

Newly Established Human Tumor Cell Line:  
NCC-nu Derived from Renal Cancer -Comparative  
Examination of Chemo- and Thermo-sensitivity of  
the Cells in vitro-

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7764">http://hdl.handle.net/2297/7764</a>

## ヒト腎癌細胞株 (NCC-nu 細胞) の樹立および その *in vitro* 抗癌剤感受性と温熱療法効果

金沢大学がん研究所外科部 (主任：磨伊正義教授)

沢 口 潔

(昭和60年1月14日受付)

本研究は、臨床的アプローチを目的としてヒト癌細胞の *in vitro* におけるその生物学的特性および抗癌剤、温度に対する感受性について検討した。手術により摘出後、ヌードマウス (BALB/C, nu/nu) に移植した腫瘍組織を用い、ヒト腎癌由来細胞培養株 (NCC-nu) を新しく樹立した。この細胞株をダルベッコのイーグル変法培地で培養したところ、多角形の上皮性細胞が一層の増殖を示し、所々に巨大細胞の混在を認めた。細胞倍加時間は27時間で、コロニー形成率は約50%であった。コロニー性クローニングで分離した7株のクローンは、その母細胞である非クローン細胞に比べて細胞倍加時間は48時間以上と長く、またコロニー形成率も5~25%と低かった。染色体の分析は継代38代と84代で行った。両代ともにモードは64で、染色体は人型を示す低三倍性であった(64 XXY)。ヌードマウスへの再移植により境界明瞭な腫瘍を形成し、組織像はそのヒト原腫瘍と同様であった。さらに、コロニー形成法を用いて、アドリアマイシン (ADM)、マイトマイシン (MMC)、およびカルバジールキノン (CQ) の NCC-nu 細胞と HeLa 細胞に対する殺細胞効果を比較検討したところ、これら薬剤の両細胞株における濃度依存曲線は exponential decrease type を示した。2時間または6時間処理後の50%および90%増殖阻止濃度 ( $IC_{50}$ ,  $IC_{90}$ ) は、CQが両細胞に対し最も殺細胞効果が高かった。しかし therapeutic index (臨床投与濃度/ $IC_{90}$ ) では ADM が NCC-nu 細胞に対し最も効果的であった。さらに low grade hyperthermia (39°Cおよび42°C, 2時間処理) と ADM および CQ による抗癌剤との併用で相乗的殺細胞効果を示し将来的に温熱化学療法の有効性を示唆するものであった。

---

**Key words** clear cell carcinoma, human renal cell line, HeLa cell,  
*in vitro* chemosensitivity, low grade hyperthermia.

---

1907年、Harrison<sup>1)</sup>により始められた組織培養は、その後、Carrelら<sup>2)</sup>によりヒト悪性腫瘍培養が試みられ、1952年 Geyら<sup>3)</sup>により黒人子宮頸癌由来の HeLa 細胞株の樹立に成功した。これを契機としてヒト悪性腫瘍由来株の樹立が数多く報告され<sup>4)~6)</sup>、これらは悪性腫瘍に関する生化学、免疫学、ウイルス学などの基礎的研究に応用され、ヒト癌の生物学的特性を知る上で寄与するところ大であった。さらに、1956年 Puckら<sup>7)</sup>が培養細胞を用いての *in vitro* コロニー形成法により放射線の生物物理学的作用の定量化に成功して以

来、抗癌剤の殺細胞効果の定量化<sup>8)~10)</sup>にも応用され、抗癌剤研究に重要な方法として用いられている。

一方、今日の癌化学療法の進歩発展は、これら培養細胞や実験動物を用いて、腫瘍に対して選択的にはたらく抗癌剤を開発することと、それら抗癌剤のより効果的な利用法<sup>11)</sup>の二者に負うものと考えられる。これらの中で、抗癌剤の剤型転換<sup>12)~14)</sup>や非抗癌剤との併用<sup>15)~19)</sup>などの試みのほかに、比較的古くより行われてきた温熱療法<sup>20)~22)</sup>や他の治療法<sup>23)~25)</sup>との併用による増感効果現象も試みられ、臨床的にも効果を上げつつ

---

Abbreviations: ADM, adriamycin; AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; CEA, carcinoembryonic antigen; CFI-15, Connaught Medical Research Laboratory-1066 contains 15% fetal bovine serum and insulin; CMRL-1066, Connaught Medical Research Laboratory-1066; CQ, carbazilquinon; CT, computed tomography; DF-5, Dulbecco's modified Eagle's medium contains 5% fetal

ある。

以上の事実を踏まえ、著者はヒト癌細胞の単層培養を試み、1例の腎癌由来細胞株を樹立しその性状について検討した。さらに、その新樹立化細胞のコロニー形成法による抗癌剤の *in vitro* における殺細胞効果および加温の併用による抗癌剤増感作用について、HeLa 細胞と比較しつつ実験して得た結果について以下に報告する。

### 材料および方法

#### I. 材 料

59才男性、左腹部巨大腫瘍のため当科受診し、超音波、CT スキャン、血管造影で腎癌と診断し、1983年4月18日左腎摘出術を施行した。腫瘍は21×17×10 cmで脾臓、大腸、横隔膜に直接浸潤し、重量1750 gであった。術後の病理学的検索よりこの腫瘍は腎淡明細胞癌 (Grawitz's tumor) と診断された。

摘出腫瘍の一部をヌードマウス5匹に移植したところ、1匹に生着し、その継代1代目の腫瘍を培養出発材料として使用した。

#### II. 癌細胞単離法

Miyazaki ら<sup>26)</sup>の肝細胞単離法に準じて行った。ヌードマウスをエーテル麻酔後屠殺、皮膚をアルコールで消毒し、無菌的に血管、結合組織をなるべく除去しながら腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍をハンクス液に入れ、腫瘍中心壊死部を除去し、メス2本で可及的すみやかに1~2 mm角に細切した。その後0.5 mM ethyleneglycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) NN'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma, Chem. Co., U. S. A.) を加えて pH 7.4 に調整したハンクス液 ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  free) (Gibco, Co., U. S. A.) にて4°C30分間洗浄した。50×g, 5分間低速遠心上清除去後、0.05% コラゲナーゼ (type IV, Sigma, Chem. Co., U. S. A.) を加えたハンクス液で37°C30分間振盪し、消化を行った。その後EGTAを加えたハンクス液 ( $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  free) で再度洗浄し、低速遠心上清除去後ディスペーゼ (1000 pu/ml: 合同酒精社, 東京) で37°C30分間振盪消化を行った。ついで充分なピペッティングを行い、ナイロンストッキングで濾過し、濾液を50×gの低速遠心で5分間3回繰り返し洗浄して腫瘍細胞を単離した (図1)。

単離細胞はトリパンブルーを用いて染色し、非染細

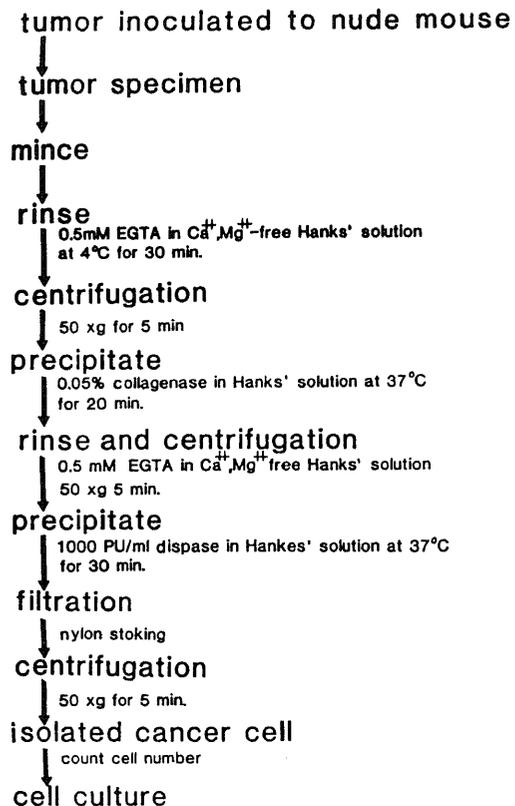


Fig. 1. Isolation and preparation of NCC-nu cells from tumor tissues.

胞を生細胞として血球計算板で計測した。

#### III. 初代培養

##### 1. 培養液

85% Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (日水製薬, 東京), CMRL-1066 (Gibco, Co., U. S. A.) および RPMI-1640 (Gibco, Co., U. S. A.) と 15% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Co., U. S. A.) より成る培養液に抗癌剤 (カナマイシン 100  $\mu$ g/dl, ファンギゾン 0.1 Cq/dl) さらに使用直前インスリン 0.8 U/ml を追加した3種の培養液を使用した (以下それぞれの培養液を DFI-15, CFI-15, RFI-15 と略す)。

##### 2. 培養法

それぞれの培養液で単離生細胞数  $50 \times 10^4$  cells/ml の細胞浮遊液を作成し, plastic flask (Falcon, Co.,

bovine serum; DF-10, Dulbecco's modified Eagle's medium contains 10% fetal bovine serum; DFI-15, Dulbecco's modified Eagle's medium contains 15% fetal bovine serum and insulin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethyleneglycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether) NN'-tetraacetic acid; FBS, fetal bovine

3013)に5 ml づつを分注して37°C湿潤, 5%CO<sub>2</sub>/95% air 下に初代培養を行った。培養液の交換は培養開始3日目に初めて行い, 以後2日に1度半量ずつ交換した。

#### IV. 継代培養

##### 1. 培養液

継代1代より8代までは初代培養に用いたDFI-15, CFI-15及びRFI-15を使用した。7代以後はインスリンの使用を中止し, 85%DMEMと15%FBSよりなる培養液を使用した。さらに30代以後は血清濃度を10%に減少した90%DMEMと10%FBSよりなる培養液(DF-10)に切り替えた。

##### 2. 培養法

0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)と0.025%トリプシン(Difco, U. S. A.)を用いて細胞浮遊液を作製し, 1:2又は1:3 splitで3日より5日に1回継代を行った。培養条件は, 開放系(37°C, 湿潤, 5%CO<sub>2</sub>/95%air)と閉鎖系(37°C)とで行った。

#### V. 細胞増殖曲線の測定

継代培養後3日で70~80%にconfluentとなった細胞をEDTA, トリプシンで剥離し, パスツールピペットで充分ピペッティングを行い, 細胞浮遊液を作成した。この細胞浮遊液を10<sup>6</sup>cells/mlに希釈した後, Falcon tissue culture dish 3001, 直径20 mmに2 ml づつ分注し培養した。培養開始6時間又は10時間後より8日後までEDTAとトリプシンを用いて, 毎日経時的にdish 3枚づつから細胞浮遊液を作成した。その生細胞数をトリパンブルー染色により, 血球計算板で計測し, その平均値をプロットした。

#### VI. 光顕観察

各代の生細胞を倒立位走査顕微鏡で観察したほか, Lab-Tek, 4804 (Miles, Lab., Inc., U. S. A.)で培養した細胞にヘマトキシリン-エオジン染色, Periodic Acid Schiff 染色(PAS染色), ズダンIII染色を行い観察した。

#### VII. 電顕観察

dish内に培養した細胞を2.5%グルタルアルデヒド液4°C30分間固定後, 0.1 M カゴジール酸緩衝液で洗浄し, 2%四酸化オスミウムで固定した。固定した細胞をEponで包埋後dish面より手動的に剥がし細胞付着面に水平にダイヤモンドカッターを用いて標本を作成し, 2%酢酸ウラン水溶液で染色し観察した。

#### VIII. コロニー形成率の測定

対数増殖期の細胞をEDTA, トリプシンを用いて95%以上のsingle cell suspensionとして, トリパンブルー染色より総生細胞数を算定した。これを培養液で希釈し, Falcon tissue culture dish 3002, 直径60 mmに3 ml づつ分注し, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>/95%airで8日間培養した。ついで, 培養液を捨て, 10%ホルマリンで固定後, 1%クリスタルバイオレットで染色し, 30個以上の細胞よりなるコロニーを倒立顕微鏡下に算定した。植え込み細胞数に対するコロニー数の比を求め, コロニー形成率とした。植え込み細胞数は各dish 100個, 200個, 400個とし, それぞれ3枚ずつのdishの平均より求めた。なお, 培養液はDF-10を使用した。

#### IX. 細胞のクローニング

このクローニングは既報<sup>27)</sup>のコロニー性クローニング法に準じた。前記コロニー形成法と同様に50 cells/dishの細胞をFalcon plastic dish 3002に植え込みコロニー形成を行わせた。ついで純水で処理した濾紙細切片(1 mm角)に0.02%トリプシンを浸したものをあらかじめ倒立顕微鏡下にdishの裏面より印した目的のコロニー上に数分のせて作用させた。その濾紙片を別のシャーレの培養液の中で振り, 吸着している細胞を剥がし, そのまま静置培養して再度コロニー形成を行った。この操作を3回繰り返して行い, コロニー性クローニングをした細胞とした。

#### X. 染色体分析<sup>28)</sup>

培養2日目の対数増殖期の細胞に0.05 µg/ml デメコルチン(コルセミッド, 和光製薬, 大阪)を加えて2時間培養した。その後EDTA, トリプシンを用いて細胞を単離し, ギムザ染色では1%クエン酸ソーダ水で, Gバンド染色では0.075 M~0.016 M, KClを用いて低張液処理を行った。細胞固定はカルノア液で行い, 10<sup>6</sup>cells/mlの細胞を浮遊させスライドガラスに滴下した。ギムザ染色にはガスバーナーにより乾燥し, Gバンド染色には自然乾燥を行った。Gバンド染色はさらに0.1%トリプシンにて1分処理後ギムザ液で染色した。観察は光学顕微鏡400倍又は1000倍にて写真撮影を行った。

#### XI. ノードマウス戻し移植

EDTA, トリプシンで細胞浮遊液を作製し, 培養液0.2 mlに目的数の細胞を浮遊させ, ノードマウス

serum; IC<sub>50</sub>, 50% growth inhibitory concentration; IC<sub>90</sub>, 90% growth inhibitory concentration; MMC, mitomycin C; PAS, periodic acid Schiff; RFI-15, Roswell Park Memorial Institute Media-1066 contains 15% fetal bovine serum and insulin; RPMI-1066, Roswell Park Memorial Institute Media-1066; S. R., survival rate.

(BALB/C, nu/nu)の大腿筋内に皮内針を用いて接種した。細胞数は $50 \times 10^4$ ,  $100 \times 10^4$ ,  $250 \times 10^4$ , cells/mouse で各群 1 匹から 5 匹を用いて 2 回の移植実験を行った。

### Ⅲ. 抗癌剤殺細胞効果測定<sup>9)~10)</sup>

一般に濃度依存性と考えられるマイトマイシン C (MMC), アドリアマイシン (ADM), カルバジールキノン (CQ) についてコロニー形成法により腎細胞癌 (NCC-nu) および, HeLa 細胞を用いて検討した。培養液は NCC-nu 細胞では DF-10, HeLa 細胞では 95% DMEM に 5% FBS を加えた (DF-5) のものを使用した。いずれも対数増殖期の細胞を用いて 200 個の細胞を 3 ml に single cell suspension として浮遊させ Falcon plastic dish 3002 に分注した。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下に 24 時間培養後, 高濃度より倍々希釈された抗癌剤含有培養液と交換して, 2 時間および 6 時間培養した。ついで培養液を除去した後, ハンクス液で 3 回洗浄し, 以後抗癌剤を含まない培養液にて 7 日間培養した。対照としての抗癌剤無処置群も同様の洗浄と培養液交換を行った。8 日目に培養液を除去し, 1% クリスタルバイオレットにて染色し, 各 dish の細胞数 30 個以上よりなるコロニー数を倒立顕微鏡下に測定した。各実験は triplicate にて行い, 同様の実験を 3 回くり返し行った。各濃度における survival rate (S. R.) は次の式より算出した。

$$S. R. (\%) = \frac{\text{処置群のコロニー数}}{\text{無処置群のコロニー数}} \times 100$$

この式より得られた値を probit 値に変換し, それぞれの回帰直線より生存率 50% および 90% の殺細胞効果を示す薬剤濃度を IC<sub>50</sub> 値 (50% growth inhibitory concentration), IC<sub>90</sub> 値 (90% growth inhibitory concentration) として求めた。

### Ⅲ. 温度感受性

NCC-nu 細胞と HeLa 細胞を用い抗癌剤殺細胞効果測定と同様に dish あたり 200 個の細胞を植え込み, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下に 24 時間培養後, 39°C および 42°C の炭酸ガス培養装置内で 2 時間より 12 時間の加温を行い, その後再度 37°C 下に 7 日間の培養を行った。8 日目クリスタルバイオレットで染色し, コロニー数を測定した。本実験も triplicate で 3 回くり返し行い各加温時間における survival rate を算出した。

### Ⅳ. 抗癌剤の加温による増感作用

NCC-nu 細胞について抗癌剤殺細胞効果と同様の方法を用い, さらに抗癌剤作用時にあらかじめ 37°C に加温した培養液に使用直前に抗癌剤を希釈し, 39°C および 42°C の培養装置内で 2 時間および 6 時間の培養を行った。

## 成 績

### Ⅰ. ヒト腎癌細胞株の樹立過程

ヌードマウス腫瘍より単離された癌細胞を DFI-15, CFI-15, RFI-15 それぞれで生細胞数  $50 \times 10^4$  cells/ml の細胞浮遊液を作成し, 初代培養を行った。3 種培養液ともに細胞は一層の敷石状に付着した。培養液の交換は, 培養開始 3 日目に初めて行い以後培養液を 2 日に一度半量ずつ交換した。1 回目の継代は初代培養開始後 4 日目より 11 日目までに行った。

継代後, 3 種の培養液すべてにおいて細胞の増殖を認めたが, RFI-15 では他 2 種培養液に比して極めて増殖が遅く, また DFI-15 と CFI-15 とでは増殖に差は見られなかった。さらにインスリン含有の有無でも差はなく, 7 代以後は 15% fetal bovine serum を含有した DMEM のみを使用した。継代 30 代以後は血清濃度を下げて DF-10 を使用したが細胞増殖に影響はなかった。さらに培養条件を変更して Ham's F-12 に 10% calf serum を加えた培養液では増殖が悪かったので, この培養液の継続使用は行わなかった。

開放系と閉鎖系何れにおいても増殖に大差は見られず, 開放系と閉鎖系の両方で培養を続けた。継代は 1:2 または 1:3 split で 3 日より 5 日に一度行い, 現在, 培養開始 450 日を, 継代 120 代を超え安定した増殖を示しており, この細胞株を NCC-nu と命名した。

### Ⅱ. 樹立化細胞 (NCC-nu) の性状

#### 1. 形態

##### 1) 光顕像

培養細胞は多角形の大型細胞が一層の敷石状の配列を示し, また核も比較的大きく 1 個から数個の核小体を有していた。さらにところどころ単核または多核の巨大細胞を混じていた (図 2 a)。PAS 染色ではわずかに PAS 陽性細胞がみられたのみで, 大部分の細胞では PAS 染色は陰性であった。ズダン III 染色では胞体内に多数の赤褐色顆粒を有し, 脂肪が豊富であることを示していた (図 2 b)。

##### 2) 電顕像

細胞は明瞭な核小体のある大型核をもち, junctional complex が見られ, microvilli<sup>29)</sup> は少数であった。原形質内核近傍にはゴルジ装置が発達し, ミトコンドリア, 粗面小胞体も多く, またグリコーゲン顆粒が豊富で脂肪滴も認められた (図 3)。

#### 2. 増殖曲線

増殖開始後, 10 数時間は細胞数増加のない lag phase を認め, 対数増殖期, そしてプラトーに達し, 次に定常期という通常の増殖度を示した。対数増殖期に細胞数の 2 倍となる時間, つまり細胞世代倍加時間

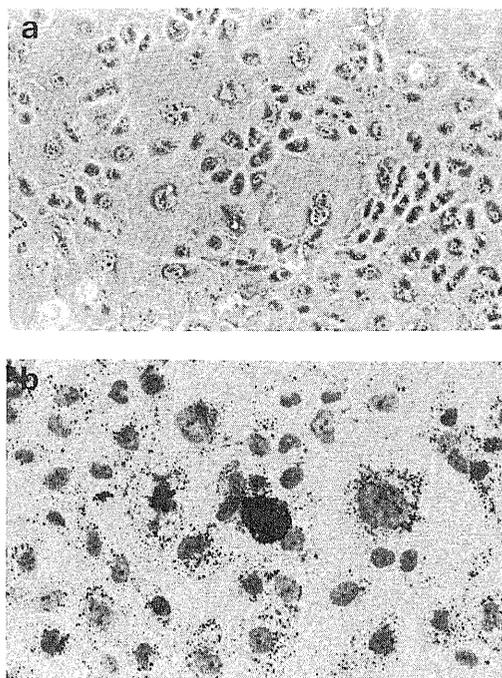


Fig. 2. (a) Phase-contrast inverted microscopic view of human renal cell carcinoma cell line: NCC-nu (74 th generation). Polygonal epithelial cells with giant cells are growing as a sheet.  $\times 200$ . (b) Sudan III stain of cultured cells, NCC-nu. Cytoplasm contains large number of red-brown granules.  $\times 200$ .

(population doubling time) は著者の培養条件で約 27 時間で、継代による変化は現在まで認められない (図 4)。

### 3. NCC-nu 細胞のクローン化細胞

コロニー性クローニングにより、継代 35 代より NCC-35 A と継代 38 代より NCC-38 Ab, NCC-38 Da, NCC-38 Ea, NCC-38 Ga, NCC-38 Ia, NCC-38 Ja の 7 株のクローンを分離した。全てのクローン細胞は非クローン細胞に比して増殖は遅く、比較的増殖の速い NCC-35 A においても population doubling time は約 48 時間と非クローン細胞の 1.8 倍であった。

### 4. コロニー形成率

各 dish あたり 100 個, 200 個, 400 個の細胞を植えたコロニー形成率は、NCC-nu 非クローン細胞ではそれぞれ  $52.3 \pm 4.9\%$ ,  $44.5 \pm 3.7\%$ ,  $41.8 \pm 1.8\%$  であった。7 株のクローン細胞は全て非クローン細胞に比してコロニー形成率は低く、 $2.3 \sim 27\%$ を示した。また比較に用いた HeLa 細胞はそれぞれ  $56.4 \pm 4.0\%$ ,  $65.2 \pm 6.2\%$ ,  $56.4 \pm 3.2\%$ であった (表 1)。

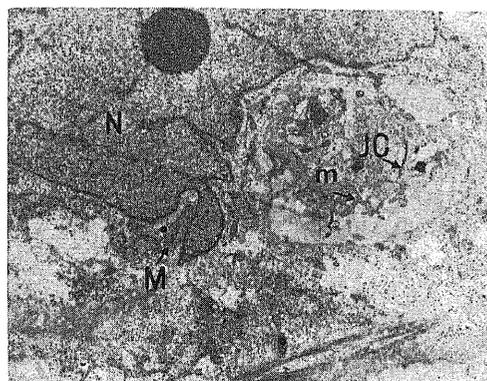


Fig. 3. Electron microphotograph of the cultured cells, NCC-nu. The cells have junctional complex and microvilli. N, nucleus; M, mitochondria; JC, junctional complex; m, microvilli.  $\times 3000$ .

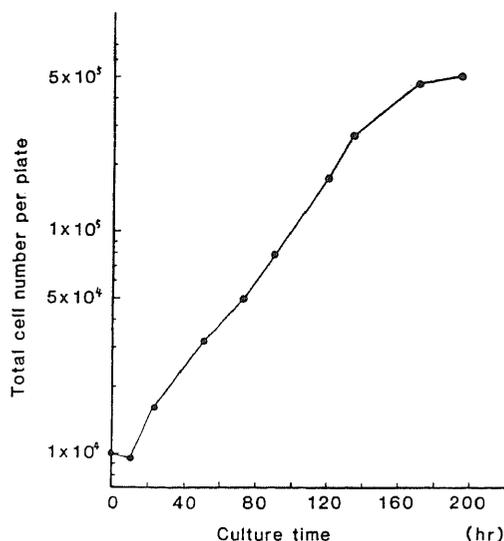


Fig. 4. Growth curve of NCC-nu cells. The cells are cultured in a medium composed of 90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum. The results are shown as mean of three dishes.

### 5. 染色体分析

染色体をみるためにギムザ染色と G バンド染色を行った。この際、ギムザ染色は 1% クエン酸ソーダによる低張処理により十分な染色体の拡がりを得た。しかし、KCl 低張処理による G バンド染色で一般に使用される 0.075 M から 0.065 M の KCl 処理では染色体の拡がりが悪く最終的に 0.016 M の KCl で 20 分の低張処理を行い標本を作製した。

染色体はすべてヒト型で、ヌードマウス移殖腫瘍ということより懸念されたマウス染色体の混在はなく、44個から144個と幅広い分布を示した。モードは継代38代、84代共に64個で継代による若干の変動はあるものの大きな分布の差は見られなかった(図5)。84代のGバンド染色で、7q(+)のマーカー染色体を有する64XXYの低3倍性であることが判明した。この7q(+)のマーカー染色体は4番長腕の転座の可能性が示唆された(図6)。

Table 1. Plating efficiency of NCC-nu (uncloned and seven clones) cells and HeLa cells

cells/dish	100	200	400	
cells				
NCC-nu (uncloned)	52.3±4.9	44.5±3.7	41.8±1.2	
cloned	NCC 35A	25.7±2.4	27.3±0.9	20.5±2.8
	NCC 38Ab	2.3±1.2	3.8±0.5	3.7±0.9
	NCC 38Da	13.7±3.6	14.8±2.5	12.9±1.0
	NCC 38Ea	4.3±1.6	2.7±0.9	3.6±0.4
	NCC 38Ga	14.7±3.1	11.4±3.1	13.0±1.2
	NCC 38Ia	19.3±5.5	24.0±3.3	26.5±1.0
	NCC 38Ja	19.0±1.7	19.5±2.3	13.6±0.4
HeLa	56.4±4.0	65.2±6.2	56.4±3.2	

The results are shown as mean±S.D. (n=3). (%)

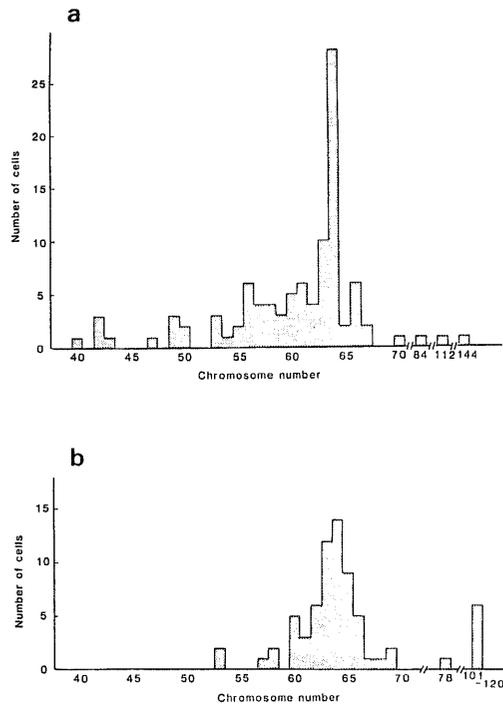


Fig. 5. Chromosome frequency of NCC-nu cells. (a) 38th generation (b) 84th generation.

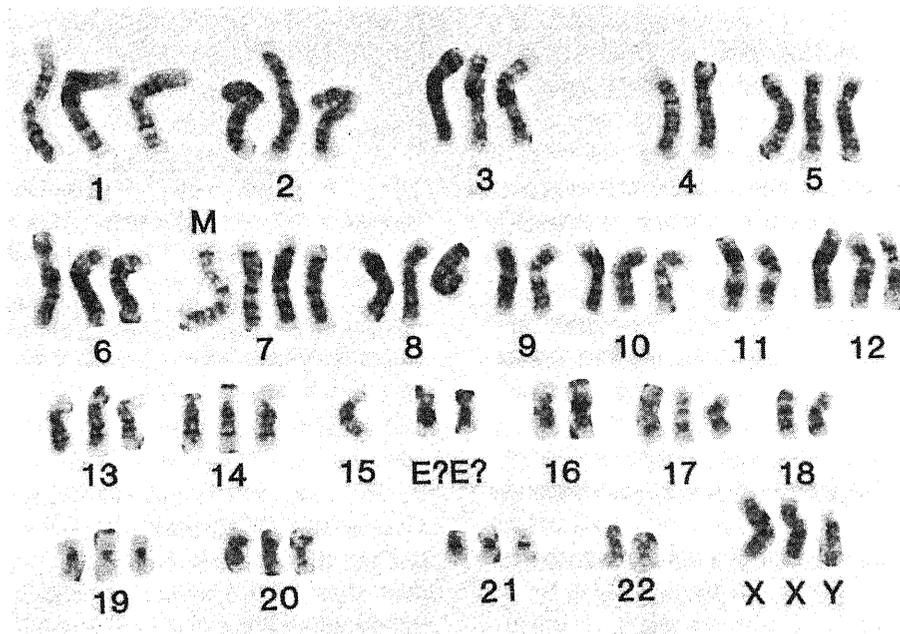


Fig. 6. Modal karyotype of NCC-nu cells (G-banding). M, marker chromosome.

## 6. ノードマウス戻し移植性

非クローン細胞では、2回の移植実験で、1回目  $100 \times 10^4$  個の細胞を移植した3匹の内、1匹に腫瘍形成がなかった以外、全てのマウスで腫瘍を形成した。そして移植より腫瘍の出現までの期間、いわゆる潜伏期は移植細胞数が多いほど短かった(表2)。しかしクローン細胞である NCC-35 A では細胞数にかかわらず腫瘍形成は見られなかった。

ノードマウス戻し移植により形成された腫瘍組織像は、手術摘出標本と同様の淡明細胞癌で、明るい胞体を有する中～大型の細胞が索状配列あるいは一部管腔を形成し、豊富な血管増生を伴っている。また核は大小不同を伴い、異型性が強い(図7, a, b.)。

Table 2. Tumor incidence by retransplantation of NCC-nu cells to nude mouse

cell/mice	$50 \times 10^4$	$100 \times 10^4$	$250 \times 10^4$
Exp. 1	3/3* (7w)*	2/3* (6w)*	
Exp. 2	5/5* (6w)*	5/5* (5w)*	1/1* (3w)*

\* Latent periods (week), \* No. of tumor (+) mice/No. of mice retransplanted.

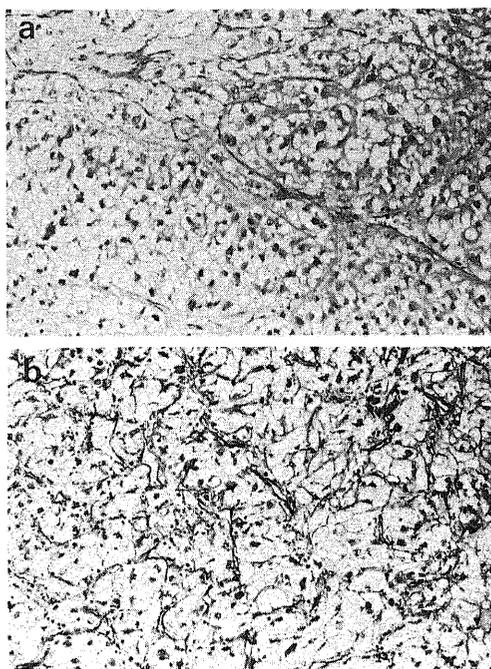


Fig. 7. (a) Histology of clear cell carcinoma from the patient. (b) Histology of the tumor formed in nude mouse after transplantation of NCC-nu cells. Hematoxylin-eosin stain.  $\times 200$ .

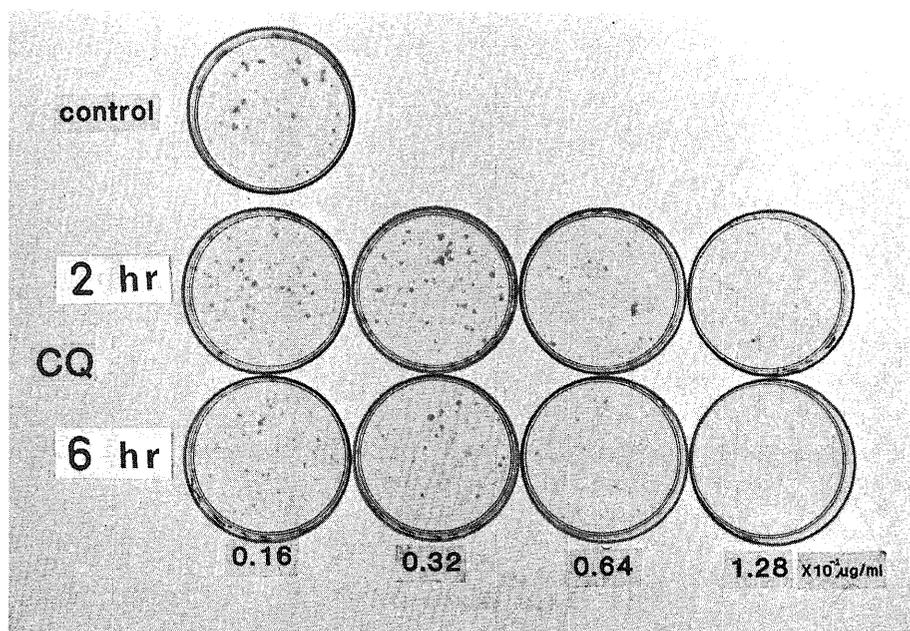


Fig. 8. Colony forming assay after treatment with CQ (carbazonin). One dish contains 200 cells. The cells were exposed to various concentration of CQ for 2-hr or 6-hr. After exposure, the drug was removed and the cells were washed three times with Hanks' solution. Then, the cells were further cultured for 7 days and colonies formed were counted after staining with crystal violet.

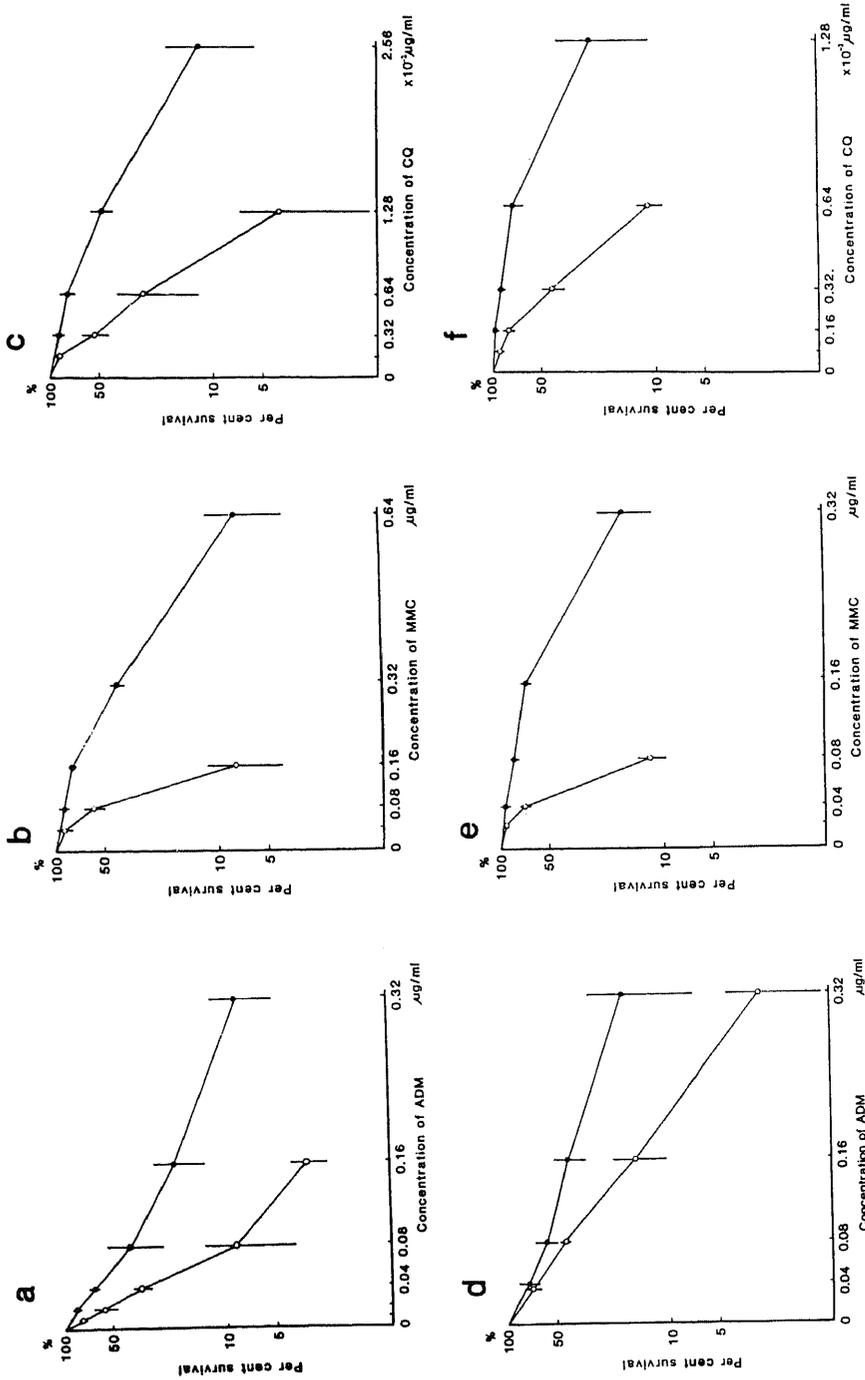


Fig. 9. Dose-survival curve of cells treated with drugs. The cells were exposed to different concentration of the drugs in medium for 2-hr or 6-hr. After exposure, the drugs were removed and cells were washed three times with Hanks' solution. Then the cells were cultured for 7 days. Survival rate of the cells was determined by colony-forming assay as explained in Materials and Methods. (a)NCC-*nu* cells treated with ADM (adriamycin); (b)NCC-*nu* cells treated with MMC (mytomycin C); (c)NCC-*nu* cells treated with CQ (carbazilquinon); (d) HeLa cells treated with ADM; (e) HeLa cells treated with MMC; (f) HeLa cells treated with CQ. (●—●) 2-hr exposure, (○—○) 6-hr exposure. The results are shown as mean  $\pm$ S. D. (n=9).

7. 細胞産生物質検査<sup>30)~32)</sup>

培養液中に癌細胞由来の生物活性物質の産生があるかどうかを検査するために、細胞培養3日目の培養液につき測定した。しかし、エリスロポイエチン、プロスタグランジン、副甲状腺ホルモン、トランスフェリン、CEA (carcinoembryonic antigen)、AFP ( $\alpha$ -fetoprotein) などの産生は全てみられなかった。

## III. 抗癌剤感受性試験

前記のコロニー形成実験より、抗癌剤感受性試験にさいして、NCC-nu 細胞では最もコロニー形成率の高い非クローン細胞を使用した。また植込み細胞数が400個以上ではコロニー間の癒合が見られるため、約100個のコロニー形成が期待できる1dishあたり200個の細胞を植え込んだ。HeLa 細胞ではこのようなコロニーの癒合は見られなかったが、同様に1dishあたり200個の細胞を用い、感受性試験に供した。

## 1. 形成コロニーの性状

今回コロニーとして算定したのは、30個以上の細胞数よりなる細胞集団であるが、抗癌剤作用群では1個のコロニーを形成する細胞数が少ない傾向にあり、30個以下の細胞より成るコロニーがしばしばみられた。コロニー数については、一般に濃度に依存して減少し、また2時間処理群より6時間処理群の方がより少なかった(図8)。

## 2. 濃度依存曲線について

NCC-nu 細胞、HeLa 細胞におけるADM, MMC, CQそれぞれ2時間および6時間接触によるコロニー形成率を薬剤各濃度につき測定した。得られた濃度依存曲線(図9 a~f)は、3剤全て類似したexponential decreased typeであり、biphasic typeはなかった<sup>33)34)</sup>。

3. IC<sub>50</sub>値とIC<sub>90</sub>値

それぞれの回帰直線より求めたIC<sub>50</sub>値およびIC<sub>90</sub>値を表3に示す。2時間処理群(表3 a)では両細胞においてCQがIC<sub>50</sub>値、IC<sub>90</sub>値ともに最も低い値を示した。次いで両細胞のADMでのIC<sub>50</sub>値が低く、NCC-nu細胞のIC<sub>90</sub>値はADM, MMCの順に低かった。しかしHeLa細胞のIC<sub>90</sub>値はMMC, ADM両者ともにほぼ同様でそれぞれ0.37  $\mu$ g/ml, 0.36  $\mu$ g/mlであった。6時間処理群(表3 b)でも両細胞のIC<sub>50</sub>値、IC<sub>90</sub>値はともにCQが最も低い値を示し、ついでNCC-nu細胞ではADM, MMC, またHeLa細胞ではMMC, ADMの順であった。

これらの両細胞における薬剤感受性の有意差をそれぞれのIC<sub>50</sub>値、IC<sub>90</sub>値を用いてt分布より検定した。ADMでは2時間処理群において有意差はなかったが、6時間処理群でIC<sub>50</sub>値、IC<sub>90</sub>値ともに有意差(p<

0.001)をもってNCC-nu細胞で低値を示し、ADMに高い感受性を有することが判明した。MMCでは2時間処理群、6時間処理群の全てで有意差を認め、2時間処理群のIC<sub>50</sub>値はp<0.01, IC<sub>90</sub>値はp<0.005, 6時間処理群ではIC<sub>50</sub>値、IC<sub>90</sub>値ともにp<0.005の有意差でHeLa細胞に高い感受性を認めた。またCQでは2時間処理群と6時間処理群のIC<sub>50</sub>値で1%以下の有意差を認め、さらに2時間処理群のIC<sub>90</sub>値でp<0.005, 6時間処理群のIC<sub>90</sub>値ではp<0.001の有意差を示してHeLa細胞に感受性がより高かった。

## 4. 時間依存性

今回実験に用いた3剤は全て濃度依存性薬剤であるが、時間依存性作用についてそれぞれ2時間および6時間処理群で検討し、IC<sub>90</sub>値の比で表した(表4)。

NCC-nu細胞ではMMCで3.93を示し、ADMの2.45, CQの2.57に比べ高値であり、またHeLa細胞でもMMCが4.50と他2剤より高値を示した。つまりMMCは3剤の内でも最も時間依存性作用を兼ね備えているといえる。

## 5. 臨床投与量との比較

臨床的に使用する各抗癌剤の一回投与量は当教室では通常ADM 30 mg, MMC 4 mg, CQ 2 mgを使用し

Table 3. *In vitro* chemosensitivity of NCC-nu cells and HeLa cells  
a

drug		NCC-nu cells	HeLa cells
ADM	IC <sub>50</sub>	0.09 $\mu$ g/ml	0.14 $\mu$ g/ml
	IC <sub>90</sub>	0.27 $\mu$ g/ml	0.37 $\mu$ g/ml
MMC	IC <sub>50</sub>	0.32 $\mu$ g/ml	0.21 $\mu$ g/ml
	IC <sub>90</sub>	0.59 $\mu$ g/ml	0.36 $\mu$ g/ml
CQ	IC <sub>50</sub>	$1.40 \times 10^{-2} \mu$ g/ml	$10.5 \times 10^{-2} \mu$ g/ml
	IC <sub>90</sub>	$2.57 \times 10^{-2} \mu$ g/ml	$1.75 \times 10^{-2} \mu$ g/ml

b

drug		NCC-nu cells	HeLa cells
ADM	IC <sub>50</sub>	0.03 $\mu$ g/ml	0.09 $\mu$ g/ml
	IC <sub>90</sub>	0.11 $\mu$ g/ml	0.22 $\mu$ g/ml
MMC	IC <sub>50</sub>	0.10 $\mu$ g/ml	0.05 $\mu$ g/ml
	IC <sub>90</sub>	0.15 $\mu$ g/ml	0.08 $\mu$ g/ml
CQ	IC <sub>50</sub>	$0.49 \times 10^{-2} \mu$ g/ml	$0.36 \times 10^{-2} \mu$ g/ml
	IC <sub>90</sub>	$1.00 \times 10^{-2} \mu$ g/ml	$0.63 \times 10^{-2} \mu$ g/ml

The chemosensitivity is expressed by 50% and 90% growth inhibitory concentration (IC<sub>50</sub> and IC<sub>90</sub>) of drugs. (a) 2-hr treatment with drugs, (b) 6-hr treatment with drugs.

ており、これは一般に使用されている投与量<sup>35)</sup>に該当する。それぞれの投与量で理論的に達し得る最高血中濃度は、循環血液量を5*l*とするとADM 6  $\mu\text{g/ml}$ 、MMC 0.8  $\mu\text{g/ml}$ 、CQ 0.4  $\mu\text{g/ml}$ と予想される。そこで各理論的血中濃度と実験より得られた比較的短時間処理すなわち2時間処理群のIC<sub>90</sub>値の比、つまり血中濃度/IC<sub>90</sub>値で現し、therapeutic index<sup>36)</sup>を求めた(表5)。

その結果therapeutic indexはNCC-nu細胞ではADMが22.2と最も高く、ついでCQ 15.6、MMC 1.4であった。またHeLa細胞ではCQ 22.9、ADM 16.2、MMC 2.2の順であり、換言すればNCC-nu細胞では

Table 4. Time dependency of lethal effect

Anti-tumor drugs	IC <sub>90</sub> (2 hr)/IC <sub>90</sub> (6 hr)	
	NCC-nu cells	HeLa cells
ADM	2.45	1.68
MMC	3.93	4.50
CQ	2.57	2.77

$$\text{Lethal effect} = \frac{\text{IC}_{90} \text{ treated for 2-hr}}{\text{IC}_{90} \text{ treated for 6-hr}}$$

IC<sub>90</sub>, 90% growth inhibitory concentration  
ADM, adriamycin; MMC, mitomycin C; CQ, carbazilquinon.

ADMが、HeLa細胞ではCQが臨床上の常用濃度で最も感受性効果を示すことが示唆された。逆にMMCは両細胞における臨床的効果はあまり期待できないものと考えられた。

#### 6. 温熱化学療法

##### 1) 温度感受性

NCC-nu細胞、HeLa細胞での39°C処理と42°C処理におけるコロニー形成率をグラフ上に経時的にプロットし回帰直線を求めた(図10,a,b)。

Table 5. Therapeutic index by anti-tumor drugs on NCC-nu cells and HeLa cells

Anti-tumor drugs	therapeutic index	
	NCC-nu cells	HeLa cells
ADM	22.2	16.2
MMC	1.4	2.2
CQ	15.6	22.9

Clinical dose=regular clinical dose/body blood volume (5*l*).

Regular clinical dose, ADM (adriamycin)=10 mg; MMC (mitomycin)=4 mg; CQ (carbazilquinon)=2 mg.

$$\text{Therapeutic index} = \frac{\text{Clinical dose}}{\text{IC}_{90} \text{ (90\% growth inhibitory concentration)}}$$

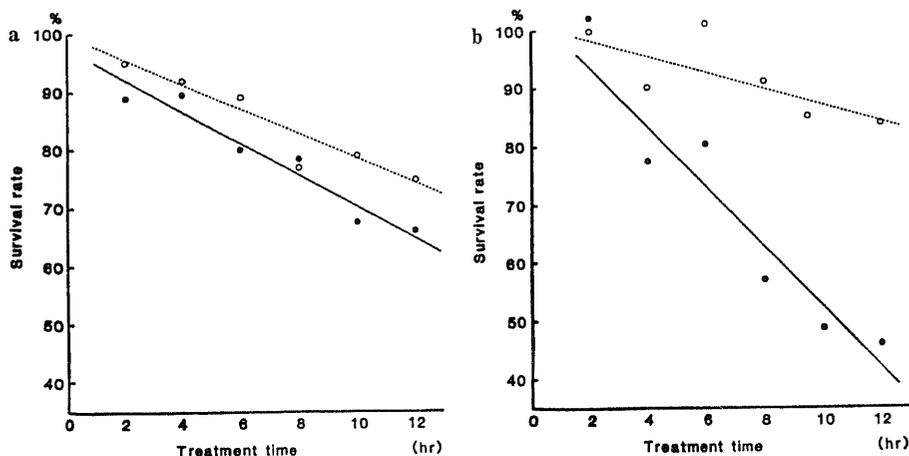


Fig. 10. Time-survival curve of the cells treated with low grade hyperthermia. The cells were incubated at 39°C or 42°C for 2-hr to 12-hr. After treatment, the cells were cultured for 7 days at 37°C.

Survival rate of cells was determined by colony-forming assay. The results are shown as mean of data obtained from nine dishes. (a) NCC-nu cells treated with low grade hyperthermia. ○, incubated at 39°C,  $Y = -2.1X + 99.9$  ( $r = 0.965$ ,  $p < 0.001$ ); ●, incubated at 42°C,  $Y = -2.8X + 98.2$  ( $r = 0.978$ ,  $p < 0.001$ ).

(b) HeLa cells treated with low grade hyperthermia. ○, incubated at 39°C,  $Y = -1.5X + 101.2$  ( $r = 0.829$ ,  $p < 0.05$ ); ●, incubated at 42°C,  $Y = -5.2X + 104.3$  ( $r = 0.961$ ,  $p < 0.001$ ).

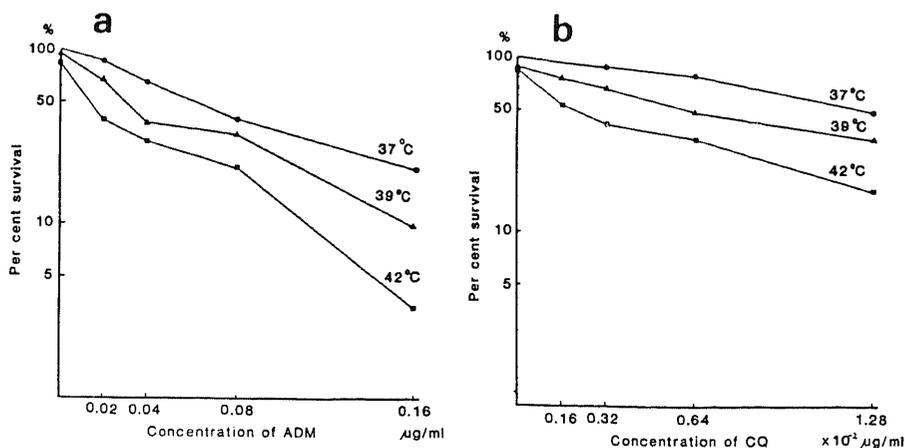


Fig. 11. The effect of low grade hyperthermia on dose response curve by adriamycin or carbazilquion in NCC-nu cells. The cells were incubated at 39°C or 42°C for 2-hr with different drug concentrations. After treatment, the drug was removed and the cells were washed three times with Hanks' solution. Then, the cells were cultured at 37°C for 7 days. Survival rate of cells were determined by colony-forming assay. (a) Case by ADM (adriamycin) combined with heat. (b) Case by CQ (carbazilquion) combined with heat. ●—●, 37°C (control); ▲—▲, 39°C; ■—■, 42°C; The results are shown as mean of data obtained from nine dishes.

それぞれの回帰直線は NCC-nu 細胞の 39°C 処理群では  $Y = -2.1X + 99.9$  ( $r = 0.95$ ,  $p < 0.001$ ), 42°C 処理群では  $Y = -2.8X + 98.2$  ( $r = 0.978$ ,  $p < 0.001$ ) であった。また HeLa 細胞の 39°C 処理群は  $Y = -1.5X + 101.2$  ( $r = 0.829$ ,  $p < 0.05$ ) で 42°C 処理群は  $Y = -5.2X + 104.3$  ( $r = 0.961$ ,  $p < 0.001$ ) であり時間とともに高い相関をもってコロニー数は減少した。回帰直線の傾きで比べると、42°C 処理群では HeLa 細胞で NCC-nu 細胞より傾きが大きく、また 39°C 処理群では NCC-nu 細胞で HeLa 細胞より大きな傾きを示した。つまり 42°C では HeLa 細胞の方が NCC-nu 細胞より温度感受性が高く、39°C では NCC-nu 細胞の方が HeLa 細胞より温度感受性が高かった。

## 2) 加温処理併用による抗癌剤の増感効果

therapeutic index の高かった ADM と CQ において 39°C および 42°C 処理を 2 時間併用した濃度依存曲線を NCC-nu 細胞を用いて作製し、37°C における抗癌剤処理群と比較した (図 11, a, b)。

さらに、それぞれの温度処理における  $IC_{90}$  値を前記同様の回帰直線より求め、37°C 処理群の  $IC_{90}$  値を 100% としてそのパーセントで 39°C および 42°C 処理群の  $IC_{90}$  値を表した (表 6)。

t 分布より検定した  $IC_{90}$  値は、両剤ともに 39°C 処理群、42°C 処理群で 37°C 処理群との間に有意差を示した。それぞれの有意差は、CQ で 37°C と 39°C では  $p <$

Table 6. Effect of temperature on  $IC_{90}$  values by adriamycin or carbazilquion

drugs	37°C	39°C	42°C
CQ	2.57 $\times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$	1.69 $\times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$	1.33 $\times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$
	100%	65.8%	51.8%
ADM	0.27 $\mu\text{g/ml}$	0.14 $\mu\text{g/ml}$	0.11 $\mu\text{g/ml}$
	100%	51.9%	40.7%

NCC-nu cells were treated with ADM (adriamycin) or CQ (carbazilquion) combined with low grade hyperthermia (39°C and 42°C). The  $IC_{90}$  (90% growth inhibitory concentration) of 37°C is used as the standard value of 100%.

0.01, 37°C と 42°C では  $p < 0.001$  であり、ADM では 37°C と 39°C, 37°C と 42°C は共に  $p < 0.001$  であった。

温度単独処理 2 時間でのコロニー形成率は図 10 で示した回帰直線より求めると、39°C 処理群では 95.7%, 42°C 処理群では 92.6% であった。これに対し抗癌剤と加温を併用した場合その  $IC_{90}$  値は、39°C 処理群は CQ で 65.8%, ADM で 51.9% であり、また 42°C 処理群では CQ で 51.8%, ADM で 40.7% であった。以上の結果より、抗癌剤と加温の併用により明らかな抗癌剤の相乗的増感効果が得られることが判明した。

## 考 察

ヒト癌細胞株の樹立は Gey ら<sup>3)</sup>によって HeLa 細胞が樹立されて以来、決して容易ではなく約 30 年を経過した現在においても chance finding によることが多いとされている。著者もこれまでヒト癌の手術摘出材料およびヌードマウス移植ヒト腫瘍を用いて胃癌 14 例、大腸癌 3 例、食道癌 1 例、腎癌 1 例の計 19 例についてヒト癌細胞の組織培養を試みてきた。しかし 1 年以上を経過して維持されているものは、今回報告した腎癌由来細胞株(NCC-nu 細胞)と大腸癌由来株の 2 株のみであった。

腎癌細胞の組織培養の試みはかなり古く、1957 年 Richter らによる 5 日間の初代培養の報告が始めてとされており<sup>37)</sup>、その後 Bregman ら<sup>38)</sup>、Elhilali ら<sup>39)</sup>、Daly ら<sup>40)</sup>、Shore ら<sup>41)</sup>、が比較的短期間の培養成功を報告している。しかしながら明らかなヒト腎癌細胞株樹立の報告は Williams<sup>37)</sup>によれば 16 株であり、その他いくつかの樹立の報告<sup>42)~44)</sup>を加えれば、現在までに世界で約 30 株<sup>45)</sup>の腎癌細胞株が樹立されたものと推定される。

著者の用いた Miyazaki ら<sup>26)</sup>の細胞単離法は従来より一般に用いられてきたトリプシン処理のかわりに、振盪法とコラゲナーゼおよびディスパーゼによる化学的細胞分散法を組み合わせたものである。この方法は元来肝細胞単離に用いられる方法で、組織構築を応用しているものといえよう。すなわち、カルシウムイオン除去による細胞間接着、とくにデスモゾームの開裂、コラゲナーゼ消化による組織骨格の解離、物理的な方法による細胞間の解離、さらにファイブロンネクチンなどの糖蛋白の存在も考慮して各段階の消化を行っている。著者の経験では、腫瘍組織にこの単離法を用いた場合の細胞の生存率は、0.2%トリパンプルーによる非染色率で見ると、90%以上と良好な結果が得られた。さらにトリプシンで分離したものに比して細胞が plate 面に付着した時点で明らかに線維芽細胞の混在が少なく、この肝細胞単離法は一般の腫瘍細胞単離にも極めて有効な方法と考えられた。

培養液とそれに加える血清について Cobb ら<sup>46)</sup>は詳細な検討を加え、Eagle's MEM に 20%自家血清を加えた培養液が最も増殖が良いとしている。しかしヒト細胞培養では自家血清で培養を続けることは不可能なため、FBS または calf serum を使用せざるを得ないのが現状で、一般に 10~20%の FBS が用いられている。血清についてはその中に様々の未知の増殖因子が存在すると考えられており、これらを総括して成長促進因子とよんでいる。現在までに epidermal growth

factor<sup>47)</sup>、fibroblast growth factor<sup>48)</sup>、ソマトメジン<sup>49)</sup>、インスリン<sup>50)</sup>、platelet derived growth factor<sup>51)</sup>、などが知られているが、今回著者もこの成長促進因子を補う意味で、培養初期にインスリンを使用し盛んな細胞増殖が得られた。

樹立細胞株では培養液の違いによる増殖の差は少ないといわれているが、腎癌樹立株の培養液は諸家により異なり種々の培養液が使用されている。さらに初代培養で Sytkowski ら<sup>30)</sup>の樹立した GKA 細胞は NCTC-109、NCTC-135 DMEM、F-12 の 4 種培養液のうち NCTC-109 のみでしか増殖が見られていない。また著者の NCC-nu 細胞でも前記 3 種培養液の中 RPMI-1640 による増殖は極めて悪かった。このことは培養初期における細胞の増殖の条件がかなり限られ、細胞それぞれに適した培養液の必要性を示唆するものと思われる。

さて、このようにして樹立された培養腫瘍細胞が、本来の癌細胞に特異な性格を有するかどうかを同定することが不可欠となる。同定法としては従来より、光顕レベルの細胞形態学的観察、組織化学的観察、染色体分析、電顕観察、動物への異種移植性と組織構築の再現性確認などが行われている。光顕レベルの観察では、線維芽細胞と上皮性細胞との鑑別は比較的容易であるが、上皮性細胞が増殖してもそれが癌性上皮であるか、非癌性上皮であるかの識別に難渋させられる。さらに著者の樹立した NCC-nu 細胞はヌードマウスを経由して培養系に移されているので、光顕的観察だけではヌードマウス細胞の混在も否定できない。

これら諸問題解決の一つとして染色体分析を行った。この染色体分析も佐藤ら<sup>52)</sup>によれば、正常細胞でも継代により染色体は異数性となり核型も変異し発癌することがあるため、その分析だけで腫瘍細胞に由来するかどうかを判定することは困難であるといわれている。腎癌細胞株の染色体は諸家により様々の報告があり、高 2 倍性から低 6 倍性までのものがあり、またマーカー染色体についてもその有無あるいは特徴も全て異なっており、腎癌特有の染色体の存在は未だ知られていない。その点、本研究の NCC-nu 細胞は染色体分析で全てヒト型染色体であり、患者男性由来の細胞である Y 染色体を伴い、さらに 1 個のマーカー染色体を有した低 3 倍性を示していた。染色体数については継代による若干の変化は見られたものの、モードは常に 64 個で、上記核型の特徴からマウス細胞混在は否定できた。

腎細胞癌は従来より腎近位尿管より発生することが知られており、腎近位尿管の特徴的電顕所見は管腔に面した細胞膜の microvilli と細胞内小器管の配

置の極性である。Seljelidら<sup>29)</sup>はこの特徴は腎細胞癌でも認められるとしているので、著者のNCC-nu細胞では上記のごときmicrovilliが見られることから、超微形態学的にも腎癌細胞由来はほぼ確実なものと考えられた。

しかし最も信頼性のある培養細胞のヒト癌由来の同定法は異種移植による腫瘍再現性である。Jones<sup>53)</sup>は免疫学的に寛容化したラットの皮下に腎癌由来の培養細胞を植え腫瘍結節を得ている。またKatuokaら<sup>42)</sup>内藤ら<sup>44)</sup>も著者同様にヌードマウスに腎癌由来の培養細胞を移植し、生着した腫瘍の組織像はもとの腎癌と一致したと述べている。しかしクローン化したNCC-nu細胞株が、ヌードマウスで造腫瘍性を示さなかった明確な理由は不明であるが、その増殖能力の低下が問題となる。同時に、接種細胞をより多くした実験の試みと他のクローン細胞株に対する検討が必要と思われる。またそのコロニー形成率、増殖性の低下については、今後、培地を変えて検討する余地があるように思われる。

その他、今日行われている同定法として、原発性肝癌のAFP産生のような生化学的特徴を有する癌細胞では、その培養細胞にも同様の特性が適用できる<sup>31)</sup>。腎癌でも異所性ホルモン産生が時に認められるため、KU-2細胞<sup>32)</sup>やGKA細胞<sup>30)</sup>のようにエリスロポイエチン産生の報告もあるが、このようなホルモン産生を示す腫瘍は稀であり、この生化学的性状を利用して腎癌細胞由来を決定することは決して容易でない。勝岡<sup>32)</sup>は、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るとしており、著者のNCC-nu細胞でもズダンIII染色で多量の脂肪が証明できた。一方、Matudaら<sup>43)</sup>は彼らのOUR-10細胞で特異な $\gamma$ -GTPの保持を確認し、腎細胞癌の一つの根拠としており、このように腎癌に特異な生化学的性質の検索も、その同定の助けとなる。

次にこれら培養細胞の*in vitro* 薬剤感受性については、増殖抑制法、再増殖測定法、コロニー形成法が従来より一般に用いられている。これらのうち、問題の多いとされている増殖抑制法や再増殖測定法に比し、コロニー形成法は95%以上の細胞単離率、コロニー高形成能をもつ癌細胞ならば最も信頼性のある方法といえる<sup>81)~10)</sup>。その条件を満たすヒト癌細胞は決して多くはないが、今回実験に用いた著者のNCC-nu細胞とHeLa細胞はこの条件を十分に備えていたので、著者もこのコロニー形成法を用いた。

最近では<sup>3</sup>H-thymidine, <sup>3</sup>H-uridine, <sup>14</sup>C-leucineなどのアイソトープを用いた方法<sup>54)~56)</sup>により、核酸合成または蛋白合成阻害度から短時間に結果を得る方法も行

われている。しかし、これらの場合、単一のアイソトープの使用だけではその効果判定は不十分でdouble labeling法を用いる場合<sup>57)58)</sup>もある。

しかしこのような*in vitro*での抗癌剤感受性試験の際、絶えず考慮せねばならない問題として、*in vitro* transformationがあげられる。この意味で原腫瘍の抗癌剤感受性を調べる場合、最も理想的な方法は、個々のヒト癌細胞の初代培養で行うことである。この目的に即するものが近年Hambergerら<sup>59)60)</sup>によって開発された二重寒天培養法を用いたコロニー形成法、いわゆるhuman tumor stem cell assayである。この方法は、ヒト癌細胞を直接培養して、その生死をコロニー形成能から判定する方法で、抗癌剤感受性試験として臨床的にも多くのヒト癌に試みられている<sup>61)~63)</sup>。

さて*in vitro* 殺細胞様式より下山ら<sup>9)</sup>は各種抗癌剤を濃度依存性作用と時間依存性作用にわけおり、今回著者が抗癌剤感受性試験に用いたADM, CQ, MMCは濃度依存性作用に分類されている薬剤である。さらに宮本<sup>33)</sup>は細胞分裂周期各細胞期に対する効果を考慮し、抗癌剤をその濃度依存曲線より3群に分類している。即ち、第一群はexponential typeおよびthreshold-exponential typeでADM, CQはこの範疇に属する。第二群はbiphasic typeでそれらを亜群にわけている。第三群は簡単に分類しかねるものを一括しており、MMCはこれに分類されている。しかし、著者の用いた3剤(ADM, CQ, MMC)により得られた濃度依存曲線はNCC-nu細胞、HeLa細胞共にthreshold-exponential type、またはexponential typeであった。MMCについては、Oharaら<sup>34)</sup>は、感受性の高いG<sub>1</sub>期細胞がまず殺されるためexponential typeを示し、続いて抵抗性のS期細胞がthreshold exponentialに殺されるためS字型を示すと述べている。しかし著者の実験では、濃度設定が少なく低濃度でのexponentialな低下を把握できなかったため、MMCでS字型を示さなかった。細胞間の感受性については、細胞が異なれば薬剤感受性も異なる<sup>36)64)~66)</sup>と報告されており、今回著者の用いたNCC-nu細胞とHeLa細胞の間にも明らかな感受性の差を認めた。

抗癌剤感受性の決定について、IC<sub>50</sub>値、IC<sub>90</sub>値だけで感受性を判定することは、副作用出現のため抗癌剤投与量が制限されるという臨床的实际からみて適当ではない。そこで著者は打林<sup>36)</sup>の用いているtherapeutic indexを参考に臨床投与量と2時間抗癌剤処理により得られたIC<sub>90</sub>値とを比で表した。つまりtherapeutic indexが高値を示すほど臨床応用に際し、より少ない副作用で高感受性が期待されるものと考えた。

このような抗癌剤感受性の研究のほか現在までに

多数の制癌剤増強の試みがなされている。今回著者もこの一つとして温熱療法との併用による増強効果について検討した。

温熱療法については文献上100年近くをさかのぼることができるが<sup>67)</sup>、その飛躍的な進歩はここ10年余りである。温熱療法は、外科療法、化学療法、放射線療法とは理論的に異なる機構を持っており、その致死障害はタンパクの変性である<sup>68)69)</sup>とされている。そしてその殺細胞効果、つまり細胞の生存率は処理時間と共に指数関数的に減少し、42.5°Cを境として温度に対する致死的效果は高まるとされている<sup>20)</sup>。

しかし著者の行った温熱療法では、NCC-nu細胞、HeLa細胞共に処理時間に相関して生存率は減少し、指数関数的減少は見られなかった。これは著者の温度決定が39°Cと42°Cという、42.5°Cを下回るlow grade hyperthermiaで行ったためと考えられる。細胞間の温度感受性の違いについても、NCC-nu細胞とHeLa細胞の間に明らかな差を認め、39°CにおいてはNCC-nu細胞が、42°CではHeLa細胞の方がそれぞれ温度に対する感受性が高かった。いかにいえばこの39°Cと42°Cの3°Cの温度の変化で、明らかにHeLa細胞での殺細胞効果のひらきがNCC-nu細胞より大きいことになる。つまり、温度感受性についても抗癌剤感受性同様に細胞株が異なれば感受性に差があり、さらに細胞株ごとに特有の温度変化に対する反応を示すものと考えられる。

薬剤と温熱療法の併用による増感作用についてBraunら<sup>70)</sup>がブレオマイシンと43°Cの温熱療法の併用について報告している他に、human tumor stem cell assayを用いた検索<sup>71)</sup>により臨床面からも研究されている。本邦でも水野ら<sup>21)</sup>がコロニー形成法により抗癌剤と42°Cおよび43°Cの温度の組み合わせによる効果を検討しており、ブレオマイシン、アドリアマイシン、アクチノマイシンD、マクロマイシンは温度との併用により増感効果を認めているが、他方シトシンアラビノサイド、5-フルオロウラシル、ビンクリスチンは増感作用を示さなかったと述べている。さらに増感効果のあった薬剤についてもその度合は異なりブレオマイシンが最も大きい値を示している。またアドリアマイシンにおいては時間的効果についても検討し、増感効果は加温時間30分までで、それ以上では抵抗性を示し、そのIC<sub>50</sub>値は42°Cで37°Cの1/2.8、43°Cで37°Cの1/2.0であったと述べている。今回著者は併用時間を2時間と設定して行ったがADM、CQ共に39°Cおよび42°Cの加温により、抗癌剤の殺細胞作用に相乗効果を確認した。

腫瘍の高温処理ないし全身加温による治療はすでに

臨床的にも試みられており、加温装置の開発も盛んに進んでいるので、今後の臨床応用に向けての研究の発展が期待される。

ヒト培養細胞の生物学的研究は極めて重要であり、癌化学療法や温熱療法の効果が、個々のヒト癌細胞の特異的な性状を把握できるか否かで将来的に培養細胞を用いた*in vitro*の実験の意義付けがなされるであろう。

## 結 論

ヒト腎細胞癌のヌードマウス移植腫瘍から単離細胞培養を行い、細胞株：NCC-nu細胞の樹立に成功した。その培養細胞のもつ形態学および生物学的性状の検討と共に、抗癌剤感受性と加温による抗癌剤増感作用を追求し、以下の結果を得た。

1. ヌードマウス移植腫瘍より分離したヒト腎癌細胞株は上皮系の形態を示しつつ増殖し、培養開始450日、継代120代を経過してなお安定した増殖を示しており、この細胞株をNCC-nuと命名した。

2. NCC-nu細胞はdoubling time: 27時間、コロニー形成率: 約50%、染色体: モード64の低3倍性で7q(+)のマーカー染色体を認め、ヌードマウスへの再移植が可能であった。

3. コロニー性クローニングにより7株のクローンを分離した。これらのクローンのコロニー形成率は2.3~27%と低く、またそのdoubling timeも48時間以上で、ヌードマウスへの移植性は使用実験条件下では見られなかった。

4. NCC-nu細胞はズガンIII染色、電顕所見およびヌードマウス再移植腫瘍の組織像より腎癌細胞由来と同定された。

5. コロニー形成法によりHeLa細胞と比較した抗癌剤(ADM, MMC, CQ)の感受性では、両細胞間に明らかな感受性の差を認めた。また臨床投与量との比較でもADMに高い感受性を示すことが示唆された。

6. 39°Cと42°Cの加温によりNCC-nu細胞とHeLa細胞との間に温度感受性の差を認めた。

7. 抗癌剤(ADM, CQ)と加温(39°C, 42°C)との併用で、抗癌剤殺細胞作用の相乗的な増感効果をNCC-nu細胞で認めることができた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に心から感謝致します。さらに心よく研究の場を与え御指導、御助言を戴きました金沢大学がん研究所ウイルス部、波田野基一教授、田中淳之助教授並びに諸先生に感謝します。また終始御協力と御援助を戴きましたがん研究

所外科諸先生並び水見市民病院西野逸男博士に感謝します。

本論文の要旨は、第2回人細胞研究会(1984)、第43回日本癌学会総会(1984)において発表した。

## 文 献

- 1) Harrison, R. G.: Observation on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Biol. Med., 4, 140-143 (1907).
- 2) Carrel, A. & Burrows, M. T.: Cultivation *in vitro* of malignant tumors. J. Exp. Med., 13, 571-579 (1911).
- 3) Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res., 12, 264-265 (1952).
- 4) 鎌田七男・田中公夫: 人癌培養株と染色体異常。組織培養, 6, 473-485 (1980).
- 5) 関口守正・鈴木利光: わが国で維持されている人癌由来細胞株。組織培養, 6, 527-548 (1980).
- 6) 佐藤 博: 日本で維持されている「可移植性腫瘍株」一覧表。癌と化学療法, 11, (3), PART-II, 1-92 (1984).
- 7) Puck, T. T. & Marcus, P. I.: Action of X-rays on mammalian cell. J. Exp. Med., 103, 653-666 (1956).
- 8) 本山梯一・鈴木利光: 人培養細胞の *in vitro* 薬剤感受性試験第3報。Chemotherapy, 28, 154-159 (1980).
- 9) 下山正徳・木村喜代二: 抗癌剤の殺細胞作用の定量法。Chmotherapy, 20, 787-794 (1972).
- 10) 下山正徳: 抗がん剤殺細胞作用と培養がん細胞の薬剤感受性度測定法について。癌と化学療法, 3, 149-155 (1976).
- 11) 塚越 茂: 制癌剤の効果増強の試みとその進歩。癌と化学療法, 10, 1107-1115 (1983).
- 12) Kobayashi, T., Kataoka, T., Tukagoshi, S. & Sakurai, Y.: Enhancement of anti-tumor activity of 1- $\beta$ -D-arabinofuranosylcytosin by encapsulation in liposome. Int. J. Cancer, 20, 581-587 (1977).
- 13) Rutman, R. J., Ritter, C. A., Avadhani, N. G. & Hansel, J.: Liposomal potentiation of the antitumor activity of alkylating drugs. Cancer Treat. Rep., 60, 617-618 (1976).
- 14) Kato, T., Nemoto, R., Mori, H. & Kumagai, I.: Sustained-release properties of microencapsulated mitomycin C with ethylcellulose infused into the renal artery of the dog. Cancer, 46, 14-21 (1980).
- 15) Takahashi, T., Ueda, S., Kono, K. & Majima, S.: Attempt at local administration of anticancer agents in the form of fat emulsion. Cancer, 38, 1507-1514 (1976).
- 16) 桑野信彦: ポリエン系抗生剤と制がん剤との併用増強の試み。癌と化学療法, 8, 681-688 (1981).
- 17) 鈴木磨郎・堀 勝義・阿部郁夫・斉藤祥子・佐藤春郎: 癌微小循環動態に立脚した化学療法。癌と化学療法, 8, supplement, 79-83 (1981).
- 18) Takahashi, T., Iida, H., Shiger, T. & Sakurai, Y.: Increased accumulation of vincristine and adriamycin in drug-resistant P338 tumor cells following incubation with calcium antagonists and calmodulin inhibitors. Cancer Res., 42, 4730-4733 (1982).
- 19) Matsunaga, T., Iwasaki, M., Miyamoto, K. & Koshiura, R.: Relationship between enhancement of cytotoxic effect of mitomycin C and increase of intracellular cyclic adenosine 3': 5'-monophosphate by isoproterenol in rat ascites hepatoma cells. J. Pharm. Dyn., 7, 25-32 (1983).
- 20) 奥村 寛: 温熱療法。組織培養, 10, 11-14 (1984).
- 21) 水野左敏・石田明子・新谷三春: 高温による制癌剤の効果増強。癌と化学療法, 8, supplement, 147-153 (1981).
- 22) 芳川伸治・古川雅代・近藤 隆・坪内 進・加納 永一: Low hyperthermia による細胞制癌剤感受性の増大。組織培養, 10, 36-38 (1984).
- 23) 山田龍作・佐藤守男・中塚春樹・中村健治・芝切一平・伊丹道真・小林伸行・高島澄夫・水口和夫・山口真司・小野山靖人: 肝細胞癌 60 例に対する抗癌剤併用 transcatheter arterial embolization. 日医放学会誌, 41, 742-751 (1981).
- 24) 中塚春樹・山田龍作・佐藤守男・玉岡紅一・伊丹道真・小林伸行・高島澄夫・小野隆男・水口和夫・山口真司・小野山靖人: 腎癌に対する transcatheter arterial embolization. 日医放学会誌, 41, 409-416 (1981).
- 25) 藤井昭男: 膀胱癌に関する研究。J. Jap. Soc. Cancer Ther., 15, 1211-1130 (1980).
- 26) Miyazaki, K., Takaki, R., Nakayama, F., Yamauchi, S., Koga, A., & Toda, S.: Isolation and primary culture of adult human hepatocytes. Cell Tissue Res., 218, 13-21 (1981).
- 27) 山田正篤: コロニー形成とクローニング法。組織培養(中井準之助編)第1版, 90-99頁, 朝倉書店, 東京, 1976.

- 28) 加藤施夫: 培養細胞の染色体標本の作り方, 組織培養(中井準之助編)第1版, 217-223頁, 朝倉書店, 東京, 1976.
- 29) Seljelid, R. & Ericsson, J. L. E.: Electron microscopic observations on specialization of the cell surface in renal clear cell carcinoma. *Lab. Invest.*, **14**, 435-447 (1965).
- 30) Sytkowski, A. J., Richie J. P. & Bicknell, K. A.: New human renal carcinoma cell line established from a patient with erythrocytosis. *Cancer Res.*, **43**, 1415-1419 (1983).
- 31) Smith, J. A., Francis, T. I., Edington, G. M. & Williams, A. O.: Immunofluorescent localization of human alpha fetoprotein in fetal and neonatal liver and cultured cells from hepatocellular carcinoma. *Brit. J. Cancer*, **25**, 343-349 (1971).
- 32) 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).
- 33) 宮木忠昭: 組織培養と化学療法. 組織培養, **10**, 15-18 (1984).
- 34) Ohara, H. & Terasima, T.: Lethal effect of mitomycin-C on cultured mammalian cells. *Gann*, **63**, 317-327 (1972).
- 35) 斉藤遠雄・横山正和: 各種抗癌剤の作用機序と抗癌スペクトル. 日本臨床, **33**, 1768-1793 (1975).
- 36) 打林忠雄: ヒト膀胱癌由来培養細胞株 KK-47, KW-103 および HeLa 細胞における各種抗癌剤の殺細胞効果について. 日泌尿会誌, **74**, 1606-1620 (1983).
- 37) Williams, R. D.: Human urologic cancer cell lines. *Invest. Urol.*, **17**, 359-363 (1980).
- 38) Bregman, R. U. & Bregman, E. T.: Tissue culture of benign and malignant human genitourinary tumors. *J. Urol.*, **86**, 642-649 (1961).
- 39) Elhilali, M. M. & Nayak, S. K.: Immunologic evaluation of human renal cell carcinoma. *Invest. Urol.*, **13**, 60-66 (1975).
- 40) Daly, J. J., Prout, G. R., Ahl C. A. & Lin, J. C.: Specificity of cellular immunity to renal cell carcinoma. *J. Urol.*, **111**, 448-452 (1974).
- 41) Shore, B., Wise, G. J., McBride, R. A., & Brendler, H.: Tissue culture of human renal cell carcinoma: Effect of serum on monolayer growth. *J. Urol.*, **103**, 554-563 (1970).
- 42) Katuoka, Y., Baba, S., Hata, M. & Tazaki, M.: Transplantation of human renal cell carcinoma to the nude mice: As an intermediate of *in vitro* and *in vitro* studies. *J. Urol.*, **115**, 373-376 (1976).
- 43) Matuda, M., Osafune, M., Nakano, E., Kotake, T., Sonoda, T., Watanabe, S., Hada, T., Okochi, T., Higashino, K., Yamamura, Y. & Abe, T.: Characterization of an established cell line from human renal carcinoma. *Cancer Res.*, **39**, 4694-4699 (1979).
- 44) 内藤克輔・久住治男・鹿子木基二・加藤正博・中嶋和喜・塚原健治・小林徹治・黒田恭一・松原藤継: ヒト腎癌および膀胱癌由来培養株細胞株(KH-39, KN-41 および KW-103)の樹立とその性状. 日泌尿会誌, **73**, 1019-1031 (1982).
- 45) 松田 稔・藤岡秀樹・中野悦次・高羽 津: ヒト腎癌細胞. 組織培養, **9**, 455-458 (1983).
- 46) Cobb, J. P. & Walker, D. G.: Effect of heterologous, homologous, and autologous serums on human normal and malignant cells *in vitro*. *J. Nat. Cancer Inst.*, **27**, 1-9 (1961).
- 47) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1555-1562 (1962).
- 48) Holley, R. W. & Kiernan J. A.: "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **60**, 300-304 (1968).
- 49) Daughaday, W. H., Hall K., Raben, M. S., Salmon, W. D. & Van Wyk, J. J.: Somatomedin: proposed designation for Sulphation factor. *Nature*, **235**, 17 (1972).
- 50) Jiménez de Asúa, L., Surian, E. S., Flawia, M. M. & Torres, H. N.: Effect of insulin on the growth pattern and adenylate cyclase activity of BHK fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **70**, 1388-1392 (1973).
- 51) Antoniades, H. N. & Scher, C. D.: Radioimmunoassay of a human serum growth factor for Balb/c-3T3 cells: Derivation from platelets. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 1973-1977 (1977).
- 52) 佐藤二郎・常盤考義: 培養細胞の染色体偏倚と癌化. 組織培養, **7**, 231-235 (1981).
- 53) Jones, G. W.: Primary and metastatic epithelial tumors of the human kidney and bladder in tissue culture. *Cancer*, **20**, 1890-1898 (1967).
- 54) 加藤哲郎: 膀胱癌の Cell Kinetics に関する研究. 日泌尿会誌, **67**, 497-501 (1976).
- 55) Tobey, R. A.: A simple, rapid technique from

- determination of the effects of chemotherapeutic agents on mammalian cell-cycle traverse. *Cancer Res.*, **32**, 309-316 (1972).
- 56) Nagatsu, M., Richart, R. M. and Lambert, A. : Effect of bleomycin on the cell cycle of Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.*, **32**, 1966-1970 (1972).
- 57) Meriwether, W. D. & Bachur, N. R. : Inhibition of DNA and RNA metabolism by daunorubicin and adriamycin in L 1210 mouse leukemia. *Cancer Res.*, **32**, 1137-1142 (1972).
- 58) Smith, D. B. & Chu, E. H. Y. : A genetic approach to the study of cytotoxicity and resistance of cultured Chinese hamster cells in presence of cytosin arabinoside. *Cancer Res.*, **32**, 1651-1657 (1972).
- 59) Hamberger, A. W. & Salmon, S. E. : Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, **197**, 461-463 (1977).
- 60) Hamberger, A. & Salmon, S. E. : Primary bioassay of human myeloma stem cells. *J. Clin. Invest.*, **60**, 846-854 (1977).
- 61) Salmon, S. E., Hamberger, A. W., Soehnlen, B. B. S., Durie B. G. M., Alberts, D. S. & Moon, T. E. : Quantitation of defferential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N. Eng. J. Med.*, **298**, 1321-1327 (1978).
- 62) Hoff, D. D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D. & Makuch, R. : Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Amer. J. Med.*, **70**, 1027-1032 (1981).
- 63) Sikic, B. I. & Taber, R. L. : Human tumor colonogenic assays. *Cancer Chem. Pharm.*, **6**, 201-203 (1981).
- 64) Martorelli, B. Jr., Paulo, S., Parshley, M. S. & Moore, J. G. : Effect of chemotherapeutic agents on two lines of human breast carcinomas in tissue cuture. *Surg. Gynecol. Obst.*, **128**, 1001-1006 (1969).
- 65) Barranco, S. C., Haenelt, B. R. & Gee, E. L. : Differential sensitivities of five rat hepatoma cell lines to anticancer drug. *Cancer Res.*, **38**, 656-660 (1978).
- 66) 鈴木利光・本山梯一 : 人癌培養株細胞の *in vitro* 薬剤感受性検定法の吟味とその応用. *組織培養*, **6**, 465-472 (1980).
- 67) Coley, W. B. : The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Amer. J. Med. Sci.*, **105**, 487-511 (1893).
- 68) Gersma, S. Y. : The effects of polyhydric and monohydric alcohols on the heat induced reversible denaturation of chymotrypsinogen A. *Eur. J. Biochem.* **14**, 150-153 (1970).
- 69) Herskovits, T. T., Garegbeku, B. & Jaillet, H. : On the structural stability and solvent denaturation of proteins. *J. Biochem.*, **245**, 2588-2598 (1970).
- 70) Braun, J. & Hahn G. M. : Enhanced cell killing by bleomycin and 43°hyperthermia and the inhibition of recovery from potentially lethal damage. *Cancer Res.*, **35**, 2921-2927 (1975).
- 71) Mann, R. D., Storm, K., Molton, D. L., Bertelsen, C. A., Korn, E. L., Kaiser, L. R. & Kern, D. H. : Predictability of response to clinical thermochemotherapy by colonogenic assay. *Cancer*, **52**, 1389-1394 (1983).

**Newly Established Human Tumor Cell Line: NCC-nu Derived from Renal Cancer—Comparative Examination of Chemo- and Thermo-sensitivity of the Cells *in vitro*—** Kiyoshi Sawaguchi, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 921 — J. Juzen Med. Soc., 94, 21—38 (1985)

**Key words:** clear cell carcinoma, human renal cell line, HeLa cell, *in vitro* chemosensitivity, low grade hyperthermia.

#### Abstract

This study was pursued to examine the characteristic behavior and the chemo- or thermo-sensitivity of human cancer cells *in vitro*, keeping an aim for clinical approach. Using tumor tissues which were originally obtained from surgical extraction and then transplanted into nude mice (BALB/C, nu/nu), a continuous human cell line (NCC-nu) from clear cell carcinoma of the kidney was newly established. When cultured in Doubecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, this cell line formed monolayers of polygonal epithelial cells, occasionally containing giant cells. The doubling time *in vitro* was approximately 27 hr and the plating efficiency for colony formation was about 45%. Seven clones obtained by colonial cloning techniques generally showed a longer doubling time (about 48 hr) and a lower plating efficiency (5-25%) than those of parent uncloned cells. Chromosomal analysis was done with the cells of the 38th and 84th generations. Both generations revealed hypotriploid number (64 xxy) with one marker chromosome at seven, showing the modal number of 64 and the human karyotype. Retransplantation of this cell line into the nude mouse formed a well-circumscribed solid tumor with similar histological features to the original human tumor. Using *in vitro* colony formation techniques, the cytotoxic effects of adriamycin (ADM), mitomycin (MMC) and carbazilquinon (CQ) on NCC-nu cells and HeLa cells were compared. The dose-response curve of these drugs in the two cells demonstrated an exponential decrease type. In the values of 50% and 90% growth inhibition concentration ( $IC_{50}$  and  $IC_{90}$ ) after 2- or 6-hr exposure, CQ showed the highest cell killing effect on both cells. The therapeutic index (clinical dose/ $IC_{90}$ ) indicated that ADM was most effective against NCC-nu cells. Moreover, low grade hyperthermia (at 39°C and 42°C for 2hr) combined with chemotherapy by ADM or CQ revealed a multiplication effect on tumor-cidal activity of both drugs, suggesting a promising future of these therapeutic procedures.