

ヒト肺癌実験モデルの作製に関する研究

第 1 編

ヒト肺扁平上皮癌細胞株(EBC-1株)およびヒト肺腺癌細胞株(ABC-1株)の樹立とその性状

岡山大学医学部第2内科学教室(主任:木村郁郎教授)

渡 辺 洋 一

(昭和60年5月22日受稿)

Key words : human lung cancer cell line,
squamous cell carcinoma, adenocarcinoma,
tissue culture

緒 言

ヒト肺癌の大部分は、気管支上皮から発生するとされているが、その詳細は必ずしも明らかでなく、またその組織学的所見は著しく多彩で、多型性の強い癌の一つであると考えられている。肺癌は、組織学的には扁平上皮癌、腺癌、小細胞癌、大細胞癌に分けられるが、発生部位、進展様式、臨床像、各種治療に対する感受性、予後などは、その組織型により著しく異なることが知られている¹⁾⁻²⁾。

各組織型のヒト肺癌由来の培養細胞株を樹立し、*in vitro*における実験モデルを作製することは、各組織型の細胞生物学的特徴を知る上で大きな意義をもつとともに、ヒト肺癌の細胞生化学的あるいは細胞薬理学的研究に極めて有用であると思われる。したがって、従来より多くの研究者によってヒト肺癌の長期培養が試みられてきたが、ヒト肺癌細胞株の樹立は1955年、Frischら³⁾が肺腺癌患者の胸水から肺腺癌細胞株の樹立に成功したことに始まる。以来、本邦においても各種組織型のヒト肺癌細胞株がいくつか樹立されている⁴⁾。

今回著者は、ヒト肺癌の*in vitro*における実験モデルの作製を目的とし、肺癌患者より培養細胞株の樹立を試み、ヒト肺扁平上皮癌由来細胞株(EBC-1株)ならびにヒト肺腺癌由来細胞株

(ABC-1株)を樹立し、これら細胞株の性状について検討したので若干の文献的考察を加えて報告する。

症 例

(1)EBC-1株由来症例

患者:69才、男性

主訴:背部痛

現病歴ならびに臨床経過:生来健康であり、昭和52年8月集検時の胸部レ線にても何ら異常を認めなかった。昭和53年2月頃より、発熱、咳嗽、喀痰等を認め、胸部レ線検査にて右肺門部を中心に異常陰影を認めたため、抗生剤、抗結核剤等の投与をうけたが、症状の改善を認めなかった。同年3月中旬より背部痛、食思不振が出現し、同年3月28日某病院にて気管支鏡検査を施行し、肺癌と診断されたため、同年4月21日岡山大学医学部第2内科に転院となる。転院時、理学的には右側肺にて呼吸時に乾性ラ音を聴取し、頸部、腋窩、鼠径部に小豆大からえんどう大のリンパ節を多数触知し、胸部、腹部皮下にえんどう大の腫瘤を多数触知した。肝を1.5横指触知した。レ線検査では、右肺門部の腫瘤影および第9胸椎に圧迫骨折像を認めた。入院後の右側胸部皮下腫瘤生検の組織所見は、比較的大型の未分化な腫瘍細胞が充実性の胞巣を形成し、明らかな角化は示さないが扁平上皮癌へ

の移行を示す低分化型扁平上皮癌であった(図①)。同年4月28日よりneocarzinostatin 6 mg/日を5日間投与したが効果は認められず左胸水の貯留および上大静脈症候群をきたした。胸水は、黄色透明で貧食細胞と成熟リンパ球が主体であった。ひきつづき cyclophosphamide, vincristine, methotrexate, procarbazine による化学療法を2コース施行したが十分な効果は認められず、胸水の増加、皮膚転移巣の増悪、脳転移を疑わせる精神症状等出現し、同年6月18日死亡した。

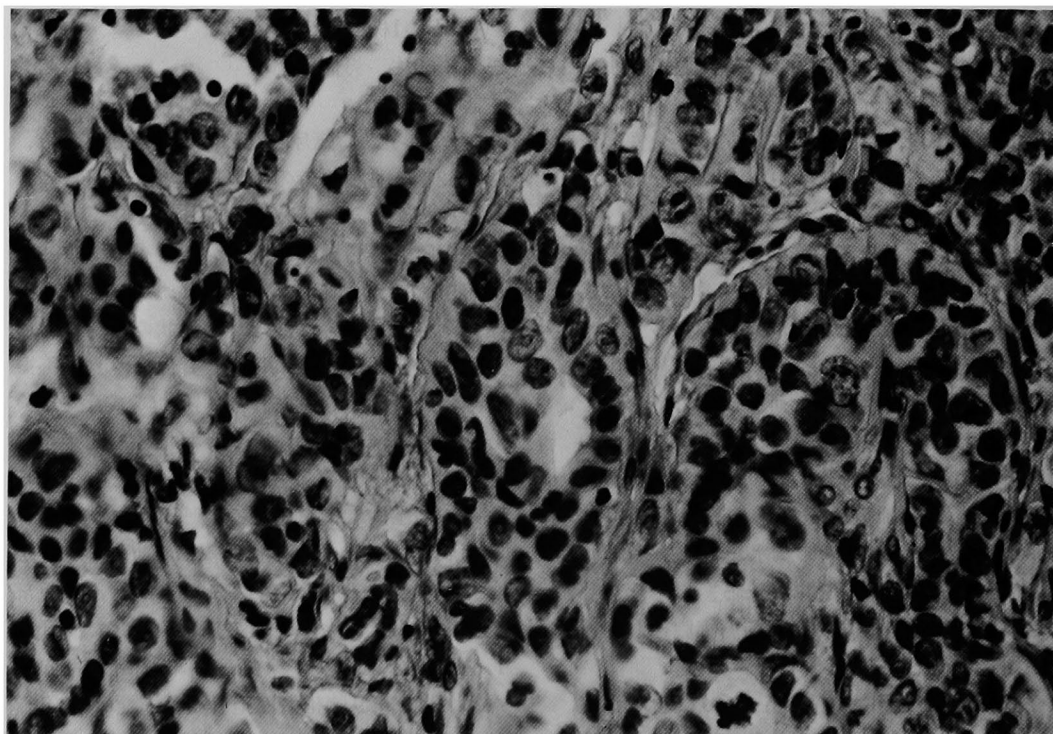
(2)ABC-1株由来症例

患者：47才、男性

主訴：胸痛

現病歴ならびに臨床経過：生来健康であったが昭和52年8月、右側胸部痛が出現した。某医にて神経痛として加療されたが、昭和53年4月胸痛の増悪、発熱、体重減少、胸水の貯留が認められたため、浸出性胸膜炎を疑い抗結核剤の投与をうけた。しかしながら、症状の改善は認められず、同年11月精査加療を目的に岡山大学

医学部第2内科に転院となった。転院時、理学的には右胸郭の萎縮、運動制限あり、右第5肋間以下にて呼吸音は聴取されず、打診にて濁音であった。胸部レ線検査では、右胸水の貯留および右横隔膜上に巨大腫瘤状陰影を認めた。右第4肋骨および胸膜の生検を試みたが、肋骨に悪性所見は認められず、嚢胞状の腫瘤内より暗赤色の液体を採取したのみであった。同年12月、腸骨骨髓生検を施行した結果、組織像は低分化型腺癌で、比較的大型の腫瘍細胞が胞巣を形成し、一部で管腔形成が認められた。胸水のパapanicolaou染色では、癌細胞は明瞭な核小体と泡沫状の中等量の細胞質を有し、典型的な腺癌細胞の像を呈していた(図②)。同年12月15日より cyclophosphamide, vincristine, methotrexate, procarbazine による化学療法を3コース施行したが臨床効果は認められなかった。昭和54年2月右胸腔内に aclacinomycin 40 mg を注入したところ腫瘤は著明に縮小したが、同年3月になり左側に血性胸水の出現を認めたため mitomycin



図①. EBC-1株由来患者の皮下腫瘤のH-E染色標本。×400倍。比較的大型の腫瘍細胞が充実性の胞巣を形成し、低分化型扁平上皮癌の像を呈している。

C10mgを胸腔内に注入した。左側胸水の細胞診にても腺癌細胞を認めた。この頃、骨シンチにて全身に多発性の骨転移巣を疑わせる集積像を認め、肝シンチにて肝右葉下端に肝転移を示唆する所見を得た。同年4月になり、慢性播種性血管内凝固症およびCO₂ナルコージスの状態におち入り、同年4月29日死亡した。

実験材料と方法

1. 培養方法

EBC-1株は、下記の手順で培養を行なった。すなわち、まず未治療時の患者皮下転移巣を摘出後、非腫瘍部分を除去したのち、耳鼻科用鉗で細切し、パイペティング後、茶こしでろ過した。次に、ろ過した細胞浮遊液を遠沈し、得られた細胞をRPMI 1640(Flow製)で1回洗浄後培養に共した。

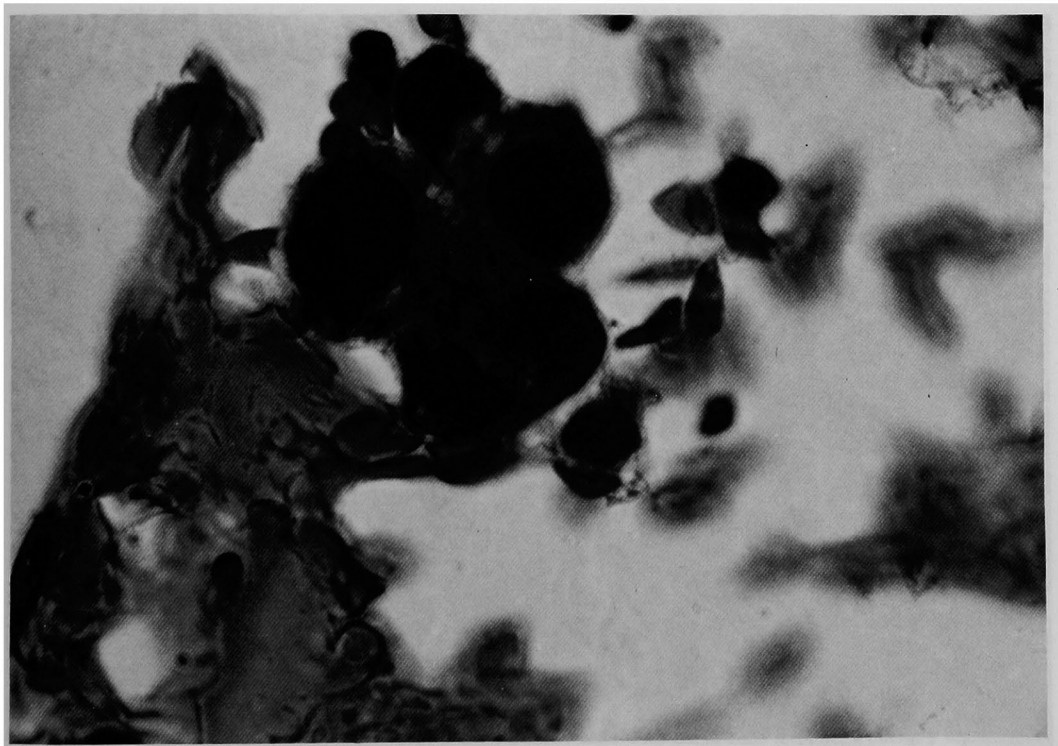
ABC-1株は、下記の手順で培養を行なった。すなわち、化学療法後出現した左血性胸水を、へパリンでぬらした注射器で150ml採取し、

Ficoll Conray 比重遠沈法で赤血球を除去したのち、腫瘍細胞層をRPMI 1640で1回洗浄後培養に共した。

植え込みは、培養液2.5mlに細胞を浮遊させ、直径35mmのガラスシャーレに植え込み、37°C、5% CO₂培養器にて静置培養した。培養液はストレプトマイシン100r/mlとペニシリン100単位/mlを含むRPMI 1640に、20%胎児牛血清(FCS, GIBCO製)を加えたものと、20%ヒト臍帯血血清(HCS, 自家製)を加えたものの2種類を使用した。培養液は、1週間に2回半量を静かに更新した。EBC-1株の継代は、0.25%トリプシン溶液に0.05% EDTAを加えた液で培養細胞を分離し、その一部を新しいシャーレ内の培養液に浮遊させて行った。ABC-1株の継代は、細胞浮遊液の一部を新しいシャーレに移し、これに新しい培養液を加えて行なった。

2. 電子顕微鏡観察

培養細胞を2000rpm 10分間遠沈し、cell pelletを作り、3%グルタルアルデヒドで1時間固



図②. ABC-1株由来患者の胸水のPapanicolaou染色標本。×1000倍。腫瘍細胞は、明瞭な核小体と泡沫状の中等量の細胞質を有し、細胞形態学的に腺癌細胞の特徴を有している。

定したのち、1%オスミウム酸で30分間固定した。次いで、エチルアルコール系列で脱水し、プロピオンオキシドを経てエボン812に包埋した。LKBウルトラトームを用いてガラスナイフで超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で重染色を施し、Hitachi HS-8型電子顕微鏡で観察した。

3. 染色体分析

染色体分析は原則としてMoorheadら⁵⁾の方法に準じて行なった。すなわち、培養シャーレに1r/mlの濃度のコルヒチンを加え、37°C60分間静置したのち、0.6%クエン酸ソーダにより低調処理を行なった。次いで、メタノールと氷酢酸の3:1の混合液にて固定し、細胞をスライドグラスに滴下し、乾燥後Giemsa染色し、顕微鏡写真を撮影し、染色体を分析した。

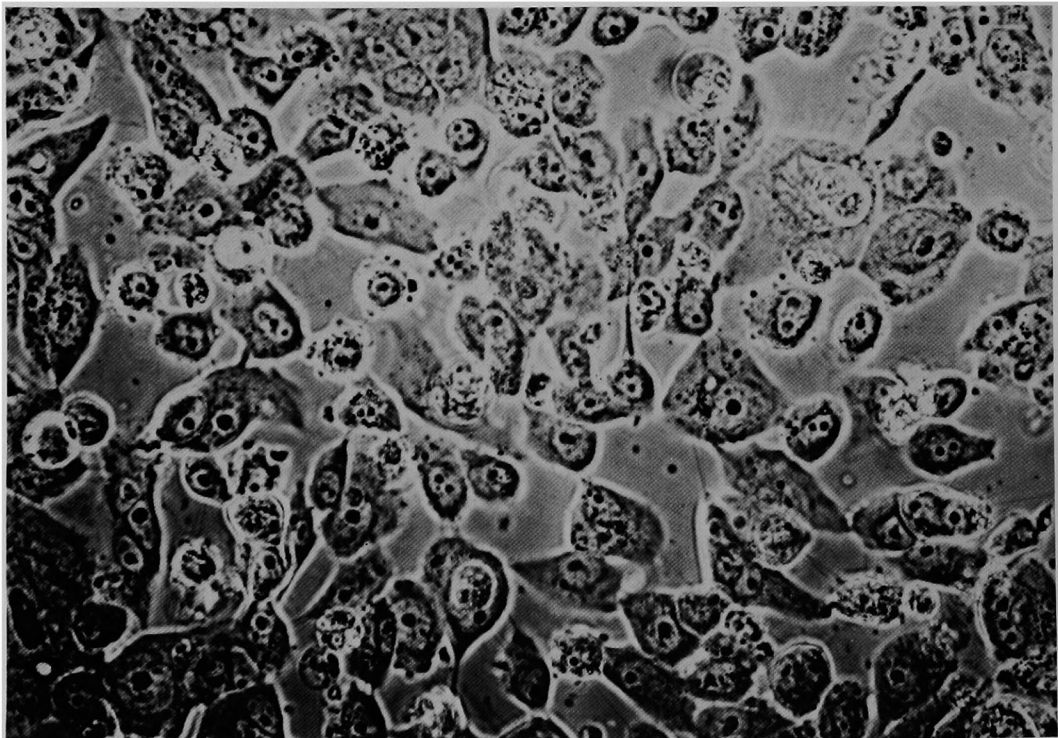
結 果

1. 樹立経過

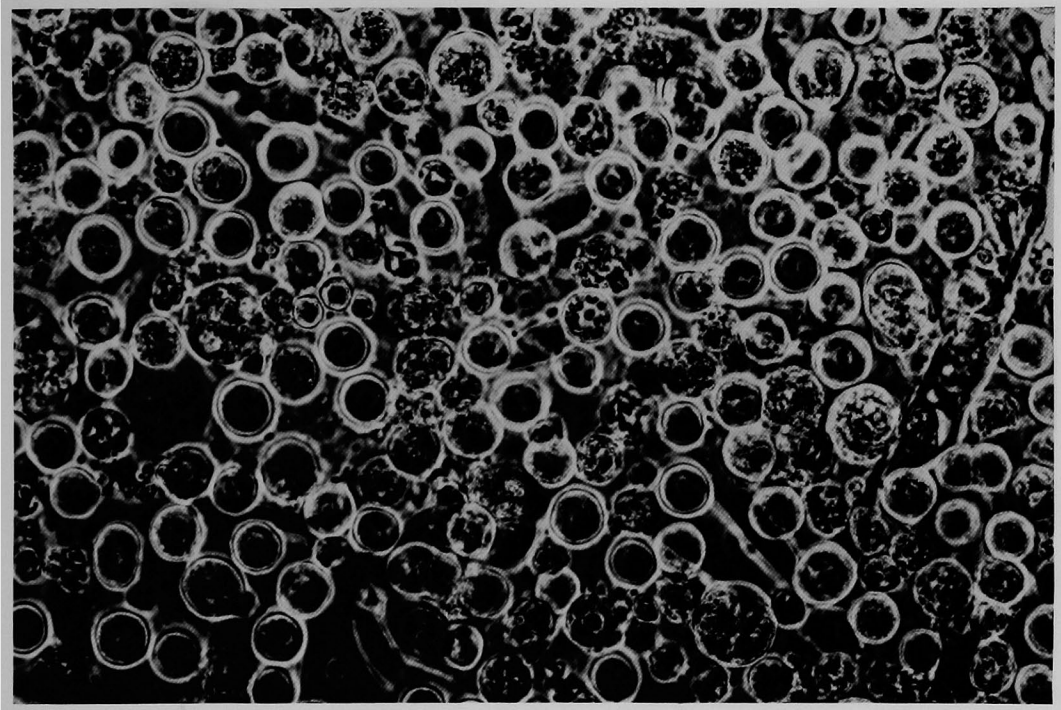
EBC-1株は、昭和53年4月21日に培養を開始

した。培養初期の増殖速度は、極めて緩徐であったが、同年9月2日に初代継代に成功した。増殖速度は、しだいに速くなり、10代目頃よりは約2週間に1回の継代が可能となった。細胞は、比較的一様の中等大の細胞で、浮遊することなく、上皮様配列を示し、ガラス面に単層性に付着増殖し、重層性は殆んど認められなかった(図③)。細胞分裂指数は2.2で、細胞の倍加時間は42時間であった。継代を重ね、昭和59年9月現在、180代の継代数を数えている。

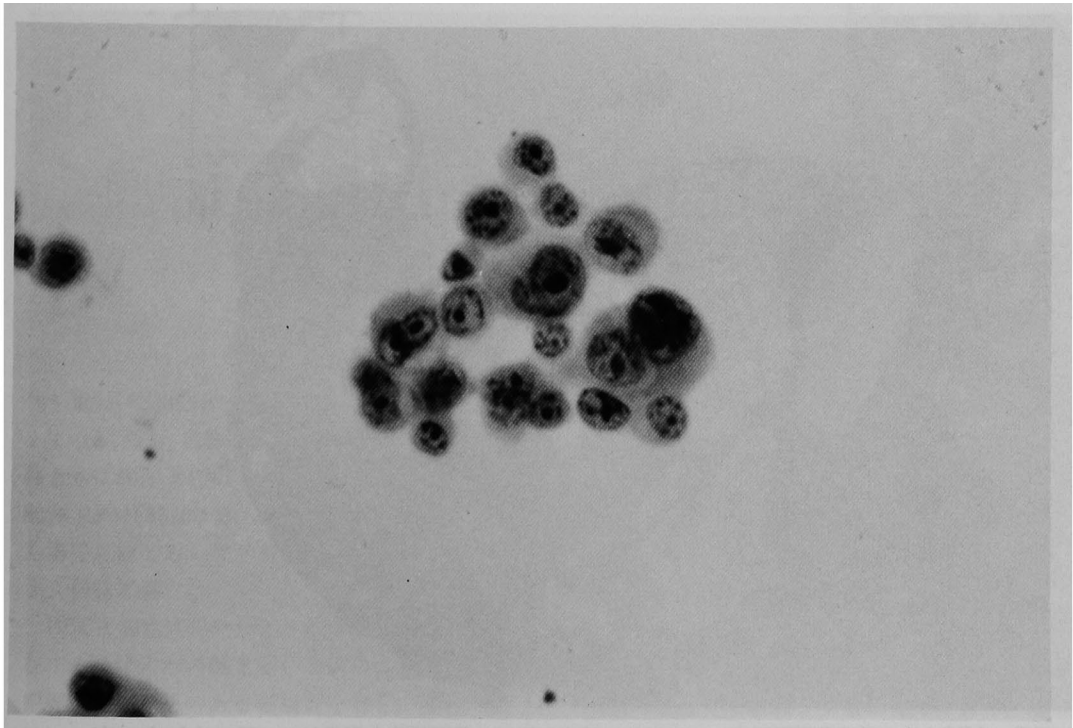
ABC-1株は、昭和54年4月4日に培養を開始した。培養開始後20日目までは、大半の細胞はガラス面に付着増殖を示し、一部の細胞のみが浮遊増殖を示した。この頃より、浮遊増殖の細胞がしだいに増加し、同年5月14日初代継代に成功した。以後は、中等大の球形細胞が、多くは浮遊増殖を示し、その一部は小さな細胞集塊を形成し、また少数の細胞はガラス面に付着増殖した(図④)。細胞分裂指数は1.4で、細胞の倍加時間は72時間であった。約2週間に1回の継



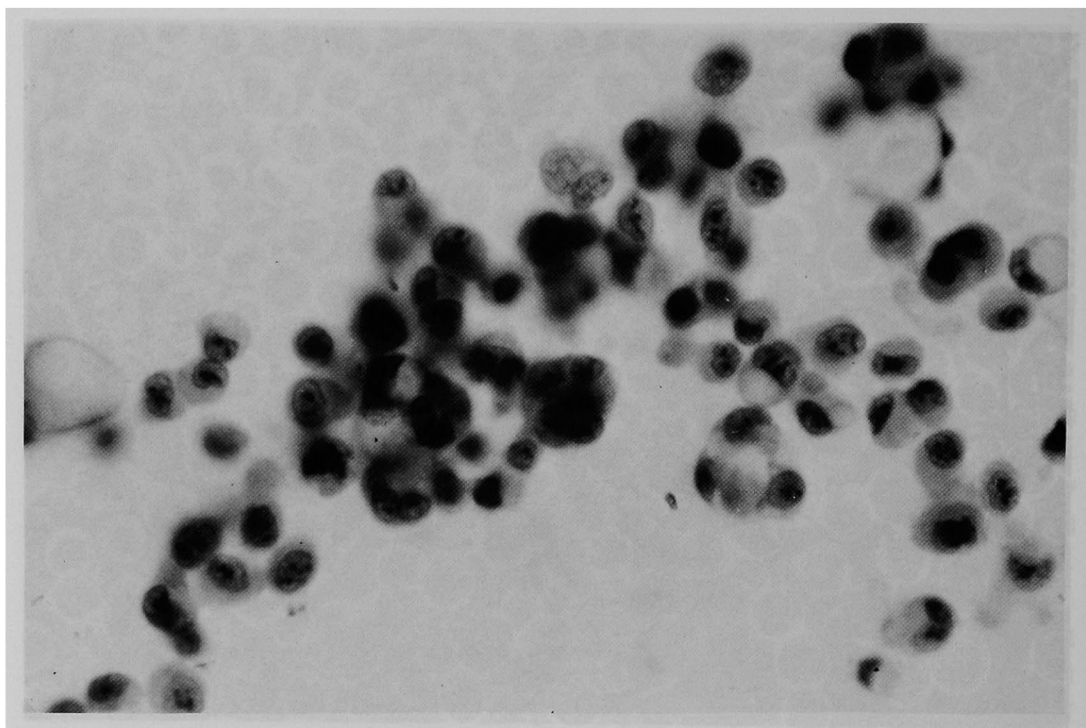
図③. EBC-1株の位相差像。×300倍。EBC-1細胞は、上皮様配列を示し、ガラス面に単層性に付着増殖している。



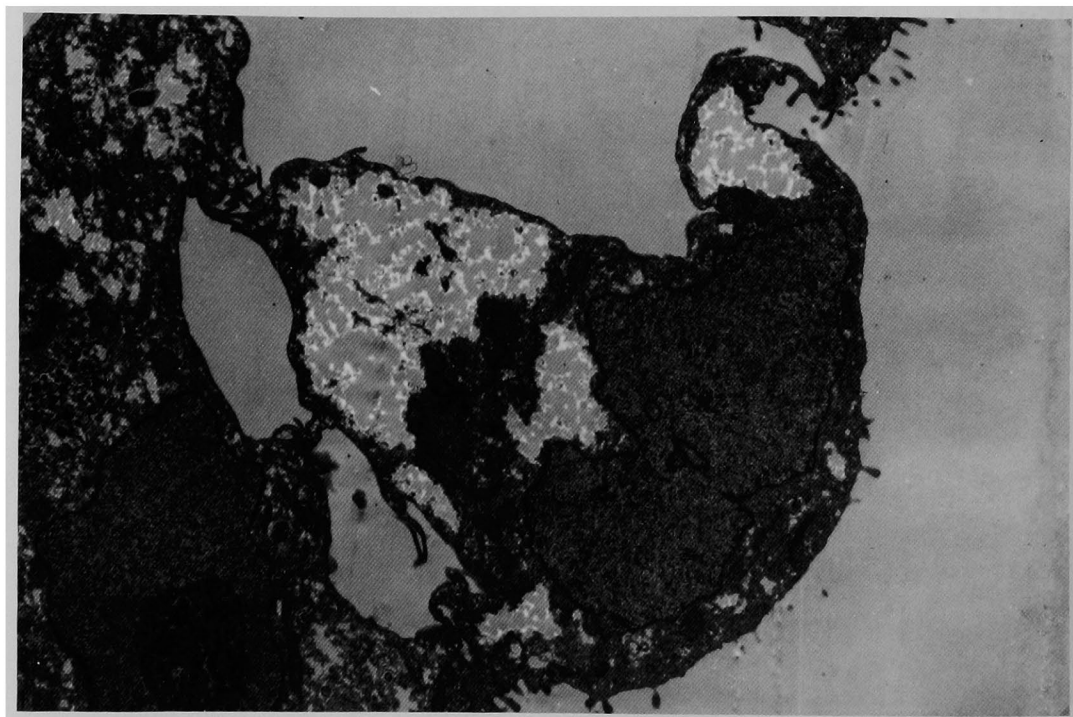
図④. ABC-1株の位相差像. $\times 300$ 倍. ABC-1細胞は, 大多数が浮遊増殖を示し, 一部は小さな細胞集塊を形成している. 少数の細胞は, ガラス面に付着増殖している.



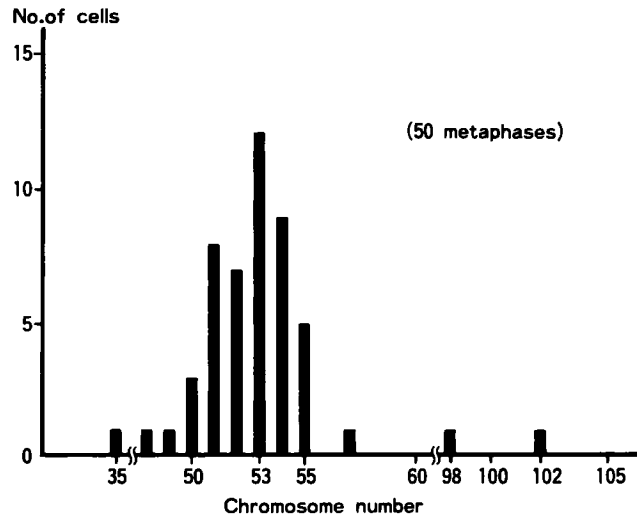
図⑤. EBC-1株のPapanicolaou染色標本. $\times 400$ 倍. やや扁平するほぼ円形の核と1~2個の核小体および中等量の重厚感のある細胞質を有し, 低分化型扁平上皮癌細胞の像を呈している.



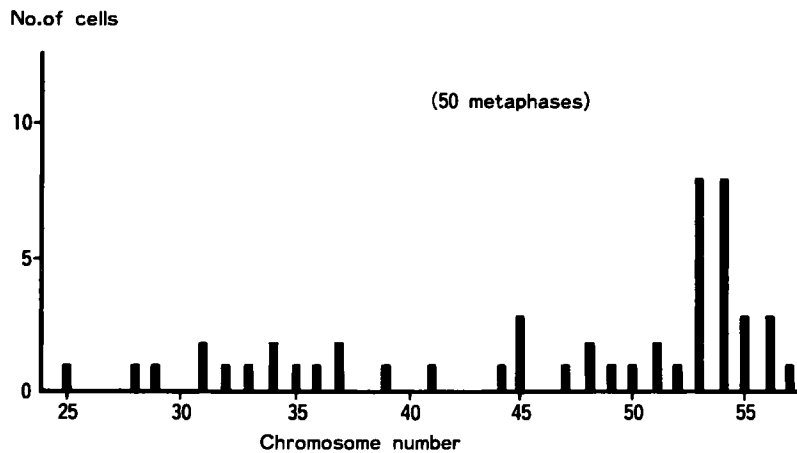
図⑥. ABC-1株のPapanicolaou染色標本. $\times 400$ 倍. 扁平する卵円形の核と1~数個の明瞭な核小体を有し, 細胞質は明るく, ABC-1株由来患者の胸水中の腫瘍細胞(図②)に類似している.



図⑦. ABC-1株の透過型電顕写真. $\times 3800$ 倍. 腫瘍細胞は, 腺房構造を形成し, 一部に tight junction が認められ, 細胞質内には多量の粘液顆粒がみられる.



図⑧. EBC-1株の染色体分布図. モードは53本である.



図⑨. ABC-1株の染色体分布図. モードは53本と54本である.

代を重ね、昭和59年9月現在190代の継代数を数えている。なお、培養液はEBC-1株およびABC-1株ともに80% RPMI 1640+20% HCSあるいは80% RPMI 1640+20% FCSのどちらを用いても培養可能であった。

2. 細胞形態

EBC-1細胞は、パパニコロー染色ではやや扁平するほぼ円形の核と1~2個の核小体および中等量の重厚感のある細胞質を有し、細胞形態学的に低分化型扁平上皮癌細胞の特徴を有していた(図⑤)。

ABC-1細胞は、パパニコロー染色では扁平する卵円形の核と1~数個の明瞭な核小体を有し、細胞質は明るくABC-1株由来患者の胸水中の癌細胞に類似していた(図⑥)。

ABC-1株の透過型電子顕微鏡による観察では、いくつかの腫瘍細胞が腺房構造を形成し、細胞は一部にtight junctionをもって互いに接着していた。細胞周辺には少量の微絨毛を認め、細胞質内には粘液顆粒を多量に含んでおり、腺癌細胞としての特徴を有していた(図⑦)。

3. 染色体

EBC-1株の染色体分析は、62代目の培養細胞を用いて50個の細胞について行なった。染色体数は、35~102と広範囲に分布し、モードは53本にあった(図⑧)。

ABC-1株の染色体分析は、69代目の培養細胞を用いて50個の細胞について行なった。染色体数は、25~57と広範囲に分布し、モードは53本と54本にあった(図⑨)。

考 察

各組織型のヒト肺癌細胞株の樹立は、肺癌の組織発生、増殖態度、各種治療に対する感受性の差異など、肺癌の基礎的、臨床的研究に有意義な材料を与えてくれる。ヒト肺癌細胞株の樹立は、1955年 Frisch ら³⁾がヒト肺腺癌胸水よりの培養細胞株(MABEN株)を報告して以来、本邦においても1974年⁶⁾から¹²⁾が扁平上皮癌由来細胞株2株、腺癌由来細胞株5株、小細胞癌由来細胞株1株を報告するなど、いくつかの細胞株の樹立が報告されている¹³⁾。

著者は、1977年より1979年にかけて、ヒト肺癌の *in vitro* における実験モデルの作製を目的とし、岡山大学医学部第2内科に入院中の肺癌症例20例(扁平上皮癌7例、腺癌13例)より培養細胞株の樹立を試み、扁平上皮癌細胞株1株(EBC-1株)および腺癌細胞株1株(ABC-1株)の樹立に成功した。細胞株の樹立を試みた20例の臨床材料別の内訳は、扁平上皮癌症例では原発巣6例、皮膚転移巣1例であり、腺癌症例では原発巣8例、胸水5例であった。細胞株の樹立に成功したEBC-1株は皮膚転移巣由来であり、またABC-1株は胸水由来であった。原発巣よりの細胞株樹立は14例について試みたが、全て成功しなかった。

原発巣より細胞株の樹立ができず、EBC-1株およびABC-1株がそれぞれ皮膚転移巣および胸水由来であったことは、これらの部位からは培養材料が得られやすいことのみならず、原発巣に比し、非腫瘍性の上皮細胞成分が少なく、他の環境に生着しやすいクローンが選択されている可能性があること、壊死が少なく *viability* のよい細胞が得られやすいことなどが考えられる¹⁴⁾⁻¹⁵⁾。諸家の報告でも、培養材料をみると、

Baron ら¹⁶⁾が肺腺癌原発巣よりの細胞株(LAC株)の樹立を報告しているが、肺癌原発巣由来の細胞株の報告は少なく¹⁷⁾⁻¹⁸⁾、転移リンパ節、胸水、皮膚転移巣由来の細胞株が圧倒的に多い^{8)-10),19)-20)}。このことは、前述の理由によるものと推測される。

今回著者は、2名の患者よりヒト肺癌の代表的な組織型である扁平上皮癌および腺癌の培養細胞株の樹立に成功した。これら2つの細胞株は、肺癌の組織型による生物学的特異性の相違を明らかにするための材料としてその意義を有するとともに、ヒト肺癌細胞を用いての *in vitro* における各種治療法の基礎的研究、単クローン抗体の作製、抗腫瘍剤のスクリーニング、あるいは細胞薬理学的研究などのための *in vitro* におけるヒト肺癌の実験系として有用であると考えられる。

結 語

今回著者は、肺扁平上皮癌患者皮下転移巣由来のヒト肺扁平上皮癌細胞株(EBC-1株)と、肺腺癌患者癌性胸膜炎胸水由来のヒト肺腺癌細胞株(ABC-1株)の樹立に成功した。EBC-1株は、昭和53年4月21日に培養を開始し、昭和59年9月現在180代の継代数を数えている。細胞は、単層性に付着増殖し、細胞分裂指数は2.2で、倍加時間は42時間であった。培養細胞のパパニコロー染色では、低分化型扁平上皮癌の特徴を有しており、患者皮下転移巣の腫瘍細胞と形態学的によく類似していた。染色体数は35~102と広範囲に分布し、モードは53本にあった。ABC-1株は、昭和54年4月4日に培養を開始し、昭和59年9月現在190代の継代数を数えている。細胞は、大部分が浮遊増殖を示し、一部が付着増殖し、細胞分裂指数は1.4で、倍加時間は72時間であった。培養細胞のパパニコロー染色では、低分化型腺癌の特徴を有しており、患者胸水中の癌細胞と形態学的によく類似していた。透過型電子顕微鏡による観察でも、粘液顆粒を多量に有しているなど腺癌細胞としての特徴が認められた。染色体数は25~57と広範囲に分布し、モードは53本と54本にあった。

これら2つのヒト肺癌細胞株は、肺癌の組織型による生物学的特異性の検討、抗腫瘍剤のス

クリーニングを含めた各種治療法の基礎的研究
において有用な実験系になりうると考えられる。

本論文を撰筆するにあたり、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、直接御指導を賜りました大熨泰亮助教授、平木俊吉先生に深謝致します。

文 献

1. Feinstein, A.R.: Symptomatic patterns, biologic behavior and prognosis in cancer of the lung. *Ann. Int. Med.* **61**, 27—43, 1964.
2. Selowry, O.S.: Monotherapy of bronchogenic carcinoma with special reference to cell type. *Cancer Chemother. Rep.* **4**, 177—188, 1973.
3. Frisch, W., Jentoft, V., Barger, R. and Losli, E.J.: A human epithelium-like cell (Maben) derived from an adenocarcinoma of lung. *Am. J. Clin. Pathol.* **25**, 1107—1112, 1955.
4. 大星章一, 関口守正: 日本で樹立維持されているヒト癌細胞培養株。蛋白質・核酸・酵素, **23**, 697—711, 1978.
5. Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. and Hungerford, D.A.: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613—616, 1960.
6. 辻啓次郎, 他: ヒト肺癌細胞由来の1培養株の作成とその性状。医学のあゆみ, **82**, 762—763, 1972.
7. 早田義博, 他: ヒト肺癌細胞培養における技術と細胞同定。医学のあゆみ, **90**, 36—41, 1974.
8. 辻啓次郎, 他: 組織培養による異所性ホルモン産生腫瘍の研究。最新医学, **28**, 1861—1863, 1973.
9. 辻啓次郎, 他: 組織培養による異所性ホルモン産生腫瘍の研究。最新医学, **29**, 2301—2303, 1974.
10. 辻啓次郎, 他: ヒト肺癌細胞由来の1培養株の作成とその性状。医学のあゆみ, **82**, 762—763, 1972.
11. 辻啓次郎, 他: 人肺癌細胞の培養株の樹立。成人病の研究, **1**, 102—106, 1973.
12. 辻啓次郎, 他: Dibutyryl cyclic AMP による株化肺癌細胞の分化誘導。医学のあゆみ, **98**, 600—601, 1976.
13. 長瀬千秋, 他: マイクロプレートを用いる制癌剤感受性検査法(第2報)。最新医学, **32**, 1400—1403, 1977.
14. Nicolson, G.L.: Experimental tumor metastasis: Characteristics and organ specificity. *Bioscience* **28**, 441—447, 1978.
15. Nicolson, G.L.: Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res.* **38**, 4105—4111, 1978.
16. Baron, S. and Robson, A.S.: A culture strain (LAC) of human epithelial like cells from an adenocarcinoma of the lung. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **96**, 515—518, 1957.
17. Cailleau, R.: The establishment of a cell strain (MAC-21) from a mucoid adenocarcinoma of the lung. *Cancer Res.* **21**, 837—840, 1960.
18. Kawashima, K.: Establishment of a cell line in vitro from a case of human lung cancer. *Sci. Rep. Inst. Tohoku Univ.-C* **11**, 386—400, 1964.
19. Pettengill, O.S., Faulkner, C.S., Wurster-Hill, D.H., Maurer, L.H., Sorenson, G.D., Robinson, A.G. and Zimmerman, E.A.: Isolation and characterization of a hormone-producing cell line from human small cell anaplastic carcinoma of the lung. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 511—518, 1977.
20. Oboshi, S., Tsugawa, S., Seido, T., Shimosato, Y., Koide, T. and Ishikawa, S.: A new floating cell line derived from human pulmonary carcinoma of oat cell type. *Gann* **62**, 505—514, 1971.

Experimental model of human lung cancer

Part I. Establishment and characterization of new tissue culture cell lines from human squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung.

Yoichi WATANABE

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. I. Kimura)

Two human lung cancer cell lines designated as EBC-1 and ABC-1 were newly established for the purpose of making an in vitro experimental model of human lung cancer. The EBC-1 line was established from a metastatic skin tumor of a patient with squamous cell carcinoma of the lung. The cells grew in a monolayered sheet with a population-doubling time of 42 hr. The chromosome number showed wide variation from 35 to 102 with a modal peak at 53. The ABC-1 line was established from pleural effusion of a patient with adenocarcinoma of the lung. The cells grew mainly in a floating clump with a population-doubling time of 72 hr. Karyotypic analysis disclosed a wide variation from 25 to 57 with two modal peaks at 53 and 54.

The EBC-1 and ABC-1 lines may be useful for biological, cytopharmacological and therapeutic studies of human squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung.