

## ヌードマウス移植系を用いた卵巣胎児性癌の化学療法

大阪大学微生物病研究所臨床研究部婦人科

澤田 益 臣 早川 謙 一

松井 義 明 西 浦 治 彦

大阪府立成人病センター婦人科

奥 平 吉 雄

### Chemotherapy of Yolk Sac Tumor Heterotransplanted to Nude Mice

Masumi SAWADA, Kenichi HAYAKAWA, Yoshiaki MATSUI and Haruhiko NISHIURA

*Department of Gynecology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Osaka*

Yoshio OKUDAIRA

*Department of Gynecology, Center for Adult Diseases, Osaka*

**概要** 卵巣胎児性癌の有効な化学療法を検索するため5例のヒト胚細胞系腫瘍の nude mouse 移植系を維持し、この中の1例を用いて制癌剤投与実験を行なった。

1. 38歳の卵巣胎児性癌患者より採取した組織を BALB/c 系 nude mouse 雌に移植継代し(YST-1 と命名)増殖速度が一定となつた第8代の腫瘍を用いた。腫瘍は充実性で均一の増殖を示し  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) を産生し、組織形態、機能共に典型的な胎児性癌の特徴を示した。

2. 卵巣癌治療に使用される制癌剤の効果を検討するため、Adriamycin 5mg/kg, Carbazilquinone 0.6mg/kg, Mitomycin C 0.2mg/kg, 5-Fluorouracil 25mg/kg, Cyclophosphamide 20mg/kg, Chromomycin A<sub>3</sub> 0.05mg/kg, Vinblastine 1mg/kg, Bleomycin 3mg/kg の各薬剤を単剤ないし合剤で担癌 nude mouse 腹腔内に投与した。制癌剤投与実験期間中は腫瘍径を定期的に計測し、長径 $\times$ (短径)<sup>2</sup> $\times$ 1/2を腫瘍の大きさ(tumor size)とした。制癌剤の効果は tumor size 及び投与開始前後の tumor size の比(relative tumor size)をもつて判定した。実験結果では、Vinblastine と Bleomycin の組合わせが最も強く腫瘍縮小効果を示したが、更に各制癌剤の投与実験結果を臨床治療との関連において考察した。

**Synopsis** Chemotherapy of yolk sac tumor heterotransplanted to nude mice was studied.

1. Yolk sac tumor of the ovary taken from a 38-year-old woman was transplanted to BALB/c female nude mice. The transplantable tumor cells produce a solid tumor, designated as YST-1 tumor. The YST-1 tumor cells preserve the histological appearance of a human yolk sac tumor and produce  $\alpha$ -fetoprotein. The tumors on passage 8 were used for experimental chemotherapy.

2. Anticancer drugs clinically known to be effective for ovarian cancer, such as Adriamycin, Carbazilquinone, 5-Fluorouracil, Cyclophosphamide, Mitomycin C, Chromomycin A<sub>3</sub>, Vinblastine and Bleomycin were administered intraperitoneally to tumor-bearing nude mice. Tumor size was measured two or three times a week during the course of experiments. Therapeutic effects were evaluated by tumor size and relative tumor size before and after experiments.

Among these drugs, Vinblastine and Bleomycin combination showed the significant effect arresting the growth of YST-1 tumor.

**Key words:** Chemotherapy • Yolk sac tumor • Nude mouse

### 緒 言

卵巣悪性腫瘍はその発生する解剖学的位置及び診断の困難な事より発見された時点で進行しているものが多く、婦人科悪性腫瘍のうちでも治療が

むずかしく予後が悪いとされている。なかでも胎児性癌は若年に好発し、急速な臨床経過をたどる極めて悪性度の高い腫瘍であり、その治療ことに化学療法に関して種々の工夫がなされてき

た4)5)13)19)。

我々が過去6カ年間に施行した胎児性癌の制癌剤治験例を検討した結果<sup>10)</sup>では、有効な制癌剤を選択すること、用いた制癌剤の効果の有無をすみやかに判定することが治療上の key point であると考えられた。しかし、胎児性癌は臨床例も少なくかつ人体において制癌剤の実験的投与を行う事は困難であるため、実験系の確立が必要となった。

そこで、腫瘍、薬剤、宿主の三者間の相互関係を同時に観察しうる in vivo 実験系として nude mouse を用いた胎児性癌の移植系確立を試みてきたが<sup>19)</sup>、今回は1977年に確立した胎児性癌の nude mouse 移植系<sup>9)</sup>を用いた実験的化学療法を試み、臨床治療との関連において考察した。

#### 実験材料及び方法

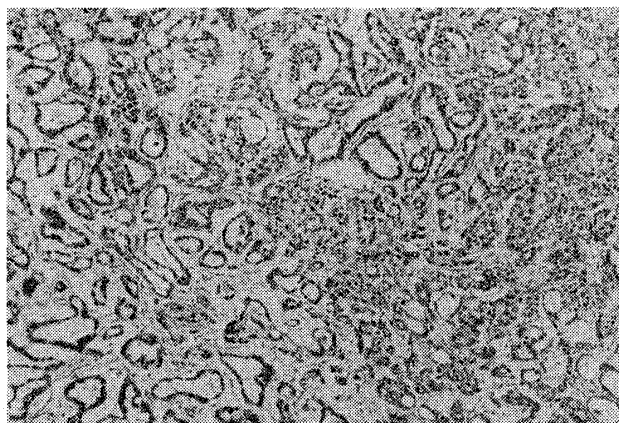
##### 1. 移植用動物

日本クレア (CLEA, 高槻) より購入した BALB/c 系 nude mouse の雌 4～8 週齢を用いた。

##### 2. 移植材料

38歳の卵巣胎児性癌患者より剖検時に採取した腫瘍組織を MEM 培養液中にて2～3mm角四方に細切し、トラカール針を用いて nude mouse 背部皮下に移植した。移植された腫瘍径が 20～30mm になった時点で継代移植を行ない、現在11代目に至っている。腫瘍は均一で充実性の増殖を示し、組織学的には microcystic, reticular, solid 部を有し (写真1)、胎児性癌の特徴を保持してい

写真1 Histology of YST-1 tumor (eighth passage). H.E. ×40



る。腫瘍の継代移植率はほぼ100%で制癌剤投与実験は8代目の系を用い、移植後4～5週頃腫瘍発育速度が一定の時期に行つた。

##### 3. 制癌剤投与方法

用いた制癌剤ならびに組合せは、

ADR 群 (Adriamycin 5mg/kg),

CQ 群 (Carbazilquinone 0.6mg/kg),

BM 群 (Bleomycin 1mg/kg, Mitomycin C 0.2mg/kg),

FAMT 群 (5-Fluorouracil 25mg/kg, Cyclophosphamide 20mg/kg, Mitomycin C 0.2mg/kg, Chromomycin A<sub>3</sub> 0.05mg/kg),

VB 群 (Vinblastine 1mg/kg, Bleomycin 3mg/kg),

の5群で、単剤あるいは併用で、卵巣癌治療によく用いられる薬剤である。

これらの5群にコントロール群を加え6群とし、担癌 nude mouse は1群5匹とし、計30匹を用いた。

投与量は、予備実験を施行して臨床投与量の5倍量とし、各薬剤は生理的食塩水 1ml に溶解し、各実験群毎に一定の方式に従い、腹腔内に注射した。なおコントロール群には 1ml の生理的食塩水のみの投与を行つた。

##### 4. 効果判定方法

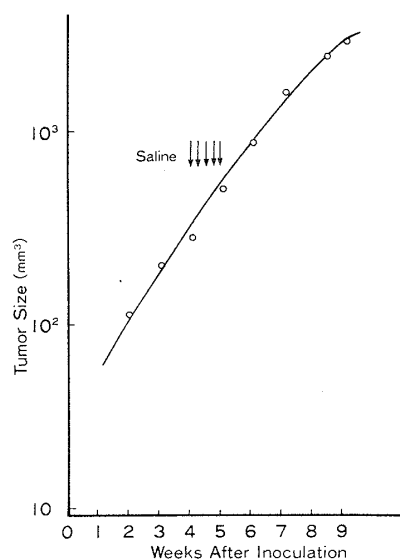
Houchens et al<sup>15)</sup> の方式に従い、腫瘍径をノギスで測定し長径×(短径)<sup>2</sup>×1/2を腫瘍の大きさ (tumor size) とした。また、制癌剤投与開始時と投与後計測時の腫瘍の大きさの比を求め、relative tumor size (R.T.S) とした。Tumor size ならびに R.T.S. をもって制癌剤の腫瘍発育抑制効果を検討した。実験終了時には腫瘍の組織学的検索を行つて制癌剤効果を確認した。尚、nude mouse の飼育ならびに実験操作はすべて barrier system による SPF 環境下にて行つた。

#### 実験成績

##### 1. Tumor size の変化

コントロール群：制癌剤投与実験開始時を0日目として0, 1, 2, 3, 4日目に生理的食塩水 1ml を投与した。腫瘍の発育は図1の如くで生理

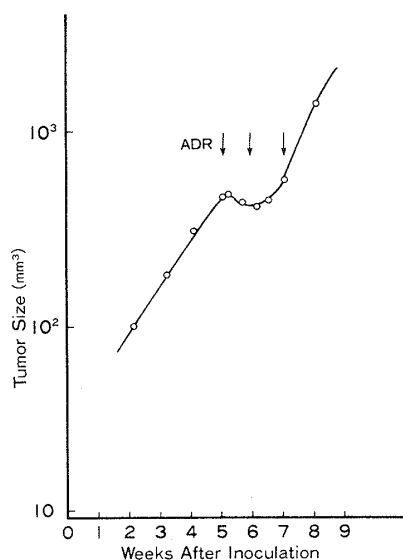
図1 Growth of YST-1 xenografts in athymic nude mice



的食塩水投与による影響は認められなかった。

ADR 群 : Adriamycin 5mg/kg を 0, 5, 14日目の3回投与した。初回投与後より腫瘍発育抑制効果を示したが、効果持続期間が短かく、投与開始後10日目より再増殖がおこった。第3回目の投与を行つたが無効であつた (図2)。

図2 Effect of ADR on the growth of YST-1 transplanted in nude mice



CQ 群 : Carbazilquinone 0.6mg/kg を 0, 5, 14日目の3回投与した。第1回投与後直ちに腫瘍縮小効果を示し、その後すぐ再増殖が認められ

た。第2回目も同様の変化を示した。再増殖後3回目投与を行つたが無効であつた (図3)。

BM 群 : Bleomycin 1mg/kg を 0, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9日目に投与し, Mitomycin C 0.2mg/kg を 4, 10日目に投与した。著明な腫瘍縮小効果はみられなかったが発育抑制効果が長く持続した (図4)。

図3 Effect of CQ on the growth of YST-1 transplanted in nude mice

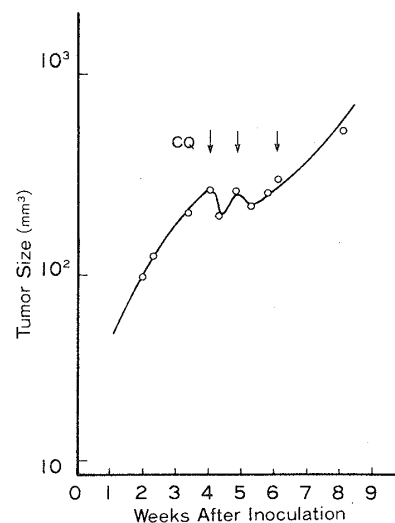
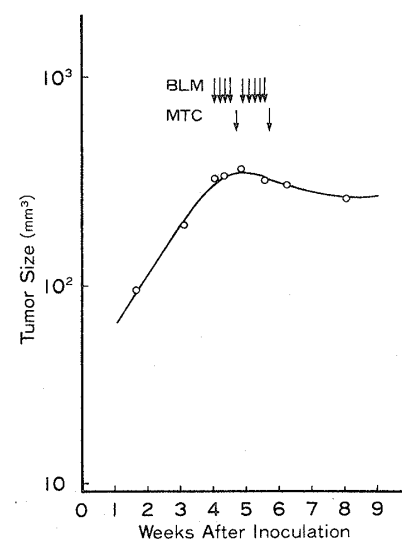


図4 Effect of BM on the growth of YST-1 transplanted in nude mice



FAMT 群 : FAMT 合剤を 0, 2, 4, 6, 8, 10日目に投与した。投与後、比較的緩徐な腫瘍縮小効果が認められた。効果持続は VB 群に比べ

長くつづき、その後再増殖がおこつた (図5)。

VB 群: Vinblastine 1mg/kg 投与6時間後に Bleomycin 3mg/kg を投与する方式で 0, 4 日目の2回投与した。投与直後より著明な腫瘍縮小効果が認められた。腫瘍の再増殖は14日目頃より認められた (図6)。

図5 Effect of FAMT on the growth of YST-1 transplanted in nude mice

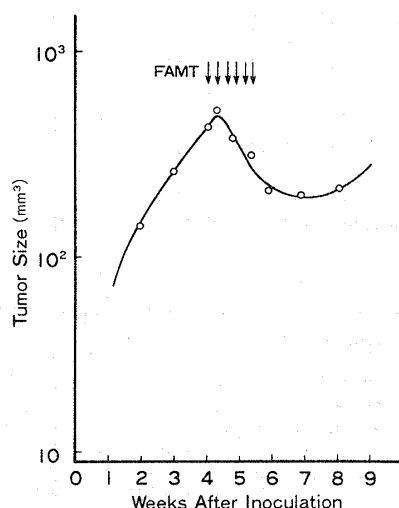
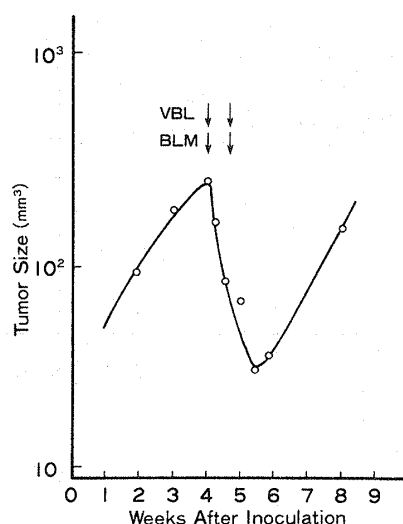


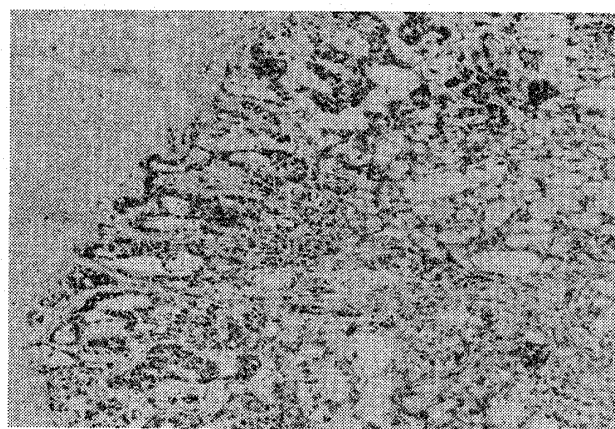
図6 Effect of VB on the growth of YST-1 transplanted in nude mice



## 2. 組織学的変化

制癌剤投与後腫瘍組織の変化を H.E. 染色にて検索した。腫瘍組織の間質部に細胞浸潤を伴った結合織の増生がみられ、壊死や血管壁の肥厚、硝子化が認められた (写真2)。腫瘍細胞に

写真2 Histology of YST-1 tumor treated with Vinblastine-Bleomycin combination therapy. H.E.  $\times 40$



おいては核や細胞質の膨化がみられ核小体識別が困難となつた。核濃縮や細胞質の空胞化も認められた。各種制癌剤による詳細な組織学的変化の差異は、現在検討中である。

## 考 案

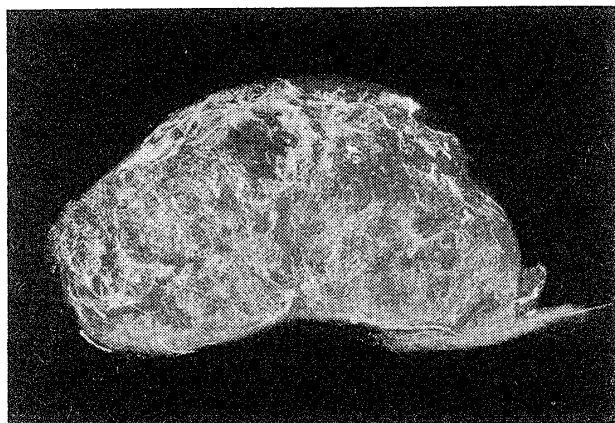
卵巣胎児性癌は多彩な病理組織像を呈する極めて悪性度の高い腫瘍であり、我々は本腫瘍の細胞分化をはじめとする腫瘍性格の検索と臨床治療への応用をめざして1976年よりヒト性腺胚細胞系腫瘍の nude mouse 移植系確立を試みてきた。ヒト悪性腫瘍の nude mouse への移植に関しては Rygaard et al.<sup>17)</sup> 以来数多くの報告があり、婦人科領域の腫瘍に関する報告<sup>2) 3) 11) 12) 14) 16)</sup> もみられるが、胚細胞系腫瘍に関する記載は未だ少ない<sup>1) 7) 9)</sup>。我々は、現在迄に14例のヒト卵巣、睪丸の胚細胞系腫瘍 (Yolk sac tumor, Dysgerminoma, Seminoma, Teratocarcinoma) の移植を行ない、うち5例の継代移植に成功した (表1)。このうち Case 1 (YST-1) は移植率ほぼ100%であり、充実性で均一の増殖を示すことが確認されたので、これを用いて制癌剤投与実験を行つた。従来より移植腫瘍を用いた制癌剤感受性テストを行う場合の問題点として原腫瘍との類似性の有無があげられているが、YST-1の腫瘍細胞は胎児性癌の特徴である microcystic, reticular, solid pattern を構築し、かつ marker 物質である AFP を産生し、形態機能両面において原腫瘍の性格を

表1 Heterotransplantation of human gonadal germ cell tumors to nude mice

| Case | Name      | Original tumor | Transplanted tissue | Histology           | Inoculation* | Serial transplantation |
|------|-----------|----------------|---------------------|---------------------|--------------|------------------------|
| 1.   | K. O. 38♀ | Ovary          | Tumor               | Yolk sac tumor      | s.c.         | 11 passages            |
| 2.   | N. O. 16♀ | Ovary          | Tumor               | Yolk sac tumor      | s.c.         | 0                      |
| 3.   | M. Y. 14♀ | Ovary          | Ascites             | Yolk sac tumor      | i.p.         | 0                      |
| 4.   | H. H. 36♀ | Ovary          | Tumor               | Yolk sac tumor      | s.c.         | 0                      |
| 5.   | Y. N. 12♀ | Ovary          | Tumor               | Yolk sac tumor      | s.c.         | 2                      |
| 6.   | S. N. 24♀ | Ovary          | Tumor               | Yolk sac tumor      | s.c.         | 4                      |
| 7.   | Y. T. 16♀ | Ovary          | Tumor               | Yolk sac tumor      | s.c.         | 0                      |
| 8.   | K. S. 13♀ | Ovary          | Tumor               | Dysgerminoma        | s.c.         | 0                      |
| 9.   | H. K. 8♀  | Ovary          | Tumor               | Teratocarcinoma     | s.c.         | 2                      |
| 10.  | K. M. 37♂ | Testis         | Tumor               | Seminoma            | s.c.         | 0                      |
| 11.  | H. S. 80♂ | Testis         | Tumor               | Anaplastic seminoma | s.c.         | 0                      |
| 12.  | J. N. 25♂ | Testis         | Tumor               | Seminoma            | s.c.         | 0                      |
| 13.  | Y. M. 26♂ | Testis         | Tumor               | Teratocarcinoma     | s.c.         | 0                      |
| 14.  | S. E. 19♂ | Testis         | Tumor               | Teratocarcinoma     | s.c.         | 4                      |

\*s.c. = subcutaneously i.p. = intraperitoneally

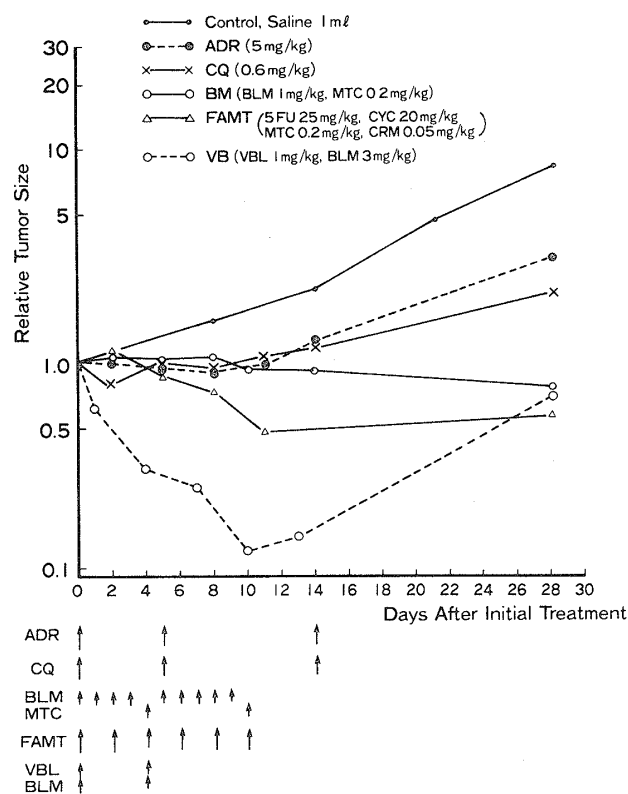
写真3 Microangiography of YST-1 tumor. Note abundant blood vessels (white looking).



保持している。また、丸山<sup>6)</sup>は薬剤の組織到達度の見地より腫瘍の vascularity の重要さを指摘しているが、本腫瘍は写真3に示す如く hypervascularであり、この点でも YST-1 は制癌剤治療実験を行なうのに恰好のモデルであるといえよう。

さて、実験結果を臨床治療経験との関連において考察してみると ADR は上皮性卵巣癌に対してよく用いられるが、YST-1 に対する効果は認められなかった。本剤は投与経路による効果の差が問題とされており、腹腔内投与であつた事が効果を示さなかつた要因とも考えられるが、腹腔内投与でも十分有効であるとの報告もあり<sup>8)</sup>、本剤に対する胎児性癌組織の感受性が低い為と思われた。

図7 Effect of anticancer drugs against YST-1 in nude mice



CQ 群では非常に response が sharp であるが、また再増殖も速やかであるという結果を示した。このことは臨床治療に際して CQ 投与時にしばしば経験する本剤の特徴と一致した。

BM 群では発育抑制効果が長く持続し、腫瘍の薬剤耐性がおこりにくいと考えられた。

FAMT 群では、腫瘍縮小効果が認められたが R.T.S. 0.47程度であり、胎児性癌の FAMT 治療経験よりえた認識（薬剤効果は認めてはいるが十分な延命効果は得難かった。）と同様であった。

VB 群では腫瘍消失には至らなかったが、R.T.S. 0.13の著明な腫瘍縮小効果が認められた（図7）。しかし、その後投与を中止すると再増殖を示したので臨床治療に際しては VB に組み合わせる薬剤が問題であると思われた。

以上の実験結果をどのように臨床治療に反映させるかが重要であり、今後、更に種々の系を用いて制癌剤の効果を確認する必要があるが、nude mouse を用いた実験的化学療法は臨床治療への応用という見地よりきわめて有用であると考えられる。

### 総 括

1. 形態的、機能的に極めて典型的な胎児性癌の性格を有し、かつ継代移植率も安定した nude mouse 移植系を確立した。

2. この系を用いて実験的化学療法を行つた結果 Vinblastine, Bleomycin の組合せが最も強く腫瘍縮小効果を示した。

3. 本腫瘍を用いた実験的化学療法は、臨床応用の基礎として極めて有用であり、かつ今後の制癌剤スクリーニング試験も行いうる可能性を示した。

稿を終るに臨み、御指導御協力を賜った国立がんセンター病理部下里幸雄先生、同外科丸山圭一先生に謝意を表します。また、御助力頂いた黒川和男、吉川有子両君に感謝致します。なお、本論文の要旨は第38回日本癌学会総会、第62回近畿産科婦人科学会総会シンポジウム“進行癌化学療法のありかた”に於て報告した。

### 文 献

1. 天崎博文, 大川 清, 小池清彦, 越智康仁, 寺島芳輝: ヒト性腺悪性腫瘍の Nude Mouse への移植について. 日産婦誌, 29: 1165, 1977.
2. 天崎博文: 産婦人科領域悪性腫瘍の Nude Mouse 移植に関する研究. 日産婦誌, 31: 314, 1979.

3. 早川謙一, 奥平吉雄, 西浦治彦, 松井義明, 井口正男, 大鶴栄史: ヒト子宮内膜癌のヌードマウス移植系の確立. 日産婦誌, 29: 875, 1977.
4. 泉 陸一, 白水健士, 川名 尚, 菅生元康, 川端正清, 滝沢 憲, 坂元正一: 卵巣癌の化学療法とその実際. 産婦治療, 35: 513, 1977.
5. 加藤 俊, 薬師寺道明: 卵巣腫瘍の診断と治療指針. 産婦治療, 39: 835, 1979.
6. 丸山圭一: ヌードマウス移植人癌の微細血管構築と化学療法の効果. 厚生省がん研究助成金「がんの薬物療法に関する研究班」班会議報告, 1977.
7. 大川 清, 天崎博文, 小池清彦, 中島康治, 桜井伝吾, 寺島芳輝: 人胚細胞腫瘍のヌードマウスへの移植. 主に形態学的変化について. 日産婦誌, 31: 97, 1979.
8. 太田和雄, 加藤武俊, 夫羽弘行, 星野 章, 村上 稔, 杉浦考彦: 癌化学療法をめぐる諸問題, Adriamycin の作用機作とその臨床. 医学のあゆみ, 91: 161, 1974.
9. 澤田益臣, 早川謙一, 松井義明, 井口正男, 西浦治彦, 大鶴栄史, 奥平吉雄: 卵巣胎児性癌の Nude Mouse 移植系の確立. 日産婦誌, 30: 279, 1978.
10. 澤田益臣, 早川謙一, 西浦治彦, 松井義明, 井口正男, 久保喬士, 大鶴栄史, 奥平吉雄: 胎児性癌の制癌剤治療について. 産婦治療, 39: 371, 1979.
11. 下里幸雄: 各種人癌のヌードマウス移植系の樹立と、その癌診断治療への応用に関する研究. 厚生省がん助成金による研究報告集(下巻), 212, 国立がんセンター, 東京, 1976.
12. Daby, M., Mossige, J. and Johannessen, V.: Heterologous growth of human ovarian cancer. A new in vivo testing system. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 56: 55, 1977.
13. DiSaia, P.J.: Endodermal sinus tumor. Obstet. Gynecol., 45: 186, 1975.
14. Hayashi, H., Kameya, T., Shimosato, Y. and Mukojima, T.: Chemotherapy of human choriocarcinoma transplanted to nude mice. Am. J. Obstet. Gynecol., 131: 548, 1978.
15. Houchens, D.P., Ovejera, A.A. and Baker, A.D.: The therapy of human tumors in athymic (nude) mice. In Proceedings of the symposium on the use of athymic (nude) mice in cancer research, 267, Gustav Fisher, New York, 1978.
16. Kullander, S., Rausing, A. and Trope, C.: Human ovarian tumors heterotransplanted to "nude" mice. Acta Obstet. Gynecol. Scand., 57: 149, 1978.
17. Rygaard, F. and Povlsen, C.O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to

- “nude” mice. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [A], 77: 758, 1969.
18. Sawada, M., Hayakawa, K., Matsui, Y., Iguchi, M., Nishiura, H. and Okudaira, Y.: Morphological and functional studies on human endodermal sinus tumors transplanted to nude mice. In Abstracts of 9th world congress of gynecology and obstetrics. 52, 1979.
19. Smith, J.P., Rutledge, F. and Wharton, T.: Chemotherapy of ovarian cancer; New approaches to treatment. Am. J. Obstet. Gynecol., 15: 261, 1973.
- (特別掲載 No. 4738 昭55・7・10受付)
-