

原 著

前立腺腫瘍の組織培養

第2報 初代培養細胞への性ホルモンの影響

柳 沢 温

信州大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 柿崎勉教授)

TISSUE CULTURE OF PROSTATIC TUMORS II THE EFFECT OF SEX HORMONES UPON PRIMARY CULTURED CELLS OF HUMAN PROSTATIC TISSUES

Yutaka YANAGISAWA

Department of Urology, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Abstract

Tissue samples of the prostatic glands were obtained by needle biopsy from patients who were clinically suspected to have prostatic carcinoma. Small pieces of the tissues were processed through routine histologic procedures and served to histopathological diagnosis. Other small pieces of the tissues were placed as explants in TD-15 flasks and incubated in Eagle's MEM supplemented with 10% bovine serum or calf serum at 37°C.

Among 36 cases of patients, 4 cases of benign prostatic hyperplasia and 4 cases of prostatic carcinoma, which resulted in well developed monolayer culture, were selected. The culture vessels from each patient were divided into 4 experimental groups; untreated control, testosterone, low dose diethylstilbestrol and high dose diethylstilbestrol groups, respectively. After a week culture, testosterone propionate (0.1 or 0.5 μ g/ml) and diethylstilbestrol diphosphate (1 and 10 μ g/ml) were added to the experimental groups, while untreated control groups were remained untreated. Each culture vessel was examined with an inverted phase contrast microscopy and morphological changes of cultured cells were recorded by means of phase contrast photomicroscopy successively twice a week. On each photomicrograph absolute growth values of cultured cells were measured planimetrically (Tables 2, 3). From these data relative growth values were calculated on the basis of the absolute growth values at the initiation of the hormone treatment.

Examples of histologic figures of both prostatic hyperplasia and carcinoma were shown in Figs. 1 and 2. As the results of tissue culture, untreated controlled cells showed a normal appearance of cultured cells (Figs. 3, 12, 21). On the other hand the experimental groups which were cultured with either testosterone or diethylstilbestrol showed some changes of degeneration (Figs. 4-11, 13-20) except 1 prostatic carcinoma cultured with both testosterone and diethylstilbestrol (Figs. 22-24), and 1 benign prostatic hyperplasia with testosterone only whose fibroblastic cells were dominant. The degeneration of cells was observed 2 weeks after primary culture; a week earlier than control. The results of relative growth values of each patient are shown in Figs. 25-32.

From these results it is clear that the growth values of each patient were suppressed with

both testosterone and diethylstilbestrol except 1 prostatic carcinoma and benign prostatic hyperplasia with testosterone only. The patient with prostatic carcinoma whose tissue cultures showed no response to testosterone and diethylstilbestrol in vitro died after 6 months without any response to anti-androgenic therapy. However, other cases were well controlled clinically with anti-androgenic therapy. These results suggest the possibilities that this in vitro model system is comparable to anti-androgenic therapy and that this model system can be employed to estimate the clinical responsiveness of the patients to anti-androgenic therapy.

Key words : 前立腺肥大症 (benign prostatic hyperplasia)
 前立腺癌 (prostatic carcinoma)
 組織培養 (tissue culture)
 性ホルモン (sex hormones)

I 緒 言

ヒト前立腺の組織培養は、困難なものと考えられており、その報告も多くはない。著者¹⁾は第1報において、臨床的に前立腺癌の疑われた患者から生検により得た前立腺組織の組織片培養を行ない、その成功率、培養細胞の形態とその経時的変化などにつき報告し、あわせてこの実験により培養された細胞に対して性ホルモンの影響を調べることが可能なことを述べた。本報においては、この細胞系を利用して培養液に testosterone propionate と diethylstilbestrol diphosphate を添加し、培養細胞の形態的变化とその増殖度を観察したので報告する。

II 材料と方法

A 材 料

第1報¹⁾において詳細に述べたが、触診、尿道造影、生化学的検査などにより、前立腺癌の疑われた患者36例(表1)より生検によって得た前立腺組織の一部を1mm×1mm×1mmの組織片に細切し、この組織片を5～6個ずつTD-15型培養瓶に入れ、10%コウシまたはウシ血清を加えたEagleMEM(PC 100 u/ml, SM 100 μg/ml 添加)を使用して、37°C 静置培養した。通常1症例に8～10本のTD-15型培養瓶を使用した。一方、生検材料の一部は10%ホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切、HE染色をして病理組織学的検査を行ない診断を確定した。以上の方法にて、単層培養に成功した症例は前立腺肥大症5例、前立腺癌12例であったが、このうち前立腺肥大症4例、前立腺癌4例を選んで今回の実験を行なった。

対象とした前立腺癌症例の臨床経過を、以下簡単に記載する。

症例7504: 67才, 昭和49年秋より排尿困難, 頻尿が出現した。50年5月30日前立腺生検を行ない前立腺癌と診断した。6月20日除勢術を行ない diethylstilbestrol 300mg/day の経口投与により, 52年7月現在前立腺触診所見には異常なく, 転移を思わせる所見もない, 酸フォスファターゼ, アルカリフォスファターゼ値も正常である。

症例7509: 76才, 昭和50年9月頻尿を主訴として来院, 来院時すでに骨盤骨に転移がみられ, 酸フォスファターゼ 16.6K. A. U., アルカリフォスファターゼ 11.3K. A. U. と高値を示していた。9月30日生検を行ない前立腺癌と確定したが細胞の異型性は低かった。diethylstilbestrol 600mg/day の経口投与にも反応せず51年3月14日癌死した。前立腺癌患者としては、非常に速い経過をとった症例である。

症例7601: 70才, 昭和48年春頃より頻尿に気づき, 51年1月排尿困難も出現して来院した。1月14日生検を行ない前立腺癌と診断したが, 酸フォスファターゼ, アルカリフォスファターゼ値は正常であり, 骨転移もみられなかった。diethylstilbestrol 600mg/day の経口投与を3ヶ月間行なった後除勢術を施行した。以後治療を中断しているが, 52年8月現在健在である。

症例7705: 69才, 昭和50年秋頃より頻尿, 排尿困難があらわれた。52年6月来院, 酸フォスファターゼ 52.5K. A. U., アルカリフォスファターゼ 46.5K. A. U. と高値を示し, 骨転移もみられた。7月25日生検を行ない前立腺癌と確定した。現在 diethylstilbestrol 600mg/day の経口投与により症状は軽快しつつある。

B 培養方法

初代培養後原則として7日目に観察し, 培養に成功

Table 1 Materials and Histological Diagnosis

Cases		Age	Histology	Success in Culture
No.	Initial			
7401	S. I.	73	Hyperplasia (g)	+
7404	I. O.	72	" (g)	-
7409	Y. K.	74	" (m)	-
7411	K. M.	59	" (m)	-
7412	T. F.	78	" (f)	-
7417	K. M.	74	" (m)	-
7418	E. U.	74	" (f)	-
7419	K. N.	59	" (f)	+*
7501	K. O.	63	" (f)	+*
7503	K. S.	67	" (f)	+*
7505	Y. A.	79	" (m)	-
7603	T. I.	73	" (m)	-
7703	G. Y.	60	" (f)	-
7704	S. I.	68	" (m)	+*
7706	I. I.	68	" (m)	-
7415	K. O.	62	Chronic Prostatitis	-
7402	M. I.	64	Adenocarcinoma	+
7403	S. F.	68	"	-
7406	M. S.	72	"	-
7407	S. S.	56	"	-
7413	K. M.	73	"	+
7414	K. M.	78	"	+
7416	K. M.	68	"	+
7504	M. M.	67	"	+*
7506	K. M.	75	"	+
7507	K. M.	65	"	-
7508	Y. T.	67	"	+
7509	K. A.	76	"	+*
7601	M. T.	70	"	+*
7602	S. K.	60	"	-
7701	T. I.	75	"	+
7702	H. H.	70	"	+
7705	S. K.	69	"	+*
7408	M. U.	73	Suspected of Carcinoma	-
7420	K. M.	79	"	+
7405	T. F.	52	Reticulum Cell Sarcoma	+

g : glandular type + successful
f : fibromuscular type - unsuccessful
m : mixed type * treated with sex hormones

した培養瓶を3または4群に分け下記のごとく実験を行なった。

1) 無処置対照群: EagleMEMのみを使用して培養を行なった群。

2) testosterone 群: testosterone propionate (水性懸濁性注射液テストロン, 杏林薬品製) を 0.1 $\mu\text{g/ml}$ または 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に EagleMEM に添加した培養液で培養した群。

3) diethylstilbestrol 低濃度群: diethylstilbestrol diphosphate (水溶性注射液ホンパン, 杏林薬品製) を 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に EagleMEM に添加した群。

4) diethylstilbestrol 高濃度群: diethylstilbestrol diphosphate を 10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に EagleMEM に添加した群。

いずれも培養液の交換は定期的に週2回同時に行なった。第3, 第4群は単層培養に成功した培養瓶の少ない時には, どちらかの実験を行なった。各群の実験した組織片は, 培養の成功率の違いから1~6個と差が生じた。

C 形態学的観察

培養細胞の形態学的観察には, 倒立位相差顕微鏡(オリンパスK型)を使用して観察記録し, 同時に位相差顕微鏡写真撮影を行なった。写真撮影には4倍および10倍のDL対物鏡と5倍および10倍の接眼鏡を組み合わせ, 富士ネオパンFフィルムを装着してNikon AFM写真撮影装置を使用した。

培養細胞の増殖度測定法としては, 面積測定法を用いた。この測定法の欠陥を出来るだけ少なくするため, 20倍で撮影したフィルムを4倍に引き延して現像し, これを1区画5mm \times 5mmの正方形の単位として測定して絶対成長値を cm^2 単位で求めた。観察記録, 写真撮影は原則として培養後7日目より行ない, 以後週1回ないし2回定期的に写真撮影した。2回目以後の絶対成長値は最初の絶対成長値で除して比較成長値を求め増殖度を比較した。測定は1対象群について1個ないし6個の組織片よりの培養細胞に行ない, 各々の比較成長値の平均値を求めて記録とした。

III 結 果

A 生検組織の病理組織学的診断

培養を試みた試料は36例(表1)で, その病理組織学的診断は, 前立腺肥大症15例, 慢性前立腺炎1例, 前立腺癌17例, 前立腺癌の疑い2例, 細網肉腫1例で

ある。前立腺肥大症と前立腺癌の組織像の代表的例を図1, 2に示す。

B 培養細胞の形態学的変化

1. 前立腺肥大症

(1) 無処置対照群 初代培養開始後移植片を中心として周辺に細胞増殖帯(outgrowth)が形成され上皮細胞様細胞(以下上皮様細胞と記載する)と少数の線維芽細胞様細胞(以下線維芽様細胞と記載する)が混合して増殖成長する。上皮様細胞では細胞質は多角形で細胞質の中心に球形ないし橢円形の核を有し, 核には通常1個, 時に2個の核小体が認められる。細胞は相互に密に接触して単層(monolayer)を形成し, 外方へ増殖する。線維芽様細胞はその間に分散し, 細胞体は紡錘形で, その中心に核小体を有する核が認められる(図3)。培養開始後ほぼ3週目になると, おもに増殖帯周辺部より細胞は萎縮し, 細胞質が球形となりガラス壁より剝離した。また一部の細胞は多数の脂肪小滴を含み, 脂肪変性をしめた。しかしこの変性剝離が少なくまだ増殖する培養例もみられた。

(2) testosterone 添加群 添加直後は細胞増殖帯が形成され成長するが, 無処置対照群より成長速度は遅く, 無処置対照群より約1週間はやく培養開始2週目を過ぎる頃になると, 主として脂肪変性が始まり細胞の崩壊消失がみられた(図4~7)。

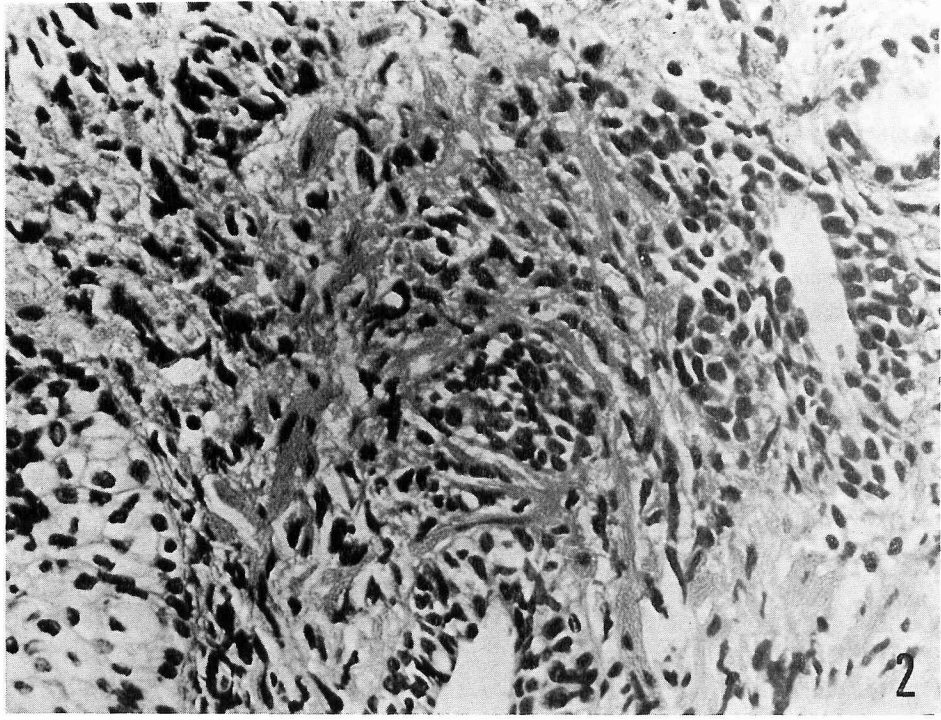
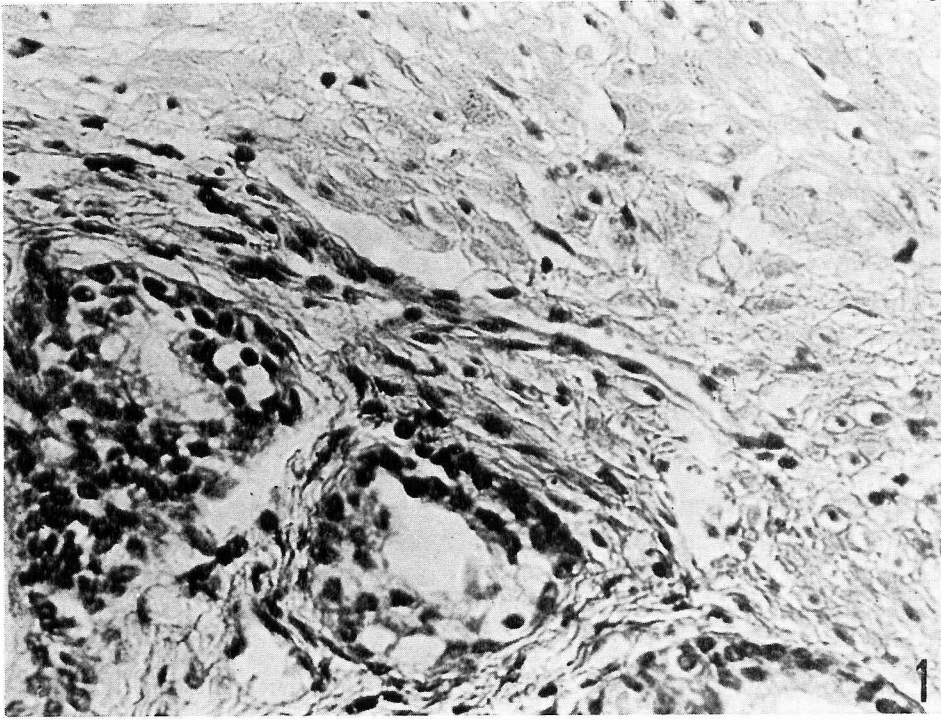
(3) diethylstilbestrol 低濃度群 1 $\mu\text{g/ml}$ の添加群では, 対照に比して成長が遅く対照群より約1週間はやく培養開始2週目頃になると萎縮, 変性, 細胞の剝離があらわれ, 上皮様細胞にかわり線維芽様細胞が目立ち始める(図8~11)。

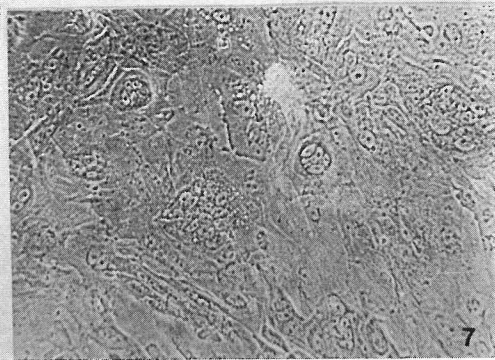
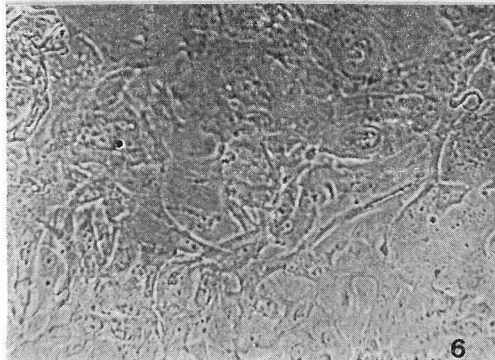
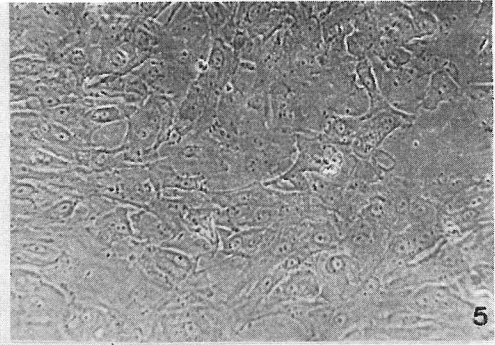
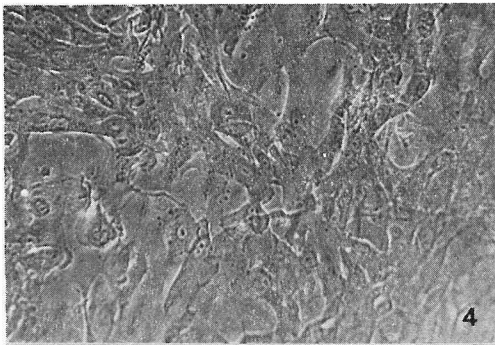
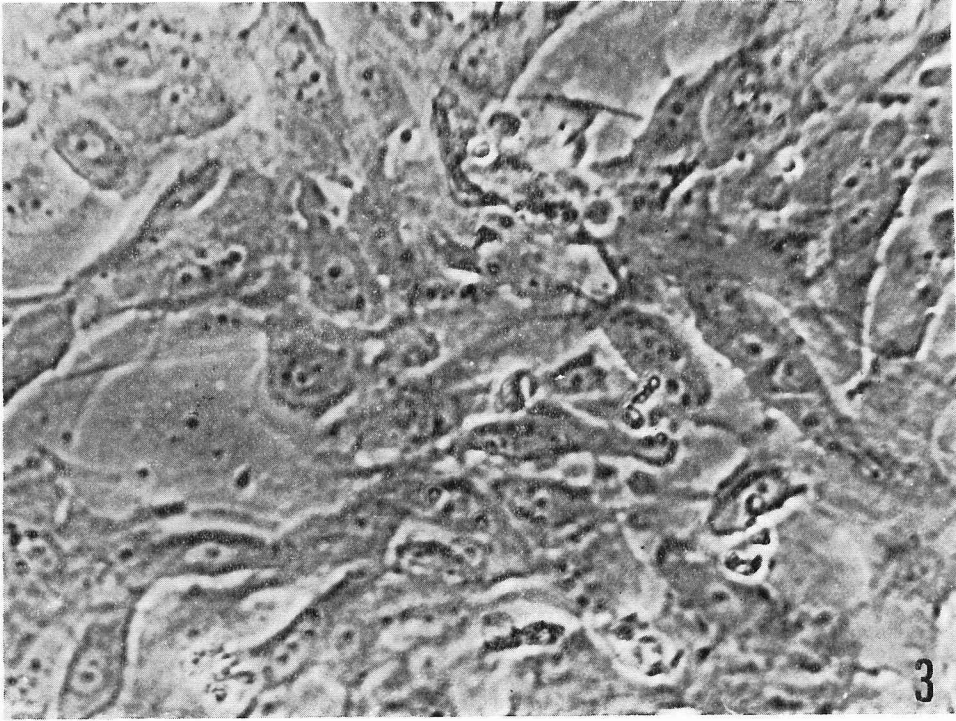
(4) diethylstilbestrol 高濃度群 10 $\mu\text{g/ml}$ の添加群では, 成長は最も遅く萎縮, 変性, 細胞剝離がよりはやく顕著にあらわれた。

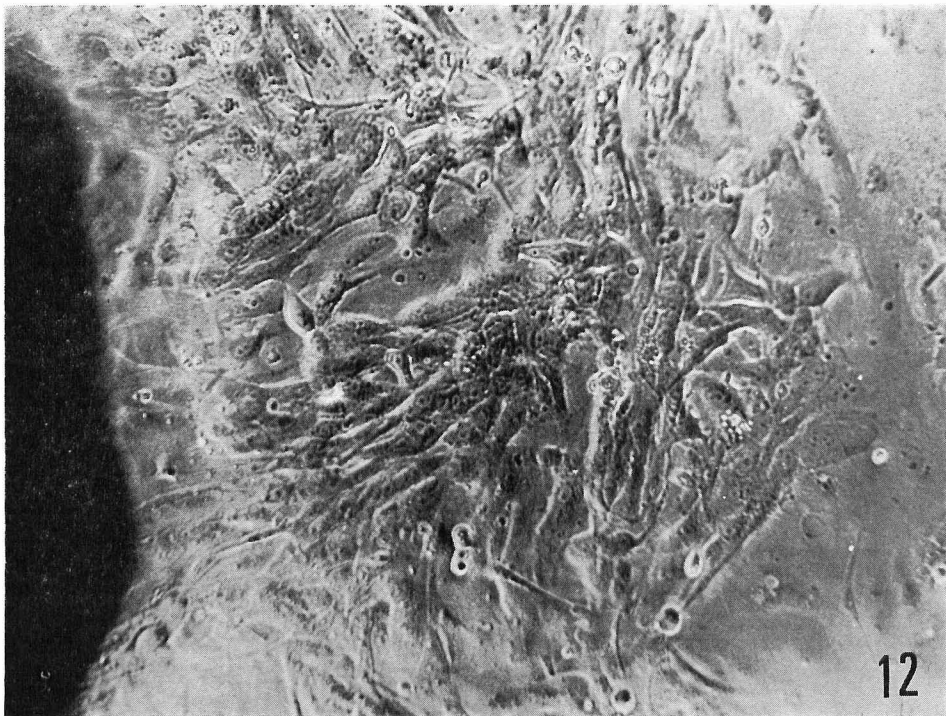
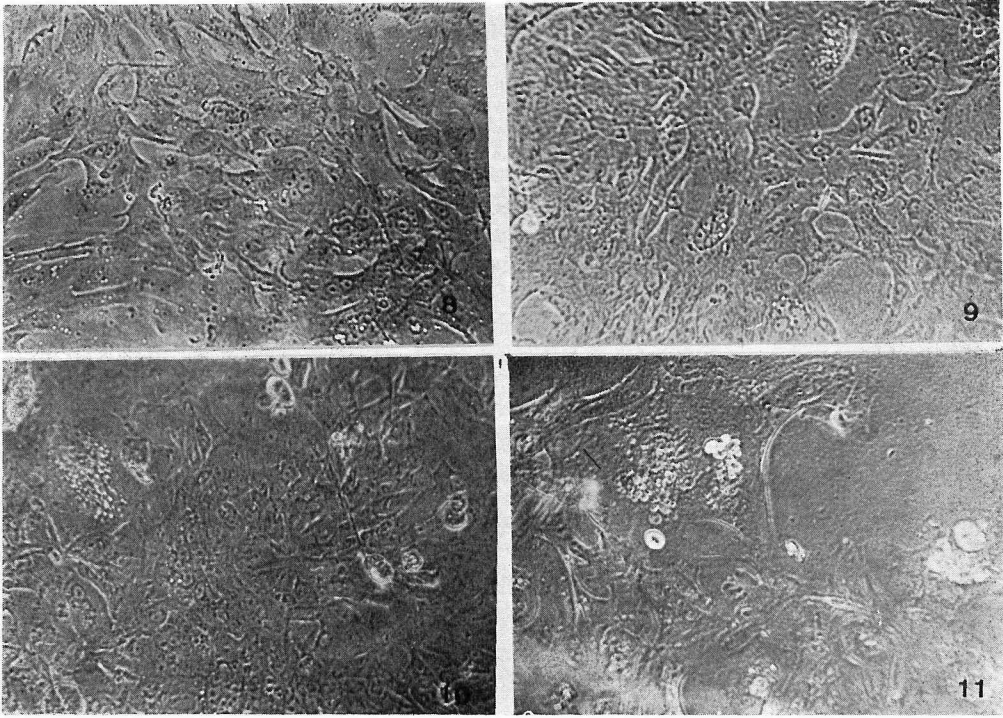
2. 前立腺癌

(1) 無処置対照群 初代培養開始後主として上皮様細胞が移植片より周辺に分裂増殖して細胞増殖帯を形成し, 成長を始める。上皮様細胞は細胞質は多角形で細胞質の中心に球形の核を有し, 核には1個ないし, 2個の核小体が認められる。また細胞質内には微細な顆粒が多数認められ, 細胞は相互に密に接触し単層を形成する場合と, 重層交差し培養下における癌細胞の特徴を示す場合がある(図12)。

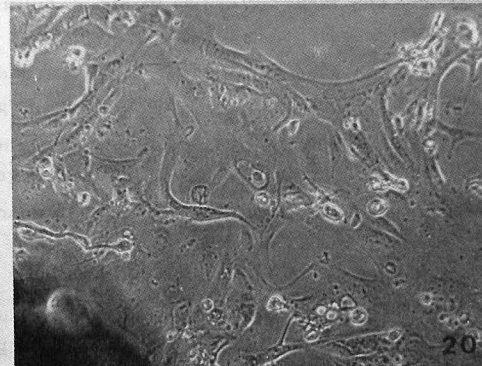
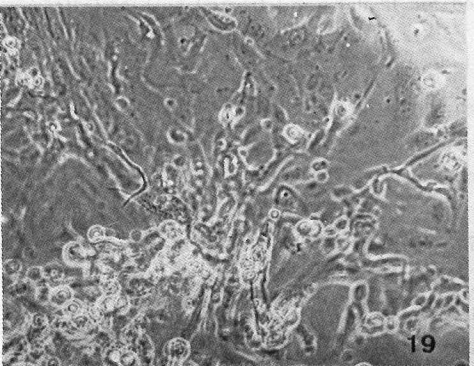
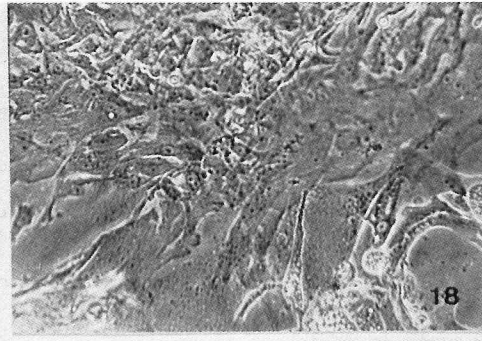
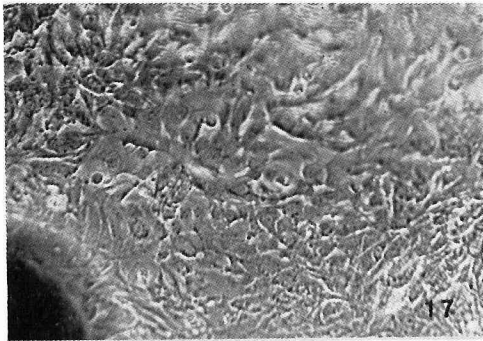
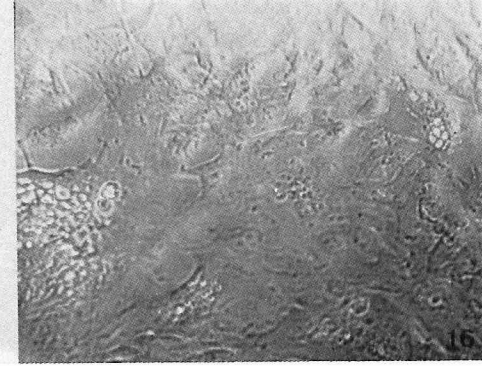
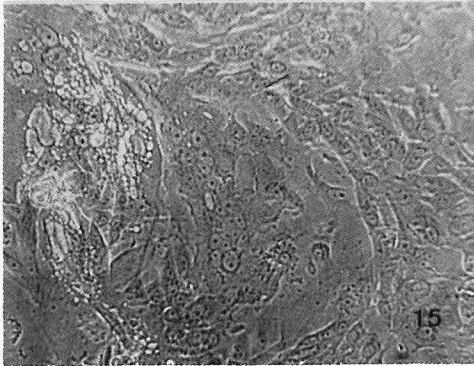
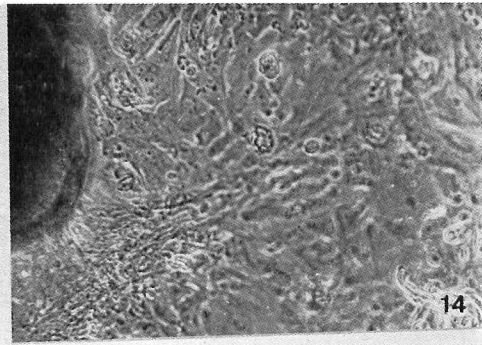
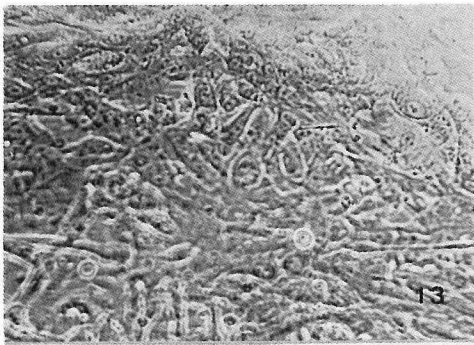
(2) testosterone 添加群 対照に比して成長は遅く, 対照より約1週間はやく初代培養開始2週目頃







培養前立腺細胞への性ホルモンの影響



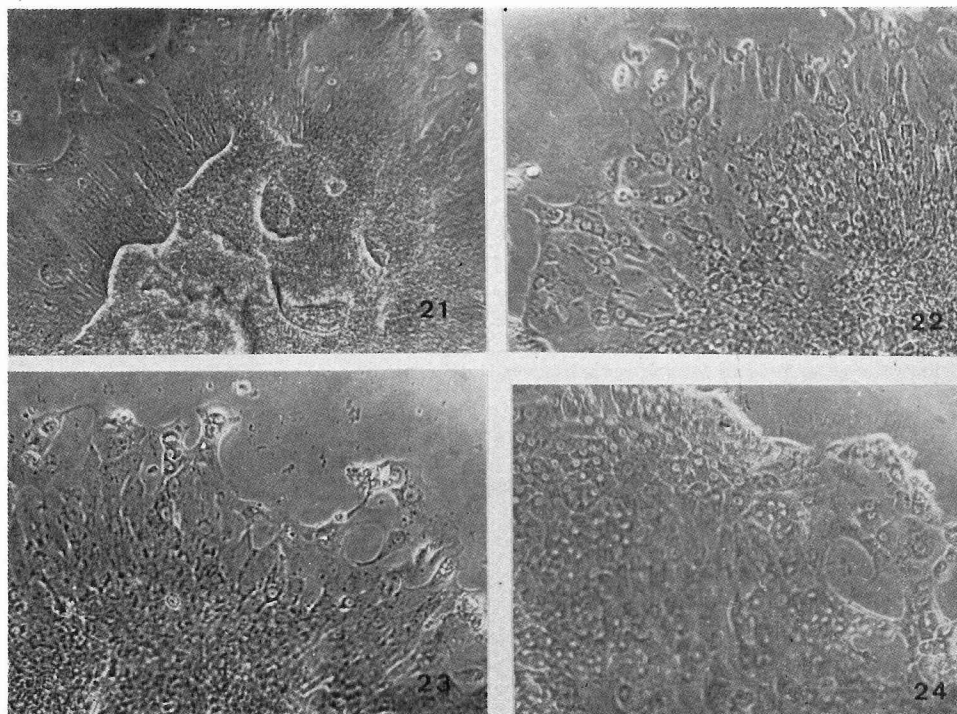


Fig. 1 Photomicrograph of a biopsied tissue section of benign prostatic hyperplasia (No. 7501), H. E. stain. $\times 400$

Fig. 2 Photomicrograph of a biopsied tissue section of prostatic carcinoma (No. 7505), H. E. stain. $\times 400$

Fig. 3 Phase contrast photomicrograph of monolayer culture obtained from a case of benign prostatic hyperplasia (No. 7501), cultured for 6 days in vitro. $\times 100$

Fig. 4 Phase contrast photomicrograph of monolayer culture obtained from a case of benign prostatic hyperplasia (No. 7501), cultured for 14 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 8 days. $\times 50$

Fig. 5 The same culture as in Fig. 4, cultured for 19 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 13 days. $\times 50$

Fig. 6 The same culture as in Figs. 4 and 5, cultured for 24 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 18 days. Degeneration can slightly be seen. $\times 50$

Fig. 7 The same culture as in Figs. 4, 5 and 6, cultured for 31 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 25 days. Degeneration can clearly be seen. $\times 50$

Fig. 8 Another monolayer culture obtained from the same case of benign prostatic hyperplasia (No. 7501) as in Figs. 3-7, cultured for 14 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 8 days. $\times 50$

Fig. 9 The same culture as in Fig. 8, cultured for 19 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 13 days. Degeneration can slightly be seen. $\times 50$

- Fig. 10** The same culture as in Figs. 8 and 9, cultured for 24 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 18 days. Degeneration and exfoliation of cells can be observed. $\times 50$
- Fig. 11** The same culture as in Figs. 8, 9 and 10, cultured for 31 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 25 days. Degeneration and exfoliation can be seen. $\times 50$
- Fig. 12** Phase contrast photomicrograph of monolayer culture obtained from a case of prostatic carcinoma (No. 7705), cultured for 7 days in vitro. $\times 50$
- Fig. 13** Phase contrast photomicrograph of monolayer culture obtained from a case of prostatic carcinoma (No. 7705), cultured for 10 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. $\times 50$
- Fig. 14** The same culture as in Fig. 13, cultured for 14 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 7 days. Degeneration can be seen. $\times 50$
- Fig. 15** The same culture as in Figs. 13 and 14, cultured for 21 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 14 days. Degeneration can be seen. $\times 50$
- Fig. 16** The same culture as in Figs. 13, 14 and 15, cultured for 28 days and treated with testosterone ($0.1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 21 days. Degeneration can be seen. $\times 50$
- Fig. 17** Another monolayer culture obtained from the same case of prostatic carcinoma (No. 7705) as in Figs. 12–16, cultured for 10 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days. $\times 50$
- Fig. 18** The same culture as in Fig. 17, cultured for 17 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 10 days. Degeneration and exfoliation can be seen. $\times 50$
- Fig. 19** The same culture as in Figs. 17 and 18, cultured for 21 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 14 days. Degeneration and exfoliation can be seen. $\times 50$
- Fig. 20** The same culture as in Figs. 17, 18 and 19, cultured for 28 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 21 days. Degeneration can be seen. $\times 50$
- Fig. 21** Phase contrast photomicrograph of monolayer culture obtained from a case of prostatic carcinoma (No. 7509), cultured for 8 days in vitro. $\times 50$
- Fig. 22** The same culture as in Fig. 21, cultured for 14 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 6 days. $\times 50$
- Fig. 23** The same culture as in Figs. 21 and 22, cultured for 21 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 13 days. Degeneration can slightly be observed. $\times 50$
- Fig. 24** The same culture as in Figs. 21, 22 and 23 cultured for 32 days and treated with diethylstilbestrol ($1\mu\text{g}/\text{mg}$) for 24 days. $\times 50$

になると、おもに脂肪変性を起し崩壊消失する(図13~16)。

(3) diethylstilbestrol 低濃度群 1 μ g/ml 添加群では、成長は対照に比して遅く、対照より約1週間はやく初代培養開始2週目頃になると、おもに萎縮、変性を起し剝離する。脂肪変性は少ない(図17~20)。

(4) diethylstilbestrol 高濃度群 10 μ g/ml 添加群では、成長は対照に比して遅くまた変性剝離が一層著明である。この時期に培養細胞を EagleMEM のみの培養液にもどすと、脂肪変性を主とする対照群と同じ変化にもどった。

臨床経過においても細胞増殖度においても、他の3例と異なる経過をとった症例7509においては、diethylstilbestrol 1 μ g/ml の濃度の添加において、萎縮して細胞質が球形となった細胞がわずかにみられるの

みで、初代培養開始後32日目においても増殖を続けている(図21~24)。

以上を要約すると前立腺肥大症、前立腺癌ともに testosterone, diethylstilbestrol 添加群では、無処置対照群に比べて1週間ほどはやく細胞変性が始まり、細胞の成長も遅い。testosterone 添加では脂肪変性から細胞の崩壊消失が認められ、diethylstilbestrol 添加では主に萎縮、変性と細胞の剝離が認められた。

C 絶対成長価

1. 前立腺肥大症

前立腺肥大症4例における絶対成長価の平均値を表2に示す。無処置対照群はいずれも培養日数の増加とともに面積が増加したが、症例7419は培養18日目に、症例7501は31日目に、症例7503は23日目に面積が減少した。症例7704のみは他の例と異なり増加を続けた。testosterone 添加群と diethylstilbestrol 添加群は

Table 2 Absolute Growth Values of Cultures from Benign Prostatic Hyperplasia (cm²)

Case Number	Days in Culture	Control	Testosterone		Diethylstilbestrol	
			0.1 μ g/ml	0.5 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml
7419	5	27.1	/	46.3	/	56.7
	7	66.6		92.4		87.5
	11	100.4		170.9		4.0
	15	138.5		179.3		
	18	120.8		165.4		
	21	73.0		100.1		
	25	48.0		105.5		
7501	6	46.1	47.4	/	53.6	46.3
	11	85.9	90.5		107.5	81.6
	14	157.8	106.2		114.8	88.3
	19	136.6	140.3		66.7	38.4
	24	136.6	110.7		33.4	50.6
	31	136.1	79.9		41.2	31.6
7503	7	16.8	/	197.0	69.3	39.8
	11	58.5		120.5	30.0	80.0
	18	64.8		8.3	22.0	81.8
	23	11.0			11.3	
7704	7	51.3	106.3	/	14.5	/
	11	202.5	120.3		62.5	
	15	751.3	143.8		138.8	
	18	1093.5	210.0		284.3	
	22	1362.5	299.3		253.0	
	25	1987.5	220.8		273.5	

培養前立腺細胞への性ホルモンの影響

対照群に比べて面積の減少が早期より起っている。

2. 前立腺癌

前立腺癌4例における絶対成長価の平均値を表3に示す。無処置対照群はいずれも培養日数の増加とともに面積が増加した。症例7504は24日目、症例7509は39日目においても面積の増加を続けているが、症例7601は18日目に、症例7705は24日目に面積が減少した。testosterone 添加群では、症例7509において32日目まで面積の減少がみられなかったが、他の例では早期より減少した。diethylstilbestrol 添加群では、症例7509, 7705において面積の減少は遅くまでみられなかったが、症例7504, 7601においては面積の増加は非常に少なかった。

D 比較成長価

1. 前立腺肥大症

前立腺肥大症4例における比較成長価を図25~28に各症例ごとに示す。図25~27の3症例は、すべて上皮

様細胞と線維芽様細胞の混在であって testosterone 添加により成長価は対照群に比して低下していた。また diethylstilbestrol の添加により明らかに細胞増生は抑制された。しかし図28の症例7704においては、線維芽様細胞優位であって diethylstilbestrol の添加により成長価は低下したが、testosterone による影響はみられなかった。

2. 前立腺癌

前立腺癌4例における比較成長価を図29~32に各症例ごとに示す。

症例7504は、培養細胞型はほぼ上皮様細胞であって、図29のごとく testosterone (0.5 μ g/ml) と diethylstilbestrol (1 および 10 μ g/ml) の添加により対照群に比して著明に成長価が抑制された。しかし上皮様細胞優位から、線維芽様細胞優位にかわった diethylstilbestrol 10 μ g/ml 添加群では、培養2週間目を過ぎる頃より細胞増殖がはやまっている。

Table 3 Absolute Growth Values of Cultures from Prostatic Carcinoma (cm²)

Case Number	Days in Culture	Control	Testosterone		Diethylstilbestrol	
			0.1 μ g/ml	0.5 μ g/ml	1 μ g/ml	10 μ g/ml
7504	7	8.8	/	11.8	9.5	8.0
	11	15.3		15.5	10.0	8.5
	17	49.8		14.0	9.0	12.0
	24	75.3		7.8	0.8	20.0
7509	8	27.8	/	8.8	10.3	13.6
	11	53.1		15.3	18.3	28.0
	14	93.8		29.3	30.0	40.4
	21	97.5		51.7	63.2	51.6
	27	102.3		53.3	76.6	52.8
	32	84.9		44.3	115.6	50.6
7601	7	31.4	/	47.5	84.0	66.8
	12	200.6		224.3	190.0	93.8
	18	178.3		244.0	198.0	73.8
	21	116.1		123.0	128.8	64.5
7705	7	120.3	158.3	/	86.5	/
	10	316.9	226.5		124.1	
	14	577.9	169.8		151.1	
	17	630.1	159.1		181.4	
	21	673.1	116.9		205.6	
	24	550.0	102.0		277.5	
	28	467.0	86.0		334.4	

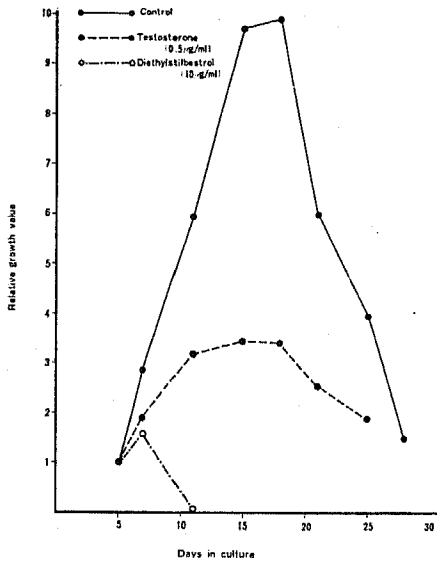


Fig. 25 Changes of relative growth value of culture from benign prostatic hyperplasia (No. 7419, Epithelial cells > Fibroblastic cells)

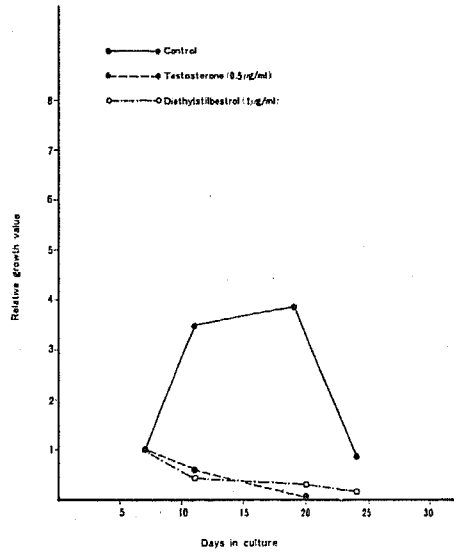


Fig. 27 Changes of relative growth value of culture from benign prostatic hyperplasia (No. 7503, Epithelial cells = Fibroblastic cells)

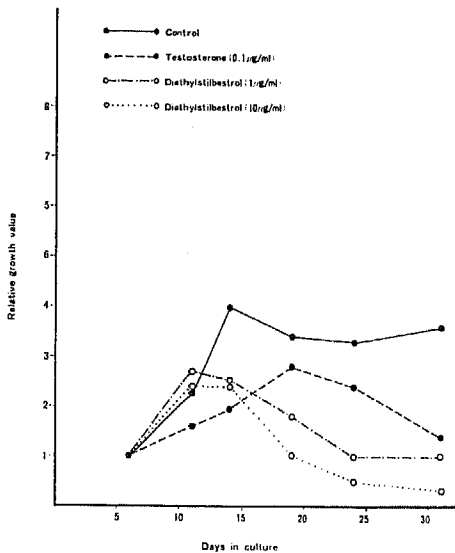


Fig. 26 Changes of relative growth value of culture from benign prostatic hyperplasia (No. 7501, Fibroblastic cells > Epithelial cells)

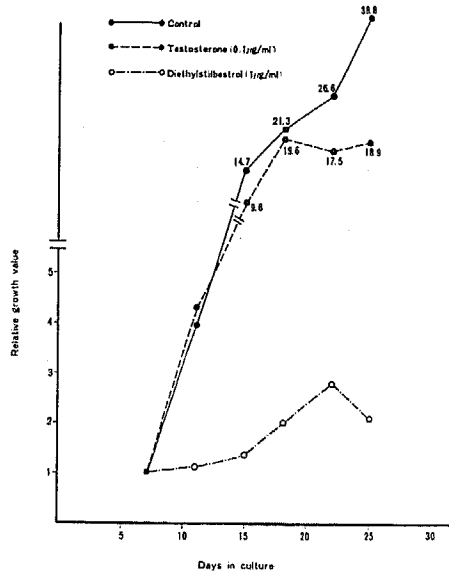


Fig. 28 Changes of relative growth value of culture from benign prostatic hyperplasia (No. 7704, Fibroblastic cell dominant type)

培養前立腺細胞への性ホルモンの影響

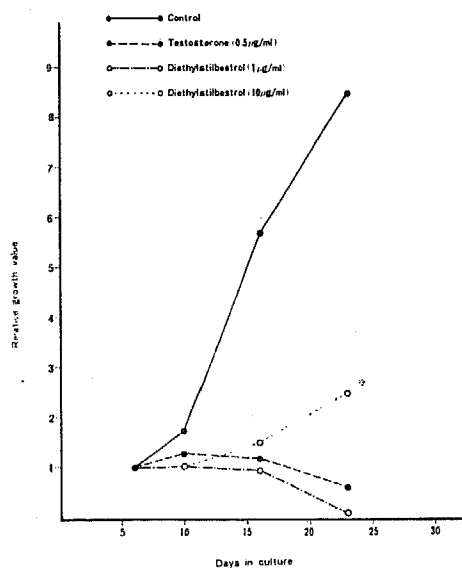


Fig. 29 Changes of relative growth value of culture from prostatic carcinoma (No. 7504, Epithelial cells dominant type)
* Epithelial cells changed to fibroblastic cells

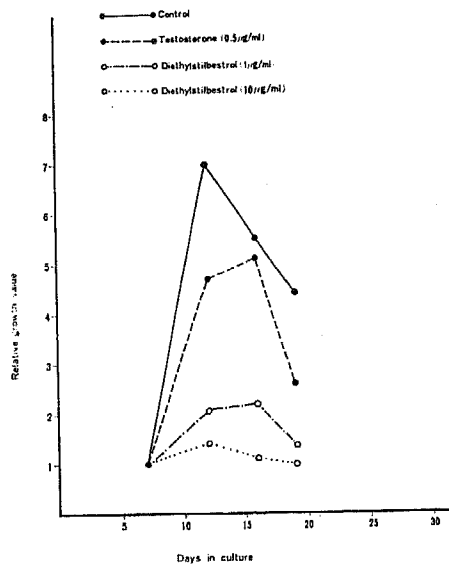


Fig. 31 Changes of relative growth value of culture from prostatic carcinoma (No. 7601, Epithelial cells > Fibroblastic cells)

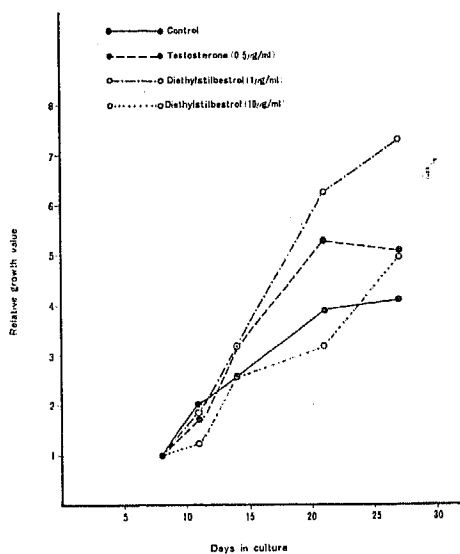


Fig. 30 Changes of relative growth value of culture from prostatic carcinoma (No. 7509, Epithelial cell dominant type)

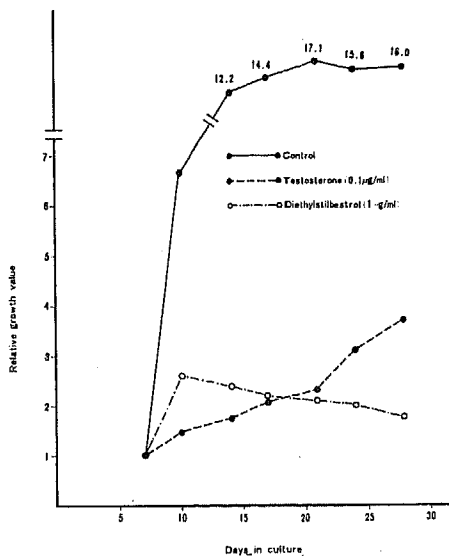


Fig. 32 Changes of relative growth value of culture from prostatic carcinoma (No. 7705, Epithelial cell dominant type)

症例7509は、培養細胞型は上皮様細胞であったが、図30のごとく testosterone (0.5 μ g/ml), diethylstilbestrol (1および10 μ g/ml)の添加による成長値の抑制はみられなかった。

症例7601は、培養細胞型は上皮様細胞が優位であったが線維芽様細胞も存在した。図31のごとく testosterone (0.5 μ g/ml)添加による成長値の抑制は軽度であったが、diethylstilbestrol (1および10 μ g/ml)添加による抑制は強くみられた。

症例7705は、培養細胞型は上皮様細胞であって、図32のごとく testosterone (0.1 μ g/ml), diethylstilbestrol (1 μ g/ml)添加による成長値の抑制が強くみられた。

以上4症例中1例は、testosterone, diethylstilbestrolの添加により比較成長値は抑制されなかったが、他の3例においては両ホルモンによりともに抑制された。抑制されなかった1例(症例7509)においては、臨床上においても抗男性ホルモン療法に反応せず6ヶ月後に癌死した。他の3例は臨床上も抗男性ホルモン療法に反応している。

Ⅳ 考 察

上述の結果に述べたように、今回の実験によって組織培養下における前立腺由来細胞の性ホルモンによる影響を観察し、前立腺肥大症4例、前立腺癌4例において無処置対照群と比較し、性ホルモン添加群は成長増殖が遅れ、早く変性が始まり細胞が消失する成績が得られた。ただし例外的に testosterone, diethylstilbestrolの両ホルモンにより何らの影響も受けなかった前立腺癌の1例と、線維芽様細胞優位の前立腺肥大症の1例で testosterone 添加による増殖度の抑制がみられなかったものがあった。それ以外の培養細胞において、testosterone では脂肪変性を中心とした細胞変性が、diethylstilbestrol では細胞が萎縮し、細胞質が球形となる所見と細胞の剝離が顕著であった。

増殖の抑制を計測する指標として、成長帯の面積測定を行ない絶対成長値と比較成長値を計算したが、培養下における細胞の増殖度の測定法は、黒田²⁾によれば面積測定法のほかいくつかの方法がある。今回用いた面積測定法は、最も古くから用いられている方法であるが、2次元的な面積の大きさによって測定する方法であるため、細胞数の増加によるものか、細胞の容積の増大によるものか判らない点、また細胞が分裂し

たものか、組織片より移住(migration)したものか判らない点、および細胞密度の差を把握できないなど、いくつかの欠点を持っている。密度の問題は、方法において述べたごとく拡大写真を撮影して測定したことにより、pile upなどの現象が存在しない時には、ある程度この欠点をおぎなうことができた。また細胞容積の問題については、1個の組織片培養においては細胞型が変わらないかぎり、組織片の近接部では細胞容積が小さく、周辺部に行くにしたがい大きくなる傾向を示したが、全体として同じ傾向を示し増殖度に大きな差を与えることはないと思われた。しかし今回の実験は、初代培養時の組織片単層培養法によって行ない、細胞を死滅させることなく培養しつつ同一組織片よりの増殖帯を測定したために、面積測定法以外に増殖度を測定する方法はなかった。従って細胞分裂か、細胞移住かを区別できず、今回の成績は両者を含んだものをあらわしていると考えるのが適当と思われるが、この両者を in vitro における細胞成長度と見なす場合、性ホルモン添加によって前立腺組織由来の培養細胞の成長が抑制されたと言うことができる。

以上の所見を考察する場合、近年しだいに分子生物学的に明らかになって来たアンドロゲンの前立腺組織に対する作用機序を参考にしなければならない。志田ら³⁾⁴⁾⁵⁾によればその概要は、第1階程として血中遊離 testosterone が前立腺上皮細胞の細胞質内非特異結合蛋白と結合することによる上皮細胞内への選択的とりこみ、第2階程として5 α -reductaseにより testosterone が5 α -dihydrotestosteroneとなり、第3階程として5 α -dihydrotestosterone は非特異結合蛋白とはなれ、特異蛋白(レセプター)と結合し5 α -dihydrotestosterone レセプター複合体が形成され、そのまま核内に進入しクロマチンのアクセプターと結合して、核酸合成が促進されホルモン効果が発現されるというものである。そして前立腺癌に対する抗男性ホルモン療法の作用機序は、間脳下垂体系を介しての抑制効果以外に、前立腺組織に対する直接効果も解明され、エストロゲン剤は5 α -reductase 活性阻害作用を有し、ゲスターゲン剤はレセプター-蛋白結合阻害作用を有することも明らかになった。以上の阻害作用は分化型の前立腺癌において認められるといわれている。

以上の作用機序にもとづいて考えれば、今回の実験において testosterone 0.1, 0.5 μ g/mlの添加は、成人男子血中 testosterone 値のほぼ100~500倍の濃度

の添加となるが、それにより細胞増殖の抑制のみでなく、細胞の変性も現われているところを見ると、ここには testosterone のホルモン作用でなくその毒性作用が表面に現われていると考えるのが妥当と思われる。しかしこの点に関しては異なる報告もある。Okada ら⁶⁾は HeLa 細胞は testosterone $1\mu\text{g/ml}$ の添加により増殖が抑制されるが、彼らがヒト前立腺癌より樹立した EB-33 なる上皮性細胞では、testosterone $1\mu\text{g/ml}$ 、または 5α -dihydrotestosterone $0.5\mu\text{g/ml}$ の添加においても増殖率に余り変化が起らないことを示している。西川ら⁷⁾は継代培養細胞において、前立腺癌由来細胞では testosterone $1\mu\text{g/ml}$ 濃度の添加においては、増進促進と DNA 合成の上昇を認め、濃度 $10\mu\text{g/ml}$ では前立腺肥大症、前立腺癌由来細胞とも増進抑制と DNA 合成の低下を認めており、これは toxic effect によると述べている。また Röhrl⁸⁾は前立腺組織片の血漿包埋法による初代培養時の増殖度を、著者と同様に面積測定法で測定し、androsterone の $12.5\mu\text{g/ml}$ または $25\mu\text{g/ml}$ の添加で、前立腺肥大症では 4 例中 1 例にわずかの増進促進を認めた。しかし前立腺癌では 6 例中分化度の高い 1 例で $50\mu\text{g/ml}$ の添加により成長が促進され、他の 2 例ではわずかに促進がみられたが、残りの 3 例では何らの影響も認められなかったと報告している。

また Brehmer ら⁹⁾は、継代培養を行なう時にホルモンを加え、細菌培養と同様な方法で増殖してくるコロニーを数えることにより、plating efficiency を測定し前立腺肥大症由来細胞においては testosterone $1\mu\text{g/ml}$ の添加で plating efficiency の低下が認められるが、前立腺癌由来細胞においては $10\mu\text{g/ml}$ においても低下は認められず、 $1\mu\text{g/ml}$ 以下ではむしろ増加していると報告している。この違いは、前立腺癌由来細胞には光学顕微鏡的にはわからないが、電子顕微鏡的には区別できる 1 つの細胞型が存在するからであると述べている¹⁰⁾。

一方、ヒト前立腺組織ではなく、SV-40 により transform された hamster の前立腺細胞をもちいた Wishnow¹¹⁾の実験では、 $25\mu\text{g/ml}$ の testosterone は世代時間を 20 時間から 30 時間に延ばし、 $50\mu\text{g/ml}$ では成長はほとんど抑制されたと報告している。また Ban ら¹²⁾は、酸フォスファターゼと蛋白含有量を測定することにより性ホルモンの影響を調べた。ヒト前立腺肥大症上皮より transform された細胞系 MA-160 においての実験で、testosterone, diethylstilbestrol

などの各種の性ホルモンの 1 または $10\mu\text{g/ml}$ の濃度の添加で、酸フォスファターゼ活性の低下と蛋白含有量の減少を認めている。transformed cell は、正常の前立腺肥大症と異なり、前立腺癌細胞に近い生物学的性状を有するに至るので、この結果はこれらの性ホルモンが、前立腺癌細胞の増殖を抑制するという 1 つの傍証になると思われる。

以上に引用した報告のごとく、組織培養下における前立腺由来細胞への testosterone の影響は、いまだはっきりした一定の結論に達していないが、志田ら³⁾の報告のごとく前立腺上皮に対するホルモン作用の発現物質が 5α -dihydrotestosterone であるとすれば、組織培養下において testosterone が細胞内にとりこまれ 5α -dihydrotestosterone となってホルモン作用を現わす以外に、toxic effect を現わし、細胞の増殖抑制や変性を起す所見が認められても理論的に矛盾しないと考えられる。

一方、エストロゲン系の diethylstilbestrol など添加した実験報告は、多くはないが結果は一致している。西川ら⁷⁾は diethylstilbestrol の添加により、前立腺肥大症由来の継代培養細胞において中等度の増進抑制と DNA 合成の低下を、また前立腺癌由来細胞においては、濃度の上昇とともに著しくなる増進抑制と DNA 合成の低下を認め、 $10\mu\text{g/ml}$ ではその所見が著明であったと報告している。また Brehmer ら⁹⁾は前述の plating efficiency により、前立腺肥大症、前立腺癌由来細胞ともに、diethylstilbestrol の 0.1 および $0.5\mu\text{g/ml}$ の濃度では影響がないものの、 $1.0\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度の添加では抑制効果が強く現われることを報告している。一方 Wishnow¹¹⁾はヒト前立腺ではなく hamster の SV-40 により transform された前立腺細胞の単層培養において、 17β -estradiol は $10\mu\text{g/ml}$ の濃度で世代時間を 20 時間から 30 時間に延ばし、細胞内酸フォスファターゼを減少させることを報告している。著者の実験においても、diethylstilbestrol は 1 および $10\mu\text{g/ml}$ の濃度で臨床上に急速な経過をとった前立腺癌の 1 例(症例 7509)をのぞき、前立腺肥大症、前立腺癌由来細胞ともに強い増殖抑制と、変性剝離をもたらしている。

以上の報告も今回の著者の実験も、diethylstilbestrol などのエストロゲン剤は、多少の差はあれ前立腺肥大症、前立腺癌由来細胞の両方に対して増殖の抑制をもたらすことで一致している。しかしそれ以外に細胞変性、剝離を促進していることが、今回の著者の

実験で明らかになった。これらの所見は、エストロゲンの細胞毒としての作用と、アンドロゲン代謝における5 α -reductase阻害作用が、ともに前立腺由来細胞の増殖抑制作用をすることを考えれば、理解することができる。

一方、前立腺癌の1例(症例7509)はin vitroでtestosteroneにもdiethylstilbestrolによっても増殖抑制を示さず、臨床的にも抗男性ホルモン療法に反応せず、急速な経過をとって死亡した例であって、生体内の癌細胞の性ホルモンの投与に対する反応をin vitroのモデル実験で推定することができる可能性を示唆しており、生検組織を培養して性ホルモンに対する反応をin vitroで測定し、治療法の決定ならびに予後の推定に、この方法を臨床的に応用することができると思われる。

V 結 語

前立腺肥大症4例、前立腺癌4例の生検組織を、組織片単層培養して、培養液にtestosterone propionate (0.1又は0.5 μ g/ml), diethylstilbestrol diphosphate (1および10 μ g/ml)を添加して無処置対照群と比較し、細胞の形態学的観察と細胞の増殖度の測定を行ない次の結果を得た。

1. testosteroneの添加により前立腺肥大症および前立腺癌のいずれにも細胞増殖の抑制と、脂肪変性を主とした細胞変性が認められた。変性所見は対照に比べて約1週間はやく、初代培養開始後2週間目頃より観察された。例外として前立腺癌(症例7509)の1例と、線維芽様細胞が優位を示した前立腺肥大症(症例7704)の1例は増殖抑制を示さなかった。

2. diethylstilbestrolの添加により前立腺肥大症および前立腺癌のいずれにも細胞増殖の抑制と、変性剝離が認められた。これは1 μ g/mlより10 μ g/mlの濃度でより顕著であった。変性剝離は対照に比べて約1週間はやく、初代培養開始後2週間目頃より観察された。ただし前立腺癌(症例7509)の1例は、増殖抑制が認められなかった。

3. testosterone, diethylstilbestrolの添加によって影響されなかった前立腺癌(症例7509)の1例は、臨床的にも非常に速やかな経過をとり、抗男性ホルモン療法に反応せず確定診断後6ヶ月にて痛死した。この症例は生体内の癌細胞の薬剤に対する反応が、in vitroの実験系にも診断できる可能性を示唆するものであると思われる。

(稿を終るにあたり御指導、御校閲を賜った柿崎勉教授、また直接御指導していただき、御校閲を賜った第1解剖学教室永田哲士教授に心より感謝いたします。また御協力下さった第1解剖学教室の各位にお礼申し上げます。)

<本論文の要旨は日本癌学会第36回総会(昭和52年10月12~14日、東京)において発表した。>

文 献

- 1) 柳沢 温：前立腺腫瘍の組織培養，第1報 培養細胞の形態学的観察. 日泌尿会誌，68：11月号掲載予定，1977
- 2) 黒田行昭：動物組織培養法. pp. 245-283, 共立出版，東京，1971
- 3) 志田圭三，島崎 淳，浦野悦郎，栗原 寛，高橋 溥朋，古谷信雄，田谷元祐：アンドロゲンの前立腺に対する作用機序に関する研究，第1編 前立腺組織におけるtestosterone代謝，特に5 α -reductionを中心とする分子生物学的解明. 日泌尿会誌，63：14-26，1971
- 4) 志田圭三，島崎 淳，浦野悦郎，栗原 寛，高橋 溥朋，古谷信雄，田谷元祐：アンドロゲンの前立腺に対する作用機序に関する研究，第2編 エストロゲンのtestosterone-5 α -reduction抑制効果. 日泌尿会誌，63：27-42，1971
- 5) 志田圭三，島崎 淳，浦野悦郎，伊藤善一，古谷信雄：前立腺癌抗アンドロゲン療法の再検討. 癌の臨床，20：859-870，1974
- 6) Okada, K., Laudenbach, I. and Schroeder, F. H.: Human prostatic epithelial cells in culture: Clonal selection and androgen dependence of cell line EB-33. J. Urol., 115: 164-167, 1976
- 7) 西川源一郎，秋元成太，川井 博，矢島権八，石河園子，浅野伍朗，福土勝成：前立腺の組織培養，第3報 前立腺肥大症および癌由来細胞の継代培養時における性ホルモンの影響. 第65回日本泌尿器科学会総会予稿集，161頁，1977
- 8) Röhrl, L.: Prostatic hyperplasia and carcinoma studied with tissue culture technique. Acta Chir. Scand., suppl. 240: 69-88, 1959
- 9) Brehmer, B., Marquardt, H. and Madsen, P. O.: Growth and hormonal response of cells derived from carcinoma and hyperplasia of the prostate in monolayer cell culture. A

possible in vitro model for clinical chemotherapy. J. Urol., 108 : 890-896, 1972

- 10) Brehmer, B., Rieman, J. F., Bloodworth, J. M. B. Jr. and Madsen, P. O. : Electron microscopic appearance of cells from carcinoma of the monolayer tissue culture. Urol. Res., 1 : 27-31, 1973
- 11) Wishnow, R. M. : The effect of sex hormones on the growth of SV-40 transformed hamster prostatic cells. In Vitro, 6 : 385, 1971
- 12) Ban, R. W., Cooper, J. F., Imfeld, H. and Foti, A. : Hormonal effect on prostatic acid phosphatase synthesis in tissue culture. Inv. Urol., 11 : 308-311, 1974

(52. 10. 7 受稿)