

培養ヒト正常細胞の発癌実験*

川崎医科大学 実験病理学教室

難 波 正 義

(昭和54年10月20日 受付)

Neoplastic Transformation in Culture of Normal Human Cells

Masayoshi Namba

Department of Pathology, Kawasaki Medical School

(Accepted on October 20, 1979)

培養ヒト正常細胞をコバルトガンマー線で照射して癌化させ、癌化した細胞の特徴を検討した。また、培養ヒト正常細胞を利用した発癌実験の目的と意義、さらにその問題点を述べた。最後に、培養ヒト細胞の利用は、動物と人体への橋渡しの意義をもつわめて重要な実験手段となることを提案した。

WI-38 normal human diploid fibroblasts were transformed into neoplastic cells by exposure to Co-60 gamma rays. Then, characteristics of the transformed cells were compared with those of the control WI-38 cells in order to obtain parameters of malignant transformation in culture of normal human cells. Since the establishment of experimental models of neoplastic transformation in culture of normal human cells is important in detecting environmental carcinogens and in preventing human cancers, various problems in experiments using cultured normal human cells were discussed.

はじめに

生体には免疫機構とかホルモン産生調節などと言った複雑なホメオスタシスが働いている。動物を用いた発癌実験は、生体内の種々の要因の影響下になされてきた。したがって、動物に投与した発癌剤が細胞の癌化に働いたのか、動物の免疫反応を低下させた結果、動物体内に自然に発生した癌細胞の増殖を許したのか、また、発癌剤が動物内に存在する腫瘍性ウ

イルスを活性化させ、その結果癌細胞が生じたのかなどの複雑な問題が生じる。このように、動物実験では発癌剤の作用機構や、発癌結果のデータの解析などに種々の要因を考慮に入れなければならない。その上、動物実験には、膨大な経費と時間とがかかる欠点もある。そこで、生体の影響を除外して細胞の癌化を試みる計画が立てられた。すなわち、培養条件下で細胞を癌化させようとする実験である。そうすれば、人工的にコントロールされた条件下で細胞の発癌の研究を行なうことが可能となるからである。

1965年、Berwald and Sachs はハムスター細胞をタール中に見出された発癌物質であるベンズピレン、メチルコラントレンで培養条件下

* 本研究は文部省科学研究費、および、川崎医大プロジェクト研究費の援助による。本論文の内容は第19回川崎医学会講演会（昭和54. 10. 17）での守分賞受賞式で発表された。

で癌化させることに世界で初めて成功した。¹⁾その後、培養動物細胞を利用しての発癌実験は急速に進展し、現在では定量的に実験を行なえるほどになっている。それらの多くの研究については、Casto and DiPaolo²⁾, Heidelberger³⁾, Mishra and di Mayorca⁴⁾らによる総説がある。

動物細胞に発癌性を示した物質がはたしてヒトに対して発癌性があるかと言う疑問が生じる。疫学的には、⁵⁾⁻⁷⁾環境汚染物質、食品添加物、医薬品、紫外線、X線などがヒトの癌の発生原因となることが推定されている。しかし、これらの物質で人体に実験的に癌を発生させることは実際にはできない。そこで、前述した培養動物細胞の発癌実験をモデルにして、培養ヒト正常細胞で人体に対して発癌性の疑われる物質の危険性の有無を検討する実験が企てられるようになってきた。培養されたヒト正常細胞が体内の細胞とまったく等しいという完全な保証は現在ないけれども、正常性を持ったことを示す報告は多い。⁸⁾したがって、培養ヒト正常細胞の利用は、実験動物とヒトとを繋ぐ重要な実験手段を提供する。すなわち、実験動物で得られたデータがどの程度ヒトに外挿されるかを知る有力な一実験手段として、培養ヒト正常細胞は多くの医学研究分野において将来利用されるようになるであろう。

1972年以來、我々は上記の考えに基づいてヒト正常細胞の発癌実験を開始した。研究の当初の目的は、ヒト正常細胞を発癌性の証明されている物質で癌化させる実験モデルを確立することであった。ついで、その実験モデルを利用して、我々の身近に存在して、ヒトに発癌性があると疑われる物質の危険性を培養ヒト正常細胞で検定しようと考えていた。

実験を開始してわかったことは、培養ヒト正常細胞は、動物細胞と非常に異なり、容易には癌化しないことであった。⁹⁾その理由は現段階では不明であるが、推察できる点を考察で述べる。

ヒト正常細胞の発癌実験法の確立は癌研究の領域で重要であり、しかも、非常に興味のある

ことでもあるので、日本国内のみならず外国の多くの研究室で試みられてきた。しかし、現在までのところ、角永の4-ニトロキノリン N-オキシド (4NQO)、ニトロソグアニジンを使っての発癌例と、¹⁰⁾難波らのコバルトガンマー線、4NQOでの成功例しか報告がない。^{9), 11)}培養条件下でのヒト正常細胞の発癌実験を動物細胞と同じような容易さで行なえるようになるにはまだ日時を要すると考えられる。

今回、我々の発癌成功例を報告することは、将来のヒト細胞の発癌実験の発展に役立つと考えられるので、その結果を報告し、現在および今後の問題点について考察する。なお、研究結果の一部は、すでに発表されている。^{9), 12)}

材料と方法

細胞の培養: 細胞はヒト正常胎児肺組織より培養された線維芽細胞株 WI-38¹³⁾を使用した。培養液、細胞の培養、細胞数の算定法などについてはすでに述べた。¹¹⁾軟寒天培養法は MacPherson and Montagnier の方法によった。¹⁴⁾この場合はダルベッコ変法イーグルMEMに胎児仔牛血清を20%添加した培地を使用した。

細胞倍加時間と細胞飽密度の決定: 35 mm径のシャーレに約 10^5 コの細胞をまき、3日ごとに培地の更新を行ない、同時にシャーレあたりの細胞数を数え、細胞の増殖曲線を作成する。そして、細胞対数増殖期から細胞倍加時間を求めた。また、細胞がシャーレ内に十分に増殖し、飽和状態になった時点の細胞数を培養容器表面積で割って細胞飽密度を求めた。

コバルト 60 ガンマー線照射: 川崎医科大学放射線治療部の好意によりコバルト60ガンマー線 (Theraton 80) で細胞を照射した。

染色体標本の作成: 既報の方法で行なった。¹⁵⁾

異種細胞への移植: すでに報告した方法によった。¹¹⁾

結 果

培養細胞世代 29 代の細胞を使用し、実験を

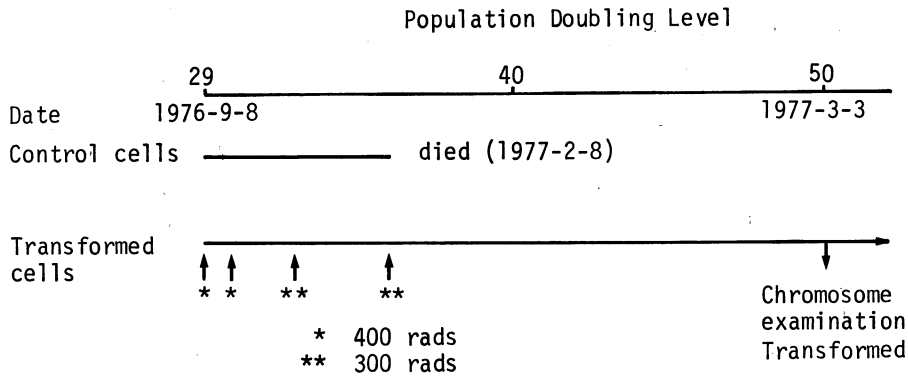


Fig. 1. Neoplastic transformation of WI-38 cells by Co-60 irradiation

開始した。Fig. 1 に示したように、約2カ月に計4回、総1400ラドのコバルト60ガンマ線照射を細胞に行なった。1回の照射線量を300ないし400ラドにしたのは、その線量で染色体の変化が多くおこること、照射後の細胞増殖曲線から約50%の増殖阻害を示す線量であったことによる。¹¹⁾ 照射後1:2あるいは

1:4の分割比で細胞の継代を続けたところ、約200日目(培養世代53代)に、1枚のシャーレ中に、線維芽様形態から一見上皮性にみえる形態に変化した癌化した1コのコロニーが出現した(Fig. 1, 2)。この変異した細胞は現在に

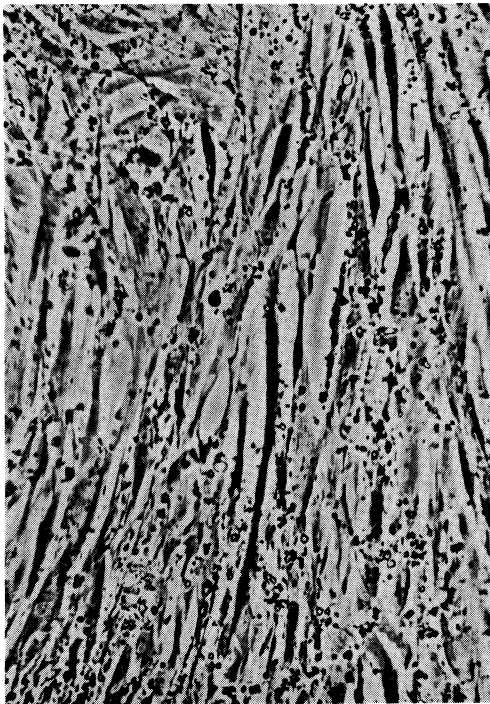


Fig. 2. Control WI-38 cells show the fibroblastic morphology. The cells are senescent and degenerative. Phase contrast, $\times 370$.

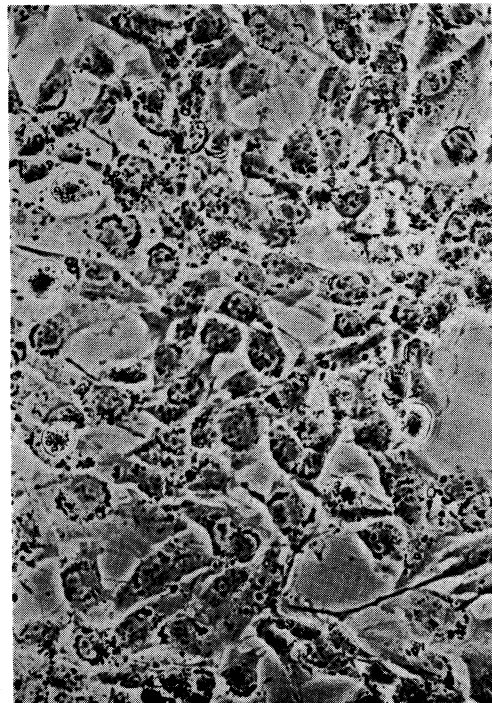


Fig. 3. When the control cells were transformed neoplastically by treatment with Co-60 gamma rays, the morphology of the transformed cells changed from the fibroblastic to the epithelial one. Phase contrast, $\times 370$.

いたるまで活発に増殖を続けている。一方、コバルト60ガンマー線未照射の対照細胞は、細胞の老化のために36培養世代で分裂を停止し死滅し始めた。

Table 1 に示したように、変異細胞出現時期の染色体の変化は非常に著しく、染色体の交

Table 1. Chromosomal change of WI-38 cells Transformed by Co-60 irradiation

Karyotype	Metaphases observed
Hypodiploid	32
Pseudodiploid	21
Diploid	10
Heteroploid	17
Total	80

換、環状染色体、染色体断片、小さな環状染色体片、二動原体染色体などが多くの細胞に認められた。また、低2倍体性の細胞が多いのが目立った。

コバルト60ガンマー線で癌化した細胞の特徴は **Table 2** に示した。表の内容を簡単に説明すると、細胞の倍化時間と、細胞のコバルト60ガンマー線に対する感受性ととの点では、癌化した細胞と正常細胞との間に差が認められな

Table 2. Characteristics of control WI-38 and neoplastically transformed WI-38 CT-1 treated with Co-60 gamma rays

	WI-38	WI-38 CT-1
1. Morphology	fibroblastic	epithelial-like
2. Doubling time (hr)	ca. 24	ca. 24
3. Serum requirement for growth (%)	5—10	1—2
4. Colony formation in soft agar (%)	0.001—0.002	0.2—1
5. Saturation density (cells/cm ²)	<10 ⁵	>(1.5—2.0) × 10 ⁵
6. Sensitivity (D ₀) to Co-60 γ-rays (rads)	130	130
7. Cytotoxicity of theophylline	prominent	slight
8. Life span	limited	unlimited
9. Chromosome	diploid	heteroploid
10. Transplantability	—	+

った。しかし、癌化した細胞は正常細胞に比べ、低血清濃度の培地で良く増殖し、軟寒天内で上昇したコロニー形成率を示す。また、癌化した細胞は、正常細胞にみられる細胞接触増殖停止現象を喪失し、¹⁶⁾ 細胞飽和密度の上昇を示す。癌化した細胞を抗胸腺リンパ球抗体血清で処理したハムスターのチークポーチに移植して生じた腫瘍の組織像は未分化線維肉腫であった。

考 察

動物培養細胞は培養内で比較的容易に発癌剤で癌化させることができるのに比べ、ヒト正常細胞は癌化させにくい。いま、変異原物質でヒト正常細胞を処理すると、酵素などを欠損する変異細胞を培養内で得ることができる。そして、ヒト正常細胞の変異出現率は動物に比べ、ほぼ等しいことが報告されている。¹⁷⁾ 細胞の変異化と癌化とを同等に論じることは少し無理かもしれない。しかし、細胞の癌化も、変異化と同様に遺伝子レベルでの現象であるとする考えが一般に強い。事実、多くの化学発癌剤や、X線、紫外線などはDNAに作用し、DNAに結合したり、DNAを傷つけたりする。

そこで、ヒト正常細胞の癌化がおこりにくい理由を考える必要がある。この理由の追求は、発癌のメカニズムの解明に繋がる手がかりを与える可能性がある。

以下に、その考えられる理由を述べると、第一に、ヒトの細胞は癌化しても培養内で増殖し続けることができず、分裂を停止し死滅してゆく可能性がある。事実、Steinらは、¹⁸⁾ 我々が化学発癌剤(4NQO)、コバルトガンマー線で癌化させた無限に増殖可能な細胞を、細胞分裂能を喪失した老化の時期にあるヒト細胞と融合させると、癌化した細胞のDNA合成が停

止することを見出した。このことは、ヒト細胞の老化を支配する遺伝子が優性であり、癌化の遺伝子は劣性であるらしいことを示している。したがって、ヒトの細胞は培養内で癌化しても培養条件で死滅する運命にあるものが多いので、その結果、癌細胞を培養条件で容易に得ることができないのかもしれない。同様の現象は生体内でもおこっていると考えられる。この問題の解決には組織培養法の利用が大いに役立つであろう。

第二の理由は、ヒトが雑系動物であることによるのかもしれない。医学研究に使用される動物は純系化された結果、遺伝子の純化—機能的ハプロイド化—がおこり、わずかの誘引で細胞の癌形質が発現される可能性がある。それに対して、ヒトのような雑系動物の遺伝子は機能的にディプロイド性で、二重の安定性が保たれているのではないだろうか。

ヒト細胞の癌化の起こりにくい第三の理由として、ヒト細胞は発癌物質による細胞障害よりの回復が、動物細胞に比べはるかに良好なためかもしれない。紫外線による DNA 損傷の回復能の悪い色素性乾皮症の患者に皮膚癌が多発することが知られている。また、我々は、化学発癌剤 4NQO で処理されたヒト細胞と動物細胞との DNA 修復を比較し、ヒト細胞が動物細胞より良好な DNA 修復をおこすことを報告した。¹⁹⁾

いずれにしても、ヒト細胞の発癌実験の確立化は、細胞の老化の機構、遺伝学、損傷 DNA の修復機構の解明などの総合的研究と相互に情報を交換しながら、今後進められるべきであろう。

培養条件下でヒト正常細胞が癌化したと判定することはなかなか困難である。「癌」と言う病気を病理学的あるいは生物学的に定義するとすれば、異常な細胞が生体の増殖の制御を受けなくなり、無限に増え続け、ついには生体を死に至らしめる病気と定義されるであろうか。しかし、培養条件は生体内の条件とはあまりにも違いすぎる。単純である、いま、試験管内で癌化していると考えられる細胞であったとして

も、その細胞が生体内に移され、腫瘍を形成しなければ、その細胞は癌とは断定できないであろう。しかし、生体に細胞を移植することはむずかしい。人道的立場から問題がある。また、道徳的視点を抜きにして、技術的にもむずかしい。その理由は、移植免疫現象のために細胞の由来した同一個人に移植したほうが望ましいが、しかし、実験に使用される細胞はしばしば胎児より採取されるからである。たとえ、移植が可能だとしても、移植した細胞が生体内に腫瘍を形成するにはしばしば長い潜伏期があるであろうことが、動物培養細胞の移植実験の結果より予想される。²⁰⁾ 以上のような理由により、移植実験で癌化を判定することはむずかしいので、ヒト細胞の培養内での癌化の基準を定める必要がある。

Hayflick は、培養ヒト細胞の癌化の基準として、1) 細胞が無限に増殖するようになること、2) 染色体が異常になること、3) 免疫を抑制した動物への移植性を示すようになることの3点を提案した。¹²⁾ 確かにこの3条件が揃えば細胞は癌化したと断定できるであろう。しかし、3条件が揃わなくても細胞が癌でないことは断定できない。多くの例外があるからである。すなわち、生体内に生じた腫瘍細胞を100%確実に現在の培養条件では培養できない点や、染色体の変異のない腫瘍の存在や、また、ヒトの悪性腫瘍を移植免疫能を抑制された動物に100%確実に移植できないことなどである。したがって、培養条件下で、細胞の癌化を確実に、明確に、そして迅速に判定できる基準を見出さなければ、今後のヒト細胞の試験管内発癌の研究は進展しないであろう。

18世紀末、英国で煙突掃除人の陰囊皮膚に癌が多発した。その原因は煤煙中に含まれるコールタールだと考えられ、タールよりジベンズアントラセン、ベンズピレンなどの発癌性芳香族炭化水素が発見された。我々が培養ヒト細胞の発癌実験を計画した目的のひとつは、環境中に存在する発癌性を疑わせる物質の人体への危険度を実験的に予測することであったので、当然のこととして、歴史的に最も古くよりヒトの癌

の発生原因と疫学的に考えられていた上記の炭化水素を用いて研究を開始した。しかし、実験は不成功に終わった。失敗の原因のひとつは、現在の培養技術で容易に培養可能なヒト正常細胞は線維芽細胞しかないことによる。上記の炭化水素や、その他の多くの発癌性物質は、そのもの自体が発癌性を示すのではなく、細胞内で代謝活性化された誘導体が発癌性を示すことがわかってきた。²²⁾ 培養線維芽細胞には代謝活性化酵素がないらしい。したがって、代謝活性をもつ細胞、すなわち、皮膚、気管支、肺、肝、尿路系などの上皮細胞が容易に培養され、しかも、代謝活性化酵素の機能が培養条件下で維持される実験条件の開発がなければ、ヒト細胞の今後の試験管内発癌実験は困難であろう。事実、ヒトの悪性腫瘍の約90%は上皮細胞に由

来する癌である。培養条件と言うまったく人工の実験条件を、少しでもヒトの生体条件に近づける培養法の工夫が将来必要である。

以上、培養ヒト正常細胞の発癌実験のむずかしさ、細胞の癌化の判定基準決定の必要性、発癌実験のための組織培養法の現状とその欠点、そして、今後の研究の展望を考察した。

謝 辞

本研究を行なうに当り、御指導を頂きました実験病理学教室木本哲夫教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究のために、ご協力ご援助下さった実験病理学教室員一同、および、培養センター始め関係各センターの職員のかたがたに、心から深謝いたします。最後に守分賞をご提唱になられた、故守分十氏のご冥福を祈ります。

文 献

- 1) Berwald, Y. and Sachs, L.: In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* 35: 641—661, 1965
- 2) Casto, B. C. and DiPaolo, J. A.: Virus, chemicals and cancer. *Progr. med. Virol.* 16: 1—47, 1973
- 3) Heidelberger, C.: Chemical oncogenesis in culture. *In Advances in Cancer Research*, Vol. 18, ed. by Klein, C. and Weinhouse, S. New York, Academic Press. 1973, pp. 317—366
- 4) Mishra, N. K. and di Mayorca, G.: In vitro malignant transformation of cells by chemical carcinogens. *Biochem. Biophys. Acta* 355: 205—219, 1974
- 5) Doll, S. R.: Strategy for detection of cancer hazards to man. *Nature* 265: 589—596, 1977
- 6) Epstein, S. S.: Environmental determinants of human cancer. *Cancer Res.* 34: 2425—2435, 1974
- 7) Wynder, E. L. and Gori, G. B.: Contribution of the environment to cancer incidence: An epidemiologic exercise. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 825—832, 1977
- 8) Mellman, W. J. and Cristofalo, V. J.: Human diploid cell cultures: their usefulness in the study of genetic variations in metabolism. *In Growth, Nutrition, and Metabolism of Cells in Culture*, ed. by Rothblat, G. H. and Cristofalo, V. J. New York and London, Academic Press. 1972, pp. 327—369
- 9) 難波正義, 西谷耕二, 木本哲夫: ヒト細胞の培養内化学発癌. *医学のあゆみ* 99: 735—739, 1976
- 10) Kakunaga, T.: Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens. *Proc. N. A. S., U. S. A.* 75: 1334—1338, 1978
- 11) Namba, N., Nishitani, K. and Kimoto, T.: Carcinogenesis in tissue culture. 29: Neoplastic transformation of a normal human diploid cell strain, WI-38, with Co-60 gamma rays. *Japan. J. Exp. Med.* 48: 303—311, 1978
- 12) 難波正義, 横山富士子, 木本哲夫: ヒト2倍体細胞における発癌研究. *組織培養* 5: 267—275, 1979
- 13) Hayflick, L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exptl. Cell Res.* 37: 614—636, 1965

- 14) MacPherson, I. and Montagnier, L.: Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23: 291, 1964
- 15) 難波正義, 有田清三郎: 染色体検査法とモザイクを示すターナ症候群 (45, XO/46, XX) の診断基準の統計学的考察. *臨床病理* 27: 335—338, 1979
- 16) Abercrombie, M. and Heaysman, J. E. M.: Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. *Exptl. Cell Res.* 6: 293—306, 1954
- 17) Spandidos, D. A. and Siminovitch, L.: The relationship between transformation and somatic mutation in human and Chinese hamster cells. *Cell* 13: 651—662, 1978
- 18) Stein, G. H.: Personal communication
- 19) Namba, M., Nishitani, K. and Kimoto, T.: Carcinogenesis in tissue culture. 28. Comparison of various effects of a chemical carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide, on normal human cells and on normal mouse cells in culture. *Japan. J. Exp. Med.* 47: 263—269, 1977
- 20) Namba, M., Masuji, H. and Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture. 9. Malignant transformation of cultured rat cells treated with 4-nitroquinoline-1-oxide. *Japan. J. Exp. Med.* 39: 253—265, 1969
- 21) Hayflick, L.: Oncogenesis in vitro. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 26: 355—385, 1967
- 22) Nebert, D. W., Winker, J. and Gelboin, H. V.: Aryl hydrocarbon hydroxylase activity in human placenta from cigarette smoking and nonsmoking women. *Cancer Res.* 29: 1763—1769, 1969