

## 絨毛癌培養細胞株の温度感受性に関する研究 —高温域における増殖能および形態について

北里大学医学部産婦人科学教室 (主任: 新井正夫教授)

下田 隆夫 蔵本 博行 新井 正夫

### A Study of Temperature Sensitivity of Choriocarcinoma Cells in vitro —Their Cell Proliferation and Morphology in Hyperthermic Environment

Takao SHIMODA, Hiroyuki KURAMOTO and Masao ARAI

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kitasato University, Kanagawa

(Director: Prof. Masao Arai)

**概要** この研究は人正常および腫瘍細胞の温度感受性に関する研究シリーズの一部として行なわれた。絨毛癌細胞の高温感受性の分析と、絨毛癌に対する温熱療法 (Hyperthermic therapy) の効果を考察するために、本研究のために設計製作された特殊な温度勾配培養装置を使用して、正常より高温域の各種温度環境を設定し、それぞれの温度における細胞の増殖能および形態学的変化について実験、考察を行なった。細胞は絨毛癌培養細胞株 GCH-nu より分離した GCH-nu-YS クローン細胞を用いた。培養法は開放系単層培養で、各種温度域で約 2 週間培養をつづけて増殖能および形態の変動を観察した。

その結果、このクローン細胞は 39.2°C までの温度域では対照 (37.0°C) と比較して増殖能の差はほとんどみられないが、39.5—39.6°C の温度域では増殖能に軽度の抑制がみとめられた。そして、39.9°C を超えると明らかな増殖抑制がみられ、さらに 40.4°C 以上の温度域になると細胞の増殖は全くみられず、むしろ細胞が破壊、死滅した。これら各種温度での培養結果からこの細胞の生存限界温度は 40.4—40.6°C 近辺にあること、また増殖限界温度は 40.1—40.2°C 近辺にあることが示唆された。癌細胞を温度感受性すなわち生存限界温度および増殖限界温度から分類する奥村分類法を適用すると、この絨毛癌細胞は腺癌細胞の性格に類似、分類されることが明らかになった。

また、形態学的には生存限界温度近辺では細胞質の増大、核周辺部の顆粒増加、奇形細胞 (Bizzare cell) の出現など細胞の著しい変性が観察された。

これらの高温処理による絨毛癌細胞の増殖態度、形態学的変化について考察がなされた。

**Synopsis** The possibility of hyperthermic therapy for choriocarcinoma was fundamentally analyzed in an in vitro study. The temperature sensitivity of choriocarcinoma cells designated GCH-nu-YS clone was examined using a severely controlled temperature gradient incubator (T.G.I.).

The cells were placed into an atmosphere at various temperatures (37.0–41.2°C) for about 2 weeks and the inhibitory effect on cell proliferation was chronologically investigated in addition to degenerative changes in cellular morphology.

When the temperature was not higher than 39.2°C the proliferation of YS clone was nearly the same as that of the cells cultured at 37.0°C. Proliferation at 39.5–39.6°C, however, was slightly inhibited. And when cultured at over 39.9°C, it was markedly inhibited. Above 40.4°C, cell proliferation was impossible, thus resulting in destruction of the cells. These data suggest that the temperature upper limit for viability (TLV) is approximately 40.4–40.6°C and the temperature upper limit for proliferation (TLP) is approximately 40.1–40.2°C. When Okumura's method of classification according to temperature sensitivity is applied, the choriocarcinoma cells may be regarded as having the characteristics of adenocarcinoma. Morphological findings for cells treated at TLV revealed enlargement of the cytoplasm, an increase in the number of perinuclear granules and the appearance of deformed cells such as bizzare cells.

**Key words:** Choriocarcinoma • Tissue culture • Temperature • Hyperthermia • Human cell

## 緒 言

正常細胞と悪性腫瘍細胞の温度感受性の差異を利用して、悪性腫瘍を高温によつて選択的に治療する云々ゆる温熱療法 (Hyperthermic therapy) が近年注目されている。一部の領域では既に臨床応用されているところもあり<sup>2)4)10)11)13)~17)26)</sup>、並行してこの療法の基礎的検討が生物学的、生化学的見地からアプローチされている。婦人科領域では Okumura et al.<sup>23)</sup> は子宮体内膜腺癌細胞株を用いて温度感受性を分析し、腺癌細胞が高温に高感受性であることを報告し、宇田川ら<sup>5)6)7)</sup> は子宮体内膜腺癌細胞株や子宮頸癌細胞株などを用いておのおの温度感受性について報告している。そして、これらの報告で温熱療法の臨床応用への可能性を示唆している。しかし、絨毛癌細胞の温度感受性についての詳細な報告は国内外で未だにない。我々は、厳密に温度制御された温度勾配培養装置 (Temperature Gradient Incubator ; T.G.I.) を用いて、純系クローンとして分離した絨毛癌細胞亜株 (GCH-nu-YS クローン) の温度感受性を主に増殖能および生存能の点から検討し、その生存限界温度および増殖限界温度を明確にしようと試み、さらに形態学的変化を位相差顕微鏡を用いて観察し、いくつかの結論を得たので報告する。

## 研究方法

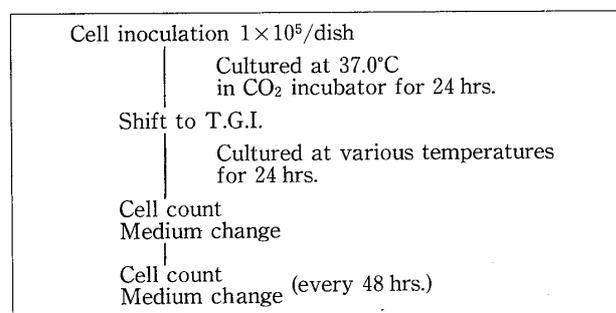
### 1. 材料

培養系で樹立された絨毛癌細胞株 GCH-nu (1975 蔵本ら<sup>3)</sup>) から1981年奥村法 (汙紙法) によつてクローンを分離、命名された亜株 GCH-nu-YS クローン (以下 YS クローンと略す) を用いた。この細胞の増殖および継代培養には合成培地 Eagle's Minimum Essential Medium (GIBCO) に10%新生牛血清 (中標津血清・三菱化成; 人正常細胞で検定されたもの) を添加して用いた。培地の最終 pH は NaHCO<sub>3</sub> 緩衝系により7.2に調整された。培養装置内は飽和湿度 5—10% CO<sub>2</sub> の混合空気を送入し、37.0°C で plastic dish (径35mm) を用い、培養は単層培養法で行なわれた。YS クローンの形態は親株 GCH-nu の特徴に類似し、単層培養では“はめ絵”状を示し、主に cytotrophoblast 型の細胞から成る。

### 2. 実験方法

図1に示される通り増殖曲線を得るために、細胞は plastic dish (径35mm) に  $1 \times 10^5$  個/2ml の濃度でうえこまれ、37.0°C で24時間培養され、細胞が dish 面に生着後、特殊な培養装置 (開放系温度勾配培養装置・Temperature Gradient Incubator ; T.G.I.・東洋製作所) へ移され各種温度条件で培養を続けられた。実験温度域は、予備実験で37.0—44.0°C の範囲をほぼ 1°C 間隔でスクリーニングし、細胞の生存限界、増殖限界に密接に関係すると考えられる温度域をしらべ、本実験では38.9°C から42.4°C までの温度域にしぼつた。この T.G.I. 装置での培養期間は温度記録計によつて温度の変動を管理したが、変化の誤差は  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  以下であつた。他の環境条件すなわちこの装置内の各培養室内の条件は98%以上の湿度、CO<sub>2</sub> ガス分圧などが厳密に管理された。培地の更新は、T.G.I. へ移動時および24—48時間毎に行なわれ、あらかじめ温度調整された培地で、培地全量交換で行なわれた。

図1



#### 1) 生細胞数の算定

生細胞数の算定は経時的に行ない、replicate culture で1つの温度条件について1回の sampling で少なくとも2個の dish の細胞数を算定した。そして、生細胞を死細胞と選別するために0.4%ニグロシン色素液を用い、生細胞数のみの数をビュルケル・チュルク型血球計算盤を用いて算定した。

#### 2) 増殖曲線の作成

経時的に算定された生細胞数を片対数グラフ上にプロットして増殖曲線とした。生細胞数の算定

は同一条件で複数の dish の sampling で行なつたので、片対数グラフ上のプロットは各 dish 内の細胞数の平均値を求めて決定した。

3) パーセントコントロール曲線の作成

対照 (37.0°C) と各種温度域での増殖能を比較するために、対照の生細胞数に対する各種温度域の生細胞数の割合を算出し、これをパーセントで表わして経時の変化をグラフ上にプロットした。

4) 形態学的観察

実験期間中の細胞の増殖にともなう形態学的変化を位相差顕微鏡を用いて観察し、写真撮影を行なつた。

研究成績

1. 細胞の増殖能および生存能について

各高温域の YS クローン細胞の増殖曲線を作成するために、37.0°Cでの培養時の増殖を対照として、他の温度域での経時的な細胞数の変化をしらべて増殖能の比較を行なつた(図2)。この図2に示される通り、39.2°Cまでの温度域では対照とほぼ同様の増殖が認められた。しかし、それ以上の高温域になると影響がはじめることが認められ

た。39.5—39.6°Cの温度域では3日目まで増殖曲線の立ち上がりの遅延がみられるが、以後次第に回復する。しかし、対照および39.0—39.2°Cに比較して増殖能の軽度の抑制が認められた。39.9—40.1°Cの温度域では増殖曲線の立ち上がりの遅延はさらに著明であり、経時的な観察ではかなりの増殖能の抑制が認められた。40.5°Cを越す温度域では細胞の増殖は最初から全く認められず、T.G.I.に移動後5日目で生細胞数は1,000個以下となつた。すなわち、99.5%が死滅した。その後、生細胞数はほぼ完全に0となり、長期間の観察でも耐性ないしは耐性らしい細胞すら出現しなかつた。41.0°C以上の温度では早ければ3日目、遅くとも5日目には生細胞数は0となつた。さらに詳しい検討を目的として40.4—40.6°Cの温度域を設定し、同様の実験を行なつた(図2×-----×)。この図に示される通り、生細胞数に多少の変動はあるものの、この温度域では細胞は増殖せず次第に減少して、11日目には87%が死滅した。

また、実験結果から対照の生細胞数を100%としたパーセントコントロール曲線を作成すると(図3)、39.5—39.6°Cの温度域では最低値44%まで、

図2 Growth curve of GCH-nu-YS clone at various temperatures

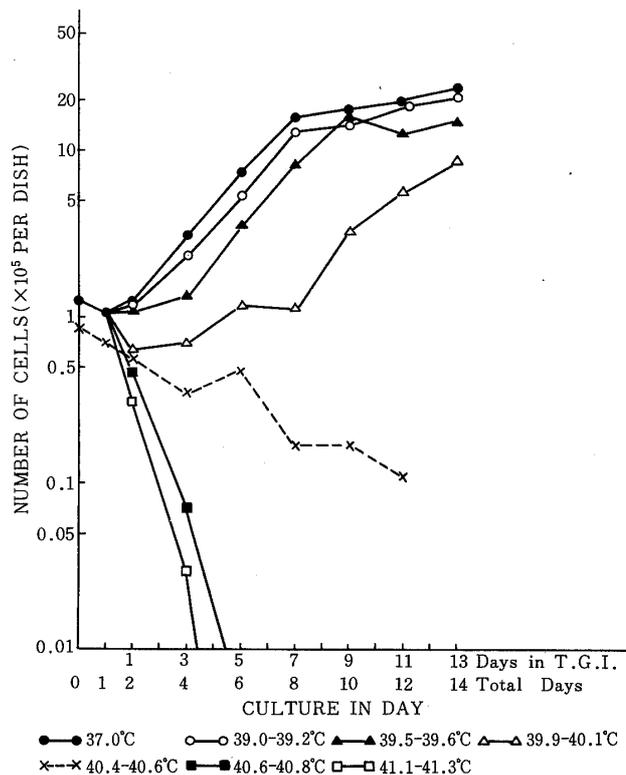
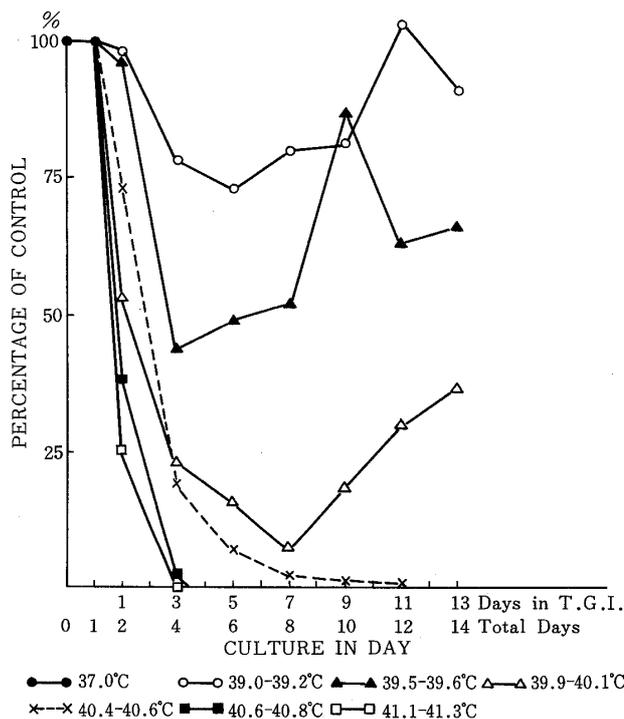


図3 Percentage of control at various temperatures



また39.9—40.1℃の温度域では最低値7.3%まで増殖能が低下することが明らかになった。

## 2. 形態学的変化について

T.G.I.へ移動後の細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡を用いて経時的に観察した(写真1—3)。増殖可能温度域で培養された細胞では、細胞個々には著明な変化や差異は認められなかったが、40.6—40.8℃で培養された細胞は、3日目で大部分が変性してdish面から剥脱し、生着しているものもその後の観察において同様に剥脱した。

40.4—40.6℃の温度域での細胞形態の変化を詳細にしらべると、実験終了までの観察において、dish面に生着している細胞では、細胞質の増大、核周辺部の顆粒増加、奇形細胞(Bizarre cell)の出現などが経時的に著明となつて行くことが明らかになった(写真4—9)。

## 考 案

悪性腫瘍の温熱療法は、19世紀後半の欧米でのいくつかの臨床報告に始まった<sup>11)</sup>。しかし、組織培養法を用いて悪性腫瘍細胞が正常細胞よりも温度感受性が高いことを示したのは1912年のLambertが最初である<sup>18)</sup>。彼は、ラットまたはマウスの肉腫細胞が正常の結合組織に比べて熱に対する抵抗性が小さいことを報告して、温熱療法の基礎的研究の先駆者となつた。以後、今日までに組織培養の技術的進歩もあつて温熱療法のメカニズムが細胞レベルで次第に解明されてきたが、従来の報告は実験動物細胞を用いたものがほとんどであり、しかも不十分な培養条件(たとえば温度設定、培地のpHなど)で行ない、研究成績も報告によつてさまざまであつた。また、人細胞の温度感受性の研究は極めて少なく、したがつて人癌の温熱療法の基礎実験としては不十分なものが大部分であつた。今回我々は、厳密に温度制御された特殊な温度勾配培養装置の開発によつて、正確な温度条件による細胞の増殖能と生存能を明らかにすることができた。さらに、従来報告のなかつた絨毛癌細胞の温度感受性について研究した。

奥村分類法<sup>19)</sup>によると、細胞の温度感受性には、増殖の限界点(増殖限界温度)すなわち細胞は増殖できないが生存できる温度と、生存の限界

点(生存限界温度)すなわち明らかに細胞が死滅する温度の2つがある。これら2つの限界点からみると、腺癌は他の癌に比べて温度感受性が高いことが特徴とされている。たとえば、子宮体内膜腺癌細胞株(SNG-M)は、子宮頸癌細胞株(SKG)よりも温度感受性が高い。奥村分類法は、従来の病理組織学的分類法とは別に、細胞のこのような温度感受性の特徴から腫瘍を分類するものである。

絨毛癌細胞株においては、図2に示される通り39.9℃を超えると明らかな増殖抑制がみられ、また40.6℃以上では明らかに生存限界温度を超えることを見出した。そして、40.4—40.6℃の温度域が本細胞の生存限界温度近辺であり、以上の結果を総合して40.1—40.2℃近辺に増殖限界温度が存在することを推定した。したがつて絨毛癌細胞の温度感受性に奥村分類法を適用すると、本細胞は温度感受性が高く腺癌型に分類することができた。高温による本細胞の増殖抑制のメカニズムについては、これからの研究によつて解明されると思われる。これまで他の悪性腫瘍細胞についての研究で、細胞呼吸の抑制、DNA・RNA合成の抑制、タンパク合成の抑制、あるいはライソゾーム活性上昇による細胞融解など種々の仮説が報告されているが<sup>6)10)12)19)~22)24)25)</sup>、本細胞の場合にはどの考察が適当であるのか未だ明らかではない。

形態学的には光顕レベルにおいては増殖可能温度域で個々の細胞には著明な変化はみられないが、生存限界温度近辺では細胞質の増大、核周辺部の顆粒増加、奇形細胞(Bizarre cell)の出現などが目立つた。このことは、高温環境下における細胞内のdrasticな変化を示唆しているものと思われる。これらのおのおの所見が、どのような変化の現われであるのか今後さらに詳しく検討して行きたい。

## 結 論

1. 絨毛癌細胞 GCH-nu-YS クローンを用いて、その温度感受性を主に増殖能および生存能の点から検討し、あわせて形態学的変化を観察した。

2. 本細胞は高温に感受性が高く、その生存限界温度は40.4—40.6℃近辺にあり、増殖限界温度は

40.1—40.2°C近辺にあることが判明した。

3. その鋭敏な温度感受性から本細胞は、奥村分類法を適用すると腺癌型に分類されると考えられた。

4. 形態学的観察において、生存限界温度近辺で細胞質の増大、核周辺部の顆粒増加、奇形細胞 (Bizzare cell) の出現などが著明になることが観察された。

稿を終るに臨み、御指導・御校閲を賜わった国立予防衛生研究所室長・奥村秀夫博士に深謝いたしますと共に、絶えざる御援助をいただきました国立予防衛生研究所山田堅一郎博士、東淑子研究生に心より感謝いたします。

#### 写真説明

写真1 GCH-nu-YS クローン, 37.0°C, 3日目。敷石状配列を示す。×109。

写真2 40.6—40.8°C, 3日目。大部分の細胞が変性剥脱する。×109。

写真3 40.6—40.8°C, 3日目。一部生着している細胞では増殖はしないが、細胞質の増大がみられる。×109。

写真4 40.4—40.6°C, 7日目。細胞質の増大。×109。

写真5 40.4—40.6°C, 7日目。細胞質の増大、核周辺部の顆粒増加。×109。

写真6 40.4—40.6°C, 7日目。核周辺部の顆粒増加。×109。

写真7 40.4—40.6°C, 7日目。樹枝状突起をもつた奇形細胞 (Bizzare cell) の出現。×109。

写真8 40.4—40.6°C, 11日目。例外的に辺縁に顆粒増加を伴った細胞。×109。

写真9 40.4—40.6°C, 11日目。核の周囲に放射状の構造をもつた細胞。×109。

#### 文 献

- 東 淑子, 奥村秀夫, 川端真人, 向井万起男: 人正常及び腫瘍細胞の温度感受性に関する研究, 第5報, 高温領域における各種癌細胞株の生物学的特性の変化. 日本癌学会総会記事(第39回), 151, 1980.
- 岸本 孝, 岡田清己, 滝本至得, 北島清彰, 熊谷振作, 新井律夫, 中村洋三, 広田米造, 清水伸一, 森田博人: 膀胱腫瘍に対する温水療法 (Hyperthermic Treatment) の研究, 第1報, 臨床的経験. 日泌尿会誌, 66: 485, 1975.
- 蔵本博行, 浜野美恵子, 鈴木光明: 現状と展望: 特に婦人性器癌の培養とホルモン機能について. 組織培養, 6: 463, 1980.
- 野澤志朗, 宇田川康博, 栗原操寿: 悪性腫瘍治療における hyperthermia の意義(その1)—その現状と将来性—. 臨婦産, 34: 333, 1980.
- 野澤志朗, 宇田川康博, 栗原操寿: 悪性腫瘍治療における hyperthermia の意義(その2)—その現状と将来性—. 臨婦産, 34: 417, 1980.
- 奥村秀夫, 東 淑子, 田島知行: 人正常及び腫瘍細胞の温度感受性に関する研究, 第6報, 高温領域における各種癌細胞の生存能と微細構造の変化. 日本癌学会総会記事(第39回), 185, 1980.
- 宇田川康博, 野澤志朗, 塚崎克己, 太田博明, 筒井章夫, 栗原操寿, 奥村秀夫: 高温条件下(Hyperthermia) に於ける婦人科領域悪性腫瘍株細胞の温度感受性の特徴. 日本癌学会総会記事(第39回), 185, 1980.
- 宇田川康博: ヒト子宮体内膜腺癌株細胞の温度感受性に関する研究. 日産婦誌, 33: 1235, 1981.
- Azuma, Y., Okumura, H., Shimoda, T. and Satoh, J.: Viability and proliferation of normal and malignant human cells in hyperthermic culture conditions. Proceedings, 13th International Cancer Congress (Seattle, Washington U. S.A.).
- Cavaliere, R., Ciocatto, E.C., Giovanella, B.C., Heidelberger, C., Johnson, R.O., Margottini, M., Mondovi, B., Moricca, G. and Rossi-Fanelli, A.: Selective heat sensitivity of cancer cells. Cancer, 20: 1351, 1967.
- Coley, W.B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: With a report of ten original cases. Am. J. Med. Sci., 105: 487, 1893.
- Dickson, J.A. and Shah, D.M.: The effects of hyperthermia (42°C) on the biochemistry and growth of a malignant cell line. Eur. J. Cancer, 8: 561, 1972.
- Field, S. B. and Bleehen, N.M.: Hyperthermia in the treatment of cancer. Cancer Treat. Rev., 6: 63, 1979.
- Hahn, G.M.: Potential for therapy of drugs and hyperthermia. Cancer Res., 39: 2264, 1979.
- Hall, R.R., Schade, R.O.K. and Swinney, J.: Effects of hyperthermia on bladder cancer. Brit. Med. J., 15: 593, 1974.
- Hartman, J.T. and Crile, G. Jr.: Heat treatment of osteogenic sarcoma—Report of five cases. Clin. Orthop., 61: 269, 1968.
- Henderson, M.A. and Pettigrew, R.T.: Induction of controlled hyperthermia in treatment of cancer. Lancet, 19: 1275, 1971.
- Lambert, R.A.: Demonstration of the greater susceptibility to heat of sarcoma cells an

- compared with actively proliferating connective-tissue cells. *JAMA.*, 59 : 2147, 1912.
19. *Levine, E.M. and Robbins, E.B.* : Differential temperature sensitivity of normal and cancer cells in culture. *J. Cell. Physiol.*, 76 : 373, 1970.
  20. *Love, R., Soriano, R.Z. and Walsh, R.J.* : Effect of hyperthermia on normal and neoplastic cells in vitro. *Cancer Res.*, 30 : 1525, 1970.
  21. *Mondovi, B., Strom, R., Rotilio, G., Agro', A. F., Cavaliere, R. and Fanelli, A.R.* : The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. I. Studies on cellular respiration. *Eur. J. Cancer*, 5 : 129, 1969.
  22. *Mondovi, B., Agro', A.F., Rotilio, G., Strom, R., Moricca, G. and Fanelli, A.R.* : The biochemical mechanism of selective heat sensitivity of cancer cells. II. Studies on nucleic acids and protein synthesis. *Eur. J. Cancer*, 5 : 137, 1969.
  23. *Okumura, H., Udagawa, Y., Yamada, K., Tsukasaki, K., Azuma, Y. and Nozawa, S.* : Effect of temperature on the proliferation and viability of normal and malignant human cells in culture. *Proc. Japan Acad.*, 55. Ser. B : 135, 1979.
  24. *Overgaard, J.* : Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo. A review and a hypothesis. *Cancer*, 39 : 2637, 1977.
  25. *Overgaard, J. and Poulsen, H.S.* : Effect of hyperthermia and environmental acidity on the proteolytic activity in murine ascites tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58 : 1159, 1977.
  26. *Stehlin, J.S.Jr., Giovanella, B.C., de Ipolyi, P.D., Muenz, L.R. and Anderson, R.F.* : Results of hyperthermic perfusion for melanoma of the extremities. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 140 : 339, 1975.

(No. 5194 昭57・11・9受付)

下田他論文附図

