

速 報

完全な In Vitro 系による Choriocarcinoma
Cell Line の培養樹立

大阪大学医学部癌研究施設腫瘍発生部門

辻 芳之 松崎 昇 浜岡 利之

Key words: Choriocarcinoma • Culture cell line • In vitro

緒 言

Choriocarcinoma を研究する上でこの細胞の in vitro culture line を用いて実験を進める事は、この腫瘍の臨床症例が比較的少ないことから非常に有意義であると思われる。そのため我々はとくに免疫学的な見地から完全な in vitro の系による choriocarcinoma cell line の樹立を試みた。今回我々は既に新潟大学にて樹立された choriocarcinoma culture line の培養上清を用いた conditioned medium を用いることにより choriocarcinoma culture cell line の樹立に成功した。研究方法、材料は胎状奇胎娩出後3年にして choriocarcinoma の発生をみた婦人の摘出子宮より得た。組織学的診断にて choriocarcinoma を確認した。

conditioned medium は新潟大学産婦人科竹内教授より恵与された choriocarcinoma culture cell line, GCH-1 の植え継ぎ後3—4日の最も増殖の良い時期の培養上清と、Fetal Calf Serum (FCS) を20%に含む Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) を1:1に混合し作成した。MEM には streptomycin 100 μ g/ml, penicillin G 100u/ml を添加した。培養細胞の継代にはディスパーゼ (合同酒清) 1,000unit/ml を用いた。手術材料を20% FCS+MEM 中で4℃に保ちつつ細切, pipetting にて単個細胞浮遊液を作成し洗浄, 一群を20% FCS+MEM のみで、他の群は conditioned medium を用い、Falcon's culture bottle 3013 で5% CO₂, 37℃で培養した。培養開始後48時間で非付着細胞を除去後3日毎、後に7日毎

の培養液交換を行なった。

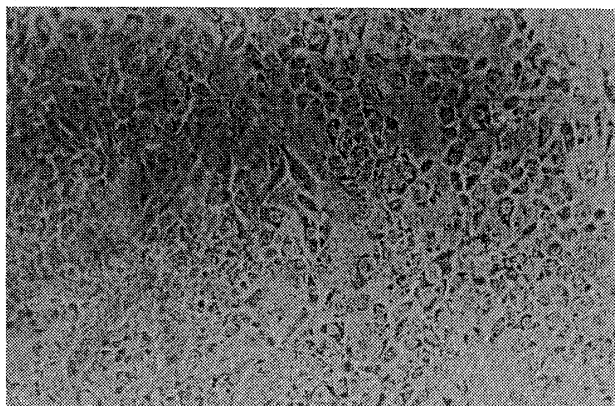
研究成績

conditioned medium を用いた群では, choriocarcinoma cell と思われる多形性の細胞の増殖がみられ約2週間で明らかな colony 形成が見られた。しかし20% FCS+MEM のみの群では、そのような細胞の増殖がみられず、早期に培養を断念した。このような多形性の細胞は最初、共存している線維芽細胞におされぎみであつたが4週付近から明らかに線維芽細胞を押しつけて増殖を始めた。4週目に混在している線維芽細胞を除去するためにディスパーゼ1,000unit/ml 37℃15分間作用させた。この条件下では, choriocarcinoma cell だけが浮遊するが線維芽細胞の浮遊は、きわめて少なくほぼ純粋な choriocarcinoma の colony のみが得られた。培養開始後8週までの増殖曲線から得られた doubling time は約88時間であり GCH-1 のそれ (約60時間) よりもかなり長くなっている。形態的には敷石状の細胞集落を作り GCH-1 に類似するが、個々の細胞の多形性が強い (写真1)。培養液中の HCG は2.0IU/ml. week の level で検出された。

考 案

今日まで choriocarcinoma の culture line は Be. Wo を始め数多く樹立されており^{1) 5) 6) 8)}、本邦においても田中ら¹⁾により GCH-1, GCH-2. が報告されている。これらの culture line は、すべて得られた材料を hamster の cheek pouch あるいは nude mouse の皮下に移植し数代の継代後初めて in vitro での培養に移したものである。とこ

写真 1



ろで choriocarcinoma はその発生母地が胞状奇胎あるいは破壊性奇胎と考えられる場合が臨床的に非常に多く、最近になりその胞状奇胎の染色体の分析より Kajii, Ohama⁴⁾ および Wake, et al.¹⁰⁾ により父方の染色体しか持たないことが確認された。また破壊性奇胎を用いた Tsuji, et al.²⁾⁹⁾ も HLA 系の解析により、父方の組織適合性抗原だけを示すことを証明した。この事実、choriocarcinoma がその発生母地から考えて免疫学的に完全な allogenic な特異性を示す可能性が強く、この方面での免疫学的研究が急がれる所以である。しかるにこれら一度 in vivo での継代を経た choriocarcinoma culture cell line を用いて免疫学的研究を行なうには、いくつかの不利な点がある。すなわち最初の in vivo 継代に用いる動物が、たとえ nude mouse と言えども完全な免疫欠損動物でなく natural killer cell や, macrophage 系の免疫監視機構が作動していることが最近報告されている³⁾⁷⁾ので、これら動物の in vivo 継代中に免疫学的選択が行なわれている可能性が残るからである。そのため最初から完全な in vitro での choriocarcinoma culture cell line の樹立が望まれるが、今までにその成功例はない。これは in vitro での trophoblast の分裂が非常に遅いことに関連して至適な培養条件の設定が困難なためであろう。我々は in vivo 継代後 in vitro line となつた choriocarcinoma cell line 培養上清を新鮮な 20% FCS+MEM に混合することによりここに in vitro の系のみで choriocarcinoma

の長期培養に成功した。しかし全く同一条件下でも培養液が 20% FCS+MEM だけでは成功しなかつた。これは GCH-1 に trophoblast の colony stimulating factor (CSF) が存在している可能性を示唆する。

結 論

我々が、ここで樹立した choriocarcinoma in vitro 培養法は choriocarcinoma に限らず、胞状奇胎あるいは、正常の trophoblast の培養にも応用でき、その研究に大いに寄与できるのではないと思われる。

稿を終るに当り新潟大学産婦人科竹内正七教授、田中憲一先生に心から謝意を表します。また大阪大学産婦人科西山 茂先生の御協力に深く感謝します。

文 献

1. 田中憲一, 片野 彰, 清藤 勉, 大星章一: 悪性絨毛上皮腫の異種移植と培養. 日本癌学会総会記事, 36: 480, 1977.
2. 辻 芳之, 松田修一, 平井健清, 藤原大美, 浜岡利之: 胞状奇胎に於ける母体側 HLA 表現の欠損. 日本癌学会総会記事, 37: 180, 1978.
3. Buruton, R.C. Grail, D. and Warner, N.C.: Natural cytotoxicity of haemopoietic cell populations against murine lymphoid tumor. Br. J. Cancer., 37: 806, 1978.
4. Kajii, T. and Ohama, K.: Androgenetic origin of hydatidiform mole. Nature, 268: 633, 1977.
5. Kohler, P.O. and Bridson, W.E.: Isolation of hormone-producing clonal line of human choriocarcinoma. J. Clin. Endocr., 32: 683, 1971.
6. Kohler, P.O., Bridson, W.E., Hammond, J.M., Weintraub, B., Kirschner, M.A. and Thiel, D.H.: Clonal line of human choriocarcinoma cell in culture. Act. Endocrinol. (supplementum), 153: 137, 1971.
7. Meltzer, M.S. and Oppenheim, J.J.: Bidirectional amplification of macrophage-lymphocyte interaction; Enhanced lymphocyte activation factor producing by activated adherent mouse peritoneal cells. J. Immunol., 118: 1, 77, 1977.
8. Pattillo, R.A. and Gey, G.: The establishment of a cell line of human hormone-synthesizing trophoblast cell in vitro. Cancer. Res., 28: 1231, 1968.
9. Tsuji, Y., Matsuda, S., Hirai, T., Fujiwara, H. and Hamaoka, T.: Selective expression of paternal human histocompatibility antigen (HLA) on the surface of hydatidiform mole cells. Gann, 69: 849, 1978.
10. Wake, N. Takagi, N. and Sasaki, M.: Androgenesis as a cause of hydatidiform mole. J. Natl. Canc. Inst., 60: 51, 1978.

(No. 4456 昭53・12・7 受付)