

培養甲状腺癌細胞への制癌剤の影響

久米田 茂 喜

信州大学医学部第1解剖学教室

(主任: 永田 哲士教授)

Effects of Antitumor Drugs on Thyroid Carcinoma Cells in Primary Culture

Shigeyoshi KUMEDA

Department of Anatomy and Cell Biology,

Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Tetsuji NAGATA)

Tissue samples from 18 cases of thyroid tumors and normal thyroid glands obtained by surgical operation and autopsy from patients who were clinically diagnosed as having thyroid neoplasm were cut in pieces and placed as explants in TD-15 flasks and incubated in Eagle's MEM supplemented with 10 % calf serum at 37° C. Other small tissues were processed through routine histologic procedures and served for histopathological diagnosis. Among 16 cases of thyroid carcinoma, 12 produced a well-developed monolayer culture. 7-13 days after the initiation of culture, the cultured cells were exposed to adriamycin (0.2, 2, 10 $\mu\text{g/ml}$), mitomycin C (0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/ml}$) or 5 fluorouracil (1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$) for 2, 6 or 24 hours. The number of cultured cells was calculated by the cell density in a definite area and the outgrowth area on each phase-contrast photomicrograph. The relative growth rate was calculated on the basis of the cell numbers at the initiation of drug exposure.

In well-differentiated thyroid carcinoma, the growth of cancerous cells was slow and was inhibited slightly by adriamycin. In anaplastic carcinoma, the growth of cancerous cells was rapid and was extremely inhibited by adriamycin. This method seemed to be a model closer to the *in vivo* situation for the evaluation of drug sensitivity. *Shinshu Med. J.*, 39 : 233—251, 1991

(Received for publication October 25, 1990)

Key words: thyroid carcinoma cell, primary culture, antitumor drug

甲状腺癌細胞, 初代培養, 制癌剤

I 結 言

甲状腺癌に対する化学療法は、手術あるいは放射線療法に比し十分な検討がなされておらず、臨床的には、わずかに未分化癌、扁平上皮癌および悪性リンパ腫に対して、手術後あるいは単独で化学療法が行われているにすぎない。甲状腺癌の大部分を占める分化癌は発育が遅く、現在のところ手術および内照射が治療の主

体となっており、化学療法は十分行われていない¹⁾。著者は、甲状腺癌の組織型による制癌剤の効果の相違を知る目的で、初代培養された甲状腺癌細胞に制癌剤を接触させて、増殖抑制効果について検討した。制癌剤感受性試験には、dye exclusion method, 酵素活性を利用する方法、組織培養による方法ならびに isotope 取り込みによる方法などがあり²⁾、現在でも様々な工夫が続けられているが、いまだ完成されたものは

ないのが現状である。*In vitro*での試験結果が、臨床での成績と一致するであろうとの前提がある一方、必ずしも一致しないという報告³⁾もみられる。著者は、より *in vivo*の状態に近いモデルとして explant 法により初代培養された甲状腺癌細胞を用いた。この方法は、樹立された細胞系を用いたモデルと異なり、癌細胞以外の細胞すなわちおもに線維芽細胞の混入があり単純な計測が困難となる。しかし、本来 *in vivo*での癌の存在は、間質を含めた形で正常細胞のなかで浸潤増殖を示すものであり、*in vivo*により近いモデルとしては理想的であると考えられる。接触させた制癌剤は、Adriamycin, Mitomycin C および Fluorouracil で、これらの制癌剤による甲状腺癌細胞の増殖抑制を組織型別に検討した。実験成績の初期の一部はすでに報告した⁴⁾。今回は症例数を追加して成績を詳細に解析した結果を報告する。

II 材料と方法

A 材料

甲状腺癌手術例12例および剖検例3例の甲状腺癌組織ならびに癌性胸膜炎を併発した末期甲状腺癌患者1例の胸水を実験に用いた。また良性腺腫および腺腫様甲状腺腫それぞれ1例を比較のために用いた。対照として7例の甲状腺癌の手術時に癌組織から十分離れた正常甲状腺組織を採取して実験に用いた。今回の研究対象とした18例の年齢は21歳から86歳までで、性別および甲状腺原発腫瘍の組織像は Table 1 に示したごとくである。

B 培養

採取した組織片を Hanks 液 (penicillin 100U/ml, streptomycin 100 μ g/ml 含有) 中でメスを用いて 1mm 四方角以下の大きさに細切し、この小組織片を短冊型のカバーガラス上に 1% fibrinogen と thrombin で接着させた後 TD 型培養管に入れ、37°C の恒温器の中で静置培養した。1枚の短冊型カバーガラス (18mm \times 36mm, 厚さ No. 1, 松浪硝子, 大阪) 上には小組織片を 5 個ずつ均等間隔で接着させ、1本の TD 管にカバーガラス 1 枚ずつを入れて底に沈め、培

Table 1 List of patients and results of culture

Cases		Age	Sex	Histology	Success in Culture (Period of Culture (days))	Treated Drugs
No	Initial					
1	K. O.	70	f	follicular ca	+	ADM
2	K. F.	71	m	papillary ca	+	ADM
3	K. N.	48	f	papillary ca	+	ADM
4	K. U.	56	f	follicular ca (trabecular ca)	+	ADM
5	K. T.	21	f	papillary ca	+	ADM, MMC
6	K. M.	67	f	anaplastic ca	+	ADM, MMC, 5-FU
10	F. K.	76	f	follicular ca	+	ADM, MMC, 5-FU
11	S. M.	49	f	papillary ca	+	ADM, MMC, 5-FU
12	F. N.	46	f	papillary ca	+	MMC, 5-FU
13	K. M.	69	f	papillary ca	+	ADM, MMC, 5-FU
14	K. M.	69	f	papillary ca	+	ADM, MMC, 5-FU
16	S. O.	86	f	anaplastic ca	+	ADM, MMC, 5-FU
7	T. H.	71	f	anaplastic ca*	—	
8	K. T.	68	f	anaplastic ca*	—	
9	H. K.	67	f	anaplastic ca**	—	
15	K. O.	64	f	anaplastic ca*	—	
17	F. M.	56	f	adenomatous goiter	+	
18	J. I.	56	m	colloid adenoma	+	

*: autopsy material, + : successful

** : pleural effusion, — : unsuccessful

養液 2ml を静かに加えて培養した。制癌剤の接触を考
え、1 例につき 10~30 本の TD 管を同時に培養し、正
常甲状腺組織が得られた場合はさらに正常組織を
10~30 本の TD 管で培養した。培養液の交換は、増殖
の程度と培養液の pH の低下に伴う色調の変化をみな
がら、平均 4~5 日ごとに行った。

C 培養液

Eagle の MEM 液を使用した。Eagle の MEM は日
水製薬製粉末培地を蒸留水に溶解し、ミリポアフィル
ター (PHWP 14250) で濾過滅菌後、10% 仔牛血清
(GIBCO, USA) を加え、10% NaHCO₃ 液を使用し
て pH を 7.4 に調節した。感染防止のため抗生物質と
して penicillin (100U/ml) と streptomycin (100μg/
ml) を添加した。

D 形態学的観察

定期的に毎週 2 回倒立位相差顕微鏡 (ニコン MD
型, DDL 位相差) で小組織片 (explant) 周辺の増殖
帯の観察を行った。位相差顕微鏡像で criss-cross し
た配列を示すもの、pile-up の認められるものを癌細胞
の示標⁹⁾とし、これらのまったく認められないものは
除外した。癌細胞の増殖が確認されたものについて
は、explant 周辺を顕微鏡写真撮影装置 (ニコン
AFM) と白黒フィルム (富士ミニコピー) を用い、
位相差顕微鏡写真に撮影して記録した。制癌剤接触実
験を行ったものについては、接触前、接触後 1~3 日
後、1 週間後、3 週間後を目安とし、同じ部位を位相
差顕微鏡に繰り返して撮影した後、引き伸ばし写真上
で形態計測を行って解析した。

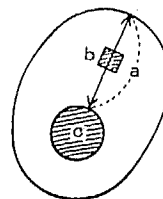
E 制癌剤接触法

癌細胞の増殖が認められたものに対し、培養 7~13
日後に制癌剤を接触させた。実験に用いた制癌剤は
Adriamycin (協和 酸 酵, 以下 ADM と略記),
Mitomycin C (三共, 以下 MMC) および Fluorour-
acil (協和 酸 酵, 以下 5-FU) の 3 種類で、上述した
培養液に溶解して使用した。濃度設定は、臨床上の体

重当たりの常用量を基準として中濃度を設定し、その
10 倍濃度を高濃度とし、1/10 倍濃度を低濃度としたが、
予備実験より ADM 高濃度は 5 倍濃度とした。したが
って、濃度は ADM を低濃度 0.2μg/ml とし、中濃度
2μg/ml, 高濃度 10μg/ml とし、MMC を低濃度 0.
01μg/ml, 中濃度 0.1μg/ml, 高濃度 1μg/ml とし、5
-FU は低濃度 1μg/ml, 中濃度 10μg/ml, 高濃度
100μg/ml とした。接触時間は 2 時間を原則とし、一
部については 6 時間および 24 時間接触群を設けた。い
ずれの実験群も接触終了後は制癌剤を含まない培養液
に交換して培養を継続して効果を観察した。

F 効果判定法

培養細胞に制癌剤を接触させた後の効果の判定には、
explant 周辺を位相差顕微鏡写真に撮影し、引き伸ば
し写真上で形態計測を行い、増殖帯の面積と細胞密度
を求めて細胞数を算出し、制癌剤接触直前の細胞数を
基準とし、増減率 (%) で比較した。実施方法は、
explant 周辺の増殖帯のうち最大の増殖を示す領域で
その増殖帯の中を測定し、これを a とし、その中間位
で細胞密度を測定し、これを b とすると、増殖帯の面
積を πa^2 として計算し、撮影倍率および引き伸ばし倍
率を一定とした場合の定数を k とすると、細胞数は



a: maximum length of cell growth zone
b: cell density
c: explant
cell count = $k\pi a^2 b$

Fig. 1 Procedure for cell count

Table 2 Correlation between cell count by calculation and real cell count

cell count by calculation	9	60	101	193	228	232	512	658	869	1051
real cell count	11	54	120	181	232	248	450	710	693	897
error (%)	-18	+11	-8	+7	-2	-6	+14	-7	+25	+17
the mean error : $11.5 \pm 6.5\%$										

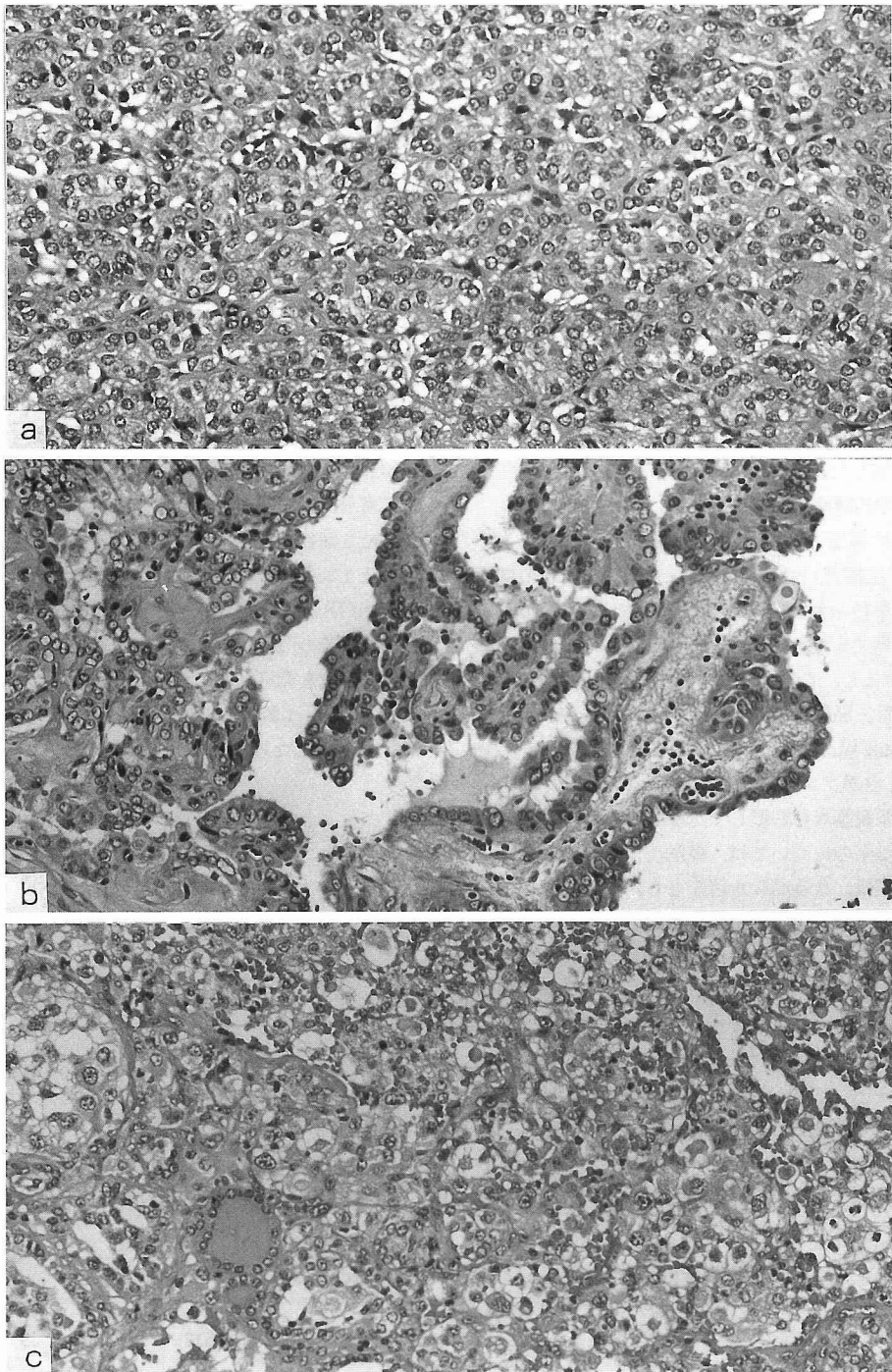


Fig. 2 Photomicrographs of tissue sections prepared from thyroid carcinoma before tissue culture, H E stain, $\times 200$

a : follicular carcinoma (Case 10)

b : papillary carcinoma (Case 5)

c : anaplastic carcinoma (Case 6)

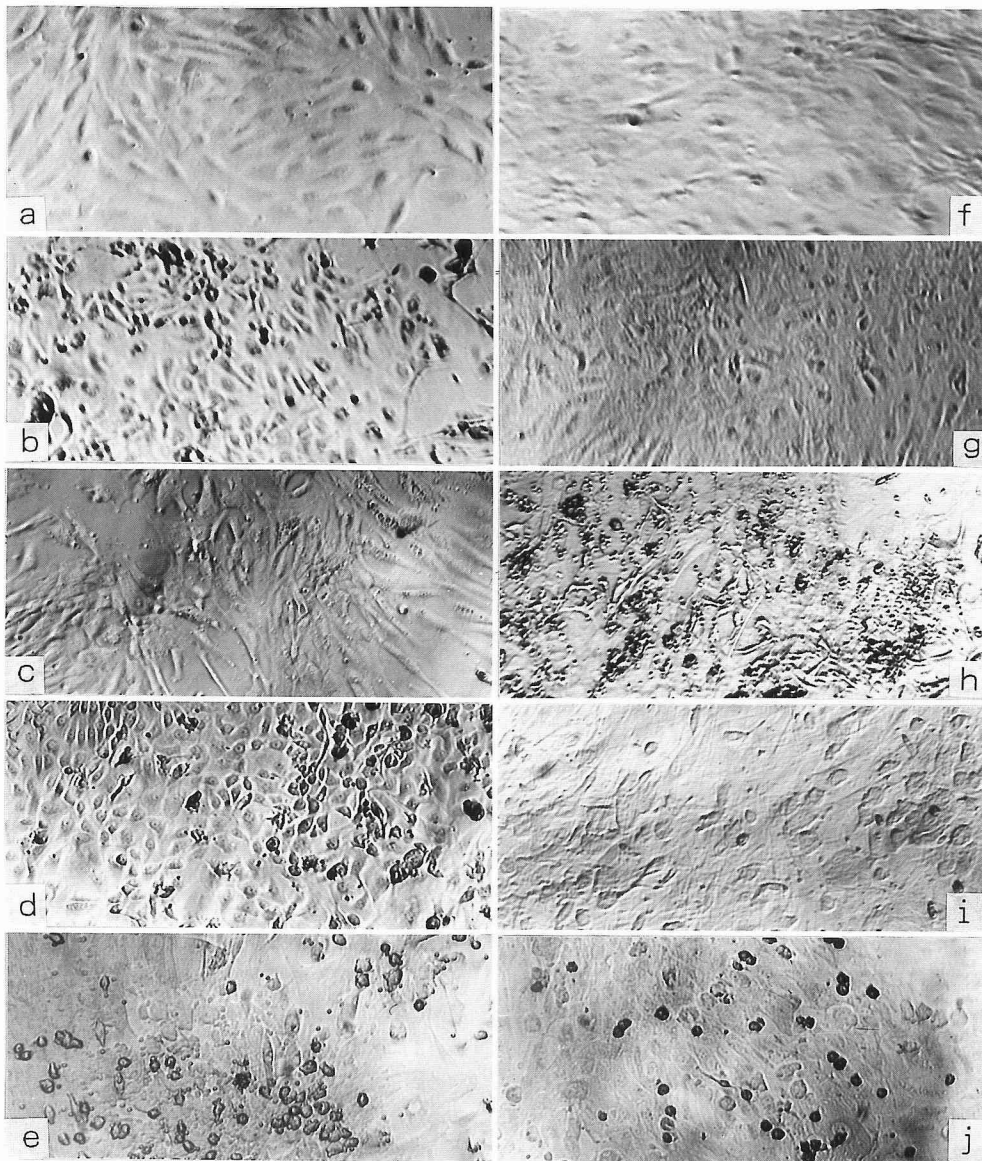


Fig. 3 Phase contrast photomicrographs of cultured cells from respective types of thyroid tumors and normal thyroid, $\times 100$

Continuous cell growth was seen on normal thyroid gland and benign tumors (a, f, g). Scattered cell growth was observed on carcinoma (b, c, d, e). Degeneration can clearly be seen (h).

- a : normal thyroid (Case 5, 10 days after the initiation of culture)
- b : follicular carcinoma (Case 10, 8 days after the initiation of culture)
- c : follicular (trabecular) carcinoma (Case 4, 8 days after the initiation of culture)
- d : papillary carcinoma (Case 5, 9 days after the initiation of culture)
- e : anaplastic carcinoma (Case 6, 9 days after the initiation of culture)
- f : adenomatous goiter (Case 17, 14 days after the initiation of culture)
- g : colloid adenoma (Case 18, 12 days after the initiation of culture)
- h : anaplastic carcinoma (Case 6, 2 days after exposure to ADM $0.2\mu\text{g/ml}$ 6hr)
- i : anaplastic carcinoma (Case 6, 7 days after exposure to MMC $0.1\mu\text{g/ml}$ 6hr)
- j : anaplastic carcinoma (Case 6, 7 days after exposure to 5-FU $10\mu\text{g/ml}$ 6hr)

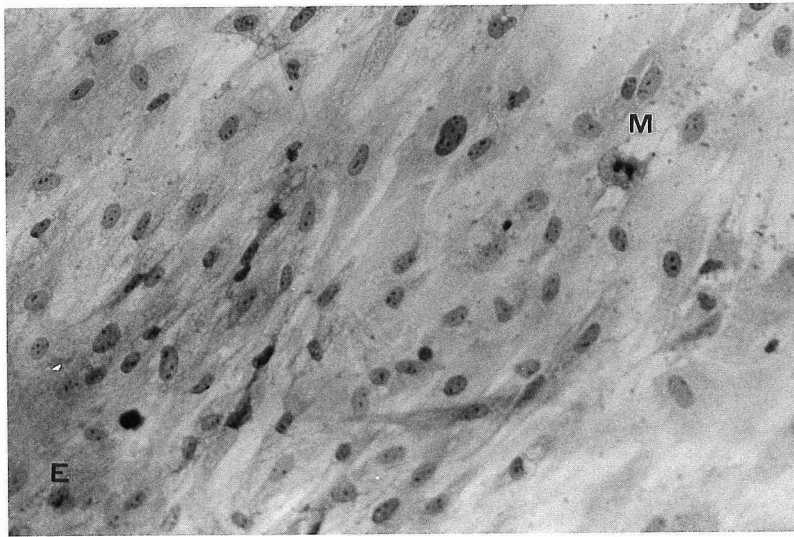


Fig. 4 Photomicrograph of cultured cells from anaplastic carcinoma (Case 6, 8 days after the initiation), Giemsa stain, $\times 200$
E: explant M: mitosis

$k\pi a^2b$ で表される (Fig. 1)。この数値は実際に総細胞数を数えた場合と大体一致した (Table 2) ので、以後この方法により細胞数を算出した。

培養に用いた組織の残りの一部は10%ホルマリン固定、パラフィン包埋を行い、薄切してスライドグラスに載せ、パラフィン切片を脱パラし、ヘマトキシリン・エオジン染色後、病理組織検査を行って培養結果と比較した。

培養に成功した場合の TD 管の一部については、短冊型カバーグラスをとりだし、メタノール固定をした後、Giemsa 染色して培養細胞の観察を行った。

III 結 果

A 培養材料の病理組織学的診断

組織培養を試みた18例の病理組織学的診断は、甲状腺分化癌10例 (濾胞癌3例、乳頭癌7例)、未分化癌6例、腺腫様甲状腺腫1例およびコロイド腺腫1例であった。濾胞癌、乳頭癌および未分化癌の代表例を Fig. 2 に示す。

B 培養結果

組織培養を試みた18例中、初代培養に成功した症例は14例で、その内訳は甲状腺分化癌10例、未分化癌2例、腺腫様甲状腺腫1例およびコロイド腺腫1例であった。培養できなかった未分化癌の4例は、死後に得られた組織材料3例と胸水中の細胞を集めた1例であ

った (Table 1)。おのおのの癌ならびに正常甲状腺組織は、それぞれ生体内での条件の相違ならびに培養条件に対する適応性の相違、さらには制癌剤に対する感受性の相違があり、その培養結果は多様であった。しかし、正常甲状腺および良性腫瘍では連続的に数石状に増殖し、甲状腺癌では非連続性、散布性に出現する傾向がみられた。正常甲状腺、濾胞癌、索状癌、乳頭癌、未分化癌、腺腫様甲状腺腫およびコロイド腺腫 (Plummer 病) の培養開始直後の培養細胞と ADM, MMC および 5-FU 接触後の変化の位相差顕微鏡像を Fig. 3 に示す。培養開始後8日目の未分化癌の培養細胞の固定標本の顕微鏡像を Fig. 4 に示す。Explant 周辺の細胞の中には分裂期の細胞像が認められた。

C 制癌剤の影響

初代培養に成功し、制癌剤接触実験を行った12例中、症例4～6, 10～14, 16について、培養生細胞の増減率 (%) を経時的に示したものが Fig. 5—13 である。以下制癌剤の影響について概説する。

1 正常甲状腺組織 (Fig. 5, 6, 8—12)

正常甲状腺組織では、培養開始後2～3日頃より explant 周囲に増殖帯を認め、10日頃には数百～数千個の単層細胞帯が認められた (Fig. 3a)。その後徐々に増殖傾向を認めたが、1ヵ月頃には次第に線維芽細胞が主体となり、その比率は時間の経過とともに増加した。培養7～13日目に制癌剤を接触させたが、

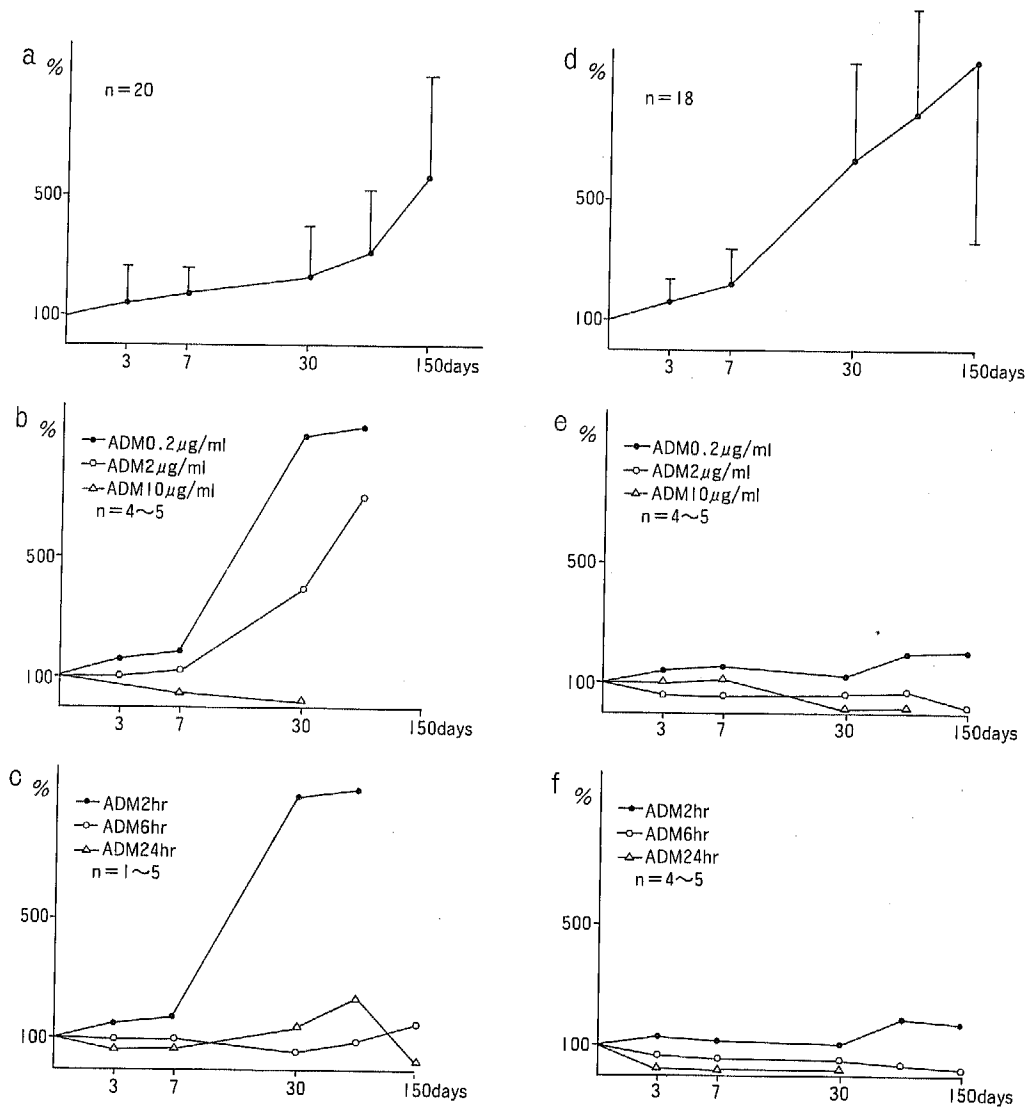


Fig. 5 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and follicular (trabecular) carcinoma (Case 4) after exposure to ADM

a : normal thyroid

b : normal thyroid after exposure to ADM for 2hr

c : normal thyroid after exposure to ADM 0.2 μg/ml

d : trabecular carcinoma

e : trabecular carcinoma after exposure to ADM for 2hr

f : trabecular carcinoma after exposure to ADM 0.2 μg/ml

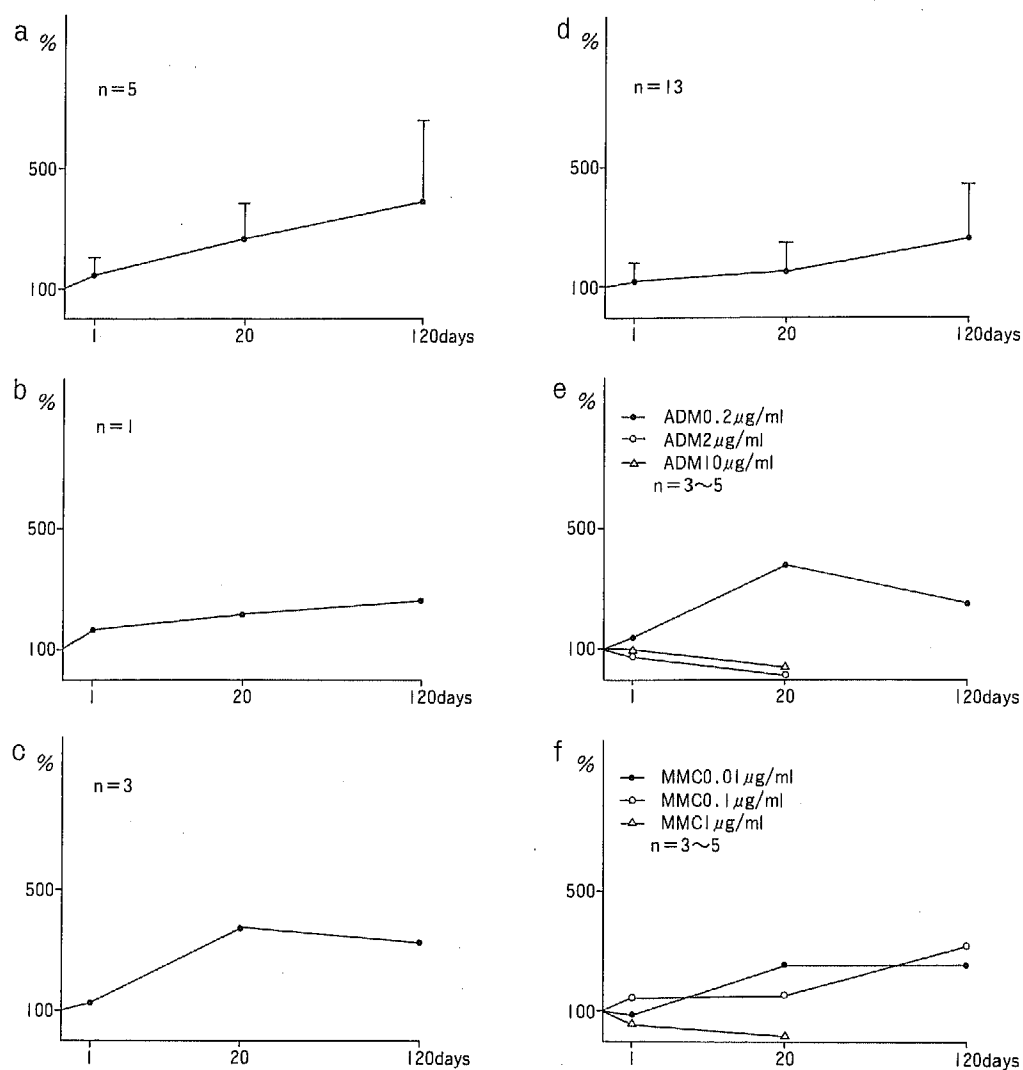


Fig. 6 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and papillary carcinoma (Case 5) after exposure to ADM and MMC

a : normal thyroid

b : normal thyroid after exposure to ADM 2 μ g/ml for 2hr

c : normal thyroid after exposure to MMC 0.1 μ g/ml for 2hr

d : papillary carcinoma

e : papillary carcinoma after exposure to ADM for 2hr

f : papillary carcinoma after exposure to MMC for 2hr

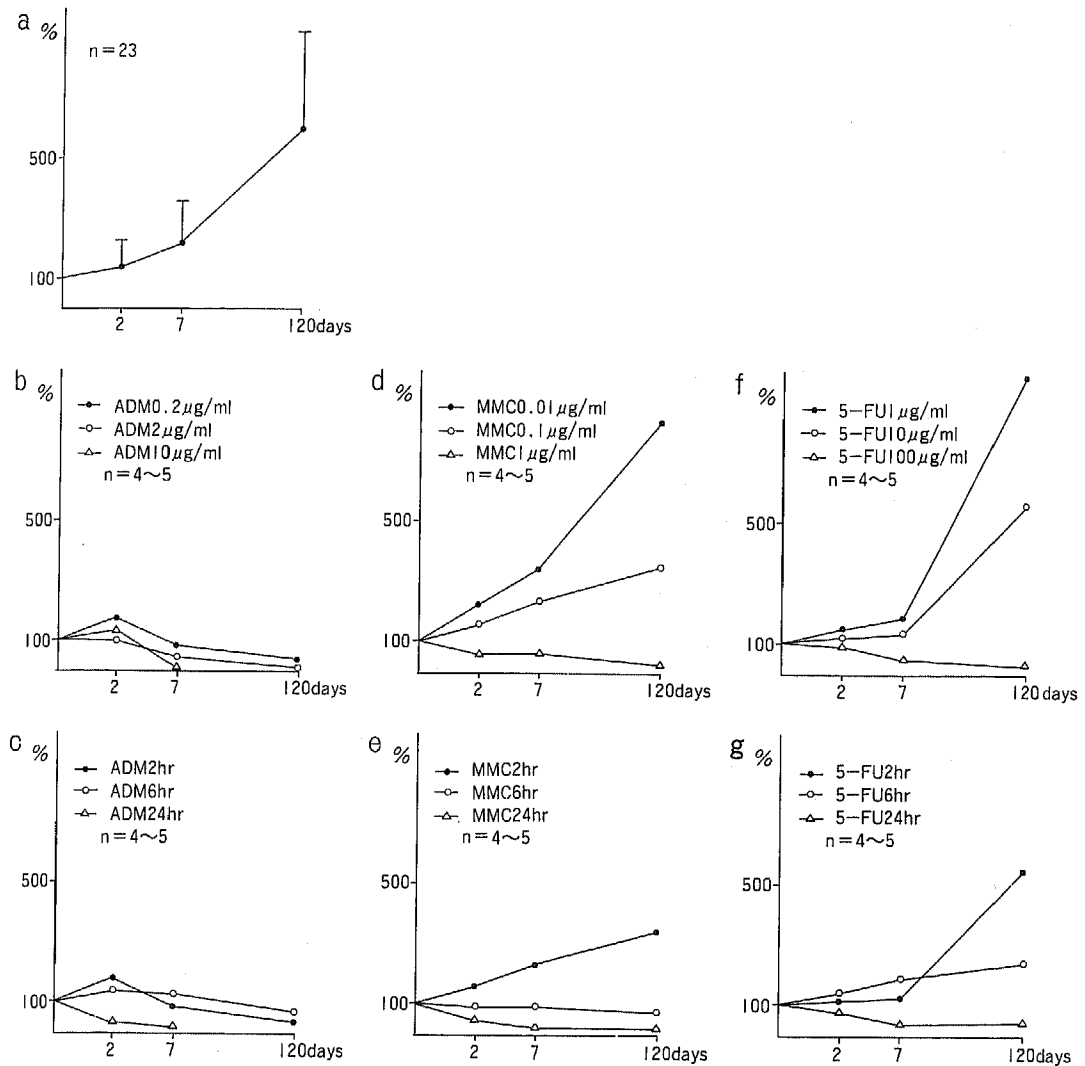


Fig. 7 Transitional curves of average cell counts in cultured anaplastic carcinoma (Case 6) after exposure to ADM, MMC and 5-FU

a : anaplastic carcinoma

b : anaplastic carcinoma after exposure to ADM for 2hr

c : anaplastic carcinoma after exposure to ADM 0.2 μ g/ml

d : anaplastic carcinoma after exposure to MMC for 2hr

e : anaplastic carcinoma after exposure to MMC 0.1 μ g/ml

f : anaplastic carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr

g : anaplastic carcinoma after exposure to 5-FU 10 μ g/ml

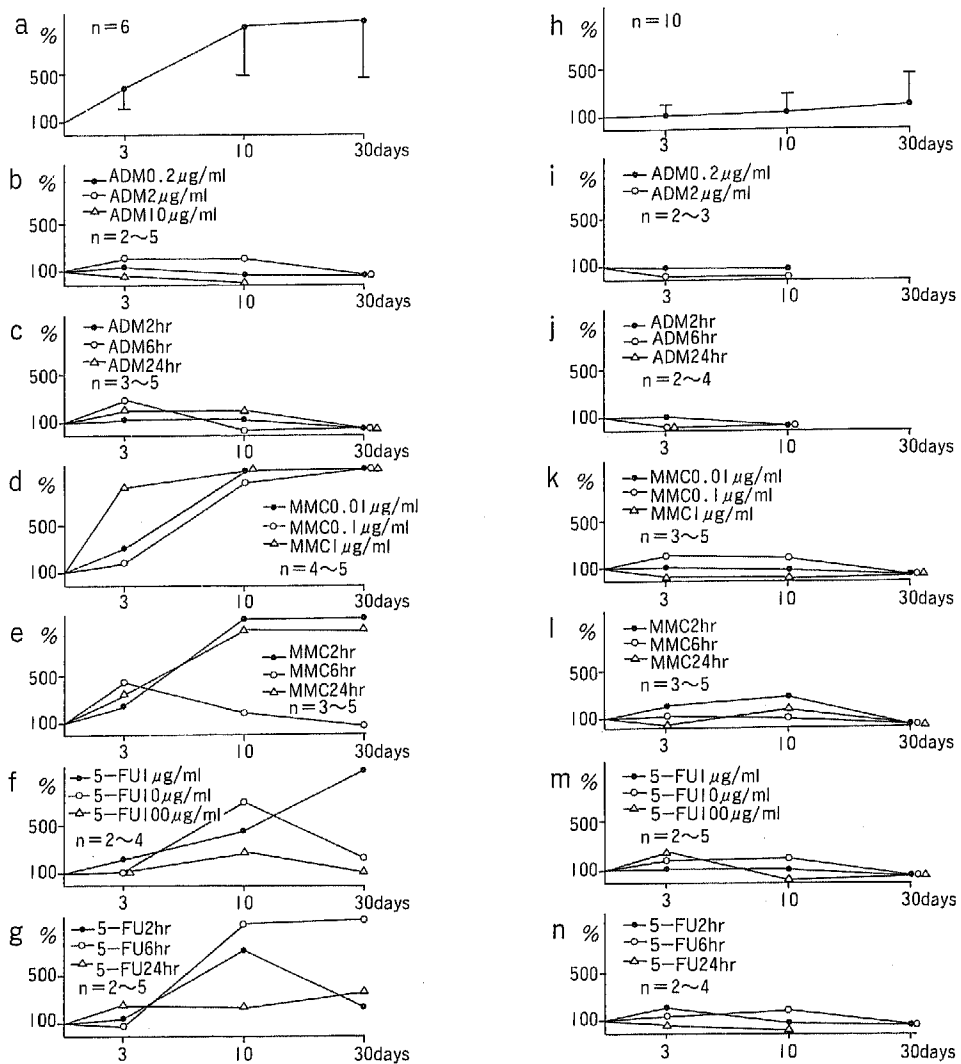


Fig. 8 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and follicular carcinoma (Case 10) after exposure to ADM, MMC and 5-FU

a : normal thyroid

b : normal thyroid after exposure to ADM for 2hr

c : normal thyroid after exposure to ADM 0.2 $\mu\text{g/ml}$

d : normal thyroid after exposure to MMC for 2hr

e : normal thyroid after exposure to MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$

f : normal thyroid after exposure to 5-FU for 2hr

g : normal thyroid after exposure to 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$

h : follicular carcinoma

i : follicular carcinoma after exposure to ADM for 2hr

j : follicular carcinoma after exposure to ADM 0.2 $\mu\text{g/ml}$

k : follicular carcinoma after exposure to MMC for 2hr

l : follicular carcinoma after exposure to MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$

m : follicular carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr

n : follicular carcinoma after exposure to 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$

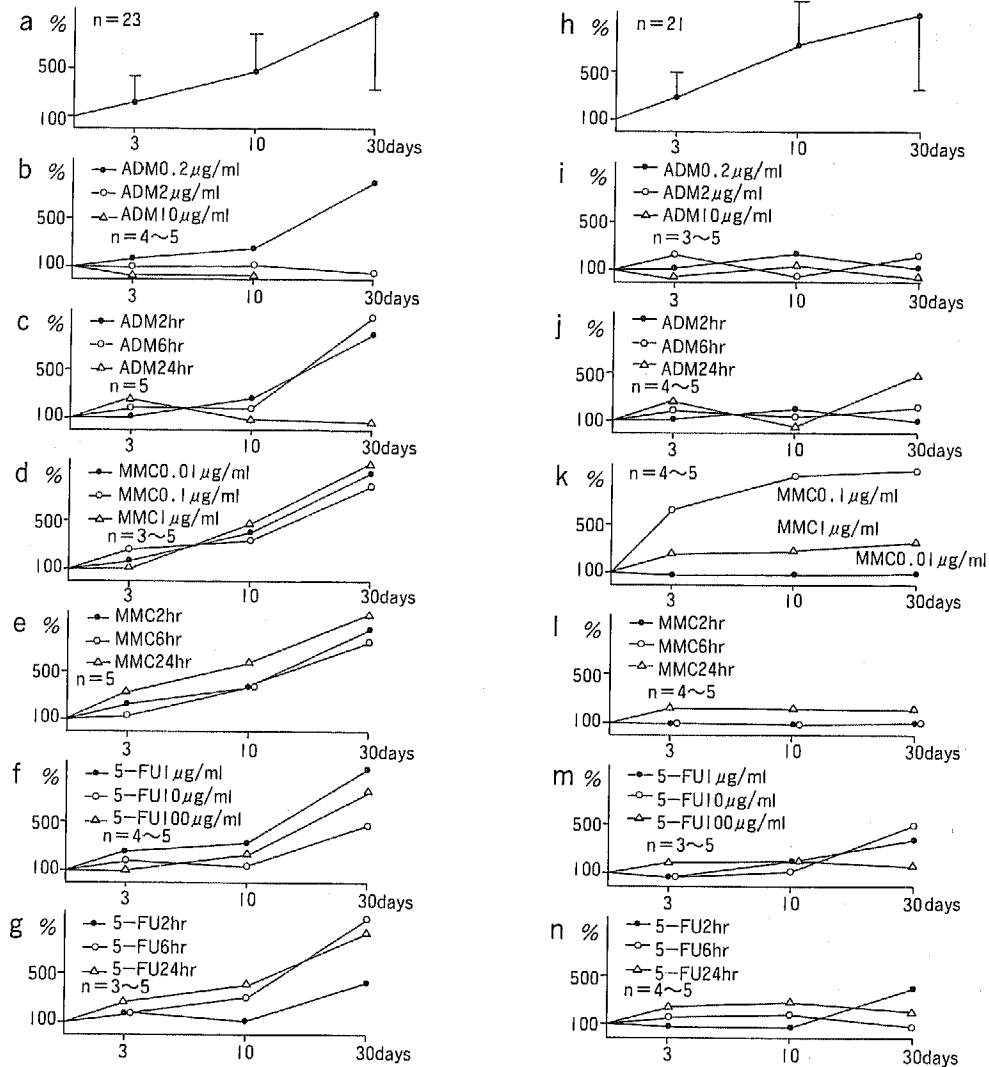


Fig. 9 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and papillary carcinoma (Case 11) after exposure to ADM, MMC and 5-FU

- a : normal thyroid
- b : normal thyroid after exposure to ADM for 2hr
- c : normal thyroid after exposure to ADM 0.2 μ g/ml
- d : normal thyroid after exposure to MMC for 2hr
- e : normal thyroid after exposure to MMC 0.1 μ g/ml
- f : normal thyroid after exposure to 5-FU for 2hr
- g : normal thyroid after exposure to 5-FU 10 μ g/ml
- h : papillary carcinoma
- i : papillary carcinoma after exposure to ADM for 2hr
- j : papillary carcinoma after exposure to ADM 0.2 μ g/ml
- k : papillary carcinoma after exposure to MMC for 2hr
- l : papillary carcinoma after exposure to MMC 0.1 μ g/ml
- m : papillary carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr
- n : papillary carcinoma after exposure to 5-FU 10 μ g/ml

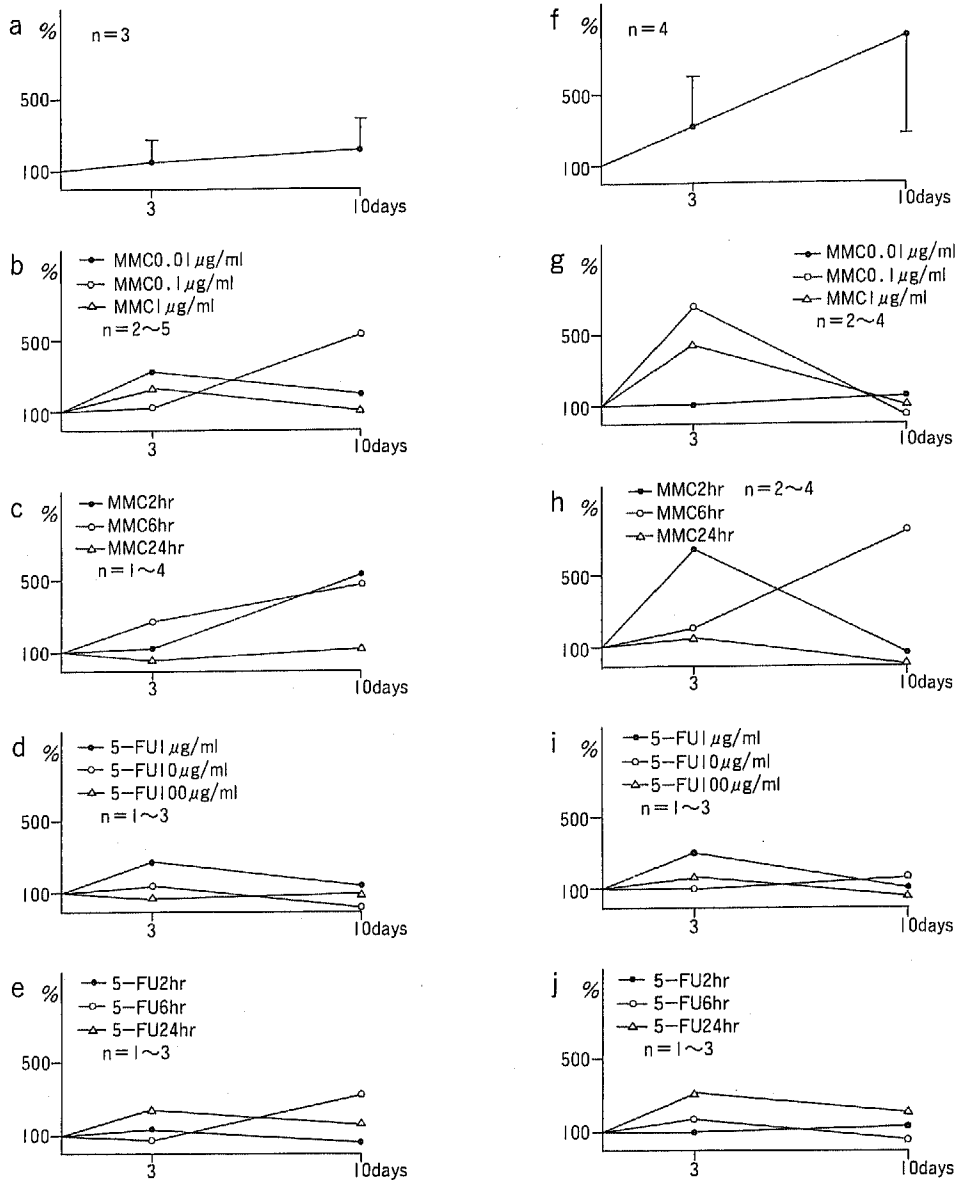


Fig. 10 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and papillary carcinoma (Case 12) after exposure to MMC and 5-FU

a : normal thyroid

b : normal thyroid after exposure to MMC for 2hr

c : normal thyroid after exposure to MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$

d : normal thyroid after exposure to 5-FU for 2hr

e : normal thyroid after exposure to 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$

f : papillary carcinoma

g : papillary carcinoma after exposure to MMC for 2hr

h : papillary carcinoma after exposure to MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$

i : papillary carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr

j : papillary carcinoma after exposure to 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$

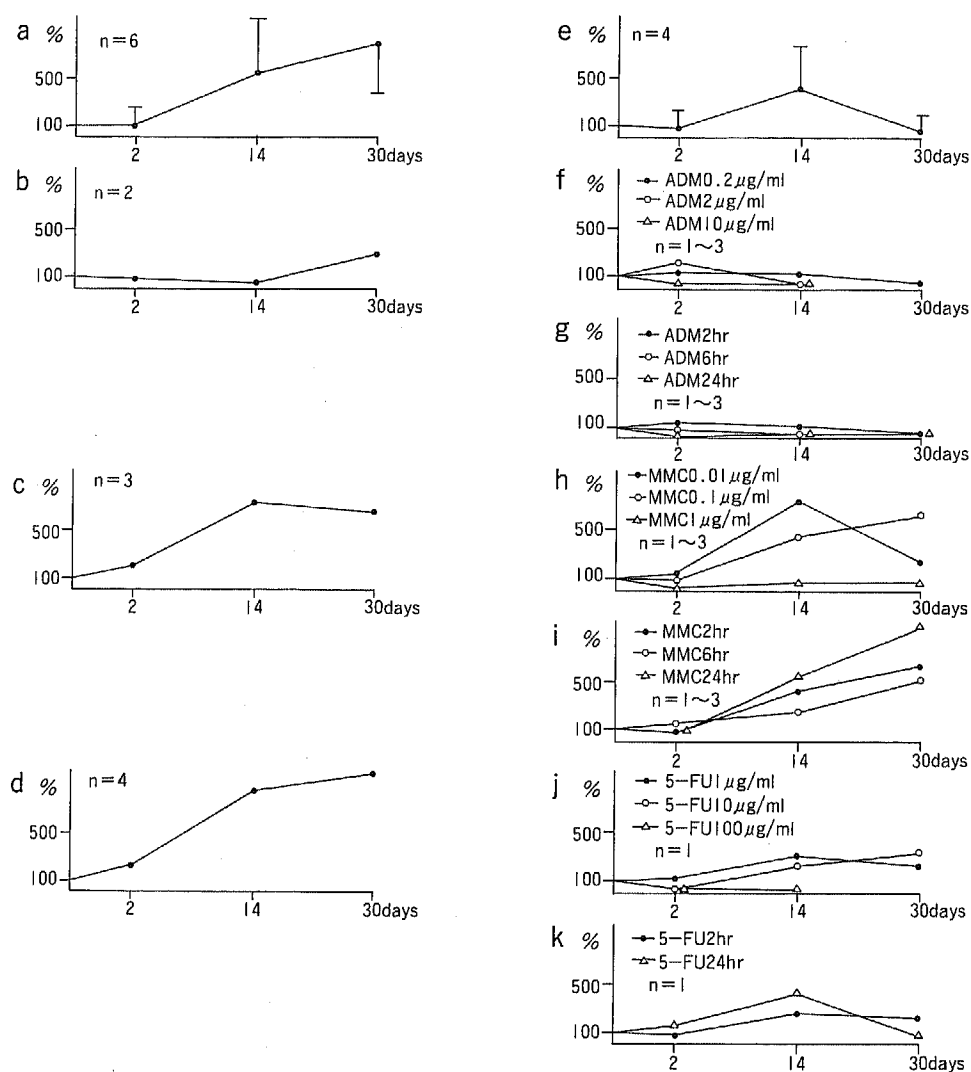


Fig. 11 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and papillary carcinoma (Case 13) after exposure to ADM, MMC and 5-FU

a : normal thyroid

b : normal thyroid after exposure to ADM 2 $\mu\text{g/ml}$ for 2hr

c : normal thyroid after exposure to MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$ for 2hr

d : normal thyroid after exposure to 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$ for 2hr

e : papillary carcinoma

f : papillary carcinoma after exposure to ADM for 2hr

g : papillary carcinoma after exposure to ADM 0.2 $\mu\text{g/ml}$

h : papillary carcinoma after exposure to MMC for 2hr

i : papillary carcinoma after exposure to MMC 0.1 $\mu\text{g/ml}$

j : papillary carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr

k : papillary carcinoma after exposure to 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$

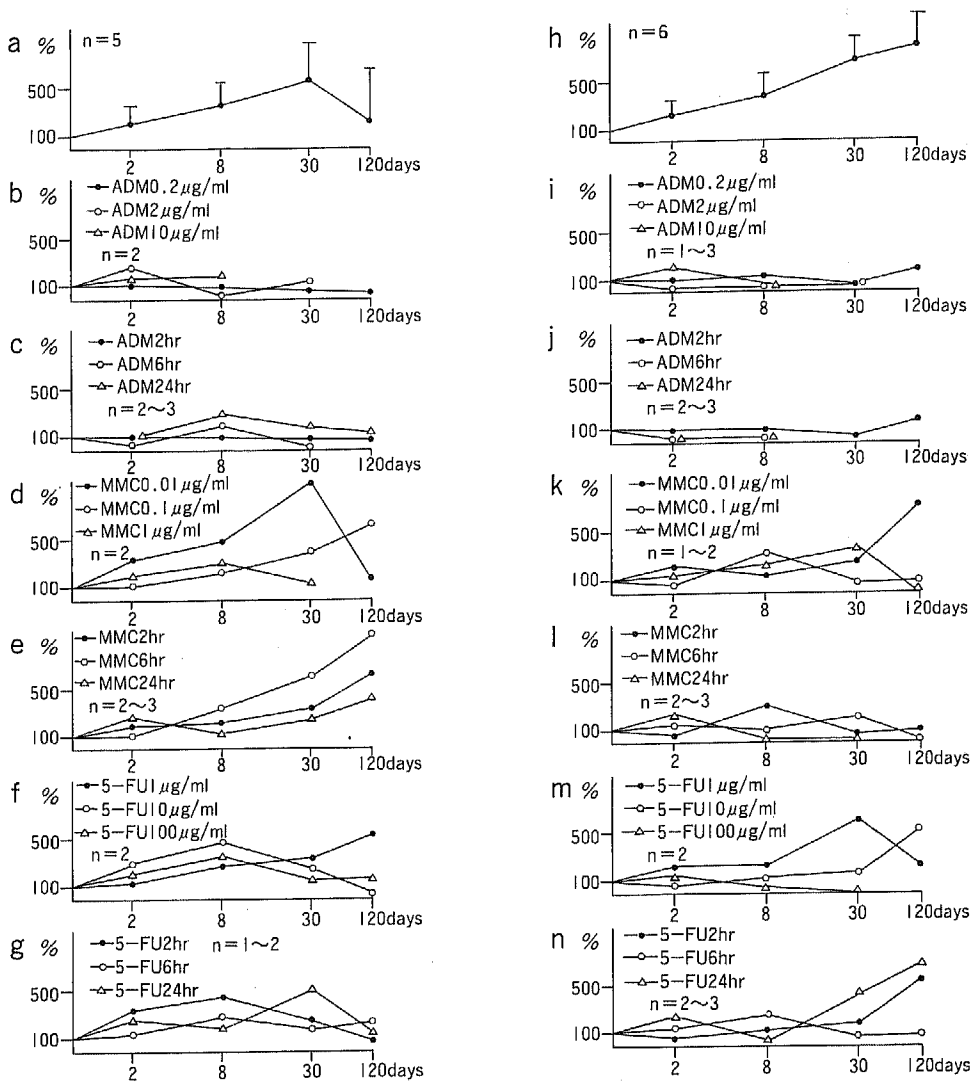


Fig. 12 Transitional curves of average cell counts in cultured normal thyroid and papillary carcinoma (Case 14) after exposure to ADM, MMC and 5-FU

- a : normal thyroid
- b : normal thyroid after exposure to ADM for 2hr
- c : normal thyroid after exposure to ADM 0.2μg/ml
- d : normal thyroid after exposure to MMC for 2hr
- e : normal thyroid after exposure to MMC 0.1μg/ml
- f : normal thyroid after exposure to 5-FU for 2hr
- g : normal thyroid after exposure to 5-FU 10μg/ml
- h : papillary carcinoma
- i : papillary carcinoma after exposure to ADM for 2hr
- j : papillary carcinoma after exposure to ADM 0.2μg/ml
- k : papillary carcinoma after exposure to MMC for 2hr
- l : papillary carcinoma after exposure to MMC 0.1μg/ml
- m : papillary carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr
- n : papillary carcinoma after exposure to 5-FU 10μg/ml

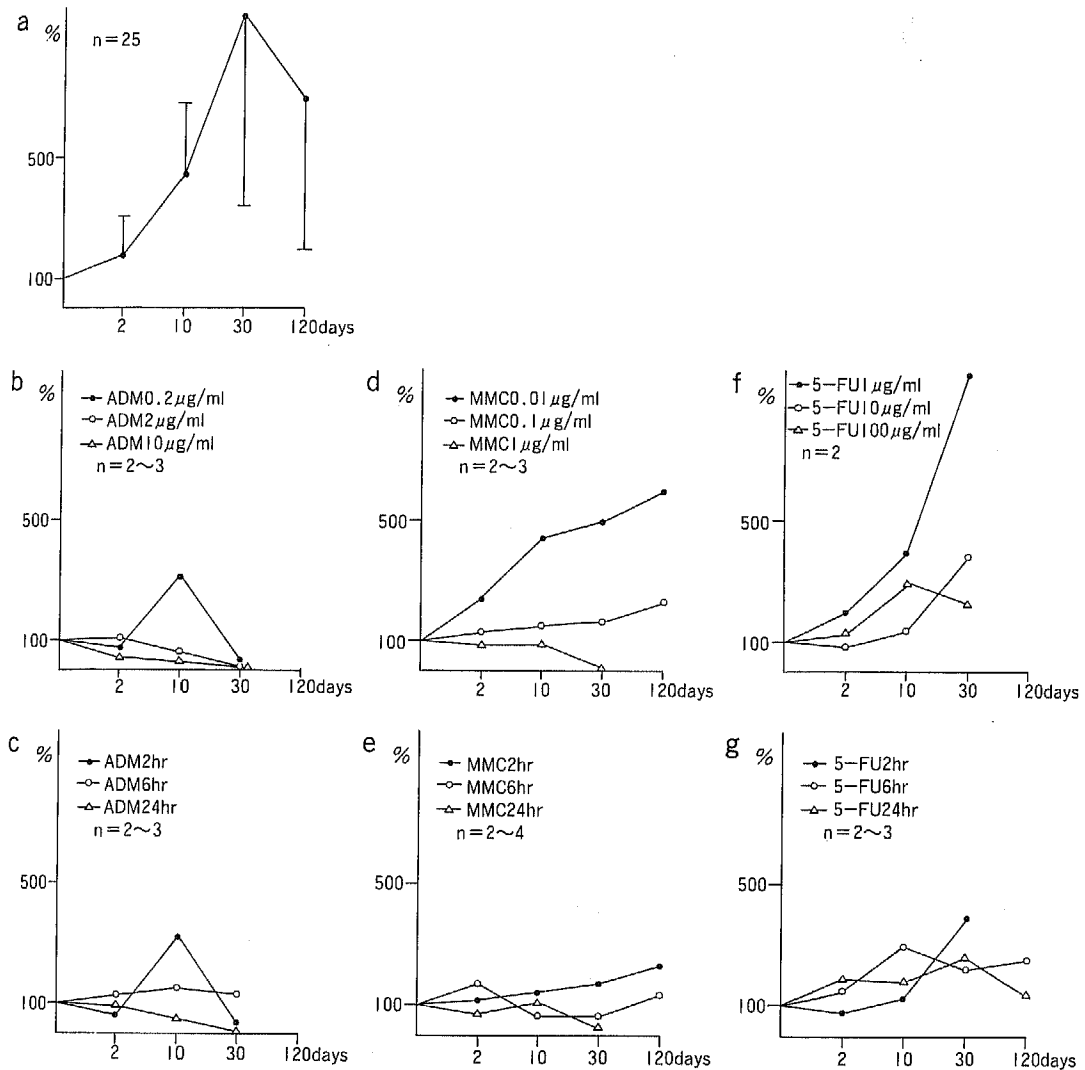


Fig. 13 Transitional curves of average cell counts in cultured anaplastic carcinoma (Case 16) after exposure to ADM, MMC and 5-FU

a : anaplastic carcinoma

b : anaplastic carcinoma after exposure to ADM for 2hr

c : anaplastic carcinoma after exposure to ADM 0.2 μ g/ml

d : anaplastic carcinoma after exposure to MMC for 2hr

e : anaplastic carcinoma after exposure to MMC 0.1 μ g/ml

f : anaplastic carcinoma after exposure to 5-FU for 2hr

g : anaplastic carcinoma after exposure to 5-FU 10 μ g/ml

ADM では低濃度 2 時間接触の場合、MMC と 5-FU ではどの濃度でもほとんどの場合、その後の増殖過程は全体として無処理対照群とあまり変わらなかった (Fig. 5 a-c, Fig. 6 a, c, Fig. 8 a, d, e, g, Fig. 9 a-g, Fig. 10 a-e, Fig. 11 a, c, d, Fig. 12 a, d-g)。しかし、ADM 中濃度・高濃度 2 時間接触、ならびに ADM 低濃度でも長時間接触では増殖抑制がみられた (Fig. 5 b, c, Fig. 6 b, Fig. 8 b, c, Fig. 9 b, c, Fig. 11 b, Fig. 12 b, c)。

2 甲状腺濾胞癌 (Fig. 5, 8)

甲状腺分化癌のうち、濾胞癌についてみると、症例 4 では正常甲状腺組織よりやや強いゆるやかな増殖傾向を示した (Fig. 3 c, Fig. 5 d) が、症例 10 では正常甲状腺組織より弱い増殖傾向を示した (Fig. 3 b, Fig. 8 h)。これに制癌剤を接触させると、ADM ではいずれの濃度においても増殖の抑制がみられた (Fig. 5 e, f, Fig. 8 i, j)。MMC と 5-FU では高濃度および長時間接触でわずかに増殖抑制傾向がうかがわれたが、大体において抑制はみられなかった (Fig. 8 k-n)。

3 甲状腺乳頭癌 (Fig. 6, 9-12)

甲状腺分化癌のうちの乳頭癌についてみると、制癌剤を加えなかった場合には、正常甲状腺組織とそれほどかわらないゆるやかな増殖傾向を示した (Fig. 3 d, Fig. 6 d, Fig. 9 h, Fig. 10 f, Fig. 11 e, Fig. 12 h)。これに ADM を接触させると、低濃度 2 時間では抑制されない場合もあったが大部分は抑制され、中濃度・高濃度 2 時間および低濃度 6・24 時間ではすべてが抑制された (Fig. 6 e, Fig. 9 i, j, Fig. 11 f, g, Fig. 12 i, j)。MMC を接触させた場合では、低濃度・中濃度接触では症例 12 の場合 (Fig. 10 g, h) を除いてあまり抑制されず (Fig. 6 f, Fig. 9 k, l, Fig. 11 h, i, Fig. 12 k, l)、また長時間接触によっても特に増殖抑制が強くなる傾向はみられなかった。しかし、症例 5, 13, 14 では高濃度で増殖抑制効果が認められた (Fig. 6 f, Fig. 11 h, Fig. 12 k)。5-FU を接触させた場合は、濃度差および接触時間の違いによる増殖抑制傾向の差は多少の例外はあるもののほとんどみられなかった (Fig. 9 m, n, Fig. 10 i, j, Fig. 11 j, k, Fig. 12 m, n) が、症例 11 と 12 では、全体的に抑制されている傾向がみられた (Fig. 9 h, m, n, Fig. 10 f, i, j)。

4 甲状腺未分化癌 (Fig. 7, 13)

甲状腺未分化癌を培養すると、1～2 日後に explant 周囲に急速な増殖帯が認められ、10 日後には異型度強く、criss-cross した配列あるいは pile-up が認

められた (Fig. 3 e)。未分化癌に制癌剤を接触させない場合には、癌細胞の増殖は速く、数週間から数カ月間順調に増殖を続け、時間の経過につれて線維芽細胞が優勢となり癌細胞が認められなくなる場合もあるが、100 日後の観察でも癌細胞の増殖が認められた (Fig. 7 a, Fig. 13 a)。培養開始後 10 日で ADM を接触させると、低濃度 2 時間の接触でその 2 日後に増殖抑制効果がみられ、中濃度・高濃度 2 時間および低濃度 6 時間あるいは 24 時間接触ではさらに強い抑制効果が認められた (Fig. 3 h)。接触後 7～10 日では、さらに抑制効果が認められ、症例 6 では、低濃度 2 時間および 6 時間接触を除いて完全な培養細胞の消失を認めた。接触後 100 日では、ほとんどすべての場合において培養細胞の消失を認めた (Fig. 7 b, c, Fig. 13 b, c)。未分化癌に MMC を接触させた場合では、低濃度および中濃度 2 時間接触では、接触後 2 日、7～10 日、100 日のいずれにおいても増殖抑制はみられず、中濃度 6 時間接触でわずかに増殖抑制効果が認められた (Fig. 3 i)。高濃度 2 時間接触および中濃度 24 時間接触では明らかな抑制効果が認められた (Fig. 7 d, e, Fig. 13 d, e)。未分化癌に 5-FU を接触させた場合では、低濃度・中濃度 2 時間接触および中濃度 6 時間接触では、ほとんど抑制効果がみられず (Fig. 3 j)、中濃度 24 時間接触および高濃度 2 時間接触で抑制効果が認められた (Fig. 7 f, g, Fig. 13 f, g)。

IV 考 察

甲状腺分化癌に対する化学療法剤は、ADM, bleomycin, cyclophosphamide, cisplatin, 5-FU および UFT 等⁹⁾⁷⁾が用いられているが、臨床的に有効と判断できる症例は少なく、一部の症例と特殊な状況下⁸⁾⁹⁾以外はほとんど用いられていない¹⁾。未分化癌に対しては、ADM, MMC, bleomycin, cyclophosphamide, 5-FU, cisplatin 等の化学療法剤が単独あるいは多剤併用として用いられ⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾、手術療法および放射線療法と併用される場合が多い¹⁾。従来、甲状腺癌に対する制癌剤の影響を *in vitro* でみた報告は、主として樹立された培養細胞に対しての効果であり¹²⁾¹³⁾、初代培養で制癌剤の効果をみた報告はない。著者は、甲状腺癌の組織型による制癌剤の効果の相違を知る目的で、手術時に採取した甲状腺癌組織を初代培養し、これに下山分類¹⁴⁾ type I 制癌剤 (concentration dependent agents) として ADM および MMC を、同 type II 制癌剤 (time dependent agents) に属

するものとして5-FUを選択し接触させた。選択の理由は、最も普遍的で古くより臨床使用され、その効果も他臓器癌で充分に立証され信頼を得ている制癌剤だからである¹⁵⁾¹⁶⁾。おのおのの制癌剤は、臨床使用時の標準の使用濃度(体重当たり)を中濃度とし、低濃度および高濃度設定を行って比較した。

培養用語ではgrowth, outgrowthは成長であって、増殖(proliferation)とは区別されている。Explant法では、explantからの細胞遊出が主体となることがあり成長と表現する方が正確かもしれない。しかし、Fig. 4に示したように細胞分裂が含まれていることは事実であり、本稿では増殖と表現した。

甲状腺未分化癌に対し濾胞癌や乳頭癌は組織学的にみて癌としてよく分化しており、生物学的性格や治療成績等に共通点も多いため、両者をまとめて分化癌とよばれる⁹⁾。本実験においても、濾胞癌の培養後の経時の変化がみれたものは2例で症例数が少ないこともあるが、乳頭癌ときわ立った差異はみられず、分化癌として一括して扱って差し支えないと考えられる。甲状腺正常組織では、ADM中濃度・高濃度2時間接触および低濃度でも長時間接触では増殖抑制効果を認めたが、低濃度2時間接触ではほとんど影響されなかった。MMCおよび5-FU接触ではいずれもほとんど影響がなかった。ところが分化癌では、ADM低濃度2時間接触でもかなり強い増殖抑制が認められた。したがってADMは臨床的にも分化癌に対する治療効果が期待できるものと推測される。しかし、分化癌にMMCを接触させても、MMC高濃度接触で増殖抑制がみられることはあったが、全体としてみるとほとんど増殖は抑制されなかったものと考えられる。したがって分化癌に対してMMCの臨床的治療効果はあまり期待できないと思われる。また、分化癌に5-FUを接触しても、明らかな増殖抑制効果があったとは思われず、これも治療効果は期待できない。臨床的には難治性の癌に対してADMを中心とした化学療法¹⁷⁾¹⁸⁾の報告がみられないことが、この実験結果から理解できる。

未分化癌では、ADMによる強い増殖抑制効果が認められ、concentration dependentでありかつtime dependentであることが示された。これは下山分類のtype Ibの制癌剤¹⁴⁾であることを裏付ける結果である。未分化癌に対するMMCの効果はADMに比し弱い。MMCはADMと同様type Ibに属する制癌剤であるが、高濃度および長時間接触での増殖抑制は認められ

たものの、中濃度接触では抑制されず、したがって臨床的治療効果も期待できない。5-FUの未分化癌に対する影響は、長時間接触で増殖抑制効果がみられたとともに、高濃度2時間接触でも増殖抑制効果が認められた。今回の結果だけでは決定的ではないが、臨床上、長時間投与で治療効果が期待できる可能性がある。

ヒト甲状腺癌の培養については、その報告は、主として樹立された細胞株を用いる¹²⁾¹³⁾か、初代培養でも遊離された細胞培養結果である¹⁹⁾。これは主として癌細胞以外の細胞すなわち線維芽細胞の増殖を除去または阻止すること²⁰⁾からくる必然的な結果であるが、本実験でも、explant周辺に増殖した細胞が癌細胞かどうかが問題となる。培養初代における上皮様細胞の増殖形態としては、①組織塊から連続性に敷石状に増殖するもの、②非連続性、散布性に出現するもの、③浮遊状態で増殖するものがあり、癌細胞では②の形態を示す場合が最も多く、正常上皮は主として①の形態を示し、また未分化癌では③の形態をとることがある²¹⁾といわれる。本実験でも、培養液を交換するために③の形態は確認できなかったが、正常甲状腺では敷石状に増殖し、甲状腺癌では非連続性、散布性に出現する傾向が確認された。さらに、本実験とほぼ同様の方法によって培養した甲状腺癌の細胞をケラチンおよびビメンチン抗体を用いて蛍光抗体法で観察したところ、ケラチン抗体染色で細胞がcriss-crossあるいはpile-upした部分での多くの細胞に蛍光が明瞭に認められ、ビメンチン抗体で染色すると、多くの細胞は弱い蛍光を発するのみであったと報告されている²²⁾。この結果から、本実験での培養細胞の多くはケラチン細糸を含有し、上皮性細胞であると思われる。したがって、本実験でcriss-crossした配列を示すもの、pile-upの認められるものを癌細胞の指標としたことは、正当性を得たものと考えられる。最近あらためて、甲状腺の細胞培養ではなく、組織培養において技術的な改善に関する報告²³⁾がみられることも、本実験のような初代組織片培養法が古くて最新の方法であることを示唆している。

制癌剤感受性試験は、同じ組織型の癌腫でも制癌剤に対する感受性が異なる²⁴⁾ために行うもので、治療に応用するためには、*in vitro*の結果が臨床治療効果と一致するものでなければならないと同時に簡便であることが条件²⁵⁾である。最近では、collagen gel法、SDI法、コロニー形成阻止法、核形法、シンチレーション法およびsubrenal capsule assay法等に種々の工夫を

した報告²⁵⁾⁻²⁷⁾があるが、おのおの利点と問題点があり、いまだ確立された方法はない。著者は、簡便さということには難点があるが、より生体内での環境に類似した、すなわち臨床治療効果に一致しているようなモデルとして explant 法を用いて制癌剤の効果を判定した。制癌剤に対する感受性は、初代培養でも変化することがある³⁾といわれており、またさらには、培養癌細胞が monolayer であるか、spheroid であるかでも感受性は異なり、spheroid の方が薬剤に対する感受性に抵抗性があるとの報告¹²⁾もある。この意味では、explant 法による培養細胞により早い時期に接触を行うことは妥当であると考えられるが、細胞数の計測に手を要し、また線維芽細胞の contamination を客観的にとらえ排除あるいは考慮することができない点に問題が残されている。本実験では、特に1カ月を過ぎた頃には線維芽細胞の増殖が優勢となり、単純に細胞数は増加しても癌細胞が増殖しているとはいえないので、制癌剤接触後3週間程度が評価するに耐えうると考えられる。正確に表現するならば、癌組織からの培養細胞に対する制癌剤の効果をみたものであって、癌細胞に対する効果ではない。今後臨床治療効果との照合ができれば明らかになると思われるが、より *in vivo* に近い形として癌組織からの培養細胞に対する効果が、臨床治療効果とより一致するものと考えられる。したがって、本実験の結果からすれば、临床上での甲状腺分化癌と未分化癌では制癌剤に対して感受性

の相違があるが、これは主としてその増殖速度の違いによるものであり、制癌剤としては、分化癌および未分化癌ともに ADM が最も感受性が高く治療効果の期待ができる薬剤であると思われる。

V 結 語

手術時採取した甲状腺癌組織の組織片培養法による初代培養細胞に制癌剤を接触させてその結果を判定したところ、次の事実が確認できた。

- 1) 甲状腺分化癌では、増殖速度は遅いが、ADM による増殖抑制効果がわずかながら認められた。
- 2) 甲状腺未分化癌では、増殖速度は速く、ADM による著明な増殖抑制効果が認められた。
- 3) 手術時採取した生検試料から甲状腺癌組織を長時間培養して、制癌剤の効果を判定することが可能であり、臨床治療の際にこの方法により、薬剤感受性を推定するのに利用することができる。

本論文の要旨は、第41回日本癌学会（1982年8月、大阪）において発表した。

謝 辞

本研究にあたり多岐にわたり御指導頂いた永田哲士教授に深謝致します。また本研究に御協力頂いた信州大学医学部第2外科学教室諸兄ならびに信州大学医学部第1解剖学教室諸氏に心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) 牧内正夫：甲状腺癌—集学的療法。日本臨牀，46：996-1000，1988
- 2) 長瀬千秋：組織培養による制癌剤感受性試験の開発の試みとその臨床応用について。組織培養，5：46-51，1979
- 3) Berry, R.J., Laing, A.H. and Wells, J.: Fresh explant culture of human tumors *in vitro* and the assessment of sensitivity to cytotoxic chemotherapy. Br J Cancer, 31: 218-227, 1975
- 4) 久米田茂喜，永田哲士：培養甲状腺癌細胞への制癌剤の影響。組織培養，12：264-268，1986
- 5) 黒木登志夫：培養細胞の癌化。中井準之助，山根 績，山田正篤，井上幸重，堀川正克(編)，組織培養，初版，pp.531-550，朝倉書店，東京，1976
- 6) 岩浅武彦：甲状腺癌—化学療法。日本臨牀，46：991-995，1988
- 7) Droz, J.P., Morardet, N., Charbord, P., Maraninchi, D., Hayat, M. and Parmentier, C.: Chemotherapy of differentiated thyroid carcinomas. Ann Radiol (Paris), 20: 814-818, 1977
- 8) Kim, J.H. and Leeper, R.D.: Combination adriamycin and radiation therapy for locally advanced carcinoma of the thyroid gland. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 9: 565-567, 1983
- 9) Bernhardt, B.: Follicular thyroid carcinoma: Response to chemotherapy. Am J Med Sci, 282: 45-46, 1981
- 10) Kim, J.H. and Leeper, R.D.: Treatment of anaplastic giant and spindle cell carcinoma of the thyroid gland with combination adriamycin and radiation therapy. Cancer, 52: 954-957, 1983

- 11) Spanos, G.A., Wolk, D., Desner, M.R., Khan, A., Platt, N., Khafif, R.A. and Cortes, E.P.: Preoperative chemotherapy for giant cell carcinoma of the thyroid. *Cancer*, 50: 2252-2256, 1982
- 12) Nedermann, T.: Effects of vinblastine and 5-fluorouracil on human glioma and thyroid cancer cell monolayers and spheroids. *Cancer Res*, 44: 254-258, 1984
- 13) Nedermann, T. and Carlsson, J.: Penetration and binding of vinblastine and 5-fluorouracil in cellular spheroids. *Cancer Chemother Pharmacol*, 13: 131-135, 1984
- 14) 下山正徳: 人癌細胞培養とその化学療法への応用. *医学のあゆみ*, 90: 273-283, 1974
- 15) 飯郷正明, 星 昭夫: 最新薬物療法 manual—代謝拮抗物質. *日本臨牀*, 44: 473-475, 1986
- 16) 星 昭夫: 最新薬物療法 manual—抗癌性抗生物質. *日本臨牀*, 44: 476-478, 1986
- 17) Pacini, F., Vitti, P., Martino, E., Giani, C., Bambini, G., Pinchera, A. and Baschieri, L.: Treatment of refractory thyroid cancer with adriamycin. *Drugs Exptl Clin Res*, 10: 911-914, 1984
- 18) Benker, G. and Reinwein, D.: Ergebnisse der Chemotherapie des Schilddrüsen-karzinoms. *Dtsch Med Wochenschr*, 108: 403-406, 1983
- 19) 後藤邦彦: ヒト甲状腺腫瘍の組織培養. *臨床病理*, 47: 132-139, 1981
- 20) 岡部哲郎, 大沢伸昭: ヒト悪性腫瘍組織培養—最近の進歩とその応用について. *医学のあゆみ*, 117: 1-10, 1981
- 21) 大星章一: 培養ヒト癌細胞の生物学的研究. 文部省研究報告集録, (昭48癌), pp. 265-268, 1973
- 22) 村山恒幸, 白田信光, 永田哲士: 培養甲状腺癌への甲状腺刺激ホルモン (TSH) の影響. *組織培養*, 12: 258-263, 1986
- 23) Bauer, M.F. and Herzog, V.: Mini organ culture of thyroid tissue: A new technique for maintaining the structural and functional integrity of thyroid tissue *in vitro*. *Lab Invest*, 59: 281-291, 1988
- 24) 仁井谷久暢: 癌の組織型と化学療法. *癌と化学療法*, 7: 1-7, 1980
- 25) 飯島信博, 関谷宗英, 大崎達也, 高見沢祐吉, 時田尚志: 新しく開発した試験管内抗癌剤感受性試験による卵巣癌の個別化化学療法. 第49回日本癌学会総会記事, p. 380, 1990
- 26) 谷 无彦, 荒谷信一, 下松谷匠, 高橋康嗣, 堀内哲也, 北 角人, 増田靖彦, 村岡隆介, 星野 孝: BrdU 標識 FCM による新制癌剤感受性試験. 第49回日本癌学会総会記事, p. 380, 1990
- 27) Yang, J., Guzman, R., Richards, J. and Nandi, S.: Primary culture of mouse mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. *In Vitro*, 16: 502-506, 1980

(2. 10. 25 受稿)