exptl. Cell Res., 6, 246 (1954).
- 19) Fell, H. B. & Robison, R. : Biochem. J., 23, 767 (1929).
- 20) Morgan, J. F., Morton, H. J. & Parker, R. C. : Proc. Soc. Exper. Bio. & Med., 73, 1 (1950).
- 21) Eagle, H. : Science, 122, 501 (1955).
- 22) Eagle, H. : Science, 130, 432 (1959).
- 23) Healy, G. M., Fisher, D. C. & Parker, R. C. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 89, 71 (1955).
- 24) Evans, V. J., Bryant, J. C., Fioramonti,

- M. C., McQuilkin, W. T., Sanford, K. K. & Earle, W. R. : *Cancer Res.*, **16**, 77 (1956).
- 25) Evans, V. J., Bryant, J. C., McQuilkin, W. T., Sanford, K. K. & Earle, W. R. : *Cancer Res.*, **16**, 87 (1956).
- 26) Parker, R. C., Castor, L. N. & McCulloch, E. A. : *Special Publ. New York Acad. Sci.*, **5**, 303 (1957).
- 27) Rappaport, C., Poole, J. P. & Rappaport, H. P. : *Exper. Cell Res.*, **20**, 465 (1960).
- 28) Rappaport, C. : *Exper. Cell Res.*, **20**, 479 (1960).
- 29) Katsuta, H., Takaoka, T. & Kikuchi. : *Jap. J. Exper. Med.*, **31**, 125 (1961).
- 30) Röller, M. R., Owen, S. P. & Heidelberger, C. : *Cancer Res.*, **26**, 626 (1966).
- 31) Fabrikant, J. I., Wisseman, C. L. III & Vitak, M. J. : *Radiology*, **92**, 1309 (1969).
- 32) Chen, J. M. : *J. Physiol. (London)*, **125**, 148 (1954).
- 33) Rivera, E. M. & Bern, H. A. : *Endocrinology*, **69**, 340 (1961).
- 34) Franks, L. M. : *Exptl. Cell Res.*, **22**, 56 (1961).
- 35) Ceriani, R. L., Contesso, G. P. & Nataf, B. M. : *Cancer Res.*, **32**, 2190 (1972).
- 36) Gey, G. O. : *Am. J. Cancer*, **17**, 752 (1933).
- 37) Gey, G. O. & Gey, M. K. : *Am. J. Cancer*, **27**, 45 (1936).
- 38) Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. & Singh, R. M. M. : *Biochemistry*, **5**, 467 (1966).
- 39) Williamson, J. D. & Cox, P. : *J. Gen. Virol.*, **2**, 309 (1968).
- 40) Shipman, C. Jr. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **130**, 305 (1969).
- 41) Fisk, A. & Pathak, S. : *Nature*, **224**, 1030 (1960).
- 42) Dickens, F. : *Biochem. J.*, **40**, 171 (1946).
- 43) Stacie, W. C., Riggs, B. C. & Haugaard, N. : *J. Bio. Chem.*, **160**, 209 (1945).
- 44) 大星章一 : 人癌細胞の培養 (大星・菅野編), 第1版, 118頁, 東京, 朝倉書店, 1975.

Abstract

Human malignant tissues were cultivated by various organ culture methods in which human fibrin foam was used as the matrix and the viabilities of cultured tissues were histologically determined.

In experiment I, the tissue fragments of ten gastric cancers were cultivated by the settled organ culture method in which the human fibrin foam was used as the matrix in the dish. But the viabilities of the cultured tissues were histologically poor. However, some cancer cells in a part of the cultured tissue fragments invaded into the human fibrin foam in spite of the poor viabilities. So the possibility of three-dimensional culture of tissue fragments was suspected on the human fibrin foam.

In experiment II, a new organ culture method in which the tissue fragments was cultivated on human fibrin foam in a roller tube was designed and various human malignant tissues were cultivated by this rolling organ culture method. The viabilities of cultured tissues of fifteen gastric cancers by the rolling organ culture method were histologically better than those of ten gastric cancers by the settled organ culture method, but the organ culture of human gastric cancer was found difficult. On the contrary, the viabilities of cultured tissues of one colon cancer, two rectal cancers, one pulmonary cancer, three thyroid cancers, two breast cancers and one ovarial cancer were remarkably better than those of the gastric cancers by the rolling organ culture method.

In experiment III, the tissue fragments of eight gastric cancers, three rectal cancers, one breast cancer and one thyroid cancer were cultivated by the hyperbaric rolling organ culture method. However, the viabilities of the cultured tissues of eight gastric cancers were not improved by the hyperbaric rolling organ culture method and those of three rectal cancers, one breast cancer and one thyroid cancer were poorer in comparison with the experiment II.

The results were as follows:

1) The rolling organ culture method in which the human fibrin foam was used as the matrix was more useful for the cultivation of the human malignant tissues than the settled organ culture method.

2) There was a remarkable difference between the viabilities of the cultured tissues of gastric cancers and of the other malignant tissues by the rolling organ culture method.

3) The hyperbaric oxygen condition was not necessary for the organ culture of human malignant tissues and was suspected to be toxic for some human malignant tissues.
