
 原 著

AFP 産生胃癌細胞株(FU 97)の生物学的特性に関する検討

奈良県立医科大学第1外科学教室

松田 雅彦

BIOLOGICAL BEHAVIOR OF AN ALPHA-FETOPROTEIN-PRODUCING
GASTRIC CANCER CELL LINE (FU 97)

MASAHIKO MATSUDA

First Department of Surgery, Nara Medical University

Received February 14, 2000

Abstract: A new cell line, designated as FU 97, was established from a 66-year-old gastric cancer patient with a high serum level of α -fetoprotein (AFP). This cell line produced a large amount of AFP in the conditioned medium as measured by radioimmunoassay (RIA), and AFP production in situ was also demonstrated by immunohistochemical study. The population doubling time was 95 hours. The cultured cells were positive for tumorigenicity in athymic nude mice and the histological feature of the xenografted tumor was similar to that of the tumor primarily isolated from the patient. The amount of AFP in the xenografted mouse serum, as measured by RIA, increased with tumor growth. In collagen gel matrix, cultured cells grew with medullary architecture, and chemosensitivity test was achievable. FU 97 is considered to be an AFP-producing gastric cancer cell line and will provide a useful tool for the study of the production and secretion of AFP from cells, and also to elucidate the biological activities of AFP.

(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 51, 79~89, 2000)

Key words: α -fetoprotein, cultured cell line, gastric cancer, collagen gel culture

緒 言

α -fetoprotein (AFP)は、1962年 Tatarinov¹⁾により胎児や原発性肝癌患者の血清中に発見された糖蛋白で、原発性肝癌や卵黄嚢癌 yolk sac tumor などの診断やモニタリングに用いられてきた。近年、これら以外の疾患の患者血清中にも正常範囲を越える AFP が検出されることが明らかとなり、中でも1970年の Bourreille²⁾らの報告以来、AFP産生胃癌に関する多くの報告がなされてきた。

AFP産生胃癌は臨床的に発見時すでに進行している症例が多く、高率に肝転移を伴っていることから、極め

て悪性度の高い胃癌としてその生物学的特性や遺伝子異常などについて多くの報告が認められている³⁻⁹⁾。著者の教室でもAFP産生胃癌のヌードマウス移植系を用いて、皮下移植腫瘍が実際にAFPを産生分泌することや、脾臓内移植により高率に肝転移を形成することなどを報告してきた¹⁰⁻¹⁴⁾。

一方、胃癌培養細胞の樹立については、CEAやCA19-9などの腫瘍マーカー産生株を含め多数報告されている¹⁵⁾。しかしながら、AFP産生胃癌に関しては3株の報告を認めるのみであり¹⁶⁻¹⁸⁾、さらに、長期にわたりAFP産生能が継代維持されている報告は1株を認めるのみである¹⁸⁾。

本研究では、手術により採取した切除標本より培養細胞株の樹立を試みた結果、その継代化に成功したので、樹立株のプレート培養およびヌードマウス皮下移植系における性状と特性について検討した結果について述べる。さらに、より *in vivo* に近い培養系として近年注目されているコラーゲンゲル内三次元培養での成績についても報告する。

実験材料および方法

1. 患者のプロフィール

患者は66才の女性で、胃前庭部に肉眼型3型の進行胃癌を指摘され、術前血清AFP値は2266 ng/mlと上昇していた。1994年9月12日手術施行、手術所見では肝転移、腹膜播種は認めなかったが、著明なリンパ節転移と膈へ浸潤があり、幽門側胃を含め膈頭十二指腸切除術が施行された。胃原発巣は組織学的に poorly differentiated adenocarcinoma で、壁深達度はss, ssINFB, ly 3, v 0と診断された。術後血清AFP値は56.7 ng/mlまで低下したが、3ヶ月目に806.9 ng/mlと再度上昇したため、5FU, MMCによる化学療法を開始した。化学療法後、血清AFP値は一旦4.6 ng/mlまで低下したが、9ヶ月後には再度上昇傾向を認めた。また、同時期に皮膚転移と肝転移が指摘され、化学療法を行うも効なく術後23ヶ月目に癌性腹膜炎、びまん性肺転移のため永眠された。

2. 初代およびプレート継代培養

培養液はDulbecco変法Eagle培地(DMEM, 日本)に、10% fetal bovine serum(以下FBS), penicillin-G

(明治製薬)100 IU/ml, streptomycin(明治製薬)100 μ g/ml 及び insulin(SIGMA, USA)10 μ g/ml を添加したものをを使用した。

初代培養は患者の手術標本より無菌的に癌組織を採取し、剃刀で細切した後、0.1% コラゲナーゼを含む培地で37°C, 20時間処理し、DMEM培地を用いて培養を開始した。継代はTrypsin-EDTA(GIBCO, USA)を加え、細胞を単離、1000 rpm, 5分間遠沈後、50 mm² flask (CORNING, USA)を用いて行った。株化された腫瘍細胞株をFU 97と命名した。今回の実験には増殖が安定した後の継代30-40代目の細胞を用いた。プレート培養における増殖細胞の状態は随時、位相差顕微鏡で観察した。

3. AFP免疫組織染色

AFPの存在を確認するため免疫組織染色を行った。ガラスプレート上で増殖させた細胞をパパニコロー法で固定し、抗ヒトAFPウサギポリクローナル抗体(ICN ImmunoBiologicals)を一次抗体とした酵素抗体法(ABC法, VECTASTAIN ABC kit(VECTOR LABORATORIES, USA))を用いて染色した。すなわち、培養細胞をPBSで洗浄後、95%エタノール・エーテル等量混合液でover night処理して固定し、70%, 50%のエタノール、次いで蒸留水で洗浄後0.3% H₂O₂加メタノールを加えた。10分間のブロッキング後、200倍希釈の一次抗体を用い室温で30分間反応させ、PBSで洗浄した後、二次抗体(抗ウサギ・ヤギIgG抗体)と室温で30分間反応させ、PBSで洗浄し、0.03% H₂O₂を含む0.05% 3, 3'-diaminodenzidine \cdot 4 HCl(DAB)を溶液と約1分間反応させ発色させた。流水で洗浄後、脱水し、キシレンで

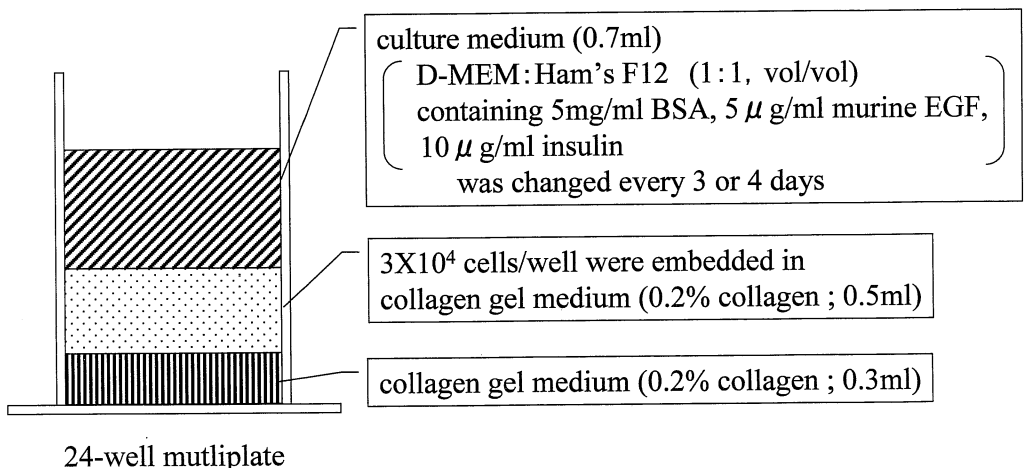


Fig. 1. Schema of cell culture in collagen gel matrix.

脱アルコールを行いEUKITT(O. Kindler, Germany)にて封入した。

4. ヌードマウス皮下移植および血漿 AFP の測定

5週齢ヌードマウス BALB/cA Jcl-nu の背側皮下に 1.0×10^7 の腫瘍細胞を注射して移植し、腫瘍形成能を検討した。形成された皮下腫瘍は、HE染色を行って組織像を観察し、癌細胞の生着の有無を確認した。一部の皮下腫瘍に対しては、前述のごとく酵素抗体法(ABC法, VECTASTAIN ABC kit(VECTOR LABORATORIES, USA))を用いてAFP免疫組織染色を行った。

腫瘍形成後のヌードマウス血漿AFP値の測定は西和田¹¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、ヌードマウスの尾静脈から経時的にヘマトクリット管に採血し血漿を分離後、Radioimmunoassay(RIA, Ab beads AFP '栄研', 栄研化学株式会社)でAFP量を測定した。

5. コラーゲンゲル内培養

コラーゲンゲル内培養は岩井¹⁹⁾の方法を用いて行った。すなわち、コラーゲンはラットの尾の腱から採取し、酢酸に溶解したコラーゲン液を希塩酸中で透析した後、凍結乾燥して⁶⁰Co- γ 線照射滅菌して用いた。

プラスチック上に単層状に増殖した培養細胞をトリプシン液(0.3% trypsin, 0.03% EDTA, 0.02 M PBS)で処理して集め、 3×10^4 個の細胞をコラーゲンゲル内包埋培養に用いた。包埋培養はFig. 1に示したように24 wellのプラスチックプレート(MICROPLATE 24 Well, IWAKI GLASS, JAPAN)に0.3 mlのコラーゲン培地を敷き、37°C, 10分間保温して固め、その上層に0.5 mlのコラーゲン培地に懸濁した細胞を重層した。さらにその上に0.7 mlの無血清培地(BSA培地: Dulbecco変法Eagle培地とFamF12を1:1で混合した培養液に5 mg/ml bovine serum albumin(BSA Fraction V; SIGMA, USA), 5 μ g/ml マウス Epidermal growth factor(宝酒造), 10 μ g/ml insulin(SIGMA, USA), 100 IU/ml penicillin-G, 100 μ g/ml streptomycinを添加)を加えた。培養液は3-4日毎に新しく交換した。コラーゲン培地は0.2%コラーゲンを含むBSA培地を使用した。培養細胞の状態はプレート培養と同様に位相差顕微鏡で観察した。形成されたコロニーの状態を観察するためホルマリン固定後パラフィン包埋切片を作成しHE染色を行った。

6. 細胞の増殖とAFP産生量の測定

3×10^4 個の細胞を24 wellのプラスチックプレート(MICROPLATE 24 Well, IWAKI GLASS, JAPAN)を使用してゲル内またはプレート上で培養した。培養液を3日毎に交換し、AFPの産生量を測定するためにその

培養上清を-20°Cに保管した。増殖曲線作成のためそれぞれの日に細胞を採取し細胞数を測定した。プレート培養の培養細胞は培地を除去後PBSで洗浄し、トリプシン処理した後0.5%トリパンブルーを加え顕微鏡下で非染色細胞を生細胞として計数した。コラーゲンゲル培養では岩井¹⁹⁾の方法を用い、培養細胞を含むゲルを0.1%コラーゲナーゼで処理した後、1000 rpm 5分間遠沈して細胞を集め、0.1%クリスタルバイオレット(0.1%クエル酸中)中でホモジナイズし、染色された核数により細胞数を推定した。

AFP産生量の測定は上記の培養上清をRadioimmunoassay(RIA, Ab beads AFP '栄研', 栄研化学株式会社)で測定した。

7. Western blot による AFP の検索

培養細胞および培養上清、ヌードマウス血清に1/10当量のsample buffer(10% SDS, 1%メルカプトエタノール, 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6)を加えて100°C, 3分間加熱し泳動sampleとした。SDS-PAGE電気泳動は5-20% linear gradient gel(AE-6000, バジエル, SPG-520 L, ATTO Corp. Japan)を用いた。泳動蛋白はクリアプロットP膜(ATTO Corp. Japan)に転写し抗ヒトAFPウサギポリクローナル抗体(ICN Immuno Biologicals)を用いて前述の酵素抗体法(ABC法, VECTASTAIN ABC kit(VECTOR LABORATORIES, USA))により検索を行った。AFP markerとしてヒト胎盤由来のAFP(コスモ・バイオ, Japan)を使用した。

8. RT-PCR による AFP mRNA の検索

AFPのmRNAの検出は山田²⁾の方法に準じて行った。すなわち、プレート培養の培養細胞からRNA sol Bを用いてtotal RNAを採取し、AFP specific primerを用いてRT-PCRを行った。specific primerとして(PAF 1, GCTGACATTATATCGGACA; PAF 2, CTCTTCAGCAAAGCAGACTT)を用いた。

9. プレート培養およびコラーゲンゲル内培養における抗癌剤感受性試験

抗癌剤: 抗癌剤は5-フルオロウラシル(5FU), シスプラチン(CDDP), マイトマイシンC(MMC), アドリアマイシン(ADR)の4種類(いずれもKYOWA, Japan)を使用した。薬剤濃度は臨床投与時の最高血中濃度(peak plasma concentration; ppc)を指標として 5^1 ppc~ 5^{-5} ppcの間で5倍希釈して用いた。

プレート培養: $1.5 \sim 2 \times 10^5$ cells 個/wellの細胞をまき、3日毎に培地を交換しながら培養した。培養液は前述の無血清培地(BSA培地)を使用した。培養後6日目に種々の濃度の抗癌剤を加え46時間処理した。ここで37

kBq/well の ^3H -thymidine を加え 2 時間培養後培地を除去, ここに $50\ \mu\text{l}$ の 2 N NaOH を加えて細胞を溶解, final 10 % TCA で処理して酸不溶分画を集め再び NaOH で溶かした後シンチレーターを加えて液体シンチレーションカウンターで ^3H -thymidine の取り込みを測定した.

コラーゲンゲル内培養: プレート培養と同様に培養を行った後, 培養後 6 日目に種々の濃度の抗癌剤を加えて 46 時間処理. 同様に 37 kBq/well の ^3H -thymidine を加え 2 時間培養後培地を除去, ここでゲルに $20\ \mu\text{l}$ の酢酸を加え 37°C , 20 分保温してゲルを溶かし 1000 rpm, 5 分間遠沈して細胞を回収し pellet を作成した. この pellet に $50\ \mu\text{l}$ の 2 N NaOH を加えて細胞を溶解, final 10 % TCA で処理してプレート培養と同様に ^3H -thymidine の取り込みを測定した.

成 績

1. FU 97 株の形態と増殖特性

①プレート培養

プレート培養では腫瘍細胞は敷石状に増殖し, 位相差顕微鏡による観察では, 形態的に, 核は比較的大きな円形で細胞質内には小顆粒が認められた(Fig. 2, A). また, 増殖速度の検討では倍加時間は約 95 時間であった(Fig. 3).

②ヌードマウス皮下移植

ヌードマウス皮下移植後 1.5 ヶ月頃より腫瘍が形成されはじめ, その後徐々に増大し 3 ヶ月頃に腫瘍長径が約 2 cm となった. 摘出した皮下移植腫瘍の HE 染色像では, 患者の胃原発巣と極めて類似した充実型の低分化腺癌像を示した(Fig. 2, C, D).

③コラーゲンゲル内培養

コラーゲンゲル内培養における細胞の形態は, 初期にはコロニーをつくりながら増殖し, 約 2 週間の培養で球形及び, 索状構造が観察された(Fig. 2, B-1). 索状構造を組織学的に検討した結果, 内部には管腔形成等はみられず充実性に増殖していることが判明した(Fig. 2, B-2). コラーゲンゲル内培養における増殖はプレート培養と同様な増殖曲線を示し, 倍加時間は約 93 時間であった

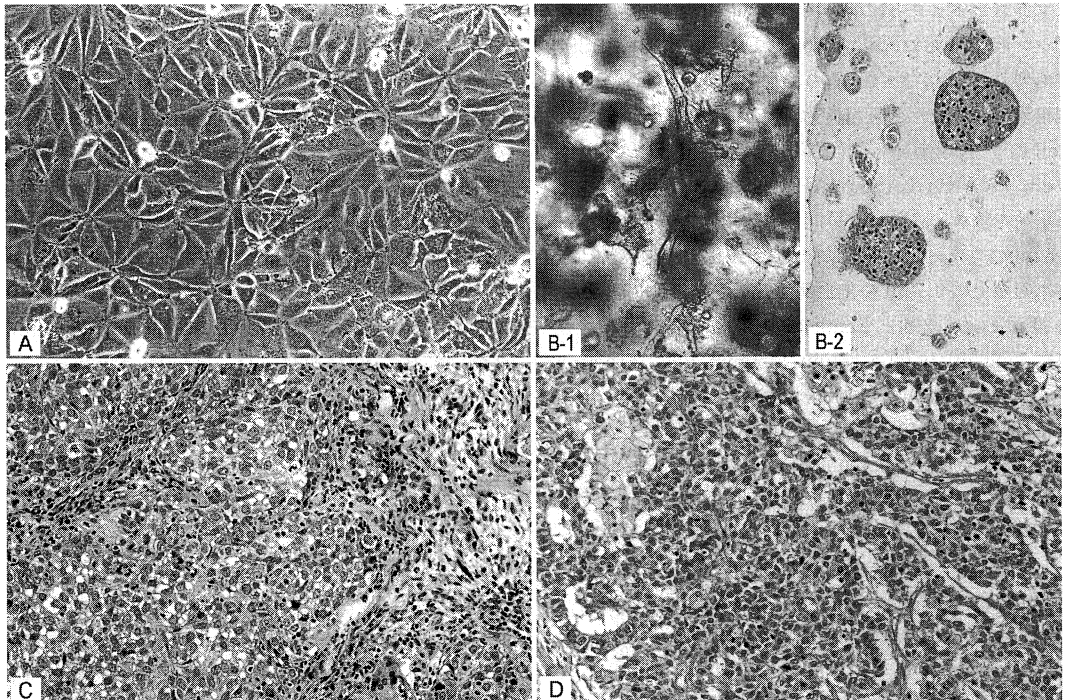


Fig. 2. Morphology of FU97 cells, xenografted tumor and primary tumor. A : Phase-contrast microphotograph of FU97 cells on a plastic plate. B-1 : Phase-contrast microphotograph of FU97 cells in collagen gel matrix. B-2 : Morphology of FU97 cells in collagen gel culture. H&E X40. C : xenografted tumor. H&E X40. D : primary tumor H&E X40.

(Fig. 3).

2. AFP 産生能の検討

①プレート培養

プレート培養における培養上清中および細胞中の AFP を Western 法にて検討した結果, AFP marker とほぼ同様に約 80 kDa 付近をメインとした複数の band が観察された(Fig. 4, A). また, RT-PCR による

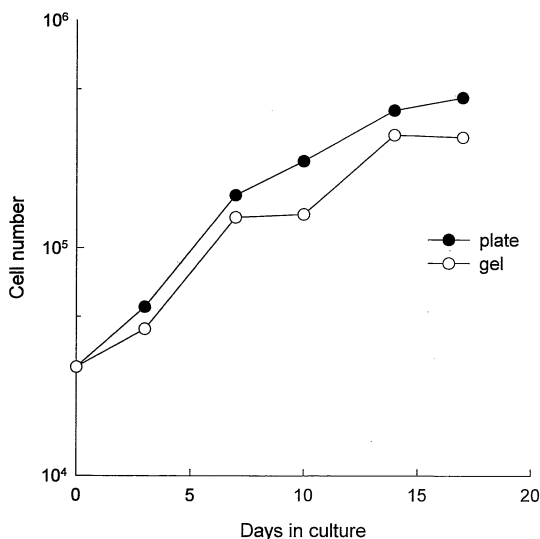


Fig. 3. Proliferation of FU97 cells.

mRNA の検討では設定した primer で検出が予想される 357 bp 付近に band が観察され AFP-mRNA の存在が確認された(Fig. 4, B). さらに腫瘍細胞に対し AFP 免疫組織染色を行った結果, 細胞間で染色強度に差はみられるものの細胞質に染色陽性顆粒を認めた(Fig. 5, A).

プレート培養上清中 AFP 濃度の経時的变化をみると, 腫瘍細胞数の変化とはほぼ同様な推移を示した(Fig. 6, A).

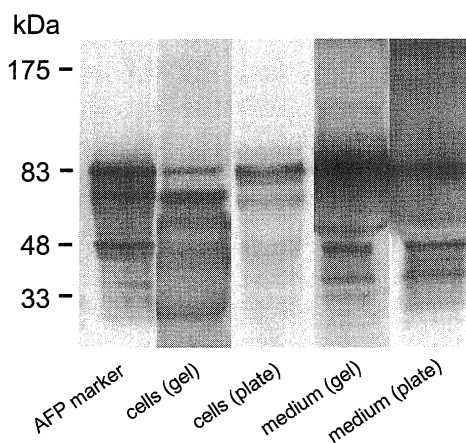
②ヌードマウス皮下移植

ヌードマウス皮下移植腫瘍の AFP 染色像では原発腫瘍の染色像と同様に, 細胞間で染色程度の差はみられるものの細胞質が染色された(Fig. 5, B, C). また腫瘍形成後のヌードマウス血漿中 AFP 値を経時的に観察した結果, 腫瘍の増大につれ血漿 AFP 値も漸次増加を示し, 血漿 AFP 値の倍加時間は 12.7 日であった(Fig. 6, B).

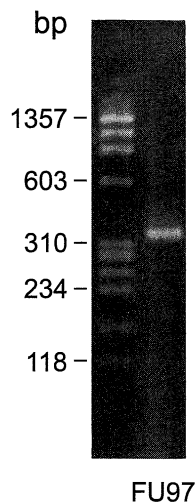
③コラーゲンゲル内培養

コラーゲンゲル内培養における培養上清中および細胞中の AFP を Western 法にて検討した結果, プレート培養と同様に培養上清および細胞内に AFP を認めた(Fig. 4, A). またゲル培養の培養上清中 AFP 値を経時的に測定した結果, 細胞増殖とともに上昇したがプレート培養とは異なり細胞増殖がプラトーになっても上昇し続け 23 日目頃から減少した(Fig. 6, A).

3. 抗癌剤感受性試験



A



B

Fig. 4. Detection of AFP in the culture supernatants and cultured cell extract of FU97 cells by western blot analysis using rabbit polyclonal antibody to human AFP and ABC staining system. B: Expression of mRNA for AFP in RNA extracted from cultured FU97 by RT-PCR using specific primers.

コラーゲンゲル内培養およびプレート培養における抗癌剤感受性試験の結果を Fig. 7 に示す。コラーゲンゲル培養ではなだらかな曲線を描いて濃度依存性に抑制効果が増大し 1 ppc の濃度で 5 FU 以外の薬剤で 15% 以下になった。ADR, CDDP, MMC の IC₅₀ はそれぞれ, ADR ; 1.3×10^{-1} , CDDP ; 3.0×10^{-2} , MMC ; 4.6×10^{-3} で MMC が最も効果が大きく、次いで CDDP であり

ADR は効果が小さかった。プレート培養では 0.04 ppc 以下の濃度ではゲル培養での抑制効果と同様の効果を示したが 0.04 ppc より高い濃度の処理では細胞の傷みによるためかばらつきが目立った。0.002~0.04 ppc の 5 FU 処理では ³H-thymidine 取込み量が薬剤非処理細胞の取込み量より増加した。

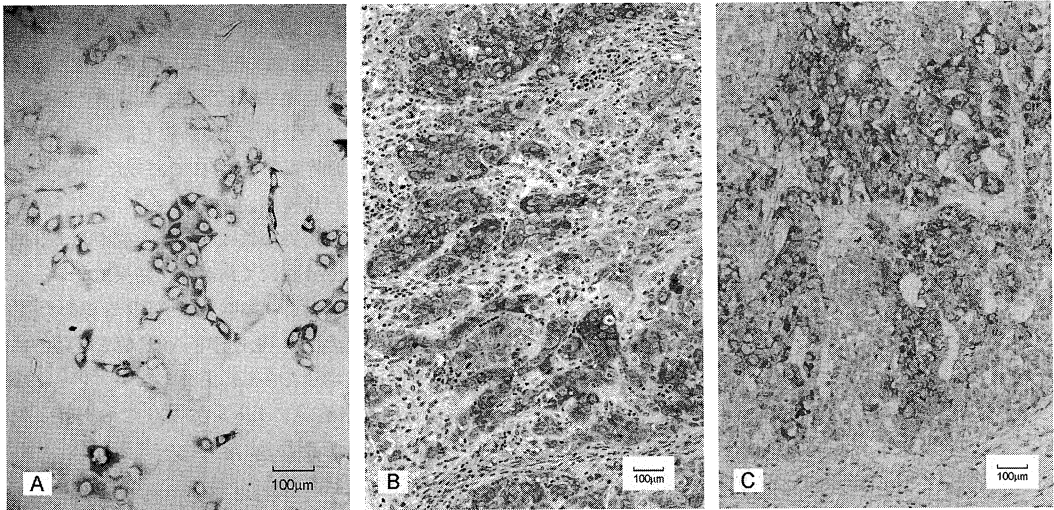


Fig. 5. Immunohistochemical analysis of FU97 cells. A : cells culture on a plate. B : xenografted tumor, C : primary tumor.

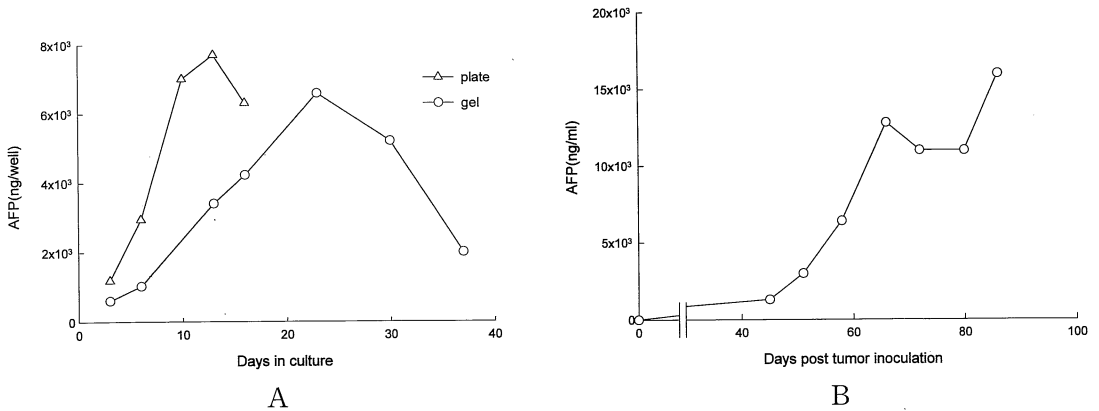


Fig. 6. AFP production of FU97 cells. A : in conditioned medium, B : in serum of xenografted mice.

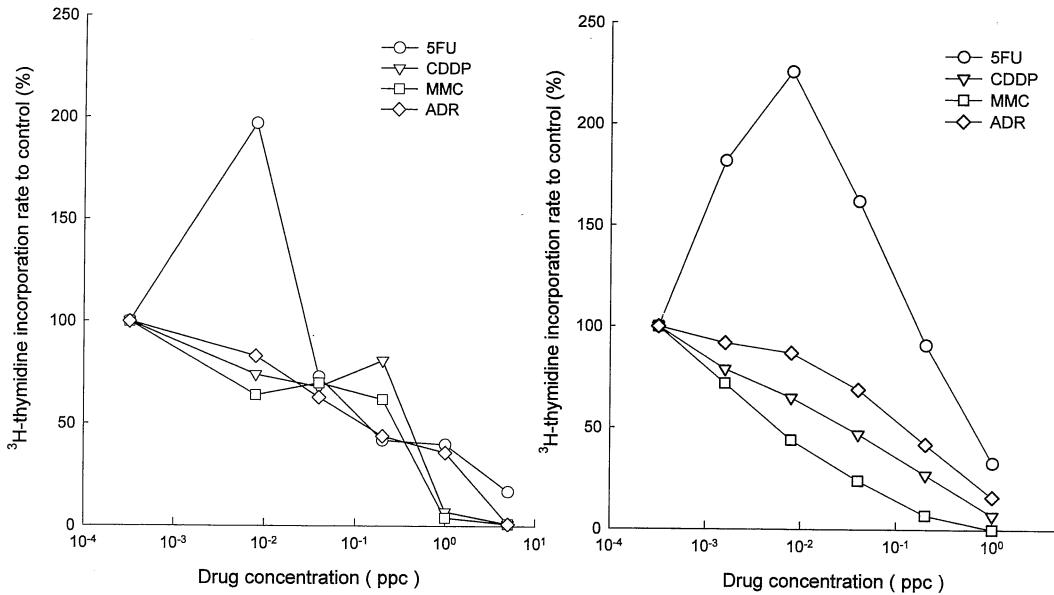


Fig. 7. Result of the chemosensitivity test. A: in plate culture, B: in collagen gel culture.

考 察

AFP産生胃癌は、1970年 Bourreille²⁾らが初めて報告して以来、多数の症例が認められ、全胃癌におけるその頻度は1.2-13.5%と報告されている³⁻⁷⁾。その臨床病理学的特徴としては、高率に異時性もしくは同時性の肝転移を伴い予後不良であることが挙げられる^{21,22)}。AFP産生胃癌の生物学特性に関しては、当教室ではこれまで、ヌードマウス移植系を用い種々の検討を行ってきた。江崎¹⁰⁾らはAFP産生胃癌がヌードマウス皮下腫瘍においても実際にAFPを産生、分泌し、ヌードマウスの血漿AFP値も皮下腫瘍の発育とともに上昇することを証明した。また、AFP産生胃癌は非産生癌と比較し、ヌードマウス皮下への着生率が高く、脾臓内移植により高率に肝転移を形成することから、より悪性度の高い腫瘍であることが判明している¹⁰⁻¹⁴⁾。しかし、*in vivo*における実験のみでは宿主動物の影響を完全に排除できず、種々の処理に対する宿主動物のコンプライアンスの問題もあって*in vitro*での細胞株の樹立が望まれるところであった。今回、著者は術前より血清AFP高値を示した進行胃癌患者の胃原発巣切除標本より胃癌細胞を分離し細胞株化に成功したので、この細胞の生物学的特性を*in vitro*, *in vivo*およびコラーゲンゲル内において検討した結果を示すとともに、抗癌剤感受性についても検討したので報告する。

今回細胞株の樹立を試みた胃原発巣は組織学的に大部分が低分化腺癌像を呈し、明るい胞体を持つ細胞が散見された。これまでの組織学的検討の報告では、Kodama²³⁾らはAFP産生胃癌の特徴的所見として、明るい細胞質と好酸性顆粒の存在、細胞の多形性および髄様もしくは乳頭管状の増殖形態を指摘した。一方、Ishikura^{24,25)}らはAFP産生胃癌の一部に肝細胞癌と類似した組織像を呈する症例の存在を示し、hepatoid adenocarcinomaという呼称を提唱した。さらに、Motoyama²⁶⁾らはAFP産生胃癌はその組織像から、hepatoid type, york sac tumor like type および fetal gastrointestinal type の3つに亜分類されると報告した。本症例は形態的にMotoyamaらのいうhepatoid typeとfetal gastrointestinal typeが混在していた。ヌードマウス皮下移植腫瘍の組織像は原発巣とほとんど同じであったが、より強い髄様性の形態を呈していた。

AFP産生胃癌細胞株の樹立に関する報告は、著者の検索した限りではTerashima¹⁹⁾らが肝転移巣から樹立したISt-1株、Kawaguchi¹⁷⁾らが原発巣から樹立したA-2株およびSekiguchi¹⁸⁾らがリンパ節転移巣から樹立したTakigawa株の3株の報告をみるのみであった。今回樹立したFU 97株はプレート培養では、細胞は紡錘形で比較的大きな円形の核を有し、細胞質内に小顆粒を認め、数石状に増殖した。形態的には上述のISt-1株やTakigawa株と類似していた。FU 97細胞のプレート培養での

倍加時間は95時間であった。これまでの報告例ではIST-1株が31時間、Takigawa株が182時間でありFU97はこれらの中間であった。A-2株では倍加時間の記載はないが緩徐であったと報告されている。AFP産生胃癌は臨床的には高い増殖活性を持つと考えられているが、このように培養系においては比較的緩徐な増殖を呈している。このことからin vivoでの増殖に特異的な因子の検討などが今後必要であると考えられる。一方、近年in vivoに近い培養系として注目されているコラーゲンゲル内三次元培養系を用い、FU97細胞の増殖形態を観察したところ、培養初期には球状のコロニーを形成し、次第に棍棒状に伸長してくることが判明した。顕微鏡的に観察すると管腔形成のない充実性の増殖を認め、後述のヌードマウス皮下移植腫瘍の組織像と類似していた。また、FU97細胞をヌードマウス皮下に移植したところ腫瘍を形成し、造腫瘍能を有することが判明した。他のAFP産生胃癌株であるIST-1株とA-2株では造腫瘍能の検討はなく、Takigawa株では腫瘍細胞単独では造腫瘍能を認めず、細胞をplastic plate上で皮下に移植してはじめて腫瘍を形成したと報告されている。以上より、FU97細胞は腫瘍細胞単独で造腫瘍能を認める有用なAFP産生胃癌細胞株であると考えられる。

AFP産生能の検討では、RT-PCR法によりmRNAレベルで、また、プレート培養およびコラーゲンゲル培養の培養上清内と細胞内でWestern法により蛋白レベルでのAFPの発現を確認した。さらにプレート培養において経時的に培養上清中のAFP値を測定したところ細胞の増殖とともに次第に増加した。当教室においてこれまで報告してきたヌードマウス皮下移植系での検討の結果でも、マウスの血漿AFP値は皮下腫瘍の増殖を良く反映し、腫瘍細胞数と相関していた¹¹⁾。このことから、AFP産生胃癌細胞はin vivoおよびin vitroにおいてほぼ安定したAFP産生、分泌能を有していると考えられた。FU97細胞はコラーゲンゲル内培養においてもプレート培養同様、細胞の増殖とともに培養上清中のAFP値は上昇した。プレート培養では増殖がプラトーになる14日目からAFPは次第に減少したが、コラーゲンゲル内培養ではプラトーになってからもAFPは分泌され23日目頃より低下した。このようにコラーゲンゲル内培養では比較的長期にわたりAFP産生能が維持されると思われた。さらに、FU97細胞は当教室でこれまで報告してきたヌードマウス皮下継代AFP産生胃癌株同様、皮下腫瘍の発育とともにマウスの血漿AFP値も上昇した。以上のようにFU97細胞は、プレート培養、コラーゲンゲル内培養およびヌードマウス皮下移植においてAFP

を産生、分泌することが判明した。一方、抗AFP抗体を用いた免疫染色を、患者の胃原発巣、プレート培養細胞およびヌードマウス皮下移植腫瘍に対し行った結果、いずれにおいてもAFPは細胞質にcoarse granular depositとして認められた。染色性は個々の細胞間にばらつきを認めたが、Takigawa株でも同様の結果が報告されている。今後、AFP染色性の細胞間不均一性については樹立した細胞株のクローニングを含めたさらなる検討が必要であると考えられる。

近年、癌患者への告知の普及や医療経済学的見地から適正な抗癌剤の使用が望まれるところとなってきた。つまり、抗癌剤の使用にあたり、あらかじめどの薬剤に感受性があるのかを検討することが理想であると考えられる。この抗癌剤感受性試験についてはin vivo, in vitroでの様々な検討がなされてきた。in vivo法ではヌードマウス法²⁷⁾や腎被膜下移植を利用したSRC法²⁸⁾(subrenal capsule assay)などが開発され、その実用性が検討されてきた。しかし、ヌードマウス法では移植生着率が低く、費用がかかり、結果を得るまで時間がかかるため現実的ではなく、SRC法は必ずしも増殖する場での薬剤の影響をみておらず、腫瘍以外の宿主反応が大に加わっており正確とはいえない。in vitro法ではSDI法²⁹⁾(succinic dehydrogenase inhibition assay)やそれを改良したMTT法³⁰⁾(methylthiazol tetrazolium bromide assay)などが実際に臨床応用されるようになりつつあるが、in vivo法より簡便で経費が低く短時間で判定が可能であるというメリットはあるものの、培養法が二次元培養であり、腫瘍塊を形成しながら増殖する腫瘍では厳密な意味で正確に評価可能かどうか議論のあるところである。そこで、より生体に近くin vivoに類似した組織培養法であるコラーゲンゲル内培養法が注目を集め、この培養法を抗癌剤感受性試験に応用する試みが行われるようになってきた^{31,32)}。この培養法は、プレート培養では細胞が二次元的に増殖するのに対して、組織の三次元的な増殖及び細胞構築を維持したまま増殖可能な組織培養法である。岩井¹⁹⁾はこの培養法を用いてヒト唾液腺細胞や乳腺細胞の培養を行い、明瞭な充実性増殖する細胞塊に管腔形成がみられ、さらに再構築した管腔内部には分泌物の存在を確認したと報告している。この培養法がもとの組織の状態を形態的にだけでなく機能的にも再現性があることを示している。今回本方法を用い、樹立したAFP産生胃癌細胞株の抗癌剤感受性をプレート培養法と比較検討した。一般にAFP産生胃癌は進行例が多い割には化学療法に感受性を示すことが報告されており³³⁾、全身投与方法^{34,35)}や肝動脈注治療法³⁶⁾で著効例も認

められる。しかしながら AFP 産生能と抗癌剤感受性の関係についてはいまだ不明であり今後の検討が必要であると考えられる。今回の検討では薬剤として 5 FU, MMC, CDDP および ADR を用いたが, MMC の IC_{50} は 4.6×10^{-3} と, 最も高い感受性を示した。本症例に 5 FU, MMC 投与を行ったところ一時は血清 AFP が 806.9 ng/ml から 4.6 ng/ml まで著明に低下したことから臨床での感受性がコラーゲンゲル培養法で確認可能であったと考えられる。一方, プレート培養法ではゲル培養に比べ評価が困難な結果となった。一細胞株の結果で一般的な評価はできないが, 本法は短時間で評価可能で, より *in vivo* に近い抗癌剤感受性試験として有用ではないかと考えられる。

結 語

術前血清 AFP 値が高値を示した進行胃癌患者の胃原発巣切除標本より細胞株樹立した(FU 97)。株化細胞樹立後 2 年経過した現在も樹立初期の細胞とほとんど変わらない安定した増殖および AFP 産生が認められ, 造腫瘍性も兼ね備えている。またコラーゲンゲル培養では *in vivo* に近い 3 次元的増殖が得られ, AFP 産生状態が長期に維持されることがわかった。さらに抗癌剤感受性試験にも効果的に利用できるとおもわれる。

FU 97 細胞は AFP 産生胃癌の研究, さらに AFP の産生や分泌など AFP の性質, 機能などの基礎的研究に非常に有用な株化細胞であるとおもわれる。

なお本論文の要旨の一部は, 第 56 回日本癌学会(1997 年)及び第 58 回日本癌学会(1999 年)において発表した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜りました奈良県立医科大学第一外科学教室中野博重教授に深甚の謝意を捧げます。また, 本論文を御校閲賜った第 3 内科学教室福井博教授ならびに細菌学教室喜多英二教授に深謝致します。さらに, 終始御指導, 御協力をいただきました奈良県立医科大学第一外科学教室の澤田秀智講師, 山田行重講師ならびに大阪府立大学先端科学研究所の岩井良昭講師, 岩井峯子講師に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Tatarinov, Y. S.: Determination of embryosppecific alpha-globulin in the blood sera of a patient with primary liver tumor. *Vopr. Med. Khim.* 10: 90, 1964.
- 2) Bourreille, J.: Existence d'alpha fetoproteine au cours d'un cancer secondaire du foie d'origine gastrigue. *Press. Med.* 78: 1277, 1970.
- 3) 高橋 豊, 磨伊正義, 荻野知巳, 上田 博, 沢口 潔, 上野雅資: AFP 産生胃癌の臨床病理学的検討—胃癌における AFP の意義—. *日外会誌.* 88: 696-700, 1987.
- 4) 上原克昌, 宮本幸男, 泉雄 勝, 塩崎秀郎, 饗場正一, 松本 弘: 胃癌における AFP の意義. 癌の臨床 32: 887-893, 1986.
- 5) 赤井貞彦, 加藤 清, 飛田祐吉: いわゆる“ α -Fetoprotein 偽陽性例”の検討—とくに α -fetoprotein 陽性癌について—. *内科* 30: 320, 1972.
- 6) 加藤 清, 赤井貞彦, 飛田祐吉, 筒井一哉, 角田 弘, 鈴木正武: ヘパトマ・悪性奇形腫以外の α -Fetoprotein 陽性癌についての考察—全国調査結果として—. *癌の臨床* 20: 376, 1974.
- 7) 太田大作, 梶原義文, 原田英二, 加茂広明, 富岡 勉, 元島幸一, 井沢邦英, 野田剛稔, 角田 司, 吉野僚三, 原田 昇, 土屋涼一, 松尾 武: Alpha-Fetoprotein 産生胃癌に関する臨床的, 病理学的検討. *日消外会誌.* 18: 43-49, 1985.
- 8) Dhar, D. K., Nagasue, N., Yoshimura, H., Tachibana, M., Tahara, H., Matsuura, C., Abe, S., Change, Y. C. and Nakamura, T.: Overexpression of P-Glycoprotein in untreated AFP-producing gastric carcinoma. *J. Surgical Oncology* 60: 50-54, 1995.
- 9) Koide, N., Nishio, A., Igarashi, J., Kajikawa, S., Adachi, W. and Amano, J.: Alpha-Fetoprotein-producing gastric cancer; histochemical analysis of cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. *Am. J. Gastroenterol.* 94: 1658-1663, 1999.
- 10) 江崎友通: ヌードマウス可移植性 AFP および CEA 産生ヒト胃癌についての研究. *奈医誌.* 35: 385-402, 1984.
- 11) 西和田敬: ヌードマウスにおけるヒト胃, 食道 Alpha-fetoprotein 産生腺癌の生物学的特性に関する研究. *奈医誌.* 40: 510-523, 1989.
- 12) 澤田秀智: ヌードマウスにおけるヒト胃低分化腺癌の肝転移能に関する研究. *奈医誌.* 38: 779-789, 1987.
- 13) Sawada, H., Nakatani, K., Miyagi, N., Nishiwada, T., Watanabe, A., Okumura, T.,

- Yamada, Y., Tsutsumi, M., Nakae, D., Nakano, H. and Konishi, Y.** : Enhanced liver metastatic potential of alpha-fetoprotein-producing human gastric carcinoma after carbon tetrachloride-induced liver damage in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.* **80** : 341-347, 1989.
- 14) **Sawada, H., Nakatani, K., Watanabe, A., Nishiwada, T., Okumura, T., Yamada, Y., Yano, T., Shino, Y., Yamada, T., Tanase, M., Nakano, H., Tsutsumi, M., Nakae, D. and Konishi, Y.** : The potential for the development of liver metastasis from alpha-fetoprotein-producing human gastric carcinomas in nude mice. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **22** : 303-307, 1992.
- 15) **Sekiguchi, M. and Suzuki, T.** : Gastric tumor cell lines. In *Atlas of human tumor cell lines*. Academic Press, London, 287-316, 1994.
- 16) **Terashima, M., Ikeda, K., Maesawa, C., Kawarura, H., Niitsu, Y., Sato, M. and Saito, K.** : Establishment of an α -fetoprotein-producing gastric cancer cell line in serum-free media. *Jpn. J. Cancer Res.* **82** : 883-885, 1991.
- 17) **Kawaguchi, T., Konishi, M., Nakatani, K., Yanagisawa, A., Kato, H. and Sugano, H.** : Establishment of A-2 derived from an α -fetoprotein-producing gastric cancer. *Proc. Jpn. Cancer Assoc.* **50** : 173, 1991.
- 18) **Sekiguchi, M., Fujii, Y., Saito, A., Suzuki, T., Shiroko, Y., Nakamura, H. and Hasumi, K.** : Alpha-fetoprotein-producing gastric carcinoma : Biological properties of a cultured cell line. *J. Gastroenterol.* **30** : 589-598, 1995.
- 19) **岩井峯子** : ヒト正常および腫瘍細胞の三次元培養による組織再構築に関する研究. *奈医誌.* **43** : 94-103, 1992.
- 20) **Yamada, Y., Sawada, H., Watanabe, A., Nakano, H. and Terada, M.** : Early detection of α -fetoprotein producing gastric cancer by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. : Recent advances in management of digestive cancers : 233-235, 1993.
- 21) **Chang, Y. C., Nagasue, N., Abe, S., Kohno, H., Kumar, D. D. and Nakamura, T.** : α -fetoprotein-producing early gastric cancer : with liver metastasis : report of three cases. *Gut* **32** : 542-545, 1991.
- 22) **Chang, Y. C., Nagasue, N., Abe, S., Taniura, H., Kumar, D. D. and Nakamura, T.** : Comparison between the clinicopathologic features of AFP-positive and AFP-negative gastric cancer : *Am. J. Gastroenterol.* **87** : 321-325, 1992.
- 23) **Kodama, T., Kameya, T., Hirota, T., Shimosato, Y., Ohkura, H., Mukojima, T. and Kitaoka, H.** : Production of alpha-fetoprotein, normal serum proteins, and human chorionic gonadotropin in stomach cancer : histologic and immunohistochemical analysis of 35 cases. *Cancer* **48** : 1647-1655, 1981.
- 24) **Ishikura, H., Fukasawa, Y., Ogasawara, K., Natori, T., Tsukada, Y. and Aizawa, M.** : An AFP-producing gastric carcinoma with features of hepatic differentiation : case report. *Cancer* **56** : 840-848, 1985.
- 25) **Ishikura, H., Kirimoto, K., Shamoto, M., Miyamoto, Y., Yaagiwa, H., Itoh, T. and Aizawa, M.** : Hepatoid adenocarcinoma of the stomach : an analysis of seven cases. *Cancer* **58** : 119-126, 1986.
- 26) **Motoyama, T., Aizawa, K., Watanabe, H., Fukase, M. and Saito, K.** : α -fetoprotein producing gastric carcinoma : A comparative study of the three different subtypes. *Acta. Pathol. Jpn.* **43** : 654-661, 1993.
- 27) **Fujita, M., Hayata, S. and Taguchi, T.** : Relationship of chemotherapy on human cancer xenografts in nude mice to clinical response in donor patient. *J. Surg. Oncol.* **15** : 211-219, 1980.
- 28) **Bogden, A. E., Cobb, W. R., Lepage, D. J., Haskell, P. M., Gulkin, T. A., Ward, A., Kelton, D. E. and Esber, H. J.** : Chemotherapy responsiveness of human tumors as first transplant generation xenografts in the normal mouse : six-day subrenal capsule assay. *Cancer* **48** : 10-20, 1981.
- 29) **Kondo, T., Imamura, T. and Ichihashi, H.** : In vitro test for sensitivity of tumor to carcinostatic agent. *Gann* **57** : 113-121, 1966.
- 30) **Carmichael, J., Drggaff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D. and Mitchell, J. B.** : Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric

- assay: assesment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936-942, 1987.
- 31) **Furukawa, T., Kubota, T., Watanabe, M., Takahara, T., Yamaguchi, H., Takeuchi, T., Kase, S., Kodaira, S., Ishibiki, K. and Kitajima, M.**: High in vitro-in vivo correlation of drug response using sponge gel-supported three-dimensional histoculture and MTT end point. *Int. J. Cancer* **51**: 489-498, 1992.
- 32) 小林飛運, 谷坂圭造, 近藤直人, 水戸欣子, 肥塚正博, 福田義孝: 新しい in vitro 抗癌剤感受性試験 collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) 法の確立とその臨床有用性: 癌と化学療法 **22**: 1933-1939, 1995.
- 33) **Chang, Y. C., Nagasue, N., Kohno, H., Ohiwa, K., Yamanoi, A. and Nakamura, T.**: Xenotransplantation of alpha-fetoprotein-producing gastric cancers into nude mice: Characteristics and responses to chemotherapy. *Cancer* **69**: 872-877, 1992.
- 34) 幸田久平, 寺田省樹, 吳 禎吉, 中沢 修, 伊藤信行, 松本修二, 照井 健, 小田正裕: UFT - Adriamycin 併用療法の奏効した α -fetoprotein 産生胃癌の 1 例. 癌の臨床 **32**: 1482-1485, 1986.
- 35) 星野和義, 川口廣樹, 宇奈手一司, 新田一豊, 福井甫, 池田 貢, 辻谷俊一: 5-FU および CDDP 少量連日持続静注による FEP 療法が著効を示した AFP 産生胃癌肝転移例の 1 例. 癌と化学療法 **23**: 1197-1200, 1996.
- 36) 権田 剛, 石田秀行, 樋口哲郎, 蛭川浩史, 中島日出夫, 北條郁生, 三島好雄: EAP 療法が著効を示した AFP 産生胃癌肝転移の 1 例. 癌と化学療法 **21**: 1659-1663, 1994.