

筑波大学

博士（医学）学位論文

DA  
1936  
1997  
HG

# 論文概要

## 子宮頸部すりガラス細胞癌の性状と 集学的治療に関する基礎的検討

指導教官

臨床医学系 久保 武士 教授

筑波大学大学院博士課程医学研究科生理系専攻

沖 明典

| 寄                | 贈                 |
|------------------|-------------------|
| 沖<br>明<br>典<br>氏 | 平成<br>年<br>月<br>日 |

子宮頸癌は婦人科腫瘍のなかで最も頻度が高い癌である。今回我々はその子宮頸癌の一亜型である、すりガラス細胞癌 (glassy cell carcinoma: G C C) 由来の2細胞株を樹立した。G C Cはその発生頻度こそ全子宮頸癌の1から2%と低いものの、進行の早さ・放射線抵抗性・化学療法抵抗性などの特徴を有しており、子宮頸癌のなかでも非常に悪性度の高い腫瘍として知られている。今回の樹立により、既存のG C C細胞株と併せて生物学的な共通点を探索し、G C Cの特徴を調べることにより、今後の診断・治療の一助とすることを目的とした。

4年間で約80例の初代培養を経験したが、そのうち11例で細胞が順調に増殖して継代が可能となり、なおかつヌードマウスへの可移植性が確認され細胞株が樹立されたものは4例であった。このうち、G C C由来細胞株はT O M - 2、及びO p t 6 0 bの2株であり、これに加えて世界で初めて報告されたG C C細胞株として知られるH O K U G株を含め、以下の検討を3株で行った。

まず、in vitroでの細胞培養時の特徴として細胞倍加時間はT O M - 2、O p t 6 0 b、H O K U Gでそれぞれ87時間、59時間、49時間であり、増殖がやや緩慢であった。培養細胞は単層シート状に配列し、細胞数が飽和しても容易に重層化しない、また細胞間が明瞭である等の特徴を有していた。

次いで染色体分析ではT O M - 2が低4倍体、O p t 6 0 bは3倍体、H O K U Gは低2倍体であり、ploidyについては共通性はなかった。腫瘍マーカーの分泌能に関しては、婦人科における腺癌系のマーカーであるC A 1 2 5が3例共に陽性を示し、扁平上皮癌系のマーカーのS C CもO p t 6 0 bを除く2例で陽性であった。これはG C Cが腺扁平上皮癌であり、腺癌・扁平上皮癌の両者の特徴を合わせ持つための性質であろうと考えられた。また、低濃度であるが神経系細胞に特徴的に分泌されるN S Eも3例共に検出されたがその生物学的意義は不明である。子宮頸癌で高頻度に検出され、癌化に関与していると考えられている、Human papilloma virusのD N Aは3例全てで検出され、T O M - 2・O p t 6 0 bが18型、H O K U Gが56型であった。

サイトカインの分泌能の検討では全ての株でInterleukin(IL)-1 $\alpha$ ,-6,-8を分泌しており、特にIL-6,-8については高濃度の分泌を認めた。14種類の他の組織型子宮頸癌由来細胞株の検討ではIL-6,-8のいずれについても分泌していないか

低値分泌するにとどまるものが多く、一部でIL-6かIL-8を比較的高濃度に分泌していたものの、両サイトカイン共に分泌している株はGCC由来細胞株のみであった。癌の発生母地である子宮頸部の正常扁平上皮細胞でもこれらサイトカインの分泌能を有していることから、GCCにおけるIL-6、-8の高濃度分泌の原因を考えると、GCCでは癌化のプロセスの中でもサイトカイン分泌能を保持し続け、このサイトカインの分泌を促進するTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ の分泌によってIL-6、-8の両者の分泌が促進されている可能性が示唆された。

非常に治療抵抗性で予後が悪いとされるGCCであるが、文献的に治療法についての拠り所となるデータはほとんどない。そこで、(1)3GCC株を用いたDisease oriented screening system (DOSS)に基づく抗癌剤の感受性検査、(2)GCC細胞のtotal cell killを目指す上での養子免疫療法の基礎的検討、の2点について検討した。

DOSSとは化学療法に際して腫瘍の組織型別に共通する感受性抗癌剤をあらかじめ調べることにより、有効と思われる抗癌剤の組み合わせを選択するものである。今回、11種類の抗癌剤について薬剤感受性を検討したところ、HOKUGは比較的抗癌剤の感受性が高く、6種類の抗癌剤に対して感受性を示したが、TOM-2では3種類・Opt60bでは5種類と比較的薬剤抵抗性であった。3株共に共通して感受性を示した抗癌剤は、ActDと婦人科腫瘍において化学療法の中心的役割を担っているCDDPのみであり、GCCの化学療法でもこれら2者の併用またはCDDPを基本とした薬剤併用がなされるべきであると考えられた。

養子免疫療法の検討については、子宮体癌由来細胞株であるMIN-2に対するautologousCTLの誘導を、癌細胞の培養細胞をtarget(live target)とした場合と手術標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片をtarget(fixed target)とした場合で確認した。また、同株やGCC株の原腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片からCTLの腫瘍抗原認識に不可欠なMHC class I分子の発現を確認し、GCCにおいても応用可能であることが示唆された。

以上より、GCCは子宮頸癌のなかで非常に特徴的は性質を持つことが判明し、今後これらの特徴を考慮することが、GCCの正確な診断・適切な治療に有用であると考えられた。



博士（医学）学位論文

子宮頸部すりガラス細胞癌  
の性状と集学的治療に関する  
基礎的検討

1 9 9 7

筑波大学大学院 博士課程 生理系専攻

9 4 5 3 5 1

沖 明典

# 目 次

## 第 1 章 緒 言

|       |                        |   |
|-------|------------------------|---|
| 第 1 節 | 本研究の動機                 | 1 |
| 第 2 節 | すりガラス様細胞癌 ( G C C ) とは | 3 |

## 第 2 章 G C C 細胞株の樹立

|       |               |    |
|-------|---------------|----|
| 第 1 節 | 樹立方法          | 6  |
| 第 2 節 | T O M - 2 株   | 7  |
| 第 3 節 | O p t 6 0 b 株 | 11 |
| 第 4 節 | H O K U G 株   | 18 |
| 第 5 節 | 小括            | 18 |

## 第 3 章 G C C 細胞株の性状

|       |    |    |
|-------|----|----|
| 第 1 節 | 材料 | 20 |
| 第 2 節 | 方法 | 20 |
| 第 3 節 | 結果 | 23 |
| 第 4 節 | 小括 | 29 |

## 第 4 章 G C C 細胞株のサイトカイン分泌能

|       |                                    |    |
|-------|------------------------------------|----|
| 第 1 節 | 細胞増殖と I L - 6, - 8 産生能             | 32 |
| 第 2 節 | G C C における I L - 6, - 8<br>産生能の特異性 | 33 |
| 第 3 節 | I L - 6, - 8 産生能に対する<br>サイトカインの影響  | 35 |
| 第 4 節 | 小括                                 | 40 |

|         |                                     |     |
|---------|-------------------------------------|-----|
| 第 5 章   | G C C の 抗 癌 剤 感 受 性 検 査             |     |
| 第 1 節   | 材 料 及 び 方 法                         | 4 2 |
| 第 2 節   | 結 果                                 | 4 6 |
| 第 3 節   | 小 括                                 | 4 8 |
| 第 6 章   | 細 胞 傷 害 性 T リ ン パ 球 ( C T L ) の 誘 導 | 4 9 |
| 第 1 節   | 材 料 及 び 性 状                         | 5 2 |
| 第 2 節   | 結 果                                 | 6 2 |
| 第 3 節   | 小 括                                 | 7 1 |
| 第 7 章   | 総 括                                 | 7 3 |
| 謝 辞     |                                     | 7 7 |
| 参 考 文 献 |                                     | 7 8 |

## 第 1 章 緒 言

### 第 1 節 本研究の動機

近年、子宮頸癌検診の啓蒙が進み、受診者の増加に伴って多くの早期癌が発見されるようになった。発見される子宮頸癌の約 20～30% は上皮内癌で Ia 期を加えると約半数となり、これらの症例の予後は極めて良好である。その一方で、検診未受診者を中心に発見される進行癌の治療成績が遅々として向上しない現状もある。

衛生環境の向上に伴う発生率の低下と早期発見が相まって子宮頸癌は比較的予後の良い腫瘍と考えられるようになった。しかしながら、進行癌では病状のコントロールは難しく、この 10 年でその予後はほとんど改善されていない[1]。これは、現在の集学的治療法をもってしても、進行子宮頸癌で癌細胞の total cell kill が得られないことによる。他方、見逃せない事実として子宮頸癌の組織型比率が徐々に変わりつつあることがあげられる。これは従来の集学的治療が比較的奏効し易く、予後良好とされる扁平上皮癌の割合が減少し、治療抵抗性の子宮頸部腺癌や少数例の予後不良癌（小細胞癌[2]、カルチノイド[3]、明細胞腺癌[4]、すりガラス細胞癌（Glassy cell carcinoma: G C C）[5][6][7][8]など）が相対的に増加傾向となり、全体の予後向上のために無視できない存在になっていることである。

極初期の子宮頸癌は組織型に関係なく予後が良好であることは、他癌と同様である。しかしながら、子宮頸癌の初期・早期

浸潤癌では組織型により予後が有意に異なることはよく知られている。例えば、扁平上皮癌は基本的な治療戦略がある程度確立されており、比較的予後が良好であることが多い。他方、子宮頸部腺癌や特殊型についての従来の治療はこの扁平上皮癌の治療に準拠して施行され、その奏功率が扁平上皮癌に比して低いということから予後不良とされていた。しかしながら、近年この組織型の違いが腫瘍の生物学的な性質を規定し、治療に対する反応性を反映するため、組織型別に治療が個別化されて一定の成果をあげている。子宮頸部腺癌では独自の化学療法プロトコールが提唱され現在検討されているところである。今後このような難治性子宮頸癌の治療を目指した独自の診断・治療法の開発が子宮頸癌全体の予後改善には是非必要であるが、特に低頻度の組織型の癌に対しては検討を行うための材料が不足しており、生物学的検討を行う際の障害となっている。

このような背景の中で、筆者は不幸にもGCCに罹患し集学的治療の甲斐なく亡くなった一人の若年婦人の手術標本からGCC由来の細胞株（TOM-2株）を樹立した。入院時から亡くなるまで高熱が持続し、また抗癌剤治療が全く無効だったこともあり、従来の子宮頸癌と切り離してGCCに特異的な生物学的特徴について研究する必要性を感じ、本研究を思いついた。また、研究中にGCCの別症例で初代培養の機会を得て、再度細胞株（Opt60）の樹立に成功したため、既存のGCC細胞株であるHOKUG株を加えた3株のGCC由来細胞株を用いてその性状と治療法に関する基礎的検討を加えることが可能となった。第二例目については、まだ樹立後間もないため全て

の検討が完了しているわけではないが、多数の細胞株の共通した性格を分析する方が、GCCの本質に迫れると考え敢えて実験対象とすることにした。本研究の成果が今後新たなGCCに遭遇したときに診療の一助となること、また、稀な組織型の子宮頸癌の生物学的特徴・治療法の開発のモデル系となり、ひいては子宮頸癌全体の予後を改善することを期待しつつGCCの生物学的特徴を考察してみたい。

## 第2節 すりガラス細胞癌（GCC）とは

本邦における子宮癌は組織学的に約90%程度が扁平上皮癌、5～10%前後が腺癌、5%が他の特殊型である。近年の報告では徐々に腺癌系の癌が増加傾向にあるといわれている。GCCは子宮頸癌の特殊型の一つである。子宮頸癌取り扱い規約[9]では腺癌・扁平上皮癌混合型に分類される腺扁平上皮癌の1亜型とされ、低分化型とされている。

1956年にGluckmannとCherryにより最初の報告がなされ[5]、ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色の所見として、すりガラス様の豊富な細胞質を持ち、核小体の目立つ類円形の核、明瞭な細胞境界、間質反応として好酸球・好中球等のびまん性の浸潤等が特徴とされている。電顕上の所見として、豊富なグリコーゲン顆粒やゴルジ装置、小胞体の拡張、トノフィラメントの存在等、扁平上皮癌と腺癌の特徴を兼ね備えていることを

特徴とする[5][6][10][11]。この組織型は上記Glucksmannらの報告では2489例中41例、すなわち 1.6%といわれ、その後の症例の報告においても全子宮頸癌の1-2%の頻度であると言われており[12][13][14]、比較的稀な組織型である。筑波大学付属病院では開院以来平成9年末まで登録された子宮頸癌は975例を数えるが、本組織型と診断された症例は今回細胞株の樹立に供された2例のみであり、約0.2%であった。罹患年齢も平均年齢36~46歳[11][14][15]と他の組織型に比してやや若年に傾いている。

そして臨床病理学的に最も重要なことは、この腫瘍の癌としての生物学的振る舞いが非常に過激であり、進展が早く発見時にIb期、II期以降にずれ込むことが多いこと[5]、早期に転移を来しやすいことなどから予後が不良なことである[5][6][7][8]。局所の進展が速いのみでなく、浸潤性に発育して早期のうちに近傍や全身に転移を来しやすい。放射線治療や化学療法にも抵抗する症例が多いとされている。また非角化型扁平上皮癌との鑑別が難しいため[15][16]、思い切った濃厚な治療を行う機会が与えられず通常为非角化型扁平上皮癌として経過観察されて再発し不幸な転帰をとる例が少なくない。5年生存率は30%以下と報告されており[10][13][17]、予後不良であることを裏付けている。

前述の我々が経験した症例でも、早期からリンパ節・遠隔転移を来し、放射線療法・化学療法に抵抗性であったために治療に難渋し、治療開始から死亡まで8ヶ月と非常に進行が速かった。このように、非常に悪性度の高いGCCについては病理

学的、臨床病理学的な検討の報告はあるものの、生物学的な検討を行った報告はなく、GCC由来樹立細胞株の培養を通して共通点が得られれば、GCCの診断・治療上非常に意味のあることと考えられた。

これに関連して前述症例では38から39度の熱が腫瘍の消長に平行する形で発熱・解熱を繰り返し、腫瘍熱と考えられた。治療中にはこの発熱の原因は特定できなかったが、今回の検討でGCCの腫瘍熱を来す原因についても推察したい。



## 第 2 章 G C C 細胞株の樹立

### 第 1 節 樹立方法

手術時に摘出した腫瘍より一部を初代培養用検体とした。検体採取の際、病理診断の妨げにならないように最小限の採取を心がけた。標本は無菌シャーレにとり、少量の滅菌生理食塩水を加え、以下の操作時まで冷蔵保存した。今回の検体はいずれも転移リンパ節組織であった。まずクリーンベンチ内で腫瘍組織を眼科用尖刀で細切し、0.25%トリプシン約 6 ml に DNase I (Sigma) 100 $\mu$ g を添加した酵素液を加えて攪拌しながら 10-20 分間消化し、初代培養用培地 (T O M-2 では 15% ウシ胎仔血清 (: F B S (ニチレイ)) 添加 M E M 培地、O p t 6 O b では 5 % 非動化 F B S 添加 R h a m - $\alpha$  培地 [18]) でトリプシンを不活性化した。1000rpm (140 x g) で 3 分間遠心分離し、他の酵素を希釈し不活化したあとで、沈渣を 4 種類の抗生物質 (Kanamycin, Streptomycin, Gentamycin, PCG) 添加した培地に懸濁してシャーレ上に播種し、5 % C O 2 インキュベーター内に 37 度で静置した。3 日から 5 日毎に培地を交換しながら細胞の観察を続けた。細菌汚染の心配がなくなり次第、漸次抗生物質を除去した培地に移行した。

## 第 2 節 T O M - 2 株

### 2 - 1 供試症例

供試症例は 27 歳未産婦、不正出血を主訴に近医産婦人科受診。細胞診上、子宮頸癌を疑われ、当院産婦人科を紹介受診し入院した。入院時より連日 38 度台の発熱が持続しており、腫瘍組織への感染が疑われ抗生物質の投与を受けたが、手術まで解熱しなかった。1993 年 2 月 9 日子宮頸癌（大細胞非角化型癌）I b 期の診断で広汎子宮全摘出術を施行した。未婚で若年であることから、左卵巢を後療法の放射線照射野外へ移動するべく、左卵巢の上腹部への移植も同時に施行した。術後、一変して平熱に戻り、40 Gy の全骨盤照射と 9.6 Gy の小骨盤追加照射を受けて同年 4 月 20 日退院した。その 2 ヶ月後、再度発熱と白血球の増多、温存した左卵巢及び傍大動脈リンパ節の腫大から再発と診断され再入院となった。その急速な進行と放射線抵抗性から病理標本を再検討した結果、G C C と訂正診断された（図 1）。高熱は再手術直前まで持続し、同年 7 月 8 日左卵巢摘出術と腫大傍大動脈リンパ節切除術の施行後解熱した。術後 C D D P を含む化学療法が行われたが、奏効せず再燃し、全身に転移を来とし 10 月 24 日死亡、高熱は再燃から死亡まで持続した。

### 2 - 2 細胞株樹立経過

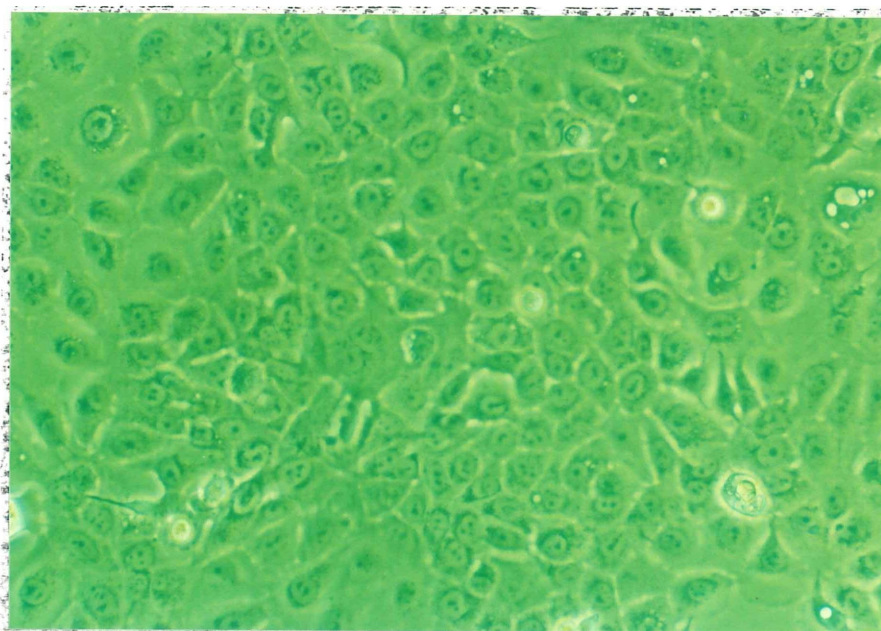
本症例では第一回目の手術時に原発巣から初代培養が試みら

れたが成功せず、第二回目の初代培養は転移リンパ節からサンプリングを行った[19]。培養初期には癌細胞の小コロニーが線維芽細胞の間に散在する程度であったが、半年にわたる培養により細胞密度が増し腫瘍細胞コロニーが優勢となって線維芽細胞が自然に剥脱した。その時点で最初の細胞回収と継代を行い、数回の継代の後に線維芽細胞の肉眼的消失を確認した。ヌードマウスに  $1 \times 10^6$  個の癌細胞を皮下接種したところ、1ヶ月で皮下腫瘍を形成した。この時点でTOM-2株の樹立と判断した。

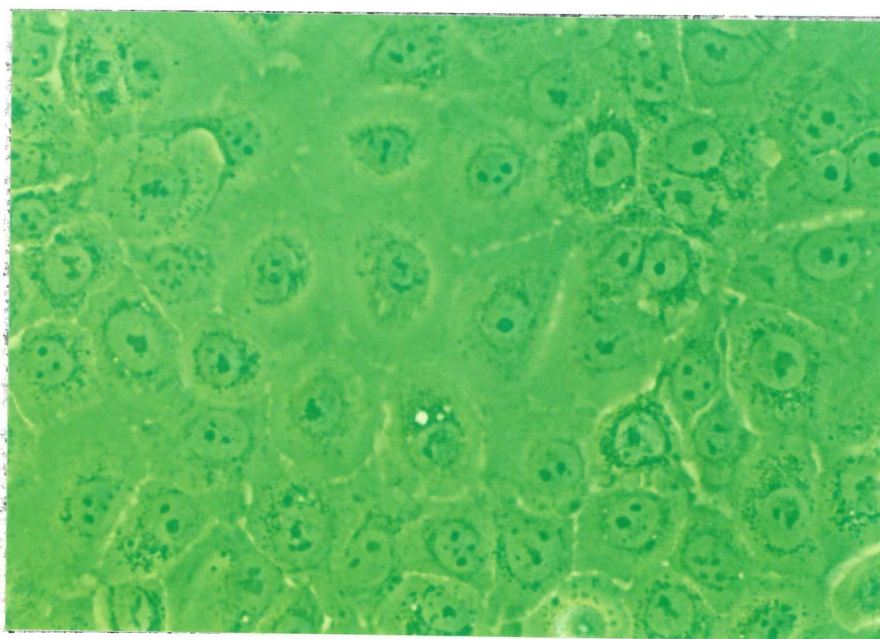
### 2-3 TOM-2株の諸性格

位相差顕微鏡でのTOM-2培養細胞の観察では、細胞はシート状に配列し、重層化はほとんどしない。低密度での培養では細胞質が豊富で個々の細胞が大型化しており細胞境界はやや不明瞭であるが、細胞増殖に伴い高密度となるに従って細胞は小さくなっていき、多稜形で細胞境界明瞭となった。個々の細胞に注目すると、大きく明瞭な核小体を1から数個持つ核が細胞質の中央に位置していた(図1)。これらの所見からは低分化から中分化の腺癌や腺扁平上皮癌が想定された。

ヌードマウスに移植された腫瘍組織を観察すると、H&E染色では腫瘍の中央部が壊死に陥っているものの、すりガラス状の胞体を持ち、明瞭な核小体をもつ類円形の核、細胞境界明瞭等の所見が認められ、十分に原腫瘍の組織形態とほぼ同一であることが確認された(図2)。電子顕微鏡での観察では小胞体

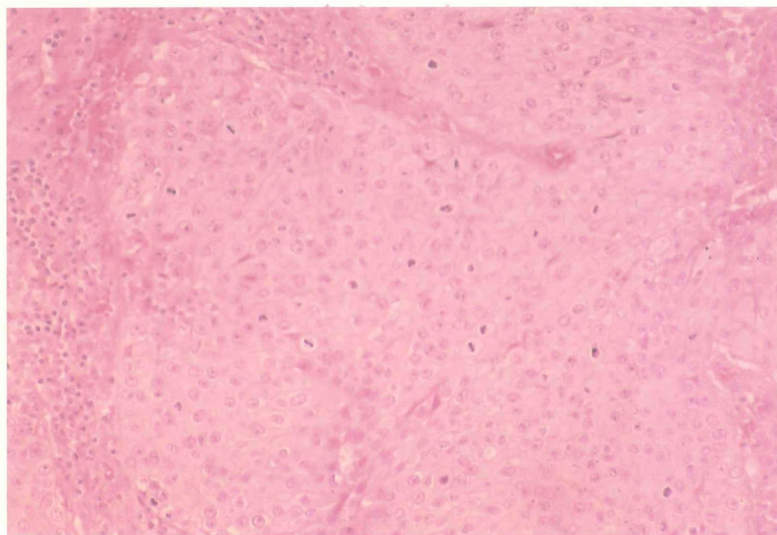


X100

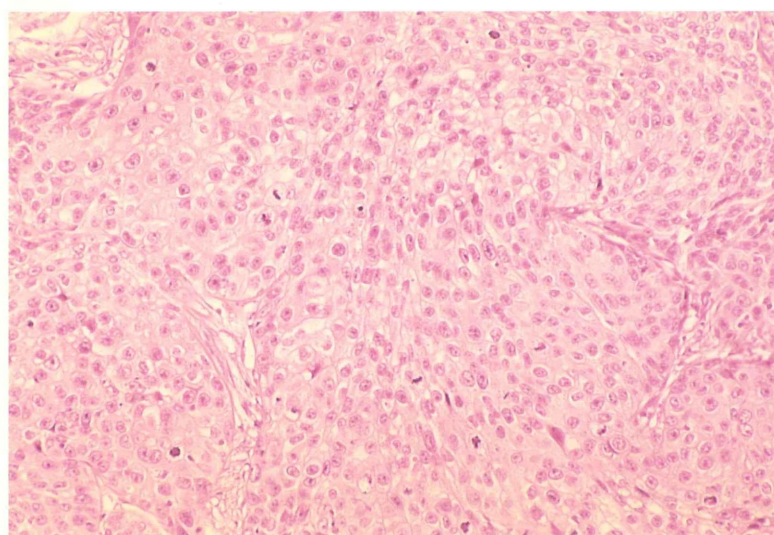


X400

図1 TOM-2の位相差顕微鏡像



TOM- 2 原腫瘍 (HE x100)



TOM- 2 nude mouse移植腫瘍 (HE x100)

図 2 TOM- 2 原腫瘍とnudemouse移植腫瘍

が豊富で拡張しており、一部にtonofilamentやグリコーゲン顆粒、ミトコンドリア、ゴルジ装置の増生が観察された（図3）。

また、PAS染色は陽性像を呈したが、Alcian Blue染色は陰性であった。

これらの所見を総合すると、原腫瘍とほぼ同様の形態的特徴を有しており、文献的なGCCの特徴 [7][8][9][11][12]と合致することからTOM-2は原腫瘍のGCCとしての特徴を保持していると考えられ、GCC由来細胞株と考えられた[19]。

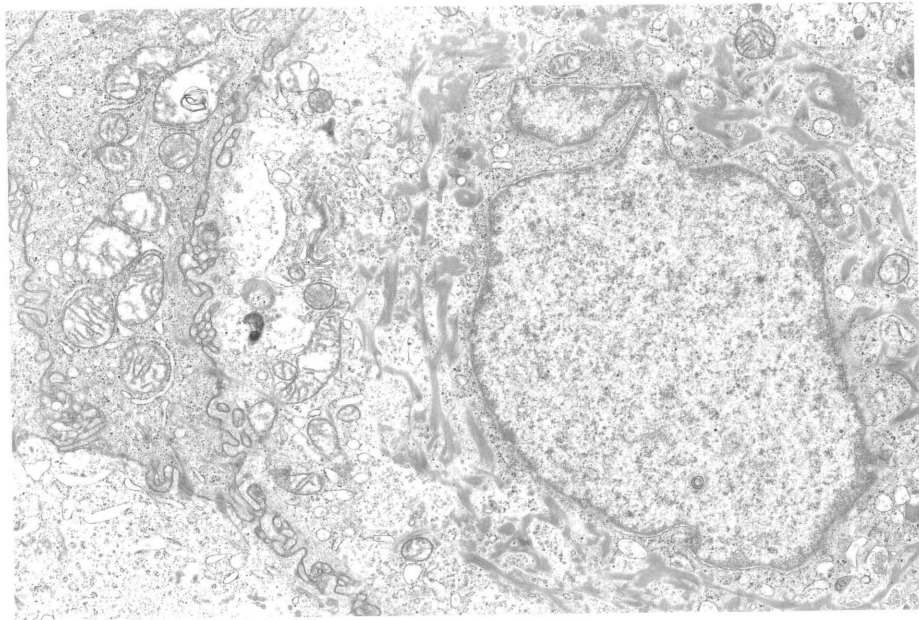
TOM-2の発育形態であるが、増殖は緩慢で（図4）細胞倍加時間は、86.5時間であり、最大培養密度は $3.47 \times 10^5 / \text{cm}^2$ であった（表1）。その他マイコプラズマ汚染のないことと、細胞がヒト型であることを確認した。

### 第3節 Opt 60b株

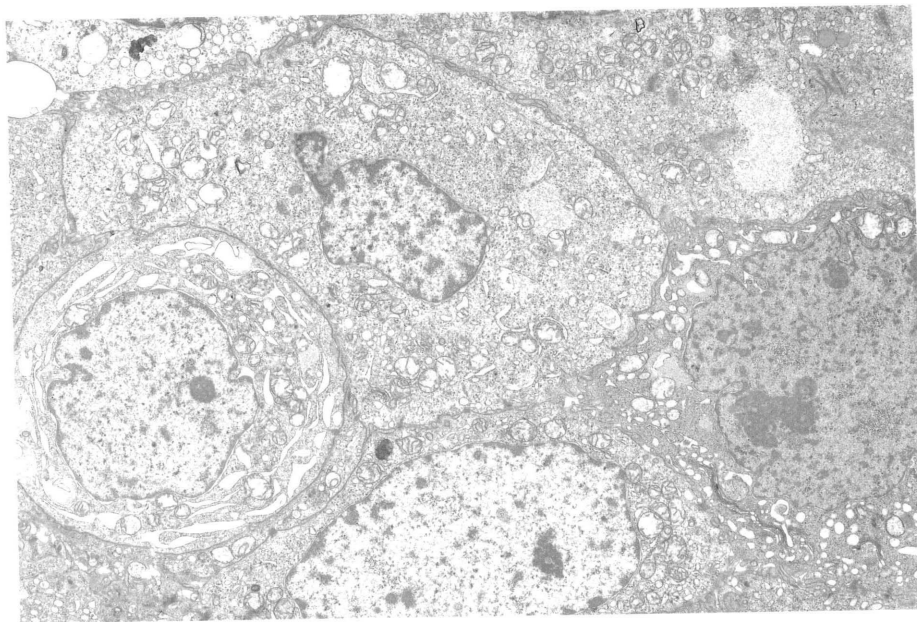
#### 3-1 供試症例

供試症例は50歳の2回経産婦である。不正性器出血により近医産婦人科を受診し、進行子宮頸癌を疑われて当院産婦人科を紹介受診し入院となった。入院当初から発熱が認められたが、1996年10月21日子宮頸癌IIb期の診断で広汎子宮全摘術を施行し解熱した。術後骨盤リンパ節転移が認められたため、全骨盤放射線照射50Gy追加して退院、現在外来にて無病生存中である。本症例も当初子宮頸癌非角化型大細胞癌と診断され、術後標本の詳細な検討でGCCと診断された。



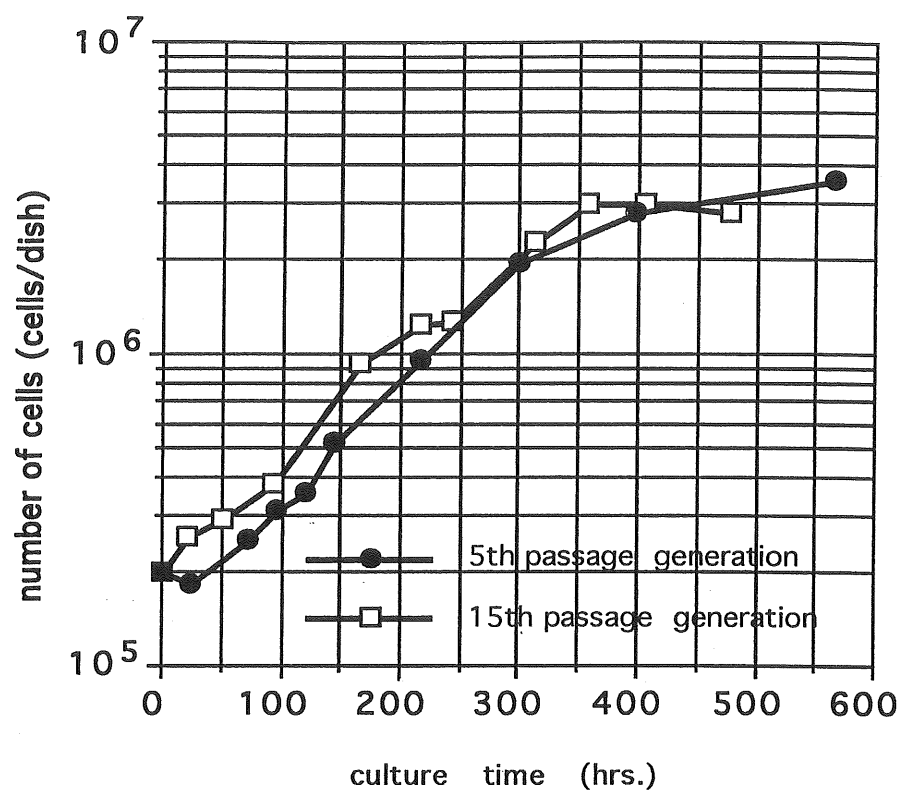


X6000

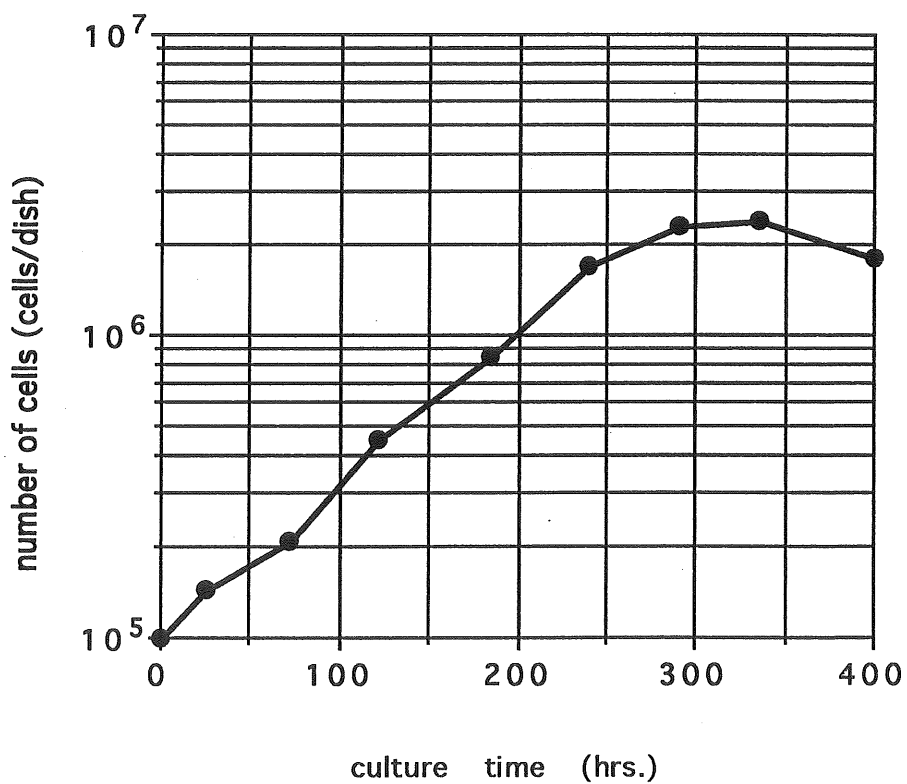


X3000

図3 TOM-2 電顕像



TOM-2



Opt60b

図4 増殖曲線



表 1 GCC株の増殖特性

| <b>GCC</b>         | <b>Passage No.</b> | <b>Doubling time<br/>(hrs.)</b> | <b>Saturation density<br/>(<math>\times 10^5</math> /cm<sup>2</sup>)</b> |
|--------------------|--------------------|---------------------------------|--|
| <b>TOM-2</b>       | <b>5</b>           | <b>83.4</b>                     | <b>3.76</b>  |
|                    | <b>15</b>          | <b>89.5</b>                     | <b>3.18</b>  |
|                    | <b>average</b>     | <b>86.5</b>                     | <b>3.47</b>  |
| <b>HOKUG</b>       | <b>5</b>           | <b>57</b>                       | <b>0.15</b>  |
|                    | <b>20</b>          | <b>45</b>                       | <b>0.31</b>  |
|                    | <b>50</b>          | <b>44</b>                       | <b>0.32</b>  |
|                    | <b>average</b>     | <b>48.7</b>                     | <b>0.26</b>  |
| <b>Opt60b</b>      | <b>7</b>           | <b>59</b>                       | <b>2.29</b>  |
| <b>GCC average</b> |                    | <b>67</b>                       | <b>1.01</b>  |

### 3-2 細胞株樹立経過

本症例では手術時の転移リンパ節を初代培養用の検体として用いた。T O M - 2 と同様の樹立経過で、線維芽細胞優勢な状態では培地交換を繰り返して線維芽細胞の疲弊を待ち、約半年後腫瘍細胞の増殖を確認して回収・播種して継代した。

継代を重ねて癌細胞を純化させて後、ヌードマウス皮下への移植能を確認して樹立とした。現在、継代12代であるが、順調に増殖している。

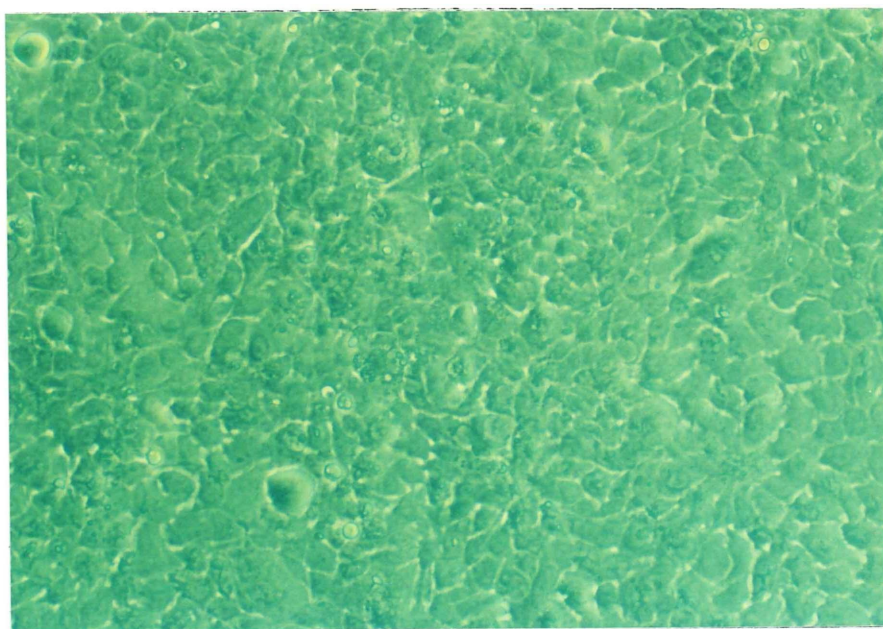
### 3-3 O p t 6 0 b 株の諸性格

位相差顕微鏡による観察では、細胞は比較的低密度の時は類円形から多稜形をなし、大きな細胞質と少数の目立つ核小体を有する核を細胞の中心に持つ細胞である。増殖に伴い高密度化すると、細胞間隙は明瞭となり細胞質の割合は低下するが、細胞の重層化は起こらずに浮遊していくものが増加した（図5）。

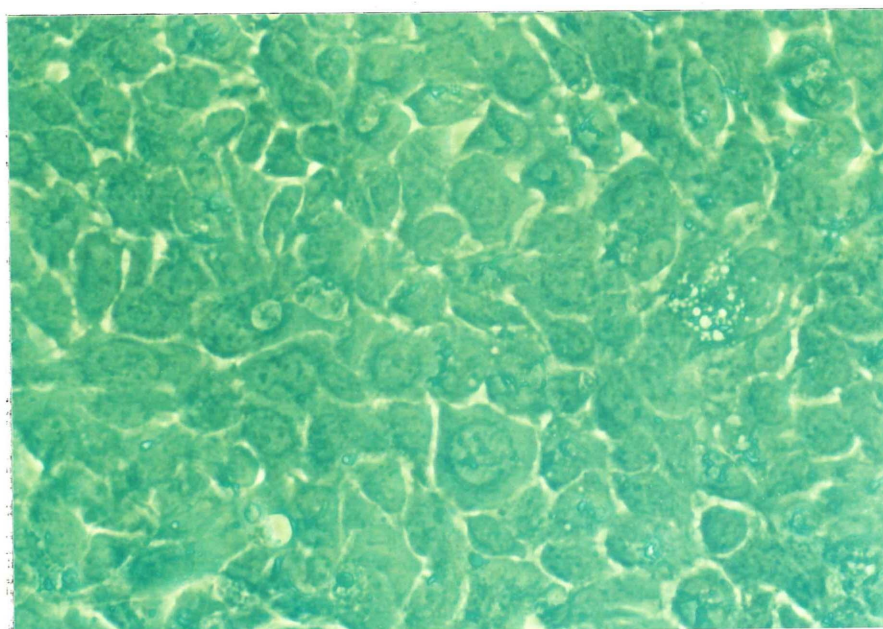
ヌードマウス移植腫瘍の光顕での観察では、H & E 染色で核小体の目立つ類円形の核を持つ細胞で、細胞質は厚く充実性に増殖しており、原腫瘍類似の形態を示した（図6）。

電顕による観察は樹立間もないことから未施行である。

O p t 6 0 b の発育形態は比較的緩慢な増殖を示し、細胞倍加時間は59時間、最大培養密度は  $2.29 \times 10^5 / \text{cm}^2$  であった（表1）。マイコプラズマは陰性であった。

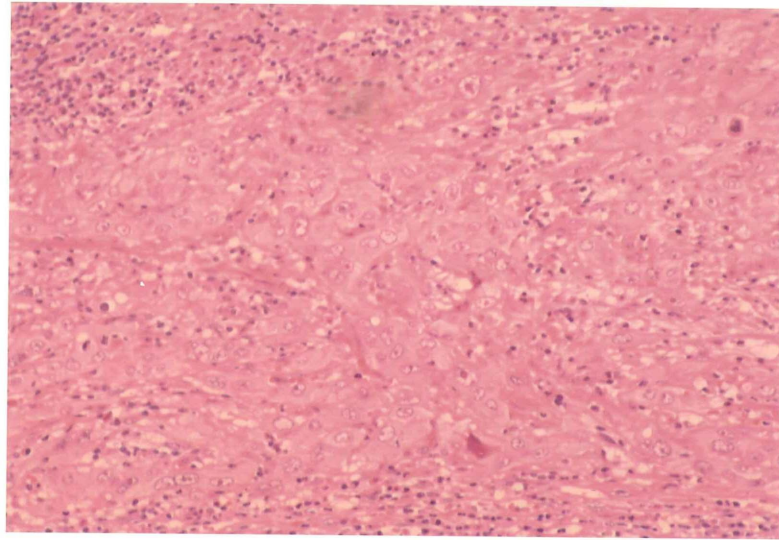


X100

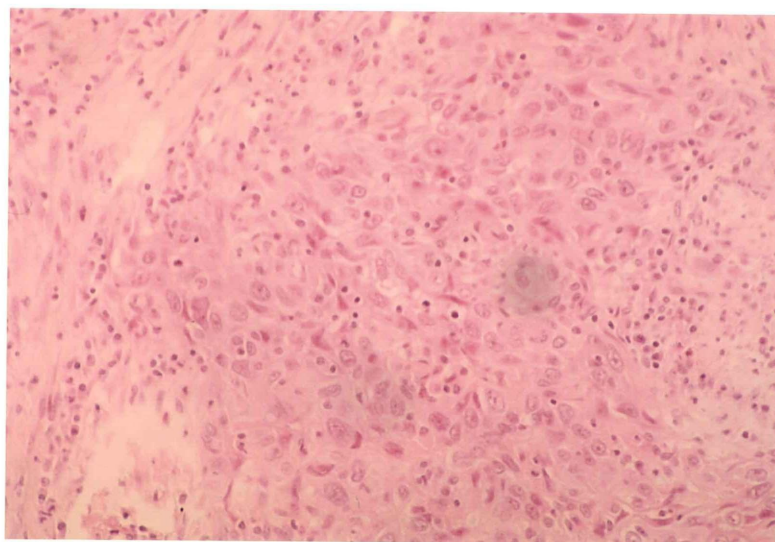


X400

図5 Opt60b の位相差顕微鏡像



Opt 60b 原腫瘍 ( HE x100)



Opt 60b nude mouse移植腫瘍 ( HE

図 6 Opt 60b 原腫瘍とnudemous

## 第 4 節

## H O K U G 株

本細胞株は G C C 細胞株として世界で最初に報告された樹立株であり [20]、樹立者である石渡 勇博士より承諾を得て今回の検討に加えたものである。供試症例、樹立経過は文献 [20] 参照。

### 4 - 1

### H O K U G 株の諸性格

位相差顕微鏡での観察では円形もしくは多稜形、紡錘形の単層シート状の配列を示した。細胞質は豊富ですりガラス状であり、P A S 染色強陽性であった。

細胞倍加時間は 49 時間、最大培養密度は平均で  $2.60 \times 10^5 / \text{cm}^2$  であった (表 1) [20]。

## 第 5 節

## 小括

G C C 由来細胞株の培養上の性質として 3 株の共通点を考えると、全ての株において培養時に単層に配列し、重層化しないことが挙げられる。通常、株化腫瘍細胞では無限増殖能を獲得し、細胞増殖時に接触阻害 (contact inhibition) が起こらないため、単層配列で full sheet となった時に上方へ発育して細胞の重層化がおこることが知られている。重層化しない性質は、細胞間接着分子の発現不足による細胞間の低親和性も考え

られるが、発生母体の性質から考えると、腺系の細胞よりは、比較的扁平なシート状の細胞の配列を持つ扁平上皮系の細胞の性質によるものと推察された。また、PAS染色陽性であることも細胞質内にグリコーゲン顆粒が豊富である扁平上皮細胞の特徴を反映したものと考えられた。

3株の細胞倍加時間は平均64時間であり、後述の他組織型子宮頸癌株では30時間から93時間に分布したことから、GCC株では細胞増殖が遅い傾向が認められた。

Opt60bは樹立後培養期間が短く、正式に初代培養の樹立と宣言するためには、今後の継続的・安定的培養が必要である。しかしながらヌードマウスに対する可移植性の獲得や移植腫瘍の検討等から今回の検討に加えることに妥当性があると判断し、以後の検討をこれら3株で行った。

### 第 3 章 G C C 細胞株の性状

前章で培養細胞としての共通点を検討したが、本章では G C C の持つ形態学的・生物学的に特徴・共通点について検討した。

#### 第 1 節 材料

G C C 由来細胞株 3 株を用いて G C C に共通する性質を調べた。前述の通り H O K U G 株は G C C 細胞株として世界で最初に樹立報告された株であり、原論文[20]に記載してあるものについてはデータを参照した。

#### 第 2 節 方法

##### 2-1 染色体分析

T O M - 2、O p t 6 0 b について G - b a n d 核型分析を行うため細胞を播種し、対数増殖期の時点で固定して染色体を調べた。また、H O K U G については論文[20]を参照した。

##### 2-2 腫瘍マーカー

対数増殖期にある細胞で培地交換を行い、24 時間後に培養上清を回収した。これを直ちに遠心分離し細胞成分を除去して凍結、各種腫瘍マーカー（C A 1 2 5, C A 1 9 - 9, C E A, S C C 抗原(TA-4), N S E）の測定用として - 3 0 度で保存し



検査依頼した。サンプリングと同時に細胞数をカウントして、  
24時間・ $10^6$ 細胞数あたりの腫瘍マーカー産生量を計算した。

### 2-3 Human papillomavirus (HPV) DNA の検出

子宮頸癌並びにその前癌状態と目される子宮頸部異型上皮ではHPVのDNAが高頻度に検出され、この感染が癌化のステップの一つであると言われている[21][22][23]。そこで、3株についてHPVのDNAの検出を試み、HPVの型判定を施行した。

まず、各々のGCC培養細胞をトリプシン処理して、約 $5 \times 10^6$ 個の細胞を遠心し回収した。その後、以下のDNA精製法でDNAを抽出した。まず、細胞を凍結融解により破壊した後、Proteinase Kを加えて一晩酵素処理した。次いでフェノールで蛋白質を変性させ、クロロホルムで除蛋白したあとでエタノール沈殿法でゲノムDNAを採取した。採取したDNAは蒸留水に溶かして吸光光度計で260nmの波長による濃度計測を行った。

HPVのDNAの検出には、Polymerase chain reaction-restriction fragment polymorphism (PCR-RFP) 法を応用したHPV typing kit (宝酒造) を用いた。HPVのDNAのE6, E7領域に特異的な配列を持つコンセンサスプライマーセットでPCR産物の増幅の有無を確認し、増幅が確認されたものについてはPCR産物を数種の制限酵素によって切断し、5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Polyacrylamide Gel Electr-



ophoresis:PAGE)法でDNA断片を泳動して断片の長さの違いからHPVの型判定するものである。このプライマーは同時にHPV 6型・11型・16型・18型・31型・33型・35型・52b型・58型が増幅されるため、今回の検討ではこれらについてDNA存在の有無を検討した。

また、HOKUG株については石渡博士の報告も参照した。

#### 2-4 サイトカイン分泌能

細胞株のサイトカイン分泌能を調べるために、培養上清中に分泌されているサイトカイン濃度を測定した。対数増殖期にある細胞を培地交換し、その24時間後に培地を回収して遠心分離し細胞成分を除去した。上清を直ちに-80度で凍結保存し、各種サイトカインをELISA法で測定した。そのうち、IL-6についてはGenzyme社製IL-6 ELISA kit(PREDICTA IL-6)を用い、IL-8はPerseptive社製のIL-8 EIA kit(Titerzyme IL-8)を使用し、IL-1 $\alpha$ ・TNF- $\alpha$ についてはPharmingen社製の抗体を用いてELISAを行った。その他のサイトカインについてはTOM-2・HOKUGについては数種類を依頼検査としたが、Opt60bでは共通性を見いだすことが目的であるためにTOM-2もしくはHOKUGで陽性となった項目のみを測定した。

### 第 3 節      結 果

#### 3 - 1      染 色 体 分 析

##### 3 - 1 - 1      T O M - 2

metaphase の 36 細胞を検討したところ染色体数は 75 から 84 に分布しモードは 79 と低 4 倍体であった（図 7）。検査した全ての細胞で 6p+, 11q+ が検出され、マーカー染色体であると考えられた。それ以外には 1p-, 2q-, 11p+, 12p-, 13p+ が大多数での細胞で観察された [19]。

##### 3 - 1 - 2      O p t 6 0 b

60 細胞の染色体数の検討から染色体数は 66 から 72 に分布し、70 にモードを認める 3 倍体であった（図 7）。

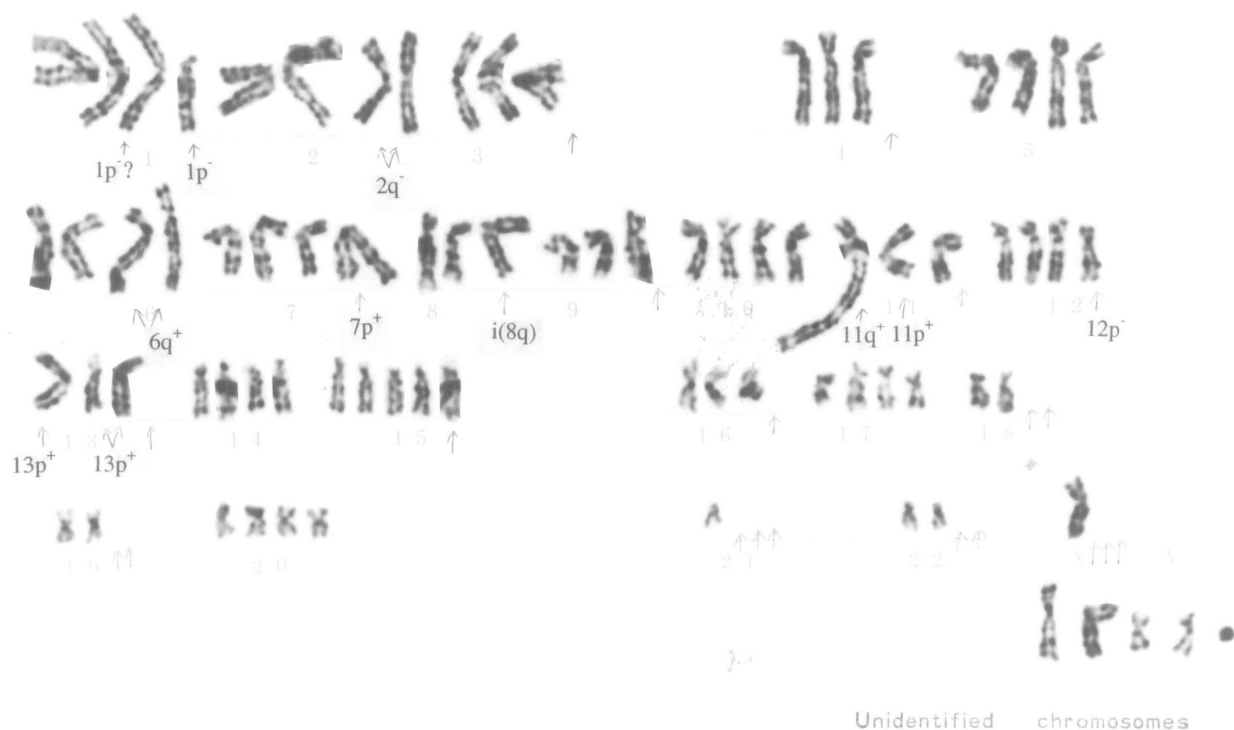
##### 3 - 1 - 3 H O K U G

染色体数は 40 から 48 に分布し、モードは 42 と低 2 倍体を示した。1p-, 1q-, 4p+, 5q-, 6q-, 15p+, 16q+, 17p+, 20p+, 22q+ が確認された [20]。

## A. G-band karyotyping

核 型 分 析

chromosome No.: 79

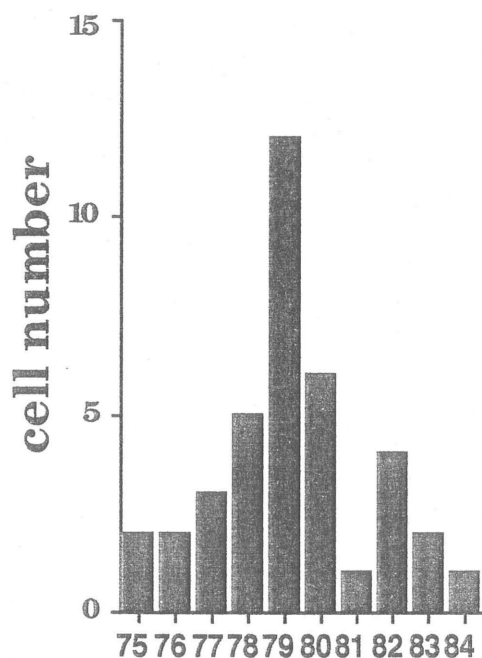


## B. histogram

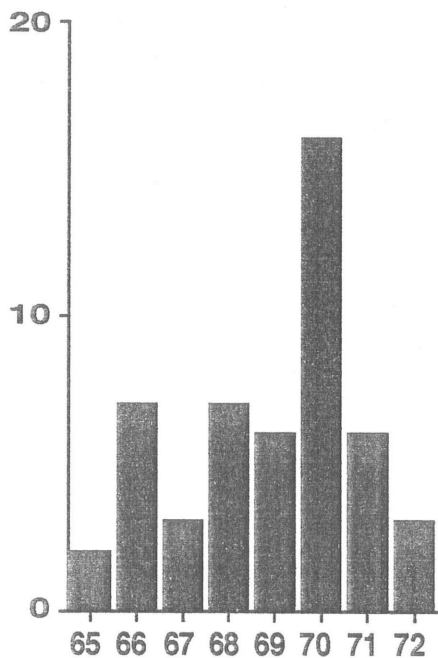
TOM-2

Opt 60b

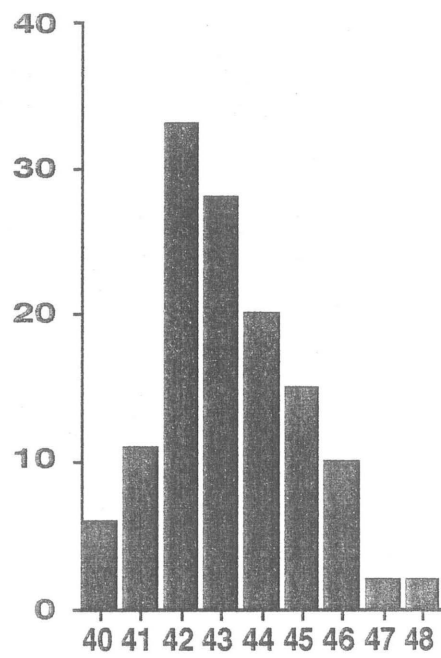
HOKUG



mode : 79



70



42

図 7 染色体分析結果

### 3-2 腫瘍マーカー

#### 3-2-1 TOM-2

腫瘍マーカーはCA125とSCC抗原、NSEの3つのマーカーを分泌していた(表2)。

#### 3-2-2 Opt60b

Opt60bに関しては、CA-125とNSEが検出され、CEA・CA19-9・SCC抗原が測定感度以下であった(表2)。

#### 3-2-3 HOKUG

HOKUG株ではCA-125・TPA・TA-4(SCC抗原)・NSEを産生していたとの報告されている。[20](表2)。

### 3-3 HPV DNAの検出

3種類のGCC由来細胞株でHPVのDNAの検出を試みたが、HOKUGではPCR産物の増幅が認められず、TOM-2・Opt60bの2株で増幅が確認された。これら2株で増幅されたDNAを制限酵素で処理した断片の長さは、HPV18型に特異的なものであった。(図8)はいずれも増幅され

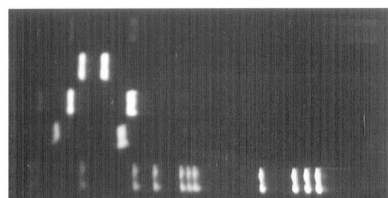
表 2 GCCの腫瘍マーカー産生能

| tumor marker |       | TOM-2 | HOKUG | Opt60b |
|--------------|-------|-------|-------|--------|
| SCC(TA-4)    | ng/ml | 88    | 23    | n.d.   |
| CA125        | U/ml  | 720   | 290   | 45     |
| CA19-9       | U/ml  | n.d.  | n.d.  | n.d.   |
| CEA          | ng/ml | 0.6   | n.d.  | n.d.   |
| NSE          | ng/ml | 2.4   | 3.8   | 2.0    |

( per 10<sup>6</sup> cells per day)

n.d. : not detectable

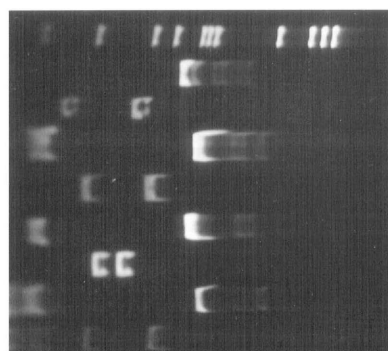
**A**



Opt 60b  
HPV No58 (HPV 33)  
HeLa.S3 (HPV 18)  
CaSki (HPV 16)  
marker 5

**HPV typing of the Opt 60b cells by RFLP  
with Ava II**

**B**



marker 5  
CaSki (undigested)  
CaSki (Ava II)  
HeLa.S3 (undigested)  
HeLa.S3 (Ava II)  
HPV No58 (undigested)  
HPV No58 (Ava II)  
TOM-2 (undigested)  
TOM-2 (Ava II)

**HPV typing of the TOM-2 cells by RFLP  
with Ava II**

**図8 GCC株 (TOM- 2,Opt60b) における  
HPV DNAの検出**

たDNA産物を制限酵素Ava IIで切断したものを電気泳動したものであるが、HPV16型陽性コントロール(Ca Ski)・33型陽性コントロール(HPV No 58)とは異なり、18型陽性コントロール(HeLa S3)と同様の泳動パターンを示したことから、HPV18型と判定した。また、今回の検討でDNAが増幅されなかったHOKUGはHPV56型が陽性であると報告があった。

### 3-4 サイトカイン分泌能

(表3)に3株の培養上清中のサイトカイン量を示す。3株で特徴的なことは、産生量の多少はあるもののIL-1 $\alpha$ 、-6、-8の分泌能を有していることであった。特にTOM-2やOpt60bではIL-6、-8を高濃度に分泌されていた。その他にTOM-2では低濃度のIL-7、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、GM-CSFが、Opt60bではTNF- $\alpha$ とIFN- $\gamma$ 、HOKUGではIFN- $\beta$ 、- $\gamma$ が検出された。

## 第4節 小括

4種類の検査を施行して、GCCの培養上の基礎的特徴について検討した。まず、染色体分析については、TOM-2が低4倍体、Opt60bが3倍体、HOKUGが低2倍体でありploidyについて一定の傾向は認めなかった。

表3 GCC細胞株のサイトカイン産生能

| cytokine      |       | TOM-2 | HOKUG | Opt60b |
|---------------|-------|-------|-------|--------|
| IL-1 $\alpha$ | pg/ml | 672   | 513   | 360    |
| IL-1 $\beta$  | pg/ml | n.d.  | n.d.  | n.t.   |
| IL-2          | pg/ml | n.d.  | n.d.  | n.t.   |
| IL-3          | pg/ml | n.d.  | n.d.  | n.t.   |
| IL-4          | pg/ml | n.d.  | n.d.  | n.t.   |
| IL-6          | pg/ml | 11000 | 2850  | 3900   |
| IL-7          | pg/ml | 38    | n.d.  | n.t.   |
| IL-8          | pg/ml | 11500 | 2130  | 710    |
| TNF- $\alpha$ | pg/ml | 7.88  | n.d.  | 253    |
| TNF- $\beta$  | pg/ml | n.d.  | n.d.  | n.t.   |
| IFN- $\alpha$ | IU/ml | n.d.  | n.d.  | n.t.   |
| IFN- $\beta$  | IU/ml | n.d.  | 1.17  | n.d.   |
| IFN- $\gamma$ | IU/ml | 1.2   | 1.4   | 117*   |
| GM-CSF        | pg/ml | 11    | n.d.  | n.t.   |

n.d. : not detectable

n.t.:not tested

\*: pg/ml



続いて腫瘍マーカーについては全ての細胞株でC A 1 2 5が分泌されていた。臨床的にこのマーカーは癌性腹膜炎や卵巣癌、その他婦人科系の腺癌において高頻度に陽性となることが知られている[24][25]。全てのG C C細胞株が分泌能を有していることは、G C Cが腺癌としての機能の一部を有していることの表れであると考えられた。また、S C C抗原は子宮頸部や他臓器の扁平上皮癌に特異的と言われているが[26][27]、T O M - 2とH O K U Gの2株で産生していた。今回の検査結果から腺癌系に特徴的なC A 1 2 5と扁平上皮癌に特徴的なS C C抗原の分泌が認められたことは、腺扁平上皮癌の一型として分類されているG C Cの位置づけが裏付けられたものと考えられた。

臨床的に癌のスクリーニングや術後のフォローアップのために扁平上皮癌ならS C C抗原、腺癌系ならC A 1 2 5を測定することが推奨されているが、G C Cやこれと鑑別が難しい非角化型扁平上皮癌が疑われる場合には、診断の一助とするべく、一度は両腫瘍マーカーの測定が必要であると思われた。また、低値ながらN S Eが3例全てで検出された。N S Eを検出したことの意味付けは今後の検討課題として残るが、通常は神経分泌腫瘍や小細胞癌など特殊な子宮癌のマーカーである[28][29]。臨床検体での検討の結果によってはG C C特異的な腫瘍マーカーとなる可能性もあると考えられ、更なる症例の積み重ねが待たれるところである。

H P V D N Aは型こそ異なるが3株全てで検出された。T O M - 2とO p t 6 0 bは1 8型、H O K U Gでは5 6型であった。1 8型は1 6型に次いで臨床的に子宮頸癌患者で検出さ

れることが多く、56型は検出されることが稀である。今回我々が用いたプライマーは比較的臨床的に高頻度に検出される型を網羅するように設計されているもので、56型の検出は保証されていない。今回のHOKUGのように稀な頻度のHPV型は見逃されてしまう可能性が指摘された。また、最近の知見ではHPV 16型陽性例の子宮頸部癌の進行症例に比して18型陽性例や16型・18型両陰性例（他のHPV型の有無は問わない）では有意に予後が悪いと言われている[30][31][32]。この原因を化学療法に対する低感受性に求めている文献もあるが完全に明らかにされているわけではない。子宮頸部腺癌では16型の頻度が扁平上皮癌に比して低いとも言われており[33][34]、今回の検討でGCCの3株全てで16型以外のHPVが陽性だったことから、これら予後不良組織型がHPV 16型陰性例の予後を下げている一因となっている可能性がある。

サイトカインの分泌能に関してはIL-6、-8の高濃度の分泌能を有しているという興味深い結果を得た。更に低濃度であるがIL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ 等のIL-6、-8の分泌に関して上流のシグナルとなるサイトカインも検出されたことから、自らのIL-6、-8産生能を増強してしている可能性が示唆された。

GCCのサイトカイン高濃度分泌について言及している報告はなく、次章で更にこの特異性について検討することとした。

## 第 4 章 G C C 細胞株のサイトカイン分泌能

前章で G C C は 3 株全てで I L - 6, - 8 を高濃度に産生していた。そこで、I L - 6, - 8 産生能と細胞増殖の関係を検討した。また、この I L - 6, - 8 産生能を様々な子宮頸癌細胞株と比較することにより特異性の有無を検討した。

I L - 6, - 8 はサイトカイン同士の相互作用（サイトカインネットワーク）により他のサイトカインの分泌を調節していることから[35][36]、I L - 6, - 8 の分泌の上流のシグナルとなるサイトカインによる影響も検討した。

### 第 1 節 細胞増殖と I L - 6, - 8 産生能

#### 1 - 1 材料及び方法

G C C の発育曲線を描くにあたり、細胞数をカウントしながら培地交換を行い、第 3 章 2 - 4 と同様の方法でサイトカイン測定用培養上清を経時的に採取し、サイトカインの総生産量を求めた。I L - 6, - 8 値の計測には前章同様に Genzyme 社製 PREDICTA IL-6 ELISA kit 及び PerSeptive 社製 Titerzyme IL-8 EIA kit を用いた。

## 1 - 2 結果

G C C の培養経過中の I L - 6, - 8 産生量を ( 図 9 ) に示す。単位時間・単位細胞数当たりの両サイトカインの産生量は対数増殖期に極大に達し、細胞密度が飽和した状態では減少した。

これは、産生能と旺盛な細胞分裂が同調しており、細胞飽和密度では培地中の栄養素の不足や、軽度の接触阻害などによりサイトカインの細胞あたりの産生量が減少するものと考えられた。T O M - 2 ・ H O K U G でのサイトカイン総生産量は I L - 8 が I L - 6 に比して高かったが、O p t 6 0 b 細胞では逆に I L - 6 が I L - 8 に比して高値であり、両サイトカインの分泌割合には一定の傾向は示されなかった。

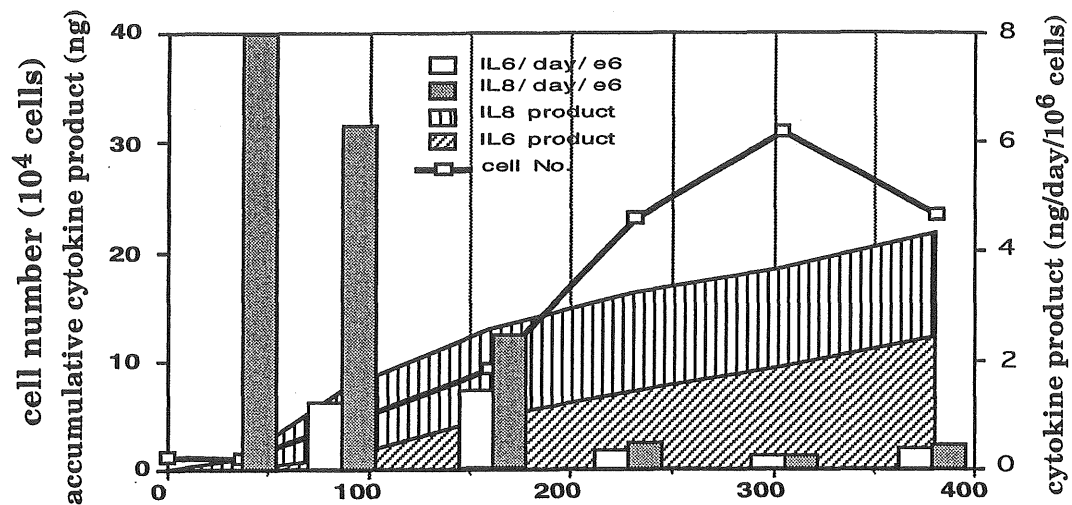
## 第 2 節 G C C の I L - 6, - 8 産生能の特異性

### 2 - 1 材料及び方法

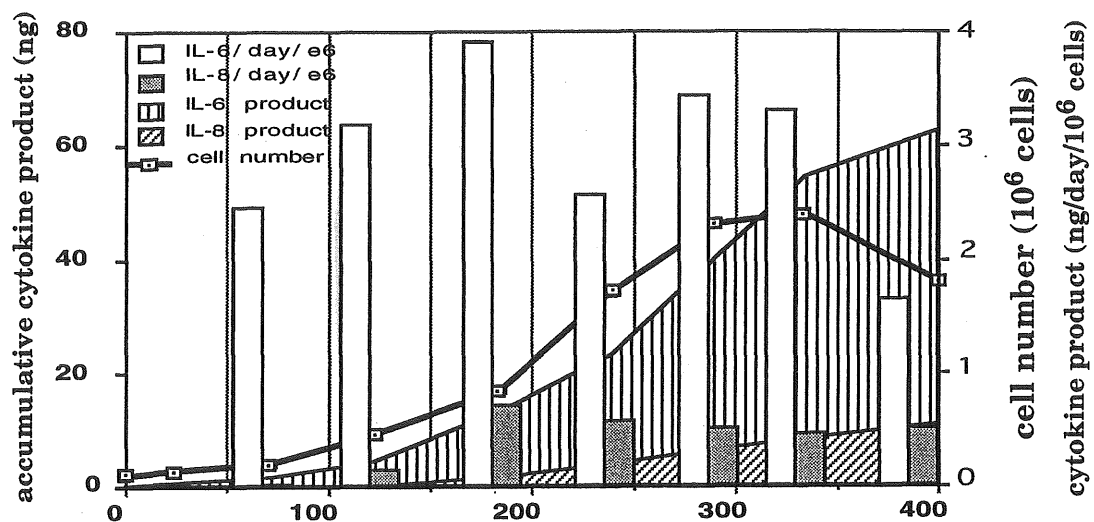
I L - 6, - 8 産生能が子宮頸癌のなかで G C C 特異的であるかを調べるために、G C C 細胞株 3 株及び子宮頸癌細胞株 14 株の合計 17 株で産生能を検討した。

G C C を除く 14 子宮頸癌株の内訳は、扁平上皮癌由来細胞株が 10 株 ( C a S k i, Q G - U, O M C - 1, T C S, H K M U S S F, S K G - I I S F, S K G - I, S K G - I I, S K G - I I I a ) であり、子宮頸部腺癌由来株が 3 例 ( H e L a . S 3, T C O - 1, T C O - 2 )、小細胞癌由来株 1 例 ( T C -

## A. HOKUG



## B. Opt60b



## C. TOM-2

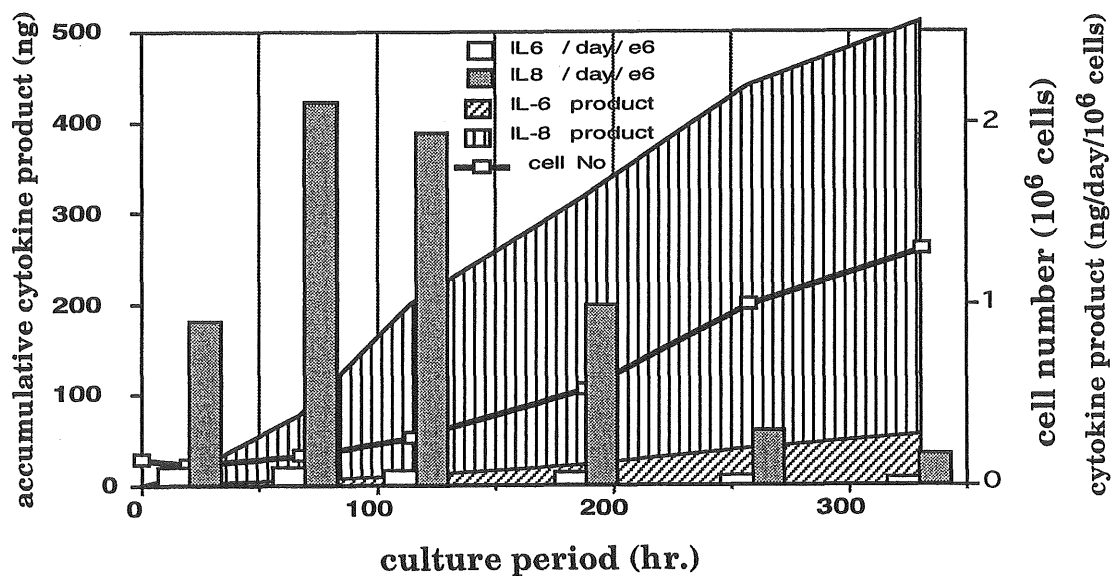


図 9 GCCの増殖曲線とIL-6,-8産生能

Y I K)、カルチノイド由来株1例(M e d a m a)である。

それぞれの細胞を3枚ずつプラスチック製3.5 cmシャーレに各々の固有に使用している培地を用いて播種し、前章2-4と同様に対数増殖期にある細胞の時間・細胞数あたりのサイトカイン産生量を計算した。

## 2-2 結果

子宮頸癌由来細胞株全17株のI L-6, -8生産能は(図10)(表4)に示すとおりである。G C C由来株では3株全例でI L-6, -8の両者の生産能が認められたが、他の組織型では検出感度以下もしくは低濃度の分泌にとどまる株が多く、少数例の産生株でもI L-6・I L-8のどちらか一方のみを産生しており、両者を産生している細胞株はなかった

## 第3節 I L-6, -8生産能に対するサイトカインの影響

以上よりG C CでI L-6, -8の2種のサイトカインを分泌していることが一つの特徴であると考えられた。また、先に第3章でG C Cの細胞株全てでI L-1 $\alpha$ を、2株でT N F- $\alpha$ をの分泌を確認した。これらのサイトカインはI L-6, -8の分泌を亢進させるため、H O K U Gにおける炎症性サイトカインネットワークによるI L-6, -8の産生増強の可能性を検討した。

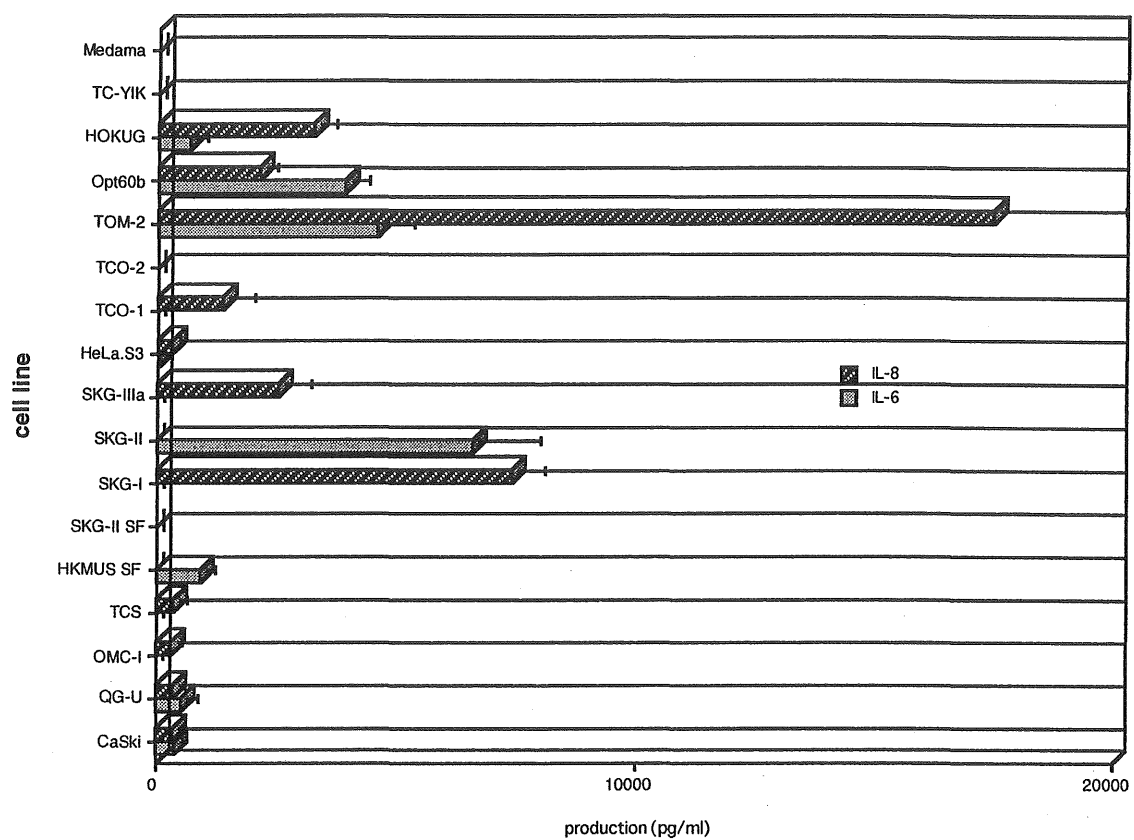


図 1 0 子宮癌細胞株におけるIL-6およびIL-8の産生能

表4 各種子宮頸癌由来細胞株のIL-6, -8産生能

|                        | IL-8<br>(pg/24hrs/10 <sup>6</sup> cells) | IL-6<br>(pg/24hrs/10 <sup>6</sup> cells) |
|------------------------|--|--|
| SCC                    |  |  |
| CaSki                  | 330±75                                   | 369±53                                   |
| QG-U                   | 364±83                                   | 516±226                                  |
| OMC-1                  | 314±55                                   | n. d.                                    |
| TCS                    | 331±157                                  | n. d.                                    |
| HKMUS SF               | n. d.                                    | 902±161                                  |
| SKG-II SF              | n. d.                                    | n. d.                                    |
| SKG-I                  | 7382±568                                 | n. d.                                    |
| SKG-II                 | n. d.                                    | 6559±1299                                |
| SKG-IIIIa              | 2540±502                                 | n. d.                                    |
| adenoca.               |  |  |
| HeLa S3                | 303±18                                   | 49±37                                    |
| TCO-1                  | 1360±532                                 | n. d.                                    |
| TCO-2                  | n. d.                                    | n. d.                                    |
| miscellaneous          |  |  |
| GCC                    |  |  |
| TOM-2                  | 17464±2648                               | 4565±603                                 |
| HOKUG                  | 3220±391                                 | 673±180                                  |
| small cell ca.         |  |  |
| TC-YIK                 | n. d.                                    | n. d.                                    |
| carcinoid              |  |  |
| Medama                 | n. d.                                    | n. d.                                    |
| mean ±SD               |  |  |
| n. d. : not detectable |  |  |



### 3 - 1 材料と方法

H O K U G 株を 35mm シャーレ 7 2 枚に  $10^5$  個ずつの細胞を 2 ml の培地で播種し、I L - 6 ・ - 8 のいずれにも分泌促進的に働くサイトカインとして知られる ( 1 ) T N F -  $\alpha$  を 10ng/ml 、 ( 2 ) I L - 1  $\alpha$  を 10ng/ml 、 ( 3 ) T N F -  $\alpha$  と I L - 1  $\alpha$  をそれぞれ 5ng/ml を培地中に添加した群と ( 4 ) サイトカイン未添加のコントロール群の 4 群に分けて培養した。2 ・ 3 日毎に細胞数の計測と培地交換、同時に遠心して細胞成分を除去した培養上清を I L - 6 , - 8 測定用としてサンプリングし凍結保存した。全ての検体のサンプリングが終了した時点で I L - 6 ・ - 8 を E L I S A 法を用いて測定し、単位時間当たり・単位細胞数あたりのサイトカイン分泌量を求めた。

### 3 - 2 結果

( 図 1 1 ) に結果を示す。細胞増殖曲線は T N F -  $\alpha$  添加群で有意に増殖が抑えられていた ( a ) 。また、T N F -  $\alpha$  添加群・I L - 1  $\alpha$  添加群では I L - 6 の産生がコントロールに比してそれぞれ約 10 倍・2 - 8 倍に増加しており、T N F -  $\alpha$  と I L - 1  $\alpha$  添加による I L - 6 生産量は相加効果を示していた ( b ) 。同様に I L - 8 の産生量についても T N F -  $\alpha$  添加群で約 4 0 倍、I L - 1  $\alpha$  では約 2 - 8 倍に増加しており ( c ) 、その効果は相加的であった。

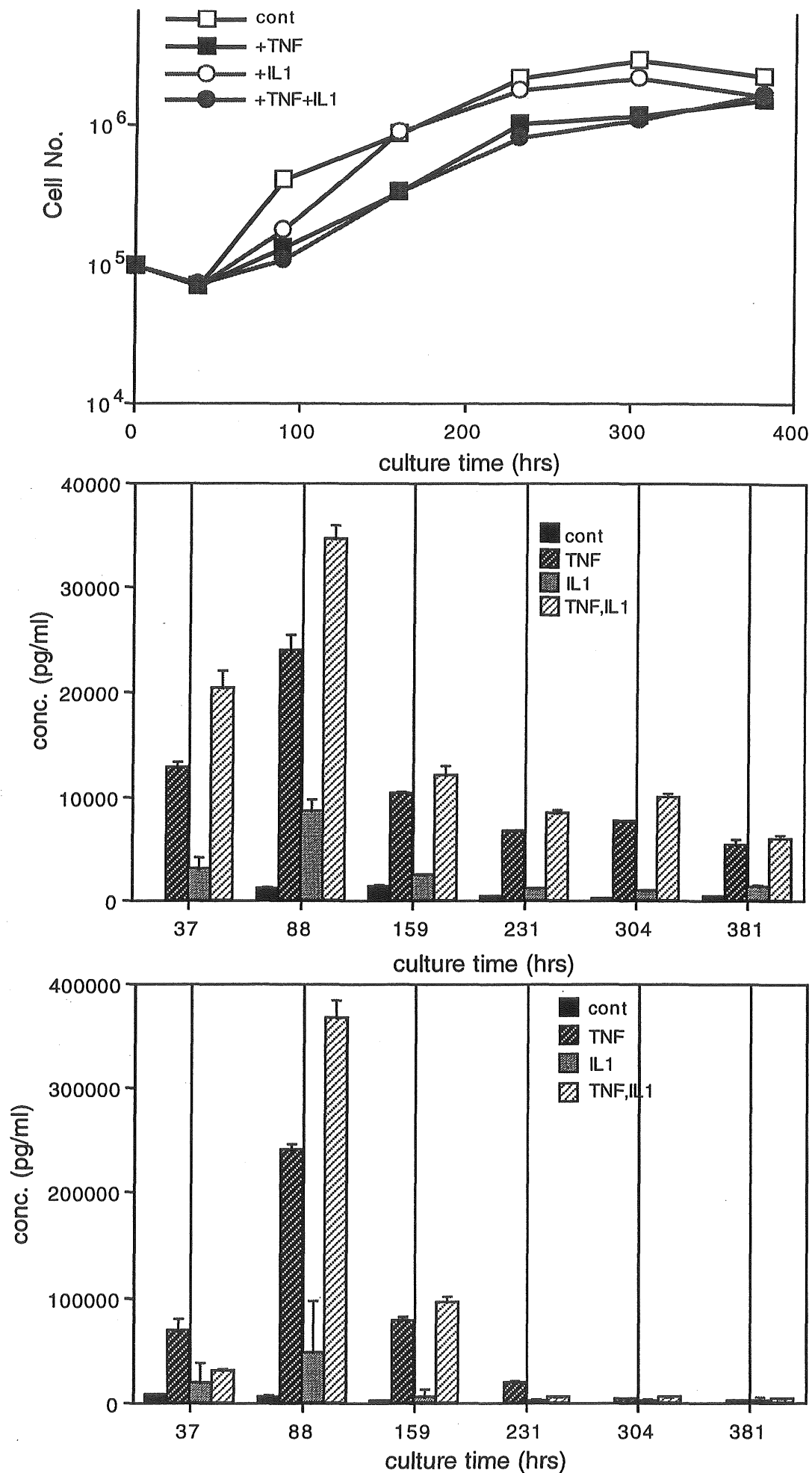


図 1 1 HOKUGにおけるIL-6、IL-8の分泌増強作用

#### 第 4 節 小括

G C C では高濃度の I L - 6, - 8 の両者を分泌していた。生体内でこれらのサイトカインはネットワークを形成し、お互いの分泌を制御しながら恒常性の維持を行っている。子宮腔部は外界からの刺激を受けやすい環境であるため、元来子宮腔部を構成する細胞である子宮頸部ケラチノサイトは I L - 6, - 8 産生能を有していることが知られている[37]。

G C C について、このようなサイトカイン産生能についてはこれまでに報告がない。そこで以下のような仮説が考えられた。

発癌過程で発生母地となった組織の持っていた分化能が欠落し、多くの子宮頸癌細胞では正常ケラチノサイトの特徴である I L - 6, - 8 の産生能を徐々に失っていき、一方 G C C では低濃度の分泌量ではあるが T N F -  $\alpha$  と I L - 1  $\alpha$  が産生されていたために I L - 6, - 8 の分泌能が保持され、徐々に分泌能が促進されたというものである。しかしながら、T N F -  $\alpha$  と I L - 1  $\alpha$  が I L - 6, - 8 の分泌を促進しても、G C C 細胞株の増殖促進的には機能していないことから、G C C の増殖に関してこれらサイトカインの autocrine, paracrine 機構は存在しないものと考えられた。

今回の実験で G C C は T N F -  $\alpha$  と I L - 1  $\alpha$  の添加により非常に高濃度の I L - 6, - 8 を分泌するようになった。G C C が生体内を浸潤・増殖していく過程で炎症反応が惹起されると、腫瘍細胞からだけではなく局所で生体反応として産生される、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1  $\alpha$  等によって I L - 6, - 8 が産生がよ

り促進されるものと推定される。このこととG C Cの臨床病理学的な特徴の関連を考察すると、まずT O M - 2の供資症例で遭遇した腫瘍熱と思われる発熱はこれらサイトカインの分泌による生体反応（腫瘍関連症候群[38][39]）の一つと考えられる。また最近の報告では末期癌患者に起こる悪液質は生体内で生産されるI L - 6やT N F -  $\alpha$ が関与していることが報告されており[40][41][42]、G C Cの予後を低下させている原因として腫瘍の産生するこれらサイトカインによる宿主の免疫反応の抑制や悪液質の惹起が関与している可能性も示唆された。具体的な臨床例でのサイトカイン分泌の証明は当該症例でサイトカイン測定に耐え得る保存血清がないため、今回の検討では不可能であるが、特にI L - 6による発熱はよく知られている事実であり、T O M - 2の臨床例での腫瘍熱の原因がI L - 6である可能性は十分に考えられるものである。

また、G C Cの病理所見として特徴的な腫瘍細胞周囲の好酸球・好中球・リンパ球の浸潤は、I L - 8が別名白血球活性化因子とも称され、腫瘍近傍や炎症組織に対して白血球を動員させる作用があることからI L - 8等の作用による可能性が高いと考えられた。

このようにG C Cの複数サイトカイン産生性が高組織型の子宮頸癌にない特徴であり、鑑別診断を行う上で大きな意味を持つことが示唆された。

## 第 5 章 G C C の 抗 癌 剤 感 受 性 検 査

G C C が臨床的に進行が早く、たとえ早期に発見されたとしても治療に抵抗して再発し、予後不良の症例の多いことは既述の通りである。一方、子宮頸癌のなかで大部分を占める扁平上皮癌は予後良好な組織型と言われているが、これは早期発見例が多いことに加えて進行例でも放射線療法や化学療法にある程度の感受性を示すことも一因である。このなかで、化学療法に関してはBleomycin ( B L M ) と C D D P の 2 剤の有効薬剤が知られ、これらの薬剤を中心に据えたいくつかのregimen が提唱されている[43][44]。このように組織型別に有効薬剤を選択することは化学療法を施行する上で必要である。そのため我々は *in vitro* で組織型別に抗癌剤の感受性を検討し、適応薬剤を選定して臨床応用する、いわゆるDisease oriented screening system ( D O S S ) の考え方にに基づき各種婦人科領域の腫瘍細胞株について ( 卵巣明細胞癌[45]、卵巣小細胞癌[46]、子宮体癌[47] ) 抗癌剤感受性検査を施行した。

今回、細胞株数が揃わなかったためにこれまで行えなかった G C C の抗癌剤感受性検査を施行し、有効薬剤の抽出を試みた。

### 第 1 節 材料及び方法

検討を加えた細胞株は前述の G C C 細胞株 3 株である。

また、抗癌剤は C D D P ・ Etoposide ( ETP ) ・ B L M ( 日本化

薬)、Mitomycin C(MMC)(杏林製薬)、254-S・4-hydroperoxy Cyclophosphamide(CPM)・Vincristine(VCR)(塩野義製薬)、5-Fluoro uracil(5-FU)(協和発酵)、Actinomycin D(Act D)(萬有製薬)、7-ethyl-10-hydroxycamptothecin(SN-38)(第一製薬: 以上は製薬会社各社より供与)、Paclitaxel(Taxol)(和光純薬)であり、婦人科領域で頻用されている薬剤を網羅した(表5)。

細胞株はほぼconfluentとなった培養フラスコからトリプシン処理で単細胞化し30000から50000個/mlの細胞浮遊液を作成した。96穴マイクロプレート(ファルマシア)を用い、1wellあたり3000から5000個の細胞を播種した(細胞浮遊液0.1mlずつ)。翌日、細胞の付着を確認して上記抗癌剤の希釈系列を作成し、培地に添加した。接触濃度は各々の抗癌剤のarea under the curve(AUC)を基に、臨床での最大耐用量で到達する血中濃度を推定し、その近傍の10段階を設定した。接触時間も臨床での投与方法を考慮して6時間から48時間の4段階を設定した。規定時間で抗癌剤を接触させた後で培地を除去し $Ca^{++}$ ・ $Mg^{++}$ 不含磷酸緩衝液(PBS(-))で2回洗浄してから培地を交換し培養を継続した。最長接触時間である48時間時の洗浄後、更に48時間継続培養しWST-1アッセイ[48]を行い、細胞の活性を比較した。この方法は、以前に我々が施行した薬剤感受性検査[45][46][47]で用いたMTTアッセイと同様のSDI法の一法であり、細胞のミトコンドリア内のコハク酸脱水素酵素の活性を調べるものである。MTTアッセイに比して、比色定量に用いられるホルマザン色素の抽出が容易であり、簡便・高

表5 IC50 values of GCC cell lines against 11 anti-neoplastic agents

| drug  | MTD                     | AUC<br>hr µg/ml | 6hr        |            |           | 12hrs       |            |             | 24hrs       |             |             | 48hrs       |             |             |
|-------|-------------------------|-----------------|------------|------------|-----------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|       |                         |                 | TOM-2      | Opt60b     | HOKUG     | TOM-2       | Opt60b     | HOKUG       | TOM-2       | Opt60b      | HOKUG       | TOM-2       | Opt60b      | HOKUG       |
| ActD  | 0.01mg/kg               | 0.94            | <u>0.1</u> | -          | 0.5       | <u>0.01</u> | -          | <u>0.01</u> | <u>0.01</u> | <u>0.02</u> | <u>0.01</u> | <u>0.01</u> | <u>0.02</u> | <u>0.01</u> |
| BLM   | 30mg/body               | 6.37            | -          | 5          | 2         | -           | 1          | 2           | -           | <u>0.1</u>  | 1           | 1           | <u>0.1</u>  | 1           |
| MMC   | 30mg/body               | 1.65            | -          | <u>0.1</u> | 0.5       | 10          | 0.5        | <u>0.1</u>  | 5           | <u>0.05</u> | <u>0.05</u> | 2           | 0.1         | 0.05        |
| CPM   | 200mg/body              | 39.2            | -          | 10         | 5         | -           | 10         | 5           | -           | 10          | 5           | -           | 10          | 5           |
| 5-FU  | 15mg/kg                 | 103.7           | 200        | -          | 100       | 50          | -          | 20          | 20          | -           | 5           | <u>2</u>    | 500         | <u>2</u>    |
| VCR   | 0.075mg/kg              | 0.22            | 5          | 10         | 2         | 2           | -          | 0.5         | 10          | -           | 0.5         | 5           | -           | 0.01        |
| ETP   | 540mg/m <sup>2</sup>    | 428.6           | -          | -          | <u>50</u> | -           | -          | <u>20</u>   | -           | -           | <u>5</u>    | -           | -           | <u>2</u>    |
| CDDP  | 120mg/m <sup>2</sup>    | 369.1           | -          | <u>2</u>   | <u>10</u> | -           | <u>2</u>   | <u>5</u>    | <u>10</u>   | <u>1</u>    | <u>5</u>    | 10          | <u>1</u>    | <u>2</u>    |
| 254S  | 120mg/m <sup>2</sup>    | 0.6             | -          | -          | -         | NT          | -          | -           | 10          | 10          | 5           | 5           | 5           | 5           |
| Taxol | 250mg/m <sup>2</sup>    | 31.9**          | -          | <u>0.2</u> | <u>1</u>  | -           | <u>0.1</u> | <u>1</u>    | -           | <u>0.05</u> | <u>0.05</u> | -           | <u>0.05</u> | <u>0.05</u> |
| SN-38 | 165mg/m <sup>2</sup> ** | 0.667           | -          | 0.5        | -         | NT          | 0.5        | -           | -           | 0.05        | -           | 2           | 0.05        | 5           |

\* : AUC obtained from reference(29)

\*\* : MTD as irinotecan hydrochloride

NT: not tested

IC50:the concentration which causes 50% inhibition of growth;

AUC:area under the curve

MTD: maximum tolerated dose.

精度であると言われている。

薬剤感受性の判定は各薬剤の4接触時間別に50%阻止濃度（IC<sub>50</sub>）を求め、接触時間とIC<sub>50</sub>値の積を*in vitro*での仮想AUC値として実際のAUC値と比較する、西出ら[47]の判定基準に従った。すなわち、薬剤の最大耐用量でのAUC値を*in vivo*での薬剤の腫瘍接触量と仮定すると、*in vitro*では薬剤濃度と接触時間の積で近似できる。従って、臨床応用を考えたとき、このAUC値以下でIC<sub>50</sub>値が得られた場合を臨床的に効果が期待できると規定し、一点でもこの条件を達成した薬剤を有効と判定した。具体的には各薬剤・各接触濃度におけるIC<sub>50</sub>値を算出して下記の式に従い、有効・無効の判定を行った。

「有効」：【IC<sub>50</sub> x 薬剤接触時間】値が一点でも最大臨床投与時のAUC値を下回った場合

「無効」：【IC<sub>50</sub> x 薬剤接触時間】値が全ての点で最大臨床投与時のAUC値を上回った場合



( 図 1 2 ) は T O M - 2 の代表的な用量生存曲線を示す。

4-hydroperoxy C P M では T O M - 2 に対して全ての接触濃度・接触時間で I C 50 が得られず無効であった。また、5 - F U では薬剤濃度依存性 ( 各々の曲線の右下がり ) は少ないものの、暴露時間が長期化するに従い生存曲線の下方移動を認め、時間依存性に作用することが判明した。一方、A c t - D では時間依存性もあるが、急峻な右下がりの曲線となり濃度依存性の薬剤であることが判明した。同様にして得られた 3 株の I C 50 値を示す ( 表 5 ) 。

斜線・太字・下線で数値を示している場所は感受性ありと判定された箇所である。T O M - 2 は有効と判定された薬剤が C D D P、5 - F U、A c t - D の 3 種類しかなく、かなり薬剤抵抗性であることが示された。

また、H O K U G では比較的感受性が高く、A D M、A c t - D、M M C、C P M、5 - F U、C D D P、T a x o l で感受性と判定された。

O p t i 0 b については C D D P、A c t - D、T a x o l、S N - 3 8 に感受性であった。

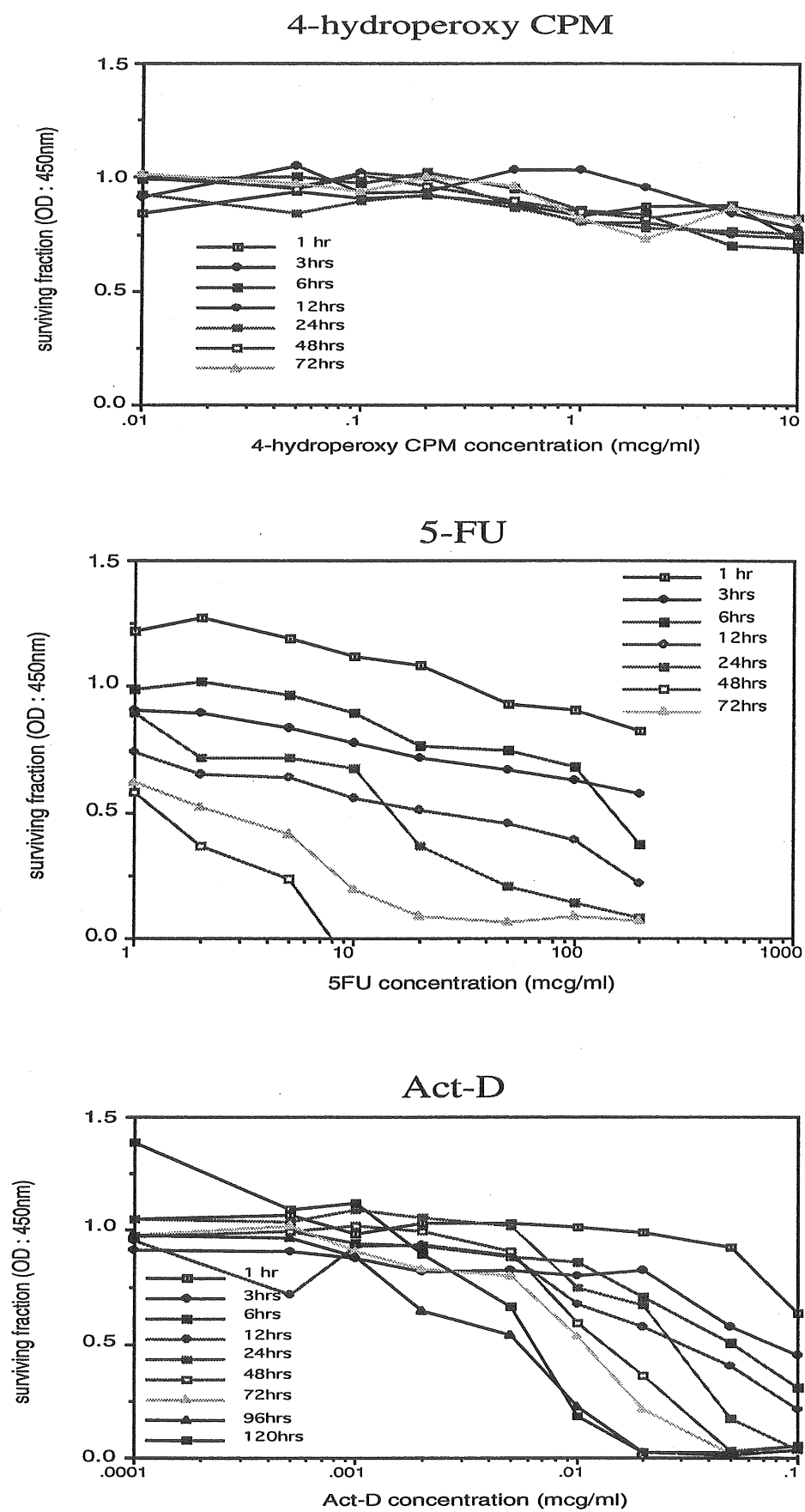


図 1 2 TOM-2における薬剤感受性検査例

*in vitro*での抗癌剤感受性検査の結果、G C C細胞株の薬剤感受性は比較的高感受性のH O K U Gから低感受性のT O M - 2まで様々であり、一概に感受性の高低を論じることではできなかった。3株に共通して有効性を認めた薬剤はC D D PとA c t - Dであった。A c t - Dは副作用、特に骨髄抑制と粘膜面の炎症が強く、臨床では絨毛癌以外では用いられる機会が少ないが、主要な副作用が腎毒性であるC D D Pとは臨床的に併用が可能であると考えられ、2者併用によるA c t - P療法の効果が期待された。また、それ以外に3株中2株で有効と判定された薬剤は5 - F U、M M C、T a x o 1、S N - 3 8であり、これらの薬剤と婦人科系腫瘍のkey drugであるC D D Pの併用療法の可能性も示唆された。特に新薬として登場したS N - 3 8やT a x o 1では、婦人科癌に対するC D D Pとの併用療法が有効であるという報告が多く[49][50][51]、効果が期待される。また、消化器癌を中心としてC D D Pと5 - F Uを併用によるBiochemical modulationが注目されている[52][53]。

臨床T O M - 2の症例ではC D D Pを含む化学治療は奏効しなかった。これは、*in vitro*と*in vivo*での薬動学的特性の差異や腫瘍周囲の環境の違いによるものと考えられるが、実際に上記の薬剤併用は施行されておらず、今後の症例での検討が必要であると考えられた。いずれにせよ、婦人科癌のkey drugはC D D Pを中心としたプラチナ製剤であり、投与方法をも考慮した新しいregimenの開発が強く望まれる。

## 第6章 細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の誘導

第5章でも論じたようにGCCに対する治療法の個別化・標準化が不十分であることから、従来の治療法では限界がある。そこで、新たな集学的治療法の可能性を求めて、近年注目されている養子免疫療法に着目し基礎的検討を行った。

アメリカNIHのRosenbergらは自己の末梢血由来リンパ球を高単位のIL-2を添加した培地で培養し、増殖させたLAK (lymphokine activated killer) 細胞をIL-2と共に患者に投与する治療法を試みた[54]。この結果は奏効率33% (CR4+PR8/36) と有望視されたが、この方法は煩雑で高価なサイトカインを大量に使用すること、その後の追試で効果の再現性が悪いこと等から現在では下火になっている。次いで細胞傷害性Tリンパ球 (Cytotoxic T lymphocytes : CTL) が注目された。CTLは当初ウイルスに感染した細胞を特異的に傷害するキラー細胞として研究が進められ[55]、これが腫瘍免疫に応用され、LAK療法の後を受けてCTL療法が登場した。LAK療法との違いは、一言で言えばLAKがIL-2でリンパ球を活性化して非自己と認識された細胞を非特異的に傷害するのに対して、CTLでは抗原を発現した特定の腫瘍のみを認識し、強い傷害活性を発揮する特異的免疫であるという点にある。CTLの抗腫瘍効果の機序の解明が進むにつれて、この細胞は標的となる腫瘍細胞上のMHC (major histocompatibility complex) 分子と、特異的に腫瘍細胞に発現しMHC分子に結合する抗原ペプチド、そしてT細胞上のT細胞受容体 (TCR)、これら三者の相互

結合によってtargetとなる腫瘍細胞を認識し殺傷していることが明らかとなった（（図13）[56]より転載）。

C T Lは抗原特異的なキラー細胞であるため、特定のM H C分子上に会合している抗原ペプチドの存在している腫瘍にのみ強い傷害性を示すため、癌に対する免疫細胞療法の主役として期待されている。

現在では、C T LやNK(natural killer)細胞等の免疫担当細胞の監視により極初期の癌病変の多くが排除されているものと考えられている。しかしながら、担癌患者では癌細胞がこのような免疫機構を逃れて増殖・発育している。これに対する説明として、担癌患者の自然経過中に十分な活性を持ったC T Lが誘導されなかったか、誘導されたC T Lが失活していることが考えられる。この点については近年いくつかの知見が得られており、癌細胞が分泌する免疫抑制的なサイトカインであるIL-4、IL-10等により近接するリンパ球の活性が失われたり[57]、癌細胞の膜表面上に存在するB7、ICAMといった、T細胞を活性化を維持するのに必要なco-stimulatory moleculesが発現せず、いわゆるanergy状態になることも知られている[58][59]。更には癌組織周囲のリンパ球のT C Rの会合分子の一つである、 $\zeta$ 鎖が欠失することによってシグナル伝達が阻害されることも指摘されている[60][61]。他方、癌細胞では増殖過程でM H C分子を発現しなくなる場合や細胞膜表面にM H C分子や抗原ペプチドを輸送する蛋白質の欠落によって[62][63][64]、腫瘍特異抗原の提示をしないことでキラー細胞から逃れているものもある。

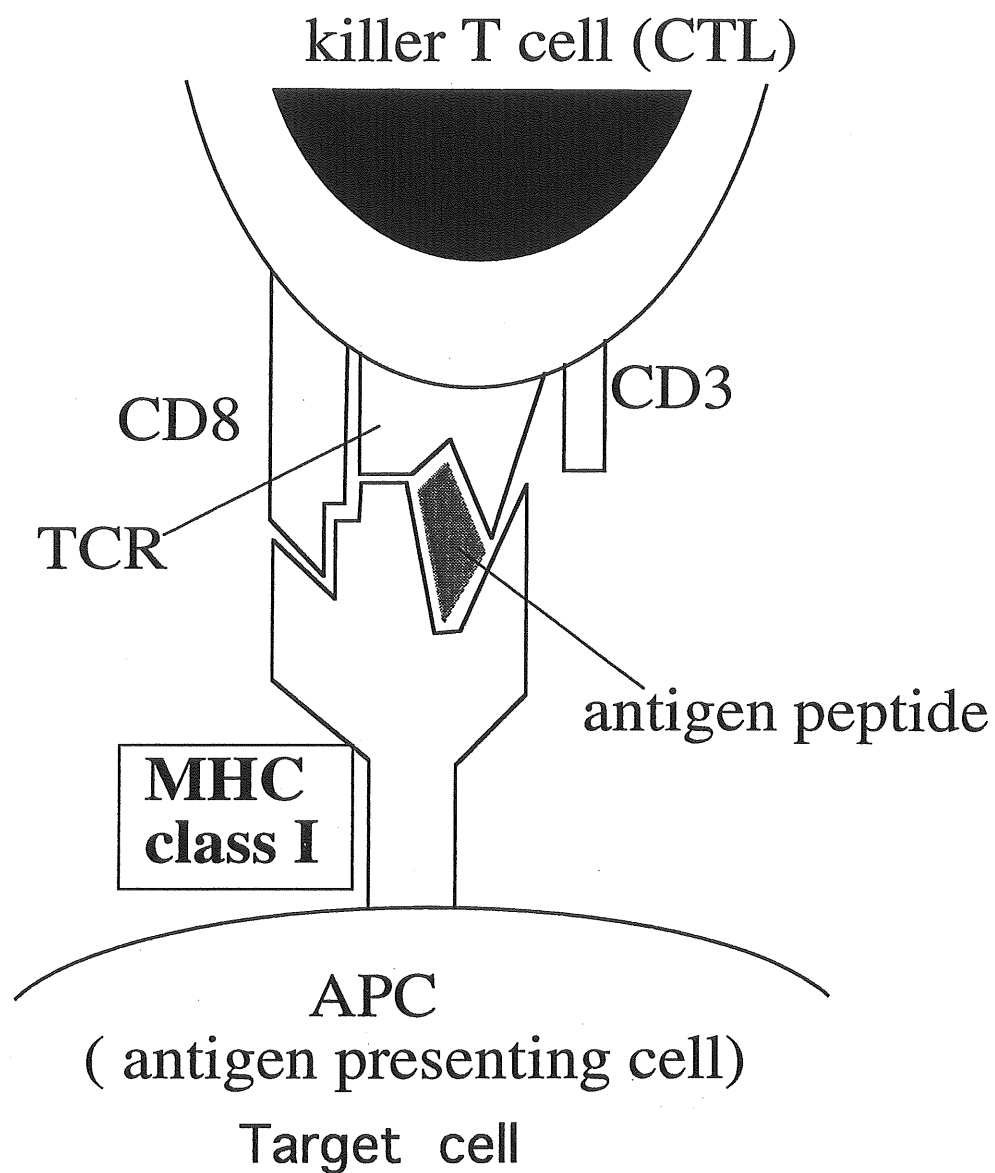


図 1 3 CTLによる腫瘍抗原の認識機構

これらの事実をふまえた上で、摘出された癌細胞を標的としてCTLを体外で誘導し体内に戻す、いわゆるCTLによる養子免疫療法が考案された。しかしながら、この方法では癌細胞の初代培養が困難であることからtargetの安定供給が困難であることが問題となる。婦人科腫瘍に対して初代培養を試みた場合、培養に成功して細胞株の樹立に至る例は10%以下であり、安定したCTL誘導が可能な症例は少ない。

そこで、今回我々は生着した癌細胞を使用せずにホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いてCTLを誘導する方法を開発した[65][66][67]。この方法の利点はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックが全ての術後患者で保存してあるため、CTL誘導の対象を飛躍的に増加させることができる点である。そこで婦人科領域の腫瘍についてCTLが誘導できることを実証するべく、モデル系として子宮体癌由来MIN-2株を用いてCTLの誘導を試み、GCCへのCTL誘導の可能性を検討した。

## 第1節 材料及び方法

### 1-1 患者自己末梢有核細胞分画の調製

モデル系として子宮体癌由来樹立株であるMIN-2を用い、婦人科領域の悪性腫瘍に対するautologousCTLの誘導法を検討した[66]。

患者本人に研究内容を説明したうえで、同意を得て採血した。

ヘパリン加採血の血液を生理食塩水で希釈しファイコールを使用した密度勾配遠心法 (Lymphoprep: Nycomed Pharma AS) で末梢血単核球分画 (P B M C) を分離した。P B M C は生理食塩水で2回洗浄したあと培地で洗浄し、リンパ球培養用培地として5%自己血清添加 R h a m -  $\alpha$  に浮遊させた。

## 1-2 生細胞からの C T L 誘導 (M I N - 2)

C T L を誘導するための標的 (target) として生着 M I N - 2 細胞 (以下 live target) を用いた。まず、6穴の細胞培養プレート (ファルコン) に M I N - 2 を播種・培養し、ほぼフルシートとなった状態で50GyのX線を照射して増殖を抑制した。その後培地に Interferon (I F N) -  $\gamma$  (塩野義製薬) を100U/ml 添加し1日培養してlive target とした。一部の癌細胞ではM H C 分子の低発現の可能性が報告されており[62][63][64]、I F N -  $\gamma$  の添加はM H C 分子の発現の増強を狙ったものである[68][69]。

live target からの具体的な C T L の誘導法であるが、前処理したlive target に1-1 で調製したP B M C を約  $5 \times 10^6$  個加えて5%自己血清添加 R h a m -  $\alpha$  培地で混合培養した。この培地にリンパ球を活性化する目的で、I L - 1 (167U/ml:大塚製薬), - 2 (67U/ml:塩野義製薬), - 4 (167U/ml:小野薬品), - 6 (134U/ml:味の素) を添加した[65]。1、2日毎に細胞数の計測と同時に培地交換を行い、サイトカインも同時添加することによりリンパ球を持続的に刺激した。targetとサイトカイン



の持続的な刺激によりリンパ球は徐々に増加したため、その培養密度を  $5 \times 10^5 / \text{ml}$  に保つように適宜希釈しつつ培養系を拡大した。

リンパ球の増加に伴い target は針状に変性して剥離し、最終的には消失した。この時点から、1～2週間毎に live target を effector / target (E / T) ratio を 10 (腫瘍細胞に比してリンパ球が10倍の割合) となるように MIN-2 細胞を添加してリンパ球を再刺激した。細胞の増殖を確認した後、フローサイトメトリーによる phenotype の確認と、細胞傷害活性を検討 (killing assay) した。(図 14)

### 1-3 ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた CTL 誘導

#### 1-3-1 腫瘍細胞上の MHC 分子の発現性の検討

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィンした標的 (fixed target) を CTL 誘導に用いるためには、最低でも腫瘍細胞膜の表面に MHC class I 分子 (HLA A, B, C) とその表面に腫瘍特異的なペプチドが会合する必要がある (図 13)。そのため、まず原腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋切片上で MHC 分子の保存を確認する必要がある。

免疫組織染色に先立ち、陽性コントロールを得る目的で live target からの CTL 誘導に使用した MIN-2・GCC 細胞株の生細胞を用いて実際の MHC 分子の存在を確認した。細胞継

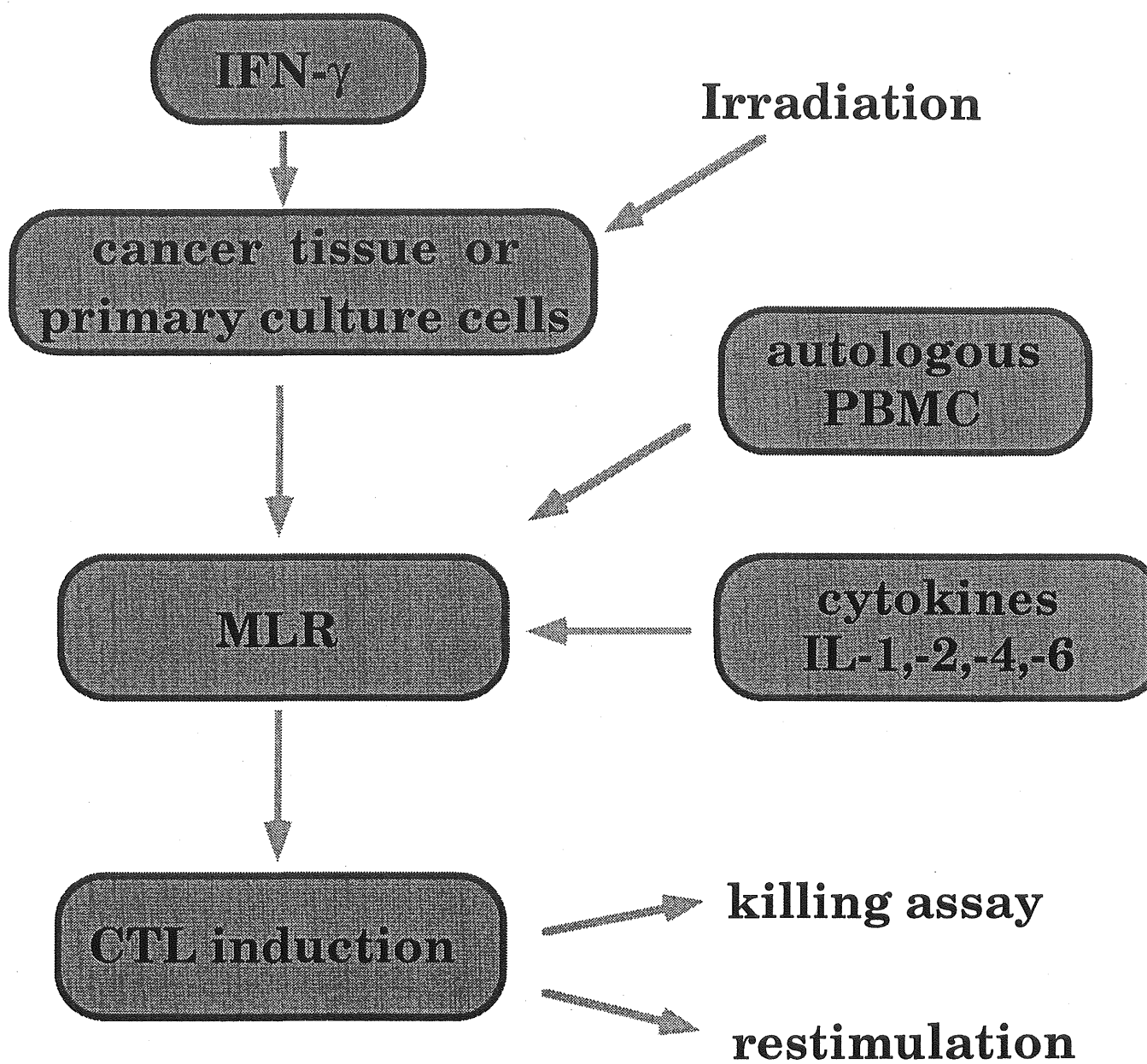


図 1 4 live targetを用いたCTLの誘導

代時に0.25%トリプシン処理により単細胞化したM I N - 2 ・ T O M - 2 ・ O p t 6 0 b ・ H O K U G の生細胞にP E 標識マウス抗ヒトM H C class I抗体（ベクトン&ディッキンソン）とF I T C 標識マウス抗ヒトM H C class II 抗体（同）を作用させてフローサイトメーターを用いてM H C 分子の発現の有無を分析した。この検討では4株全てでM H C class I・II の発現が認められたため（図15）、M I N - 2 ・ T O M - 2 ・ O p t 6 0 b ヌードマウス移植腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを薄切したスライドを陽性コントロールとして免疫組織化学による至適染色法の検討を行った。ここで問題となるのは抗ヒトM H C class I抗体で入手可能なものでパラフィン切片での染色性を保証しているものがないことであった。今回使用した、Serotech社製の抗ヒトM H C class I抗体（W6/32）も前試験として行ったL S A B 2 キット（Dako）でマイクロウェーブ処理による抗原復活を行ったにもかかわらず陽性コントロールまで全てが染色されず、通常の免疫染色では染色不可能と考えられた。そこでDako社製C S A （Catalyzed signal amplification）キット[70]を用いて感度増強によるM H C 分子の検出を試みた。

M H C 分子発現の検討対象は、M I N - 2 の臨床手術検体、G C C 株で手術標本の入手可能なT O M - 2 ・ O p t 6 0 b で、パラフィンブロックより切片を薄切しシランコートされたスライドグラスに展着させた。免疫染色に際して、抗体はSerotech社製の抗ヒトM H C class I抗体（W6/32）とD A K O 社製抗ヒトM H C class II抗体を使用し、C S A キットを用いて染色し

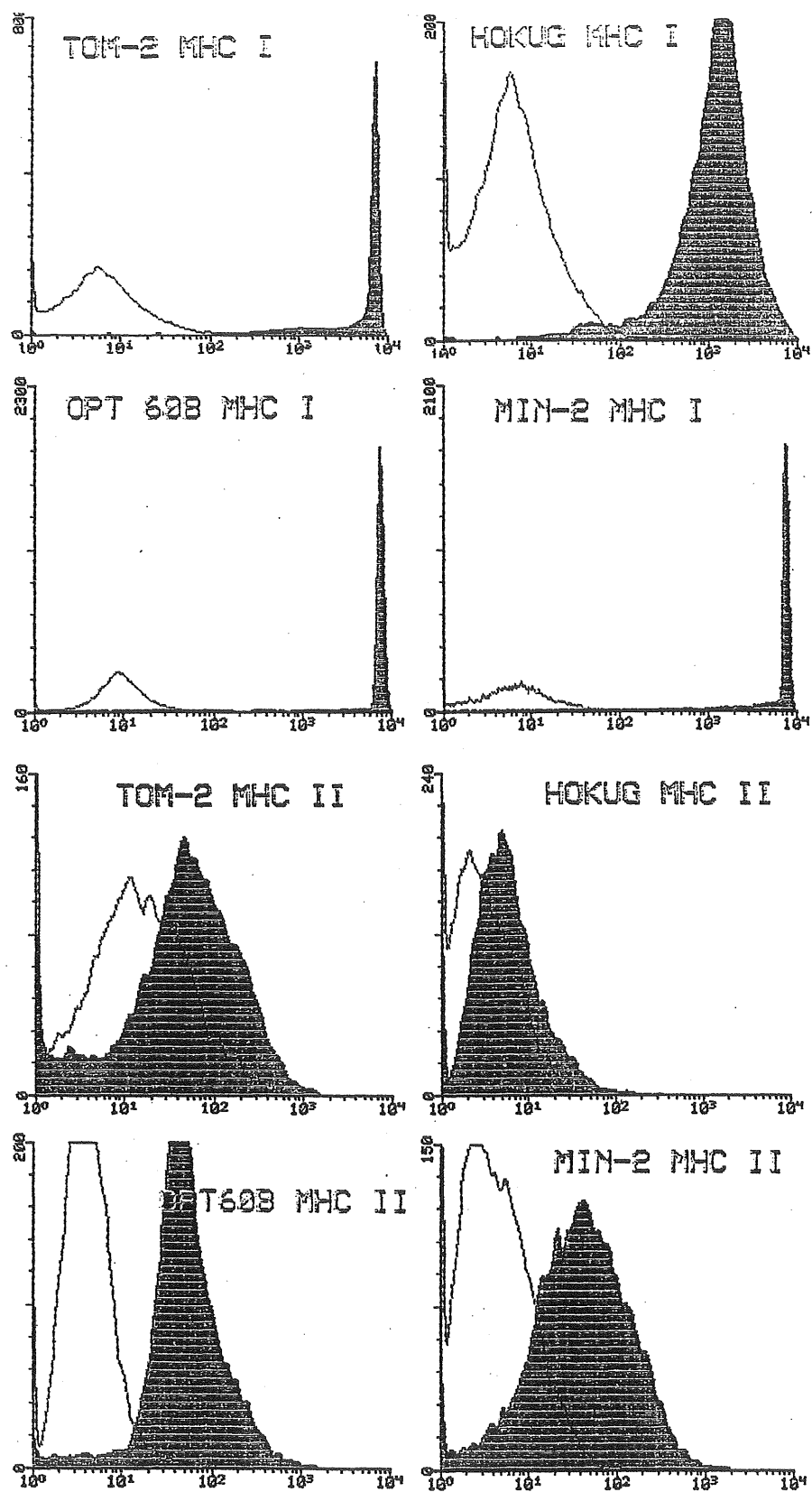


図 1 5 MIN-2 および GCC細胞株 のMHC 分子の発現

た。陽性コントロールとして上記ヌードマウス移植腫瘍の切片を用い、陰性コントロールとしては同切片にDAKO社製マウスIg陰性コントロール処理したものを用いた。

染色はCSAキットの手順に従った、すなわちスライドを一連の操作で脱パラフィンし、内因性ペルオキシダーゼの阻害、タンパクブロックを行い、一次抗体を40分接触させて、二次抗体結合処理、次いで増感剤を反応させた後は通常通りに発色させた。発色剤はキット附属の3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)を用いた。発色後にマイヤーのヘマトキシリンで核染色を行ない再透徹後にDAKO社製永久標本用メディウムで封入して観察した。染色性の判定は陰性コントロールが染色されず、陽性コントロールが染色性を示した時に、同時に染色した腫瘍組織が10%以上の染色性を示したとき陽性と判定した。

### 1-3-2 固定切片上でのMHC分子の抗原提示能

*in vitro*でのfixed targetの抗原提示能を確認するためlive target から誘導したCTLを再刺激する際に、fixed targetもしくはlive targetを用いた。経時的にCTLの増殖曲線を描き、増殖シグナルを比較検討した。

### 1-3-3 ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた

#### CTL誘導

モデル系として子宮体癌由来のにMIN-2によりCTL誘

導を試行した。fixed targetの作成法は以下の通りである。M I N - 2 の原腫瘍の手術標本として保存されていたホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを薄切し約5枚分をポリプロピレン製の15ml遠心管（ファルマシア）に入れ、100%キシレンを10ml加えて攪拌、20分の静置の後、遠心分離（2000 rpm, 800 x G）した。同様の処理を2回繰り返して脱パラフィンし、次いでキシレンを100%エタノールに置換するべく3回洗浄した。その後70%エタノールを加えて一晩室温に放置し滅菌した。翌日P B S（－）で2回洗浄し脱エタノールして最終的に培地に懸濁した。

細菌汚染チェックを行い、汚染がないことを確認したものをfixed targetとした。

1 - 1 で調製したP B M C とfixed targetを混合して培養を開始した。これから先の方法は1 - 2 の混合培養以下同様である（図16）。この場合、再刺激に際して用いるtargetはfixed targetを用い、killing assay ではM I N - 2 生細胞を使用した。

#### 1 - 3 - 4            killing assay

killing assay は4時間接触の<sup>51</sup>Cr release assayが標準法とされているが、R I を使用するため操作が煩雑で計画性が要求される。そのため我々は付着細胞をクリスタルバイオレット染色して、生細胞数を比較する方法（C V assay）を応用した[65][71][72]。この方法では生存している癌細胞がプレート上

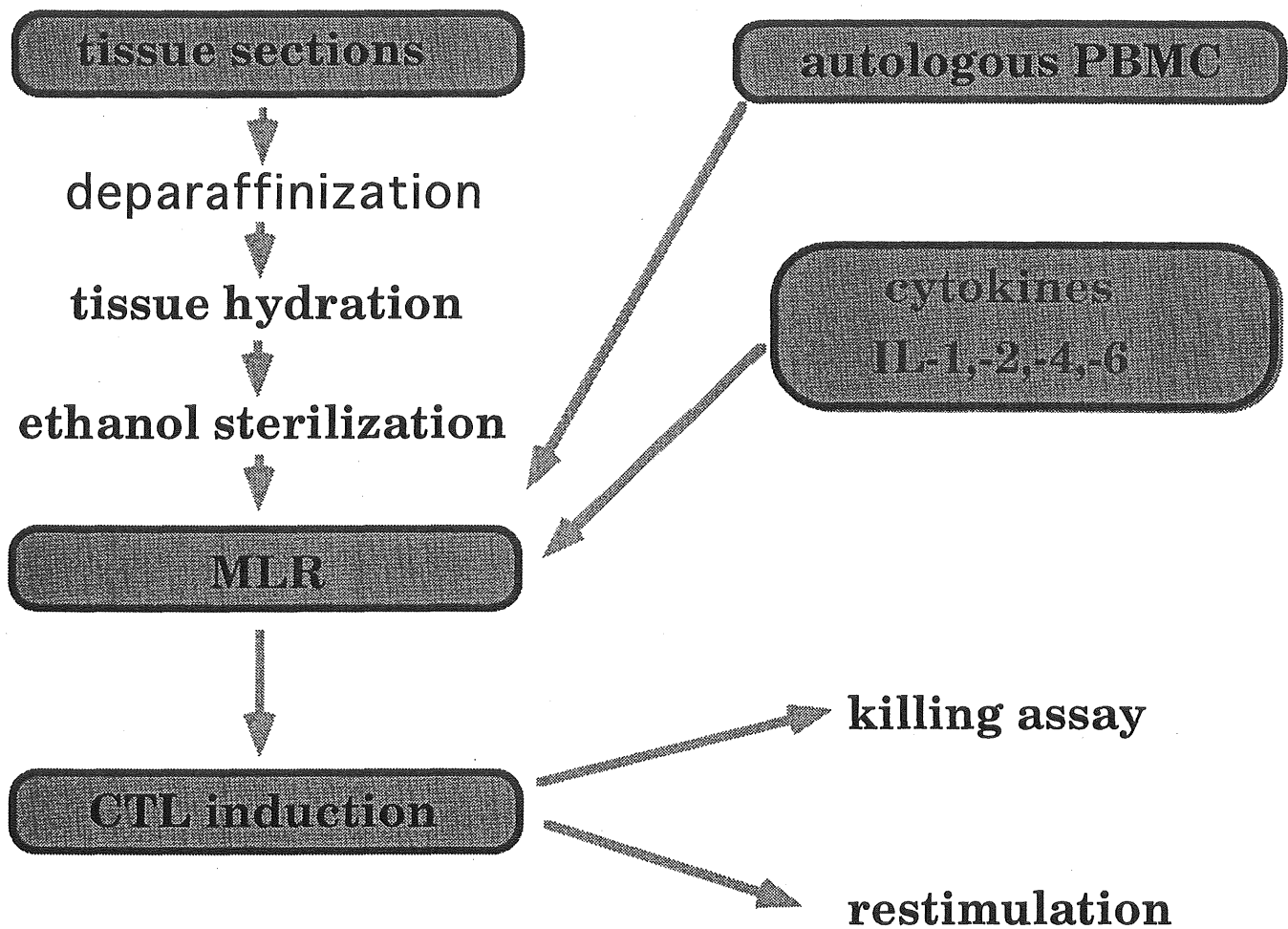


図 1 6 パラフィン包埋切片を用いたCTLの誘導

に付着していることに着目して、染色された細胞面積と細胞数 [65][73][74]。この方法では生存している癌細胞がプレート上に付着していることに着目して、染色された細胞面積と細胞数が相関することを用いて色素濃度を計測する。

前日に96穴マイクロプレート（ファルコン）上にtargetとなるM I N - 2細胞を100 $\mu$ lの培地で5000個ずつ播種した。翌日リンパ球をE / T ratioを1、2、4、8となるように調製したうえでtargetの付着しているwellに100 $\mu$ lの培地で添加した。24時間後に培地を除去してP B S（－）で1回洗浄してから中性緩衝ホルマリン液を用い10分間固定した。そのあとでP B S（－）による2回洗浄後クリスタルバイオレット溶液を加えて30分間染色し水洗、80%メタノールで色素を抽出して波長570nmでの吸光度を測定した。この方法は assayの性質上、浮遊系の細胞株には応用できないが、<sup>51</sup>Cr release assayと高い相関があることは既に証明されており[65]、簡便で再現性のあるアッセイ法である。

### 1-3-5 リンパ球のphenotyping

増殖したリンパ球の性状を調べるためにフローサイトメトリーによるリンパ球のphenotypingを行った。使用した機器はベクトン&ディッキンソン社製のF A C S c a nで、L y s i s I Iのプログラムを解析に用いた。

約1 x 10<sup>6</sup>個のリンパ球をP B S（－）で洗浄して60 $\mu$ lのP B S（－）懸濁液を作成した。これを3本に分注し、1本は

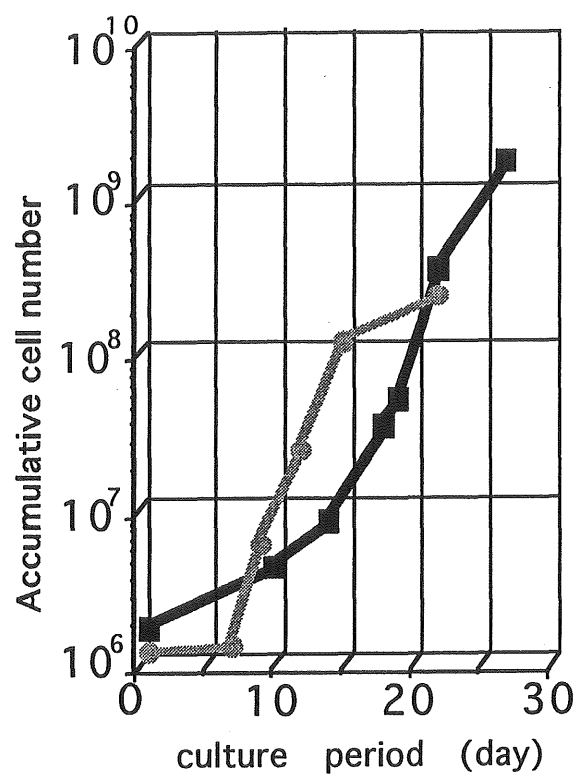


陰性コントロールとしてDAKO社製FITC／PE標識マウスIg-G1混合抗体を添加した。残りの2本はDAKO社製の2種標識の抗CD3／CD56（FITC／PE標識）、抗CD8／CD4（FITC／PE標識）抗体をそれぞれ5  $\mu$ lずつ添加した。4度に1時間静置して抗原・抗体反応させ、次いで2%FBS添加PBS（－）で2回洗浄し、0.5～1 mlのPBS（－）に懸濁した。陰性コントロールの蛍光強度から陰性範囲を決定し、試料の蛍光強度の強弱で各々の抗体に対する陽性・陰性の比率を求めた。

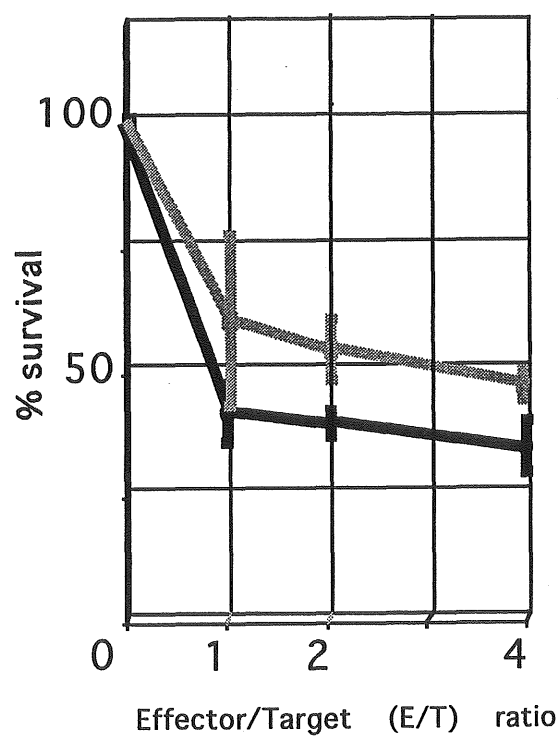
## 第2節 結果

### 2-1 MIN-2の生細胞を用いたCTLの誘導

MIN-2のlive targetを用いたCTLの誘導では、リンパ球は順調に増殖を示し、約4週間で総計 $10^9$  cellsに達した（図17）。このリンパ球のphenotypeはCD3：99%、CD4：1%、CD8：96%とCD8陽性Tリンパ球であり、またそのkilling assayの成績でも、E／T ratio：1でも50%以上の殺傷性を示した。また、婦人科悪性腫瘍由来細胞株に対する、allogenic targetに対する傷害活性はほとんどなく（図18）、autologousな腫瘍特異的な細胞傷害性が示された。以上より、誘導されたTリンパ球はCTLであると考えられた。



増殖曲線



細胞傷害活性

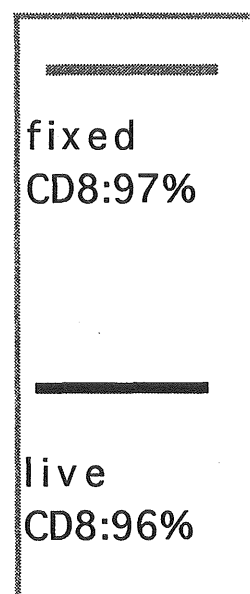


図1 7 MIN-2 CTLの増殖曲線および細胞傷害活性

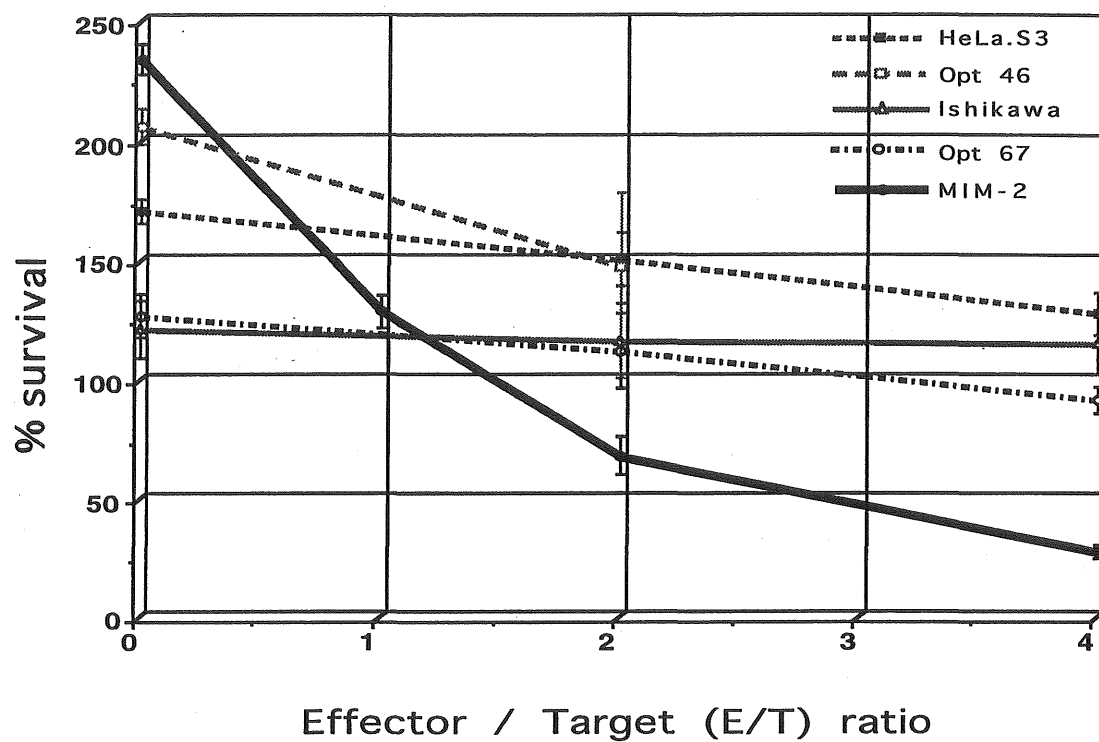
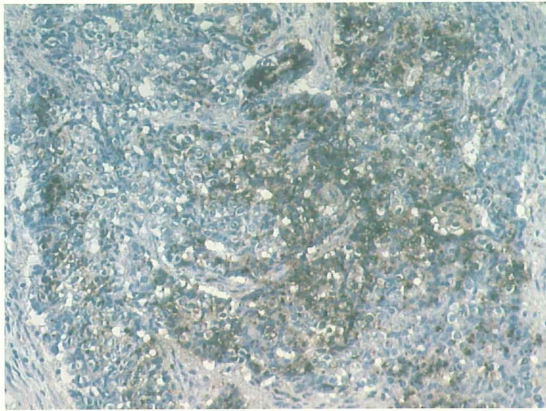


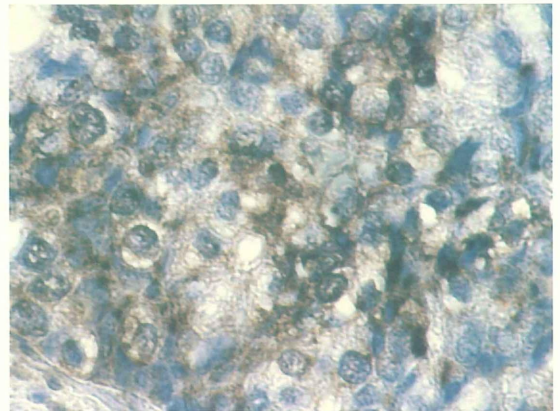
図 1 8 MIN-2 CTLの細胞傷害特異性

2-2-1 腫瘍細胞上のMHC分子の発現性の検討

まず、生細胞のMHC分子の発現をF A C S c a nで検索した(図15)。0.25%トリプシン処理により単細胞化したM I N - 2・T O M - 2・O p t 6 0 b・H O K U Gの生細胞では4株全てでM H C c l a s s Iの発現が確認された。また、M H C c l a s s I I分子の発現もH O K U Gで弱いものの、発現されているものと考えられた。そこでM I N - 2、T O M - 2・O p t 6 0 bのヌードマウス移植腫瘍より作成したホルマリン固定パラフィン包埋切片を陽性コントロールとしてC S A k i tを用いた免疫染色を行った。(図19)に結果を示す。M I N - 2の原腫瘍組織(a)は中分化型の子宮内膜腺癌で一部に腺上皮様構造をとっているが、染色性が見られない間質細胞を背景に腫瘍細胞では強い染色性を示しており、細胞膜中心の染色性が認められた。また、O p t 6 0 b(b)の原腫瘍組織においては腫瘍細胞が腫瘍巣を形成せずに間質の中に浸潤しているのが観察され、染色されない間質と対照的に腫瘍組織に染色性が確認された。T O M - 2の原腫瘍も同様であった。MHC分子は細胞膜に存在していること、並びに今回は陽性コントロールが陽性に染色され、陰性コントロールは染色されなかったことから、M H C c l a s s I分子がC S Aシステムにより免疫染色可能となり、なおかつ3種類の原腫瘍

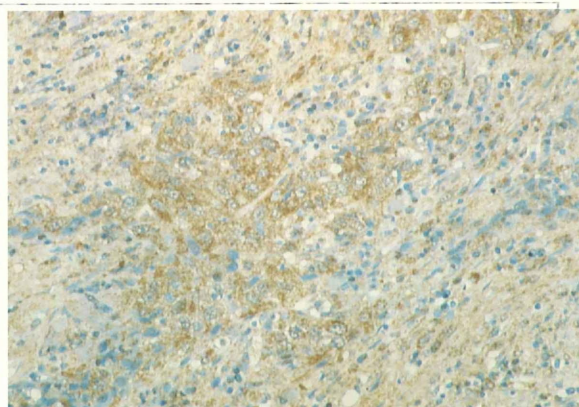


x 100

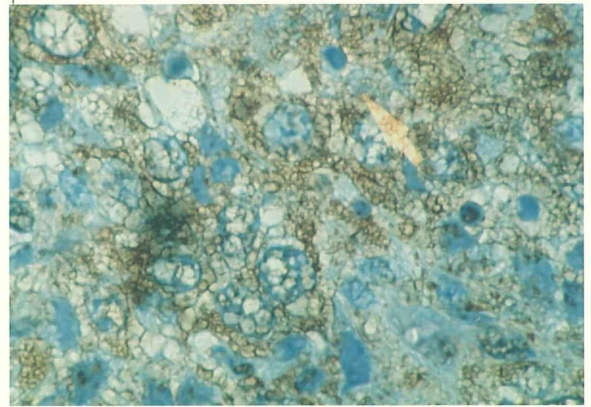


x 400

a. MIN-2



x 100



x 400

b. Opt60b

図19 GCC固定切片におけるMHC class I分子の保存

組織切片上で陽性の結果が得られたものと判断した。

## 2-2-2 固定切片上でのMHC分子の抗原提示能

そこで、live targetを用いて誘導したMIN-2のCTLを用いて、再刺激にlive targetを用いたものとfixed targetを用いたもののリンパ球増殖の差異を検討した（図20）。図中のRSは2回の再刺激を示す。live targetでは2回の再刺激ともlive targetで行い、fixed targetでも同様にfixed targetも全てfixed targetを用いた。その結果再刺激後のCTLは両再刺激群共に旺盛な増殖を示し、再刺激を行わなかった群が細胞数の減少している点を考慮すると、fixed targetの抗原提示能が保存されていることが明らかとなった。

以上よりMHC class I分子はホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを脱パラフィンした検体でも保存され、なおかつリンパ球に増殖・活性化シグナルを送る機能は保持されていることが判明した。

## 2-2-3 ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いたCTLの誘導

以上の実験によりfixed targetによる刺激でCTLの誘導が期待されたため、MIN-2 fixed targetを用いてCTLの誘導を行った。

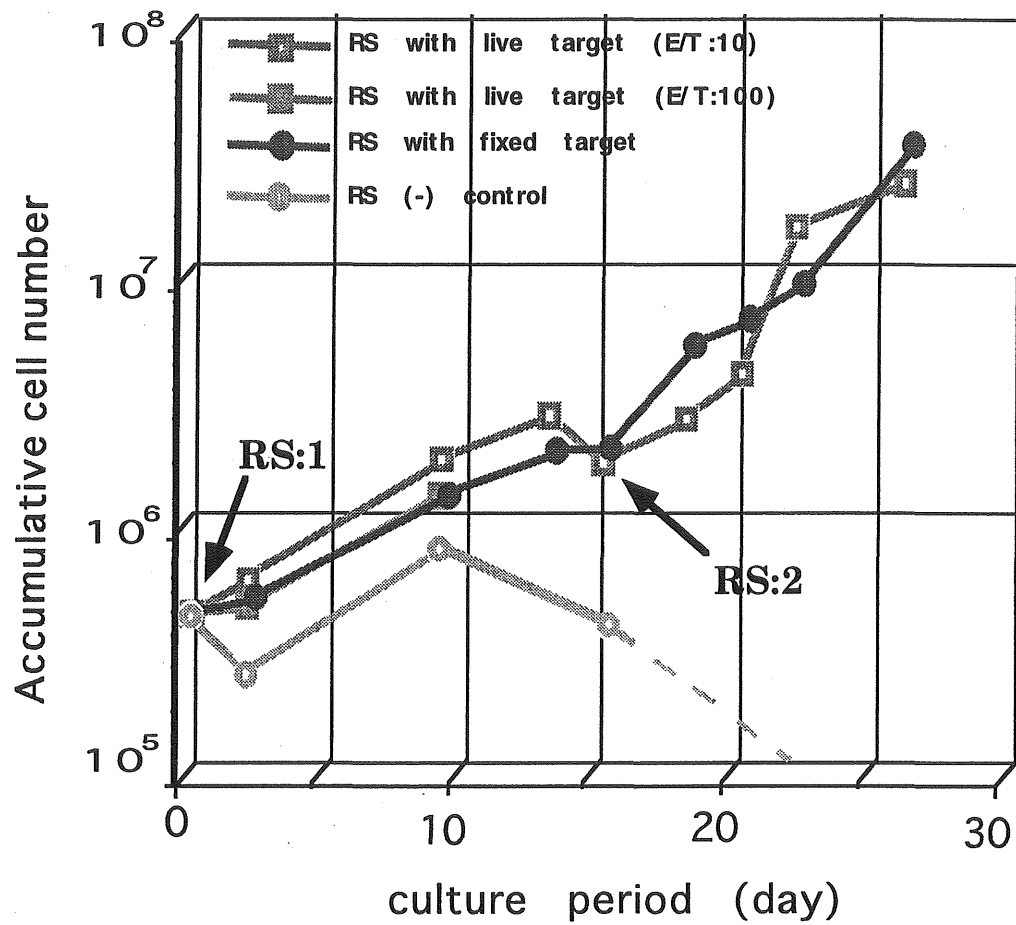
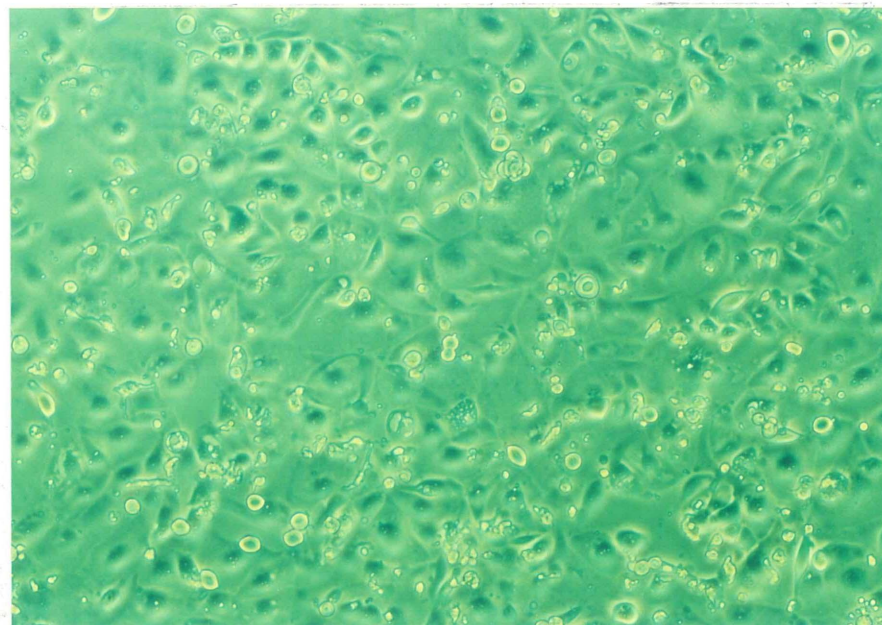


図 2 0 再刺激後のMIN-2 CTL の増殖

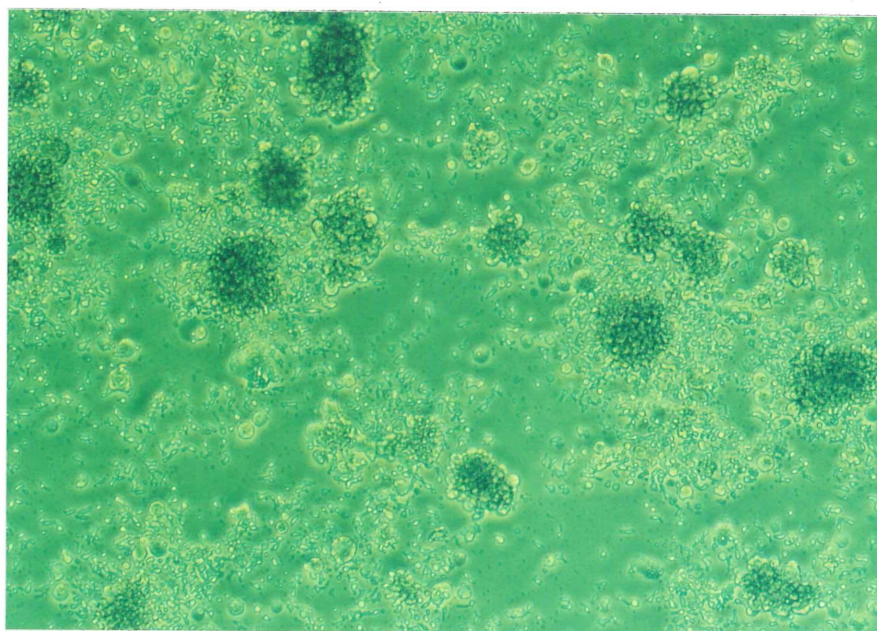
その結果、fixed targetを用いた群はlive targetを用いた群とほぼ同様の増殖様式を示し、live target群に比してやや弱い傾向はあるものの傷害活性も確認できた（図17）。また、phenotypeの確認でも95%以上の細胞がCD3陽性、CD8陽性であり、fixed targetからMIN-2に対するCTLが誘導されたものと考えられた。（図21）はMIN-2CTLの再刺激前後の培養状態を示している。E/T ratio: 10では一晩でtargetを全て傷害した。

以上より、婦人科領域の腫瘍細胞に対してlive targetからのみでなくfixed targetからもCTLが誘導できることを実証した。また、GCCの細胞もMHC分子の発現が確認されたため、GCCに対するCTL療法の可能性が示唆された。





再刺激前 (x100)



再刺激後 (x100)

図 2 1 MIN-2 CTL 再刺激時のtarget 傷害性

M H C class I分子の免疫染色は市販の抗体ではパラフィン切片では困難と考えられており、通常凍結標本の免疫染色用として販売されている。しかしながらホルマリン固定パラフィン包埋切片を脱パラフィンした、fixed targetを用いてC T Lの誘導を試みる場合、凍結標本ではなくパラフィン切片でtarget上にM H C class I分子が保存され、機能が保持されていることの証明が不可欠であった。そこでD A K O社のC S Aシステムを用いてパラフィン切片でM H C分子の発現を検討した。このシステムではこれまでパラフィン切片上で免疫染色が不可能とされていたいくつかの抗原をうまく染色すること知られており[70]、今回のM H C class I分子もうまく増感されて染色されたものと考えられた。しかしながらこれだけではM H C分子の機能の保持までは十分に証明できない。今回用いた抗体はM H C class I分子であるH L A A, B, C分子のうちの一つだけでも発現していると染色される。また、固定等諸操作によって機能が保持されているM H C分子の数が激減している(C S A k i tで増感して初めて陽性化するほど少数である)可能性も否定できない。そこでM H C分子の抗原提示能の保存状態を明らかにするべく、fixed targetを用いて再刺激を行った。結果として再刺激によるリンパ球の増殖はfixed targetでもlive targetと遜色ない増殖性を確認し、少なくともfixed targetを再刺激に用いた場合、細胞増殖を促すシグナルの伝達が行われていることが判明した。

次にモデルとして誘導を行ったMIN-2では live target、fixed target共にCTLが誘導されたが、ややfixed targetで誘導したCTLの傷害活性が弱かった。これに関しては、単位target量当たりの抗原提示能の違いや、MHC以外にCTL増殖に関与するco-stimulatory molecule [58][59]の保存状態等が今後解明されなければならない。

GCCは術前に扁平上皮癌と診断されている場合が多く、初代培養用の検体が採取されていない場合、従来のCTL誘導（live targetからの誘導）は困難となるため fixed targetからのCTL誘導の存在価値は大きいと思われる。今回GCCの原腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋切片上でのMHC分子の保存が明らかとなり、今後のCTL誘導に期待が持てるものと考えられた。

既存の集学的治療に抵抗性であるGCCに対してin vitroでの強い傷害活性は臨床上魅力的であり、養子免疫療法が今後の集学的治療の柱の一つとなることが期待される。

## 第 6 章 総括

婦人科悪性腫瘍は子宮頸癌・子宮体癌・卵巣癌の3種類が中心である。この中で子宮体癌や卵巣癌は近年進歩しつつある抗癌剤による化学療法之恩恵に浴する機会が多いが、子宮頸癌は比較的予後がよいとされ、放射線治療が奏効することが多いことから、進行子宮頸癌イコール放射線治療というステレオタイプ化された図式はなかなか直らないのが実情である。しかしながら放射線療法後に再発した症例や放射線治療抵抗性の症例などを目の前にしたとき、実際に次の治療法（2nd line treatment）を選択するための拠り所となるデータはあまりに少ない。

これはGCCについても同様であった。教科書的には放射線治療抵抗性、進行は極めて早く予後不良との記載があるだけで、有効な治療法についての記載はない。そのためGCCの細胞株が樹立されたとき、この細胞株を用いてGCCに特徴的な性質、効果的な治療法等について検討することが急務であると考えた。その後TOM-2・Opt60bが樹立され、HOKUGを加え3株を用いた検討を行った。

今回の検討で細胞生物学的特徴を挙げると、

- 1) GCCは*in vitro*では多稜形で敷き石状に配列する単層・平面的な増殖形態を示し、培養密度が高くなっても重層化しない。
- 2) GCCの細胞倍加時間は44時間以上であり、これは他の培養細胞と比して比較的長い。

3) G C Cは腫瘍マーカーとして C A 1 2 5を分泌する。T O M - 2とH O K U Gでは同時にS C C抗原も分泌されていた。これはG C Cが腺癌と扁平上皮癌の両者の性質を兼ね備えているものと考えられ本腫瘍が低分化な腺扁平上皮癌と分類される事実を反映する。また、低濃度ではあるが、N S Eも分泌されており特異性の確認の必要があるものと思われた。

4) G C Cには子宮頸癌患者で高頻度に検出されるH P VのD N Aが検出された。子宮頸癌で最も高い頻度で検出される1 6型は検出されず、1 8型2例、5 6型が1例であった。

5) G C Cは高濃度のI L - 6, - 8を産生していた。他の子宮頸癌細胞株では両者同時の産生が見られないことから、他に分泌されているT N F -  $\alpha$ とI L - 1  $\alpha$ がI L - 6, - 8の分泌促進的働いているものと考えられた。T O M - 2の供試症例で遭遇した腫瘍熱や悪液質、腫瘍細胞周囲の間質反応としての好酸球・好中球・リンパ球の浸潤等G C Cに特徴的な所見はこれらサイトカインの分泌が原因となっていることが推察された。

これらは今回初めて報告されたG C Cの生物学的特徴であり、今後臨床診断に役立つものと考えられた。特にG C Cと大細胞非角化型扁平上皮癌との鑑別に有用であると考えられた。

一方、本研究によって得られた、G C C の治療面での知見は以下のようによまとめられる。

1 ) G C C は薬剤耐性の強い腫瘍であるが、その中ではC D D P、A c t - D、5 - F U、T a x o l、S N - 3 8 に感受性を有していた。従って今後、これらの薬剤の併用療法の有効性が期待された。

2 ) G C C にはC T L の腫瘍抗原認識を行うためのM H C 分子の保存が確認され、今後C T L による養子免疫療法も考慮されるべきものと考えられた。G C C は生物学的にとってもユニークな性質を持ち合わせているため、今回検討したパラフィン切片からのC T L 誘導だけではなく、過剰発現している腫瘍マーカーであるC A 1 2 5 やS C C 抗原、N S E のみならずI L - 6、- 8 やH P V 関連蛋白質を抗原とするC T L の誘導がタンパク質レベル[73]・M H C に結合するペプチドレベル[74][75]・遺伝子レベル[76]でのターゲッティングすることで、より効率的に行えるであろうと考えられた。

最後に今回の研究でG C C について判明した生物学的特徴をシェーマとして(図22)に記してまとめとする。

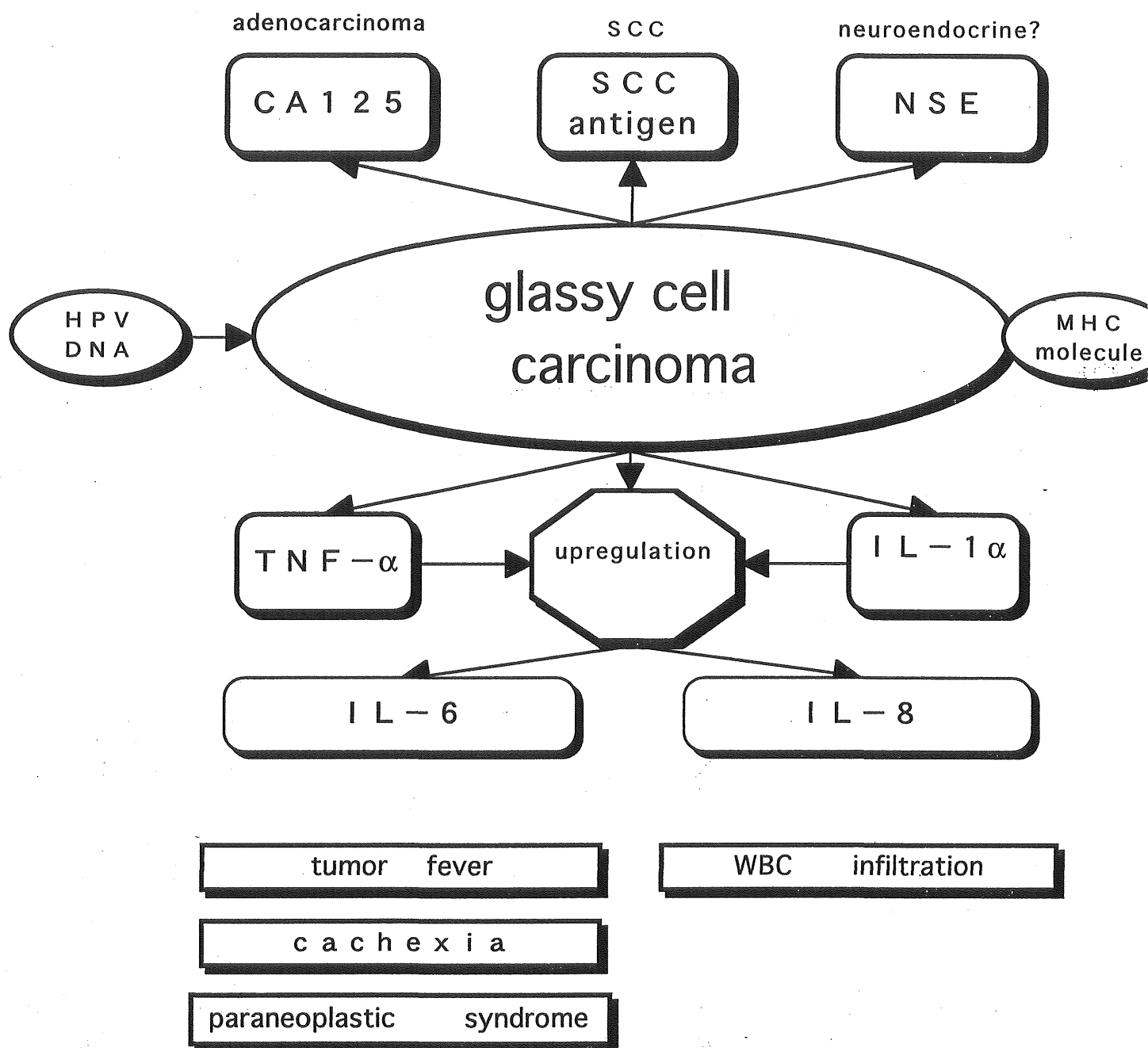


図 2 2 G C C の生物学的特徴のフローチャート

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲下さいました筑波大学臨床医学系久保 武士教授に深甚なる謝意を表します。また、実験の理論面で御指導下さいました理化学研究所ジーンバンク室長大野 忠夫先生、筑波大学臨床医学系西田 正人助教授に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり貴重な助言や援助をいただいた筑波大学体育学系目崎 登教授、筑波大学臨床医学系臼杵 惣助教授、筑波大学臨床医学系角田 肇講師、筑波大学臨床医学系西出 健講師、をはじめとする筑波大学産婦人科の諸先生方、サイトカインの測定に協力してくださった東京厚生年金病院笠原 国武先生、実験を手伝ってくださった理化学研究所細胞開発銀行西條 薫技官、林田 みどり嬢以下細胞開発銀行の方々、そして貴重な検体を提供してくださった患者さんの皆様に心から感謝いたします。

本研究の内容の一部は第33回、35回日本癌治療学会総会、第48回、49回日本産科婦人科学会学術講演会、第13回日本ヒト細胞学会大会で発表した。

また、一部はNature medicine vol.2,1997. に発表掲載された。



## 参考文献

- 1 Nieminen, P., Mervikallio, M., Hakama, M. The effect of mass screening on incidence and mortality of squamous and adenocarcinoma of cervix uteri. Obstet Gynecol 85: 1017-21; 1995.
- 2 Davis, J. R., Moon, L. B. Increased incidence of adenocarcinoma of uterine cervix. Obsetet Gynecol 45: 79-83; 1975.
- 3 Savargaonkar, P. R., Hale, R. J., Pope, R. et al. Enteric differentiation in cervical carcinomas and its prognostic significance. Histopathol 23: 275-277; 1993.
- 4 van Nagell, J. R., Donaldson, E. S., Wood, E. G., et al. Small cell cancer of the uterine cervix. Cancer 40: 2243-2249; 1977.
- 5 Albores-Saavedra, J., Larraza, P., Poucell, S., et al. Carcinoids of the uterine cervix: Additional observation in a new tumor entity. Cancer 38: 2328-42; 1976.
- 6 Dickerson, G. R., Welch, W. R., Erlandson, R. et al. Ultrastructure of 16 cases of clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix in young women. Cancer 45: 1615-1624; 1980.
- 7 Glucksmann, A., Cherry, C. P. Incidence, histology and response to radiation of mixed carcinoma (adenoacanthomas) of the uterine cervix. Cancer 9: 971-79; 1956.

- 8 Zaino, J. R., Nahhas, A. W., Mortel, R. Glassy cell carcinoma of the uterine cervix. Arch Pathol Lab Med 106: 250-54; 1982.
- 9 日本産科婦人科学会、日本病理学会、日本医学放射線学会編 子宮頸癌取り扱い規約 第1版 金原出版 pp53-61, 1982
- 10 Tamimi, H., Ek, M., Helsa, I., et al. Glassy cell carcinoma of the cervix redefined. Obstet Gynec 71: 837-41; 1988.
- 11 Pak, H. Y., Yokota, S. B., Paladugu, R. R., et al. Glassy cell carcinoma of the cervix: Cytologic and clinicopathological analysis. Cancer 52: 307-12; 1983.
- 12 Ulbright, T. M., Gersell, D. J. Glassy cell carcinoma of the uterine cervix: A light and electron microscopic study of five cases. Cancer 51: 2255-2263; 1983.
- 13 McLean, M. R. The pathology of the mixed carcinomas of the cervix. Aust NZ J Obstet Gynaec 5: 18-28; 1965.
- 14 Littman, P., Clement, P. B., Henriksen, B., et al. Glassy cell carcinoma of the cervix. Cancer 37: 2238-2246 ; 1976.
- 15 Seltzer, V., Sall, S., Castadot, M. J. et al. Glassy cell carcinoma. Gynecologie Oncol 8: 141-151; 1979.

1 6 Tsukahara, Y., Sakai, Y., Ishii, J. et al. A clinicopathological study on glassy cell carcinoma of the cervix. Acta Obst Gynec Jpn 33: 699-704; 1981.

1 7 Novak, E. R. Cervical neoplasia. in Novak's Gynecologic and Obstetric Pathology with Clinical and Endocrine Relations. (ed. by Novak, E. R., Woodruff, J.D.) Eighth edition. Saunders W.B. Press, Philadelphia, pp. 138-149 ;1979.

1 8 Kawai, K., Sasaki, T., Saijo-Kurita, K., Akaza, H., Koiso, K., Ohno, T. Additive effects of antitumor drugs and lymphokine-activated killer cell cytoactivity in tumor cell killing determined by lactate-dehydrogenase-release assay. Cancer Immunol Immunother 35: 225; 1992.

1 9 Oki, A., Nishida, M., Satoh, T., Tsunoda, H., Kasahara, K., Saijo, K., Kubo, T., Ohno, T. A novel human glassy-cell carcinoma cell line producing IL-6 and IL-8 from uterine cervix. *in press In vitro Animal*

2 0 Ishiwata, I., Ishiwata, C., Soma, M., Ono, I., et al. Differences between cell lines of uterine cervical glassy cell carcinoma and large cell non-keratinizing squamous cell carcinoma. Anal. Quant. Cytol. Histol. 12: 290-298; 1990.

2 1 Bosch, F. X., Manos, M. M., Munoz, N. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer, a worldwide perspective: International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst 87: 796-802; 1995.

2 2 Galloway, D. A., McDougall, J. K. Human papillomaviruses and carcinomas. Adv Virus Res 37: 125-71; 1988.

2 3 Wright, T. C., Richart, R. M. Role of human papillomavirus in the pathogenesis of genital tract warts and cancer. Gynecol Oncol 37: 151-64 ; 1990.

2 4 木村英三、村江正始、古賀良一、小田原靖、中村 豊 他 婦人科悪性腫瘍における新しい腫瘍マーカーCA 125の臨床的意義 日産婦誌 36: 2121-2128; 1984.

2 5 Gadducci, A., Ferdegini, M., Prontera, C., et al. A comparison of pretreatment serum levels of four tumor markers in patients with endometrial and cervical carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 11: 283-288; 1990.

2 6 Gocze, P. M., Vahrson, H. W., and Freeman, D. A. Serum levels of squamous cell carcinoma antigen and ovarian carcinoma antigen(CA 125) in patients with benign and malignant disease of the uterine cervix. Oncology 51: 430-34; 1994.

2 7 Dodd, J. K., Henry, R. J., Tyler, J. P., Houghton, C.R. Cervical carcinoma: a comparison of four potential biochemical tumor markers. Gynecol Oncol 32: 248-52; 1989.

2 8 Chen, C. A., Wu, C. C., Juang, G. T., et al. Serum neuron-specific enolase levels in patient with small cell carcinoma of the uterine cervix. J Formos Med Assoc 93: 81-83; 1994.

29 Ueda, G., Shimazu, C., Shimazu, H. et al. An immunohistochemical study of small-cell and poorly differentiated carcinoma of the cervix using neuroendocrine markers. *Gynecol Oncol* 34: 164-169; 1989.

30 Tseng, C-J., Tseng, L-H., Lai, C-H., Soong, Y-K., Hsueh, S., Pao, C-C. Identification of human papillomavirus type 16 and 18 deoxyribonucleic acid sequences in bulky cervical cancer after chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 176: 865-69; 1997

31 Riou, G., Favre, M., Jeannel, D., Bourhis, J., Doussal, V., Orth, G. Association between poor prognosis in early-stage invasive cervical carcinomas and non-detection of HPV DNA. *Lancet* 335: 1171-74; 1990.

32 Walker, J., Bloss, J. D., Liao, S. T., Berman, M., Bergen, S., Wilczynski, S. P. Human papillomavirus genotype as a prognostic indicator in carcinoma of the uterine cervix. *Obstet Gynecol*: 781-85; 1989.

33 Chen, T. M., Chen, C. C., Wu, C. C., Huang, S. C., Chang, C. F., Hsieh, C. Y. The genotypes and prognostic significance of human papillomaviruses in cervical cancer. *Int J Cancer* 57: 181-84; 1994.

34 Backe, J., Roos, T., Mulfinger, L., Martius, J. Prevalence of human papillomavirus DNA in cervical tissue. Retrospective analysis of 855 cervical biopsies. *Arch Gynecol Obstet* 259: 69-77; 1997.

35 小野崎菊夫 IL-1とIL-1レセプターアンタゴニスト. 笠倉新平編  
サイトカイン94' 日本医学館 : pp23-33; 1994.

- 3 6 Henricson, B. E., Benjamin, W. R., Vogel, S. N. Differential cytokine induction by doses of lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A that result in equivalent early endotoxin tolerance. Infection and Immunity 58: 2429-37; 1990.
- 3 7 Woodworth, C. D., Simpson, S. Comparative lymphokine secretion by cultured normal human cervical keratinocytes, papillomavirus-immortalized, and carcinoma cell lines. Am. J. Pathol. 142: 1544-55; 1993.
- 3 8 Fukumoto, S., Matsumoto, T., Harada, S., et al. Pheochromocytoma with pyrexia and marked inflammatory signs: A paraneoplastic syndrome with possible relation to interleukin-6 production. J Clin Endocrinol Metab 73: 877-81; 1991.
- 3 9 西村孝司 : IL-12の癌免疫療法への応用. 癌治療と宿主, 8: 325-33, 1996
- 4 0 Albrecht, J. T., Canada, T. W. Cachexia and anorexia in malignancy. Hematol Oncol Clin North Am 10: 791-800; 1996.
- 4 1 Cederholm, T., Wretling, B., Hellstrom, K., Anderson, B., Engstrom, L., Brismar, K., Scheynius, A., Forslid, J., Palmblad, J. Enhanced generation of interleukins 1 beta and 6 may contribute to the cachexia of chronic disease. Am J Clin Nutr 65: 876-82 ; 1997.
- 4 2 Matthys, P., Billiau, A. Cytokines and cachexia. Nutrition 13: 763-70 ; 1997.

4 3 Kim, D. S., Moon, H., Kang, K. Primary chemotherapy and postoperative adjuvant chemotherapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 22: 59-65; 1985.

4 4 Shimizu, Y., Hasumi, K., Masubuchi, K. Effective chemotherapy consisting of bleomycin, vincristine, mitomycin-C, and cisplatin(BOMP) for a patient with inoperable vulvar cancer. *Gynecol Oncol* 36: 423; 1990.

4 5 西田正人 難治性卵巣癌、特に卵巣clear cell carcinomaに対する新しい多剤併用化学療法確立に関する研究. *Oncol chemother* 8: 128-136; 1992.

4 6 河野圭子、西田正人、角田 肇、西出 健、染谷勝己、久保武士、下田隆夫、蔵本博行. In vitroにおける子宮頸部小細胞癌の抗癌剤感受性. *日癌治誌* 28: 1816-23; 1993.

4 7 西出 健、西田正人、新井ゆう子、佐藤豊実、沖 明典、河野圭子、角田 肇、久保武士 Pharmacokineticsを考慮した指標による子宮体癌のin vitro抗癌剤感受性の検討 *日癌治誌* 31:365-375.

4 8 Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., et al. A new sulfonated tetrazolium salt that produces a highly water-soluble formazan dye. *Chem. Pharm. Bull.* 41: 1118-22; 1993.

4 9 Klastersky, J., Sculier, J. P. Dose-finding study of paclitaxel (Taxol) plus cisplatin in patients with non-small cell lung cancer. *European Lung Cancer Working Party. Lung Cancer* 12 suppl 2: s117-25; 1995.

50 McGuire, W. P., Hoksos, W. J., Brady, M F., et al. Taxol and cisplatin (TP) improves outcome in advanced ovarian cancer as compared to cytoxan and cisplatin. Gynecologic Oncology Group. Proc. Amer Soc Clin Oncol 14: 274; 1995.

51 Fukuda, M., Nishio, M., Kanazawa, F., Ogasawara, H., Ishida, T., Arioka, H., Bojanowski, K., Oka, M., Saijo, N. Synergism between cisplatin and topoisomerase I inhibitors, NB-506 and SN-38, in human small cell lung cancer cells. Cancer Res 56: 789-93; 1996.

52 Scanlon, K.J., Newman, E.M., Lu, Y. et al. Biochemical basis for cisplatin and 5-fluorouracil synergism in human ovarian carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 83: 8923-25, 1986.

53 白坂哲彦、島本雄司、大下英之、木村彰男、福島正和 5-FU系抗癌剤とシスプラチンの併用による抗腫瘍効果増強とその作用機序-- 5-FUのbiochemical modulationの立場から -- 癌と化療 18: 403-409; 1991.

54 Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Chang, A. E., et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lympholine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. New Eng J Med 316: 889-97; 1987.

55 Stringfellow, M., Wraith, D. C., Askonas, B. A. Cytotoxic T-cell recognition of influenza-infected target cells varies in different H-2k mouse strains. Immunogenetics 18: 177-81; 1983.



- 56 沖 明典、大野忠夫 癌治療における細胞療法の現状と今後の展望  
養子免疫療法を中心として バイオサイエンスとインダストリー 55: 16-20;  
1997.
- 57 Yamamura, M., Modlin, R. L., Ohmen, J. D., Moy, R. L. Local  
expression of antiinflammatory cytokines in cancer. J Clin Invest 91:1005  
-10; 1993.
- 58 Blum, S., Milesi, R., Tratkiewicz, J., Olive, D., et al. Rapid  
induction of cytolytic T cells via CD28 stimulation for cellular immuno-  
therapy. Ther Immunol 1: 143-52; 1994.
- 59 河上 裕: ヒト悪性黒色腫におけるキラーT細胞認識抗原. 血液・免疫・  
腫瘍, 1: 65; 1996.
- 60 Mizoguchi, H., O'Shea, J. J., Longo, D. L., Loeffler, C. M.,  
McVicar, D. W., Ochoa, A. C. Alteration in signal transduction molecules  
in T lymphocytes from tumor-bearing mice. J Clin Invest, 258: 1795-8; 1992.
- 61 Finke, J. H., Zea, A. H., Stanley, J., Longo, D. L., et al. Loss  
of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human  
renal cell carcinoma. Cancer Res 53: 5613-6; 1993.
- 62 Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., et al. Implications  
for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors.  
Immunol Today 18: 89-95; 1997.

- 6 3 Frisan, T., Zhang, Q. J., Levitskaya, J., Coram, M., Kurilla, M.G., Masucci, M. G. Defective presentation of MHC class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes in Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 68: 251-8; 1996.
- 6 4 Seliger, B., Maeurer, M. J., Ferrone, S. TAP off-tumors on. *Immunol Today* 18: 292-99; 1997.
- 6 5 Liu, S. Q., Saijo, K., Todoroki, K., Ohno, T. Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections. *Nature Med.* 1: 267-71; 1995.
- 6 6 Liu, S. Q., Saijo, K., Todoroki, K., Ohno, T. Allogeneic, not autologous, CTLs generated from formalin-fixed tumor section[Corr.]. *Nature Med.* 2: 476; 1996.
- 6 7 Liu, S. Q., Shiraiwa, H., Kawai, K., Hayashi, H., Akaza, H., Kim, B. S., Oki, A., et al. Tumor-specific autologous cytotoxic T lymphocytes from tissue sections. *Nature Medicine*, 2: 1283; 1996.
- 6 8 Yard, B. A., Kooymans-Couthino, M., Reterink, T., van-den-Elsen, P., Paape, M. E., Bruyn, J. A., van-Es, L. A., Doha, M.R., van-der Woude, F. J. Analysis of T cell lines from rejecting renal allografts. *Kidney Int Suppl* 39: s133-8; 1993.

69 Neumann, H., Schmidt, H., Cavalie, A., Jenne, D., Wekerle, H. Major histocompatibility complex(MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon(IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. J Exp Med 185: 305-16; 1997.

70 Bobrow, M. et al. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification: Application to immunoassays. J Immunol Meth 125: 279; 1989.

71 Bonnekoh, B., Wever, A., Jugert, F., Merk, H., Mahrle. Colorimetric growth assay for epidermal cell cultures by their crystal violet binding capacity. Arch Dermatol Res 281: 4817-49; 1989.

72 Saotome, K., Morita, H., Umeda, M. cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using micrtitre plates and its application to injection drugs. Toxic in Vitro 3: 317-21; 1990.

73 Sarkar, A. K., Tortolero-Luna, G., Nehete, P. N., et al. Studies on *in vivo* induction of cytotoxic T lymphocyte responses by synthetic peptides from E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus type 16. Viral immunol 8: 165-74; 1995.

74 Evans, C., Bauer, S., Grubert, T., Brucker, C., et al. HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 protein E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. Cancer Immunol. Immunother. 42: 151-160; 1996.

7 5 Feltkamp, M. C., Vreugdenhil, G. R., Vierboom, M. P., et al. Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. Eur J Immunol. 25: 2638-42; 1995.

7 6 Tarpey, I., Stacey, S., Hickling, J., Birley, H. D., Renton, A., McIndoe, A., Davies, D. H. Human cytotoxic T lymphocytes stimulated by endogenously processed human papillomavirus type 11 E7 recognize a peptide containing a HLA-A2(A\*0201) motif. Immunology 81: 222-7; 1994.