

hCG 産生卵巣未分化胚細胞腫細胞株の樹立とその性状

香川医科大学母子科学講座

田中 耕平 黒瀬 高明 半藤 保

Establishment and Characterization of Ovarian Pure Dysgerminoma Cell Line Secreting Human Chorionic Gonadotropin

Kouhei TANAKA, Takaaki KUROSE and Tamotsu HANDO

Department of Perinato-Gynecology, Kagawa Medical School, Kagawa

概要 hCG 産生卵巣未分化胚細胞腫の原発巣から細胞株 (KURATOU 株) を樹立した。培養細胞は摘出腫瘍細胞はきわめて類似した小型細胞と、1ないし数個の核を持つ大型細胞が認められた。population doubling time は約10日で遅い増殖を示した。培養上清の hCG 測定の結果、細胞1個あたり $7\sim 9 \times 10^{-6}$ IU/cell の hCG 産生能を認めた。免疫細胞化学的にも培養細胞のほとんどに hCG は陽性であった。染色体は69に mode を示す3倍体領域に分布した。培養細胞の一部に HLA-ABC 抗原が表現されていたが、-DR 抗原は認められなかつた。異種移植能があり、形成された腫瘍は syncytiotrophoblast 様の giant cell や他腫瘍成分を含まず、原腫瘍に類似した。

Synopsis A cell line, designated KURATOU, was established from a human chorionic gonadotropin (hCG)-secreting pure dysgerminoma of the ovary. The cell line comprised small cells resembling original tumor cells and large ones possessing one or a few nuclei. Population doubling time was calculated to be about 10 days. An enzyme immunoassay study of hCG in media showed that the cells produced $7\sim 9 \times 10^{-6}$ IU/cell of hCG. Immunocytochemical studies revealed hCG in almost all of the cultured cells. The chromosomal number was distributed in triploid and the modal chromosomal number was 69. Some cells contained HLA-ABC antigens, but none contained HLA-DR antigens. The cell line was transplanted into a nude mouse and produced a tumor resembling the original tumor but with no other tumor elements.

Key words: Dysgerminoma • Cell line • hCG • Ovarian tumor

緒 言

未分化胚細胞腫は比較的稀な卵巣腫瘍の一つであるが、hCG を産生するものはきわめて稀である。未分化胚細胞腫で hCG 高値を示す場合は一般に絨毛癌、奇形腫等の合併が考えられる。その理由は、未分化胚細胞腫は遺伝的に決定された性とは関係なく発育する未分化性腺 (胎生8週以前) の段階にみられる primitive germ cell が腫瘍化したと考えられ、細胞内小器官が少なく蛋白分泌の期待できない細胞から構成されているからである²⁾。しかし、hCG 高値を示しながら他の腫瘍成分を持たない未分化胚細胞腫が Kapp et al.⁵⁾ によると15例報告されている。これらの報告の多く⁸⁾⁹⁾ は germ cell 由来の syncytiotrophoblastic giant cell が hCG を産生するとしている。

われわれは他の腫瘍成分や giant cell を含まな

い未分化胚細胞腫で、血中、尿中 hCG 高値を示した1例を経験し、摘出腫瘍から細胞株を樹立したので報告する。

材料と方法

症例は25歳未婚で0妊0産であった。昭和60年11月27日に下腹部腫瘤、約6カ月間の無月経と繰り返す不正性器出血を主訴に当科を受診した。腫瘍は成人頭大で、充実性卵巣腫瘍の診断で12月13日に開腹した。血性腹水を850ml 認めた。腫瘍は左卵巣原発で30cm×20cm の大きさ、表面は平滑で骨盤腹膜に繊維性癒着と腹腔内の腹膜に粟粒大の播種を認めたが、腸管表面、大網には異常を認めなかつた。左付属器摘出術、右卵巣生検、大網切除術および腹腔内に Cis-platinum 150mg を投与し手術を終了した。腫瘍剖面は出血性で軟らかく胎盤様であった。病理組織学的には未分化胚細胞

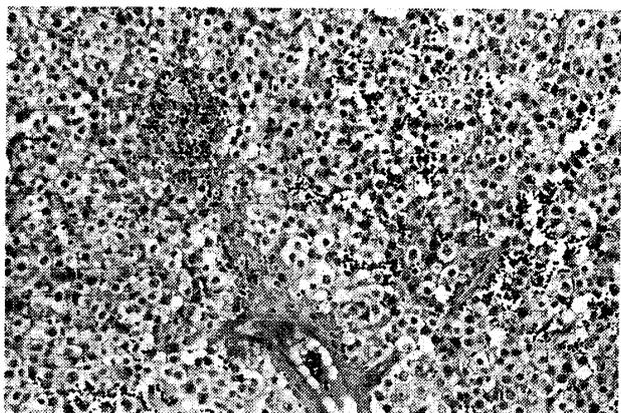


写真1 摘出腫瘍の組織所見
腫瘍細胞は均一で他の腫瘍成分を認めない。間質にリンパ球の浸潤を認める。(HE染色, $\times 50$)

腫であり、多数の切片においても他の腫瘍成分を認めえなかつた(写真1)。なお術前検査で血清および尿中hCG値が640mIU/mlと高値を示したが、術後の昭和61年1月23日に5mIU/ml以下となつてから現在まで再上昇せず再発を認めない。また術前のLHは18mIU/ml, FSHは2.3mIU/ml, estradiolは78.2pg/ml, progesteroneは0.6ng/mlであり正常範囲と判断され, AFP, CEAも正常範囲であつた。

1. 細胞培養方法

手術時に摘出した左卵巢腫瘍より無菌的に採取した腫瘍片をメスにて細切し, これにDispase(三光純薬)1,000単位/mlおよび10%牛胎仔血清(FCS)を含むDM170培地(極東製薬)を加えて1時間, 37°C, 5%CO₂の条件で培養した。その後, FCSを含まない培養液で3回洗浄し, 10%FCS加DM170培地に細胞を浮遊させ, 37°C, 5%CO₂の条件で静置培養した。以後, 培養液は10%FCS加DM170培地とし, 3日ごとに交換した。

2. 増殖曲線および培養上清のhCG値

1×10⁵個の培養細胞を1mlの培養液に浮遊させ35mm径dishにまき, 37°C, 5%CO₂の条件で静置培養した。3日ごとに培養液を交換し, 細胞を0.25%トリプシン, 0.01%EDTAで剥離し細胞数を計算した。さらに培養上清のhCGをHCG-CTPテスト(武田製薬)にて測定した。各ポイントごとにtetraplicateで測定した。

3. 染色体分析

培養細胞を通常の方法で固定し, ギムザ染色した。さらにトリプシンGバンド法にて核型分析した。

4. 異種移植実験

1×10⁷個の培養細胞を4~5週齢BALB/C系雌nude mouseの皮下または腹腔内に移植した。摘出腫瘍はただちにホルマリン固定し, 光顕標本とした。

5. 培養細胞および摘出腫瘍のβhCG染色

1×10⁵/mlの培養細胞をLab Tek Chamber (MILES)内で2日間培養し, プアン固定ののち500倍希釈の抗βhCG-CTPモノクローナル抗体(CGB 070, 持田製薬)を1次抗体としてABC法にてβhCG染色をした。

摘出腫瘍はすでにホルマリン固定後パラフィン包埋されていた標本を脱パラし, 培養細胞と同様の方法でβhCGを染色した。

6. 培養細胞のHLA抗原の検索

1×10⁵/mlの培養細胞をLab Tek Chamber内で培養し, アセトン固定ののちHLA-ABC, HLA-DR(Cappel)を1次抗体としてABC法にてHLA抗原を検索した。HLA-ABC, -DRの各抗体は予備実験の結果から, それぞれ200倍, 160倍に希釈したものを使用した。

実験成績

1. 株の樹立

培養開始より線維芽細胞の混入は少なく, 比較的小型で核小体の明瞭なN/C比の大きな細胞が散在性に, あるいはシート状に発育した。この細胞は培養継続によりマリモ状の球形を形成し容易に剝離した。小型の細胞周囲に広く淡い細胞質と1ないし数個の巨大核を有した大型細胞が散在した。この大型細胞は32カ月経過した現在でも認められ, 継続的に観察すると小型の細胞が変化して生ずるように考えられた(写真2)。いずれの細胞もPAS, Alkaline phosphatase染色陽性であつた。現在も安定した発育を認め, KURATOU株と命名した。

2. 細胞増殖能と培養上清のhCG値

細胞増殖能について6, 9代について検討した。

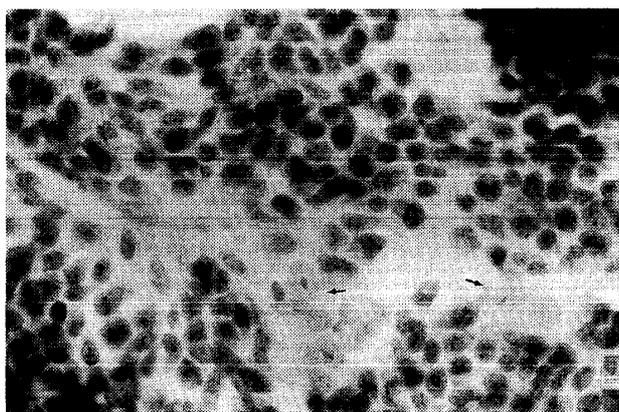


写真2 培養細胞像

未分化胚細胞腫に類似した多稜形または円形の小型細胞と細胞質の広い大型細胞が認められる。多核巨細胞も認められる。(Pap染色, $\times 100$)

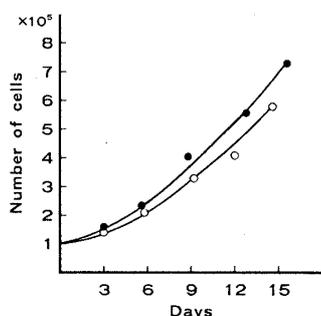


図1 KURATOU 株の増殖曲線

縦軸は細胞数, 横軸は培養日数を示す。○, ●はそれぞれ6, 9代目の細胞の増殖曲線を示す。ほぼ同様な発育を示す。

両者とも, ほぼ同様な増殖速度を示した。6代目の population doubling time は10日間と長く, 増殖の遅い細胞と考えられた(図1)。

6代目の細胞増殖能の検討と同時に培養9, 12, 15日目の培養液中の hCG を測定した。それぞれの hCG 値は 2.32 ± 0.29 mIU/ml, 3.66 ± 0.76 mIU/ml, 5.13 ± 0.46 mIU/ml であり, 細胞数の増加に伴い増量した。しかし, 細胞あたりの hCG 産生量を計算するとそれぞれ $7.12 \pm 1.37 \times 10^{-6}$ mIU/cell, $9.24 \pm 2.63 \times 10^{-6}$ mIU/cell, $8.93 \pm 1.14 \times 10^{-6}$ mIU/cell であり培養日数による明らかな増加は認められなかった(図2)。

3. 染色体分析

4代目の細胞について分析した。60個の分裂像につき染色体数を数えた結果, Triploid 領域に分

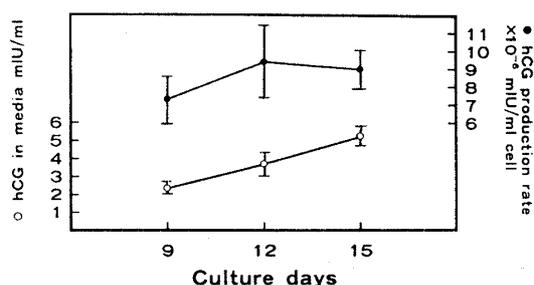


図2 KURATOU 株の培養上清における hCG 値
左縦軸は培養上清1mlあたりの hCG 値, 右縦軸は細胞1個あたりの hCG 値, 横軸は培養日数を示す。各 point は tetraplicate の平均値と標準偏差(I)を示す。

培養日数に比例して hCG 値は増量したが, 細胞あたりの hCG 値はほとんど変化がみられない。

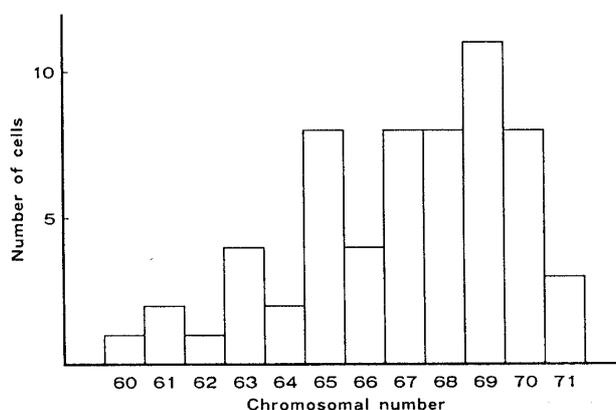


図3 KURATOU 株の染色体

3倍体領域に分布し, 69に mode を認めた。

布し69に mode を認めた(図3)。さらにトリプシン G バンド法の結果, すべての細胞において $1p^-$, $5q^+$ の異常と 6, 10および X 染色体の trisomy を認めた。

4. 異種移植実験

20代, 26代の細胞をそれぞれ nude mouse の皮下および腹腔内に移植した。その結果いずれにも約4カ月後に腫瘍を形成した。きわめて軟らかく均一で, この腫瘍は嚢腫の形成は認められなかった(図4)。

組織学的には原腫瘍に類似し, リンパ球の3ないし5倍程度の大きさを有する均一な細胞が胞巣を形成し, 間質に少数のリンパ球の浸潤を認めた。細胞質は広く染色性に乏しいが PAS 陽性であり, 核に1ないし2個の明瞭な核小体を認めた。syncytiotrophoblast 様の giant cell および他の

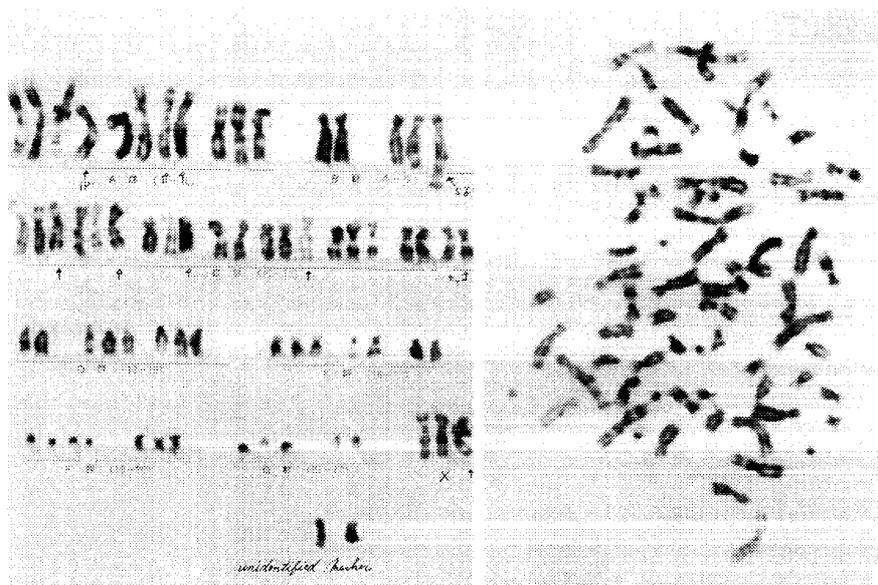


図4 KURATOU 株の染色体核型分析

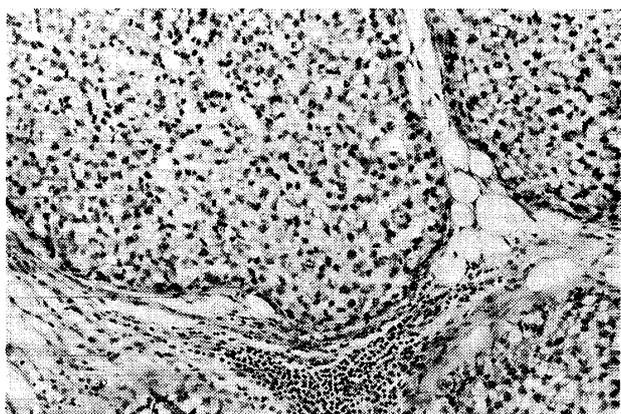


写真3 nude mouse 移植腫瘍の組織所見
原腫瘍に類似した未分化胚細胞腫の所見を示した。
(HE 染色, $\times 100$)

腫瘍成分は認められなかつた (写真3)。

5. β hCG 染色

30, 35, 41代の細胞について検討した。いずれの世代の細胞においても β hCG 陽性であつた。位相差顕微鏡で観察された比較的小さい細胞、および細胞質の大きい細胞ともほとんどの細胞は陽性であつた (写真4)。

摘出腫瘍においては、陽性細胞をごくわずかに認めた (写真5)。

6. 培養細胞の HLA 抗原

24, 30代の細胞の HLA 抗原について酵素抗体

法で検索した。HLA-DR 抗原はすべての細胞で陰性であつた。HLA-ABC 抗原は比較的小さい細胞の一部と細胞質の広い細胞において陽性であつた (写真6)。

考 案

本例は組織学的に未分化胚細胞腫の特徴を有していると考えられる。すなわち、腫瘍は染色性に乏しい広い細胞質を有する細胞の集団から構成され、これがリンパ球の浸潤を伴う間質により胞巣状、索状に区画されて配列している点、細胞質に glycogen を認める点、細胞膜は鮮明で、核小体の顕著な大きな核が細胞の中央に認められる点、syncytiotrophoblast 様の giant cell や teratoma 等他の腫瘍成分が存在しない点などから pure dysgerminoma と診断した。さらに本例は hCG 産生を認めたことから hCG 産生の pure dysgerminoma と考えられる。

未分化胚細胞腫の hCG 産生細胞は syncytiotrophoblast 様の giant cell であるという報告⁹⁾が多いが、ほかに small stromal cell や腫瘍細胞自身が hCG を産生しているという報告⁶⁾¹⁰⁾もみられる。本例は酵素抗体法で一部の腫瘍細胞に β hCG が証明され、樹立細胞自身にも認められ、腫瘍細胞が β hCG を産生していたと考えられる (写真4, 5)。また、 β hCG 陽性細胞と陰性

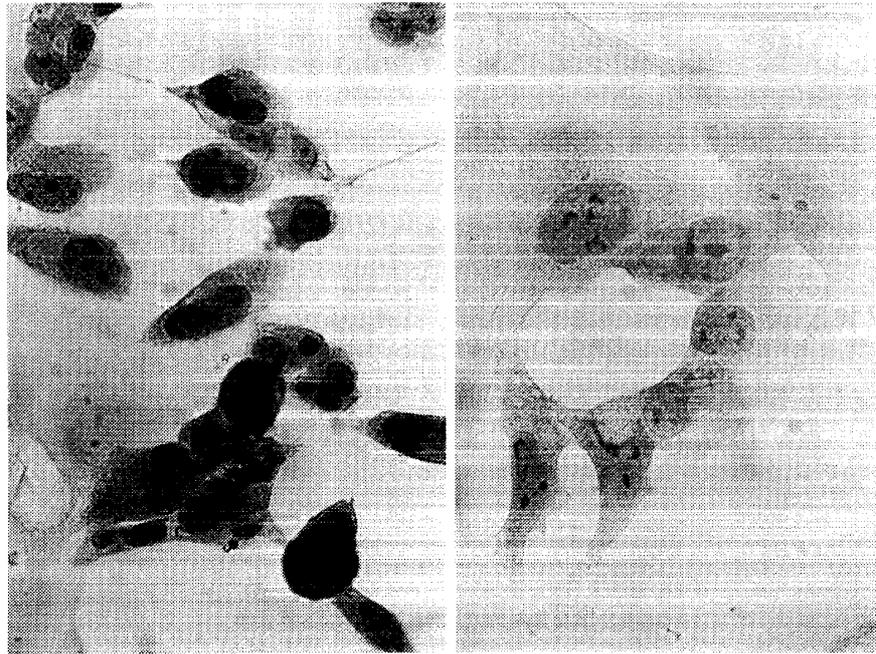


写真4 培養細胞の β hCG 染色
ほとんどすべての細胞が陽性を示した。(×100)
左：陽性像，右：陰性コントロール

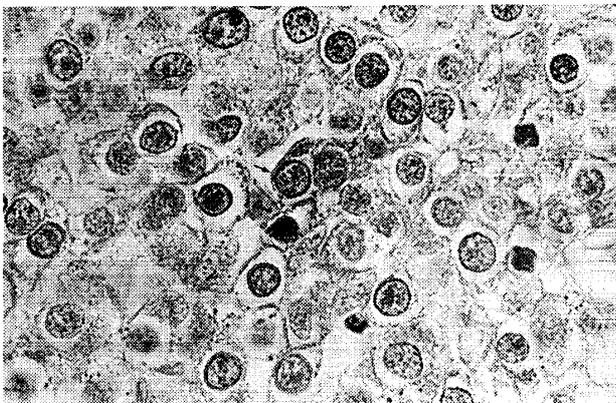


写真5 摘出腫瘍の β hCG 染色
腫瘍細胞の一部に陽性細胞を認める。(×100)
→：陽性細胞

細胞の形態的差異は認められなかつた。

摘出腫瘍では腫瘍細胞は均一であつたが、培養細胞は小型細胞に混じつて大型で細胞質の広い細胞が認められた。小型細胞は摘出腫瘍の細胞と類似し、腫瘍細胞由来とみなされるが、大型細胞は小型細胞同様に hCG 陽性であり、位相差顕微鏡下で小型細胞から移行していくように観察されること、nude mouse 移植腫瘍に認められないことか

ら培養過程で小型細胞から移行した増殖能の低い細胞と考えられる。

embryonal carcinoma の細胞株はすでに樹立されているが、未分化胚細胞腫の細胞株樹立の報告はみられず、異種移植の報告もみられない。この理由は未分化胚細胞腫の悪性度が低く、増殖能も低いことが考えられる。樹立した KURATOU 株の population doubling time が約10日と他の癌細胞株と比較して遅いことや、nude mouse に生着するまで約4カ月と長期間を要したことからも他の悪性腫瘍に比べ、未分化胚細胞腫は本来増殖が緩徐な腫瘍であると推察される。

未分化胚細胞腫は遺伝的に決定した性とは関係なく発育する未分化性腺の段階にみられる primitive germ cell に類似していることから、germ cell の発育の段階で developmental arrest をきたしたと推定され、DNA 含有量から性染色体不在説が有力視されている²⁾。さらに、笹本ら³⁾は seminoma はほとんど3倍体を示し、性染色体は XYY を示すことから精原細胞の倍数化や融合により腫瘍化すると報告している。KURATOU 株は染色体分析の結果3倍体で、X染色体も

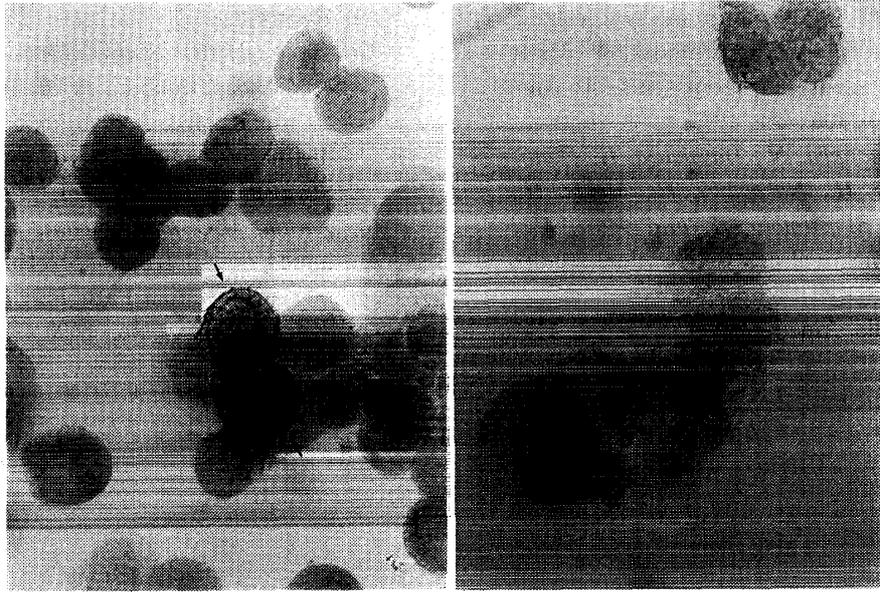


写真6 培養細胞のHLA-ABC抗原
HLA-ABCは一部の細胞で陽性を示した。(×200)
左:陽性像(→), 右:陰性コントロール

trisomyであつたことからいわゆる未分化胚細胞腫の発生母細胞と考えられる primitive germ cell より分化した段階の細胞の倍数化や融合によつて腫瘍化したと考えられる。言いかえると、KURATOU 株細胞のほとんどが hCG 陽性細胞であることから、hCG 産生未分化胚細胞腫細胞は primitive germ cell より分化した細胞が腫瘍化したと推測される。本間ら¹⁾は未分化胚細胞腫の HLA 抗原の分析で、腫瘍細胞には HLA-ABC, -DR 抗原共に陰性であつたと報告している。hCG 産生未分化胚細胞腫である KURATOU 株細胞の一部の細胞に HLA-ABC 抗原の表現をみた点も、この細胞が hCG を産生しない未分化胚細胞腫の細胞と異なる発生段階からの発生であるという所見の一つと考えられる。

hCG 産生未分化胚細胞腫由来の細胞株である KURATOU 株は trophoblast 以外の hCG 産生細胞や未分化胚細胞腫の研究に今後有用な細胞株になると考えられる。

染色体分析を行つていただいた SRL 社ならびに抗体を提供していただいた持田製薬に感謝いたします。

文 献

1. 本間 滋, 内山三枝子, 大桃幸夫, 渡辺重博, 笹

川 基, 金沢浩二, 竹内正七: 卵巣未分化胚細胞腫にみられるいわゆるリンパ球様細胞の免疫組織学的解析. 日産婦誌, 38: 2201, 1986.

2. 奥平吉雄, 松井義明, 澤田益臣, 岡田雅子: Dysgerminoma, Seminoma の微細構造—その機能形態に関する文献的考察—. 産婦の実際, 33: 1217, 1984.
3. 笹本喜代, 小沢信義, 高林俊文, 阿部祐也, 曾 宗仁, 及川直弘, 土岐利彦, 田勢 亨, 和田裕一, 矢嶋 聰: 未分化胚細胞腫の細胞遺伝学的検討. 産と婦, 53: 1154, 1986.
4. Hobson, B.M. and Baird, D.T.: Dysgerminoma of the ovary and gonadotropin excretion. J. Obstet. Gynaecol. Brit. Cwlth., 73: 131, 1966.
5. Kapp, D.S., Kohorn, E.I., Merino, M.J. and LiVolsi, V.A.: Pure dysgerminoma of the ovary with elevated serum human chorionic gonadotropin: Diagnostic and therapeutic considerations. Gynecol. Oncol., 20: 234, 1985.
6. Mullin, T.J. and Lanckerani, M.R.: Ovarian dysgerminoma: Immunocytochemical localization of human chorionic gonadotropin in the germinoma cell cytoplasm. Obstet. Gynecol., 68: 80s, 1986.
7. Pattilo, R.A., Gey, G.O., Delfs, E., Huang, W. Y., Hause, L., Garancis, J., Knoth, M., Amatruda, J., Bertino, J., Friesen, H.G. and

- Mattingly, R.F.* : The hormone-synthesizing trophoblastic cell in vitro : A model for cancer research and placental hormone synthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 196 : 288, 1971.
8. *Ueda, G., Hamanaka, N., Hayakawa, K., Tanizawa, O., Ichii, H., Nakagawa, H., Mieda, H., Furuyama, J., Matsumoto, K. and Mori, M.* : Clinical histochemical and biochemical studies of an ovarian dysgerminoma with trophoblasts and Leydig cells. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 114 : 748, 1972.
9. *Zaloudek, C.J., Tavassoli, F.A. and Norris, H. J.* : Dysgerminoma with syncytiotrophoblastic giant cells : A histologically and clinically distinctive subtype of dysgerminoma. *Am. J. Surg. Path.*, 5 : 362, 1981.
10. *Zarabi, M.C. and Rupani, M.* : Human chorionic gonadotropin-secreting pure dysgerminoma. *Human Pathology*, 15 : 589, 1984.
- (No. 6590 平1・4・11受付)
-