ヒト骨肉腫由来培養細胞(OST細胞)のin vitro,in vivoにおける走査電顕的観察

メタデータ	言語: jpn
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者:
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8608

ヒト骨肉腫由来培養細胞 (OST 細胞)の *in vitro*, *in vivo* における走査電顕的観察

金沢大学医学部整形外科学講座(主任:高瀬武平教授)

富田勝郎

今日まで一般に,病理形態学的研究には,試料を薄 切し、その透過像より情報を得る、という手段を用い てきた、その際に立体的な情報が必要であれば、連続 切片標本を観察しつつ推測を働かせねばならず、或い は、replica によって鋳型を造り、間接的に観察する 以外に方法はなかった.それ故,必要とする立体構築 像は模式図として描かれており、対象を客観的に正確 に理解するには困難であった.しかし近年,走査型電 子顕微鏡(以下,走査電顕と略す.)が発明されたこ とにより,対象物を光顕レベル以下においても立体的 に観察することが可能となり、かかる問題点は解決さ れた. 先づ, 工学関係での活用に成功した走査電顕 は,1962年頃,歯組織の観察¹⁾に応用され,次いで1966 年 Hayes¹²⁾ が赤血球を観察し、その後、走査電顕 の持つ分解能の良さ,解読の容易さ,超薄切片作成が 不必要であること. などの利点と相俟って, これが次 第に悪性細胞への研究に利用されるようになってき t.

即ち *in vitro* での研究として、マウスやラットの 腫瘍由来細胞⁽⁾¹³⁾²⁰⁾, ハムスター卵巣由来の CHO cells²¹⁾²⁰, 更にマウス fibroblast とその悪性変化 (transformation) についての報告⁽⁾ がなされてお り、特にそれらの細胞の cell cycle に関係しての 細胞表面変化、細胞相互作用、 viral infection や reverse transformation agent による形態変化に ついて論じられてきた.しかし一方, *in vivo* での 悪性細胞についての検討では、子宮頸部癌^(I) や、膀胱 魍⁵⁾の組織表面を観察したものなどを散見するに過ぎ ない.

そこで著者は、長期継代培養に成功している人骨肉 腫由来培養細胞(OST 細胞)を用いて、 in vitro における細胞表面形態を走査電顕で観察し、更にこの 細胞をマウスに異種移植してできた腫瘍組織の割断面 を同様に観察して, in vitro,及び in vivo での本細胞の表面構造の特殊性の相異を検討し、以下の如き興味ある知見を得たので報告する.

実験材料 並びに実験方法

1. 人骨肉腫由来培養細胞(OST 細胞)の由来 1963年10月,金沢大学医学部整形外科学 教室に於 て、女子高校生(15歳)の左大腿骨々幹部に発生した 骨肉腫を、下肢切断直後に剔出し、細胞を分離して培 養を行い、1964年6月に株化に成功し、Osteogenic Sarcoma Takase Strain (OST 細胞)と名付けた²⁶⁾ ものである。以後、継代培養を続けて1975年9月現 在、established cell line として546代を数えて いる。

2. OST 細胞の異種移植方法

1) 免疫反応抑制方法

著者は Kubista et al. (1967)^{III}の方法に準じて、 Rabbit Anti-Mouse-thymus Serum (以下, RAM TS と略す)を作製してマウスに投与し、その免疫反 応の抑制を図った. 即ち, 生後2週の雌 ddN マウ スより胸腺組織を剔出し, 細切して胸腺細胞をと う, Hank's balanced Salt Solution に浮遊さ せ、この胸腺細胞5~10億個を体重2~3kgの家兎 の耳静脈へ注射し、2週間後、再度同量の胸腺細胞を 静注した. 2回目の胸腺細胞静注後1週間で. この家 兎から採血し、その分離した血清を56°C, 30分間加 温して不活化した後、使用時まで-20°Cで凍結保存 した

2) マウスへの移植方法

継代培養 4 ~ 5 日目の培養細胞を policeman を 用いて培養瓶のガラス面より剥離し, pipetting し て単離細胞とした後、細胞濃度が $20 \sim 40 \times 10^6$ /mlとな るよう培養液に浮遊させたものを移植に用いた、即ち

Scanning electron microscopic studies on cultured human osteogenic sarcoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Katsuro Tomita**, Department of Orthopaedic Surgery (Director : Prof. B. Takase), School of Medicine, Kanazawa University.

富

生後2週の ddN 雄マウスに RAMTS 0.05mlを7 日間,毎日1回腹腔内に注射した後,培養細胞1~10 ×10⁶個をその大腿骨周囲に注入移植した. 移植後も 同様に毎日 RAMTS 注射を続けることにより,2週目 で移植部に小豆大,3週目で小指頭大の腫瘤形成が見 られ, RAMTS の中止のない限り regression を 起すものはなく,平均46日 (33日~58日)にてマウス は腫瘍死した.移植成功率は86% (80匹中69匹)であ った. 走査電顕試料作製には,移植後3~4週目の腫 瘍を用いた.

3. 走査電顕用試料の作製方法

1) 単離浮遊細胞の場合-in vitro での観察

継代培養7日目のOST培養細胞を EDTA 処理後, 培養瓶のガラス面より剥離し, pipetting にて単離 細胞浮遊液とした、これを300rpm 3分間遠沈し、上 清を棄てて直ちに pH7.4 の Dulbecco 燐酸緩衝 液(P.B.S.)を注いで振盪洗浄し(以後の液の交換は 全て同様の遠沈操作を行っている.),再度遠沈して上 清を棄て、2.5% glutaraldehyde (25% glutaraldehyde : P.B.S.=1 : 9) を注いで2時間,前固定 を行った. 再びP.B.S.で洗浄し,1%OsO,(2%OsO, : P.B.S.=1:1)で1時間,後固定し P.B.S.で洗浄し た.ここまでの操作は全て4°Cの条件下で行った. 次いでこの試料を50%,70%,90%,95%,100% aceton に、20分毎に1~3回浸して脱水し、99% isoamvl acetate に30分間浸して aceton を置換 した. 更にOST細胞の isoamyl acetate 浮遊液をピ ペットにてカバーグラス小片面に滴下し,直ちにHCP -1型臨界点乾燥装置に入れ,液体 CO2 噴出による 細胞流出を防ぐために,田中¹¹⁾の考案した dry ice による臨界点乾燥を行った. 乾燥を終えた試料を, 銀 ペースト又はセメダインホワイトで試料台に固定し, カーボンと金パラジウムにより回転蒸着,或いはIB-1型イオンクリーナーによる金パラジウムのスパッタ 蒸着を行った(表1).

観察には日立電界放射型走査電子顕微鏡(HFS-2) を用い,加速電圧15~20KVの条件で50~5×10⁴倍に 拡大し,試料台傾斜角0~45°で観察した.

2) 単層培養細胞の場合-in vitro での観察

滅菌シャーレの底面にあらかじめカバーグラスの小 片を入れておき、その上に単離浮遊細胞液を入れて培 養を行い、カバーグラス面に定着培養 された細胞を、 位相差顕微鏡で観察しつつ経時的に採り出して試料作 製に用いた.試料作製方法は、遠沈操作を除いては、 単離浮遊細胞の場合と同様 (表 1)であるが、臨界点 乾燥に際しては液体 CO2 を使用し、45℃の臨界状





態で行った.

OST 細胞の異種移植腫瘍の場合-in vivo での観察

OST 細胞をマウスに異種移植し3~4週を経て小 指頭大に発育した腫瘍を,走査電顕観察試料として用 いた、即ち,生きたままのマウスの大腿部より腫瘍を 切除し,速かに P.B.S. 内で2×2×4mmの大きさに切 り出し,表1に示す如く1),2)の場合と同様に試料 を作製した.ただし固定は glutaraldehyde 6時 間, OsO(2時間行い,目的とする観察面を得るた めに操作途中に次のような観察面剖出法を施行した. i)固定前又は固定中の組織を,鋭利なカミソリで切 るか,或いはピンセットでひきちぎる.

ii) 100% aceton で脱水中に、イ) カミッリで切 る、ロ) ピンセットで折損割断する、ハ) 凍結割断法 ー試料を aceton に浸したままゼラチンカプセル内 に封入し、液体窒素で凍結しつつ、ノミで鈍的に割断 する、ニ) 樹脂包埋凍結割断法-セメダイン1500中に 試料を包埋してカプセルに入れ、液体窒素で-80°C にて凍結させつつノミで鋭的に割断、次いで常温に戻 した試料を propylene oxide で20分間毎4~5回 洗ってセメダインを融かし、 isoamyl acetate で置 換する.

iii) 臨界点乾燥後にピンセットで折損する.

以上の方法のうち,主な観察には良い観察面が得ら れたii)ロ)ハ)ニ)の試料を用いた.更に観察面を イオンエッチングした後, 蒸着したものをも観察した.

4) 宿主側の結合組織の観察

OST 細胞異種移植腫瘍の組織を宿主側の結合組織 と比較するため,腫瘍周囲を囲んでいる線維組織を3) に準じて採取し,100% aceton 脱水中にピンセット で折損して得たものを観察に用いた.

尚,走査電顕試料作製に先立ち,標本を実体顕微鏡 で観察して確認すると共に,走査電顕観察後に再度, 光顕レベルで確認するために,試料を試料台より剥が し,表2に示す如くdouble embedding technique¹⁾ にて包埋し,5μmの切片をつくりH.E染色を行った.

実験結果

I. in vitro における OST 細胞の走査電顕像

1. 単離浮遊状態にある OST 細胞

弱拡大で観察すると(図1),OST 細胞はほぼ球 形に近い形態を成しており、一見、 "湖底のマリモ 様であった.その大きさは直径 8 ~15 μ mにわたり大 小不揃いで,表面には特色ある突起が見られた.強拡 大で観察すると(図2),この細胞質突起には microvilli 及び blebs の2種類の形態があり、単独に、 又は種々の割合に混在しながら密生しているのが認め られた.

microvilli は直径約 0.2μ mの指状の突起で、 その 長さは $0.5 \sim 4 \mu$ mにわたって長短まちまちであり、方 向性も細胞表面から垂直に立つもの、斜方向に曲折し ているものなどが観察された.その 5×10^4 倍拡大率 での観察は、表面平滑であった. blebs は microvilli の先端が蛇頭状,泡状又は球根状に変容して膨んだ形態をなしており,その直径は0.3~0.8µmの範囲にあった.

2. 培養後の OST 細胞の経時的観察

浮遊状態にある OST 細胞は, subculture を行 った後は時間の経過とともに沈降し, カバーグラス面 に定着し始めた.6時間を経過したものでは細胞の表 面像に著変はなかったが, ガラス面に接している部で は、細胞のアメーバ様運動の始まりとして filopodia や lamellipodia (ruffled membrane) などの 偽足 (pseudopodia) が見られた(図3). ruffled membrane は図3に示す如く,細胞周辺に拡がった 波状の細胞質突起で,その表面には microvilli を 伴っていた.filopodia は microvilli をほぼ同じ 太さであったが,培養後の時間がたつにつれて,より 伸展したものが観察され,その先端は棘状に尖鋭であ った.また,近隣の細胞との間には相互の filopodia の接触による intercellular bridges が見られ るようになった(図4).

12時間を経過した細胞を俯瞰図で見ると(図5).カ バーグラス面に沿って全周に放射状に伸展している filopodia や,その癒合した lamellipodia が観察 された.

1日を経過すると(図6),OST 細胞の アメーバ 様運動は活発となり、細胞は小丘状或いは紡錘形状の 形態を整えつつ intercellular bridges による細 胞相互接触作用や細胞分裂を示した.図7は、培養2 日目の試料で観察された細胞分裂直後の細胞である. 細胞はほぼ等量に分裂し、核の存在する膨隆部に一致

Table 2. Post-scanning electron microscopy histology processing schedule

Stage	Cumulative time(h)	
1. Chloroform, four changes of 6 h	24	
2. Hydrate through 100, 80, 60 and 40% ethanol, 3 h per change	36	
3. 0.9% sodium chloride, 6 h	42	
4. Formol-saline, 24 h	66	
5. Dehydrate through 70, 2 x 95 and 2 x 100% ethanol, 2 h per	76	
change		
6.*Impregnate with 2% celloidin in ether-alcohol, three changes		
over 2-3 days		
7. Clear in benzene, two changes of 2 h	152	
8. Impregnate with paraffin wax, two changes of 3 h	158	
9. Embed in paraffin wax		

*Stages 6 - 9 comprise Peterfi's double-embedding technique (Culling, 1963).

して細胞膜に microvilli が密生し、その部での細 胞膜代謝活動が盛んである事を示していた.また、 microvilli や blebs を伴った lamellipodia が 周囲に伸びており、活発なアメーバ様運動の開始を示 していた.

 $3 \sim 4 \text{ Hell}$ になると(図8),細胞はますます平担 化しつつ増殖し、いわゆる "monolayer"の傾向が 現れてきた、視野には cell cycle のいろんな時期 のものが混在していると考えられる像が見られ、各細 胞間には intercellular bridges が見られた、平 担化しつつある細胞では、核存在部は膨隆し、その部 の細胞膜には microvilli が発達し、周辺部にはま ばらであった、また場所によっては図9に見る如く、 細胞間に intercellular bridges よりも更に微細 な250Å前後の巾の"クモの糸"状の線維様物質が、 幾すじも複雑に絡み合いながら細胞間を縦横に走って いるのを見出し、我々はこれを microthreads、及 びその網目構造を microthreads network と呼称 した、

6日目では(図10). 殆んどの細胞がガラス面に一 面に増殖し、いわゆる "monolayer pavement"の 像を呈するようになった. これらの細胞の配列には規 則性がなく at randam で、fibroblast などに見 られるような方向性は全く示さなかった. 図 11 に見 る如く、個々の細胞の膜は広く伸展し、逆に microvilli などの表面突起構造は数少なくなる傾向にあっ た. 更に強拡大で観察すると(図12),細胞表面や細 胞間にやはり約250Åの microthreads network が縦横に走っているのが観察され、且つ、これらの microthreads は microvilli に起点と終点を有し ていた.

3. Colony の観察

OST 細胞は routine として7日目に継代培養を 施行されたが、更に培養を続けて経過を追うと、細胞 は接触抑制を示さずに重なり合いながら増殖と運動を 続け、所謂 "piling-up" の像を呈するのが観察され た(図13).

9日目の試料では(図14),50~500個の OST 細胞の堆積からなる "colony formation"を散在性 に認めた.この colony は、ガラス面に接している 最下層は平担な細胞よりなっているが、それより上層 ではほぼ球形の細胞よりなっており、外見上 "cauliflower"の様相を呈していた.その一部を拡大して 観察すると(図15)、colony は大小さまざまの大き さの球形、卵円形の細胞の堆積から成っており、個々 の細胞表面は培養初期のものに見られたものと同じく 活発な microvilli や filopodia などの細胞質突 起構造で覆われており、散発的に壊死に陥った細胞も 観察された、細胞間には intercellular bridges が 発達しており、細胞はこれによってお互いに密に結合 していた、強拡大では(図16)、密生している microvilli の間隙を縫うように、更に繊細な直径約300Å 前後の microthreads が走っているのを観察した.

Ⅱ. in vivo における OST 細胞の走査電顕像

1. X線学的,光顕的検討

OST 細胞を異種移植して3週目に形成している腫 瘍を、走査電顕で観察する前にX線学的に検討すると 図17)、腫瘍に取り囲まれた大腿骨は osteosclerotic な像のみならず osteoblastic な像を示し、 腫瘍 は osteoblastic な像を示しており、人骨形成性肉 腫に類似した所見を示した.更に組織学的に検討する と(図18)、腫瘍組織は束状の fibrous tissue に よって区切られて alveolar pattern を示す腫瘍細 胞巣より成り、中心部は central necrosis に陥っ ていた.主として fibrous tissue の中に反応性と 思われる骨新生を認めたが、一部には腫瘍細胞巣内に も osteoid を認めることができた.

 1. 腫瘍組織における OST 細胞表面の走査電顕 像

OST 細胞を異種移植してできた腫瘍組織を, 脱水 操作過程中に鈍的に折損割断すると,個々の細胞表面 が良く温存されたままでの腫瘍組織の内部構造が露出 された.この面を弱拡大で見ると(図19), OST 細 胞が塊りとなって無秩序に堆積しているのが観察され た. 個々の OST 細胞は長径10~20µmにわたって大 小不揃いで,球形,卵円形,紡錘形のものが極めて多 数を占めていた.所々に血球成分を認める他には明ら かな間質成分は殆んど認められなかった.図20,21の 如くにこれを強拡大で観察すると、細胞表面の microvilli は太さ約0.2µmで in vitro の場合と同様 であったが、その長さは概して短いものが多く、表面 に500~2000Åの小粒子の付着を認めた. blebs も大 略 in vitro と同様の大きさであったが, サボテン 状に平らになったものが多く、同様に表面に粒子の付 着を認めた.細胞間には filopodia 及び, intercellular bridges が良く発達しており、細胞はお互い にこの連結によって固く位置の安定を得ているように 観察された. 部分的に巾250Ăの microthreads network の集塊を認めた.その他には細胞間隙に明ら かな間質成分を認めなかった.以上の所見は, in vitro における colony の細胞表面と非常に類似し ていた.

 1. 腫瘍組織における OST 細胞割断面の走査電 顕像

OST 細胞異種移植腫瘍を樹脂包埋のうえ、凍結割 断すると、細胞自身も割断されて細胞内部構造が明瞭 に観察された.特に核膜や核小体は非常に明瞭に浮き 出ており、この像へ透過電顕像における悪性細胞の所 見を応用することが可能であった.即ち図22に見る如 く、核は一般に大きく、核膜は不規則なものや折れ込 んだものが多く見られ、また細胞の割断面によって異 るとはいえ、核小体は、大小数個を認めた.強拡大で 観察すると(図23)、核質は主として顆粒状物質で満 たされており、特に核小体、核膜の近傍では密であっ た.一方、細胞質は均一化しており、細胞質内小器官 は不明瞭であった.

aceton 包埋のうえ、凍結割断し、軽くイオンエッ チングを加えた試料では、上記所見とはかなり異った 像が得られた、即ち図24に見る如く、樹脂包埋法に比 較して核内構造は不明瞭であったが、逆に細胞質内部 構造はよく保存されており、小器管などの超微細構造 がある程度識別可能であった。

Ⅲ.腫瘍周囲結合組織の観察

OST 細胞異種移植腫瘍の周囲をとり巻く結合組織 を破断した面を観察すると(図25),方向性がほぼー 定している fibroblast が,互いに距離をもって散 在性に存在しており、細胞の表面は縦横に走る collagen fiber で厚く覆われていた.細胞間は fibroblast の長軸方向に一致した太い collagen fiber と、それに絡みつつ網目状に密に交錯している細い collagen fiber で埋められていた. 更に強拡大で観 察すると(図26), これらの collagen fiber は巾 約300~3000Ăで, fibroblast から周囲に向って排 出されている如くに見られ、且つこれらの collagen fiber は特に blebs から産出されている如く観 察された、これらの線維は次第に互いに結束し、更に 太い線維に成長していくのが認められた.これらの細 胞のうち,末だ collagen で覆われていない幼若な fibroblast を強拡大で観察すると (図27), blebs の一部から芽が出るかの如くに collagen 成分が突 出し始めているものから, blebs から collagen fiber が長く伸びているかの如くに観察された.細胞 表面は blebs が多く microvilli は殆んど見られ ず, intercellular bridges なども見当らなかった.

Ⅳ. 走査電顕観察後の試料の光顕観察

Ⅱ~Ⅲの試料の観察面が,目的とする部位を正しく 露呈していたものか否かを再確認するために,試料台 より剥した試料を double embedding technique を用いて包埋し、観察面に垂直な切片を作成し、 H.E染色を施したところ、走査電顕で観察した部位は カーボンと金パラジウムによる黒いラインで示され、 即ち走査電顕で得た所見が光顕レベルでどの部である かを明瞭にせしめ得た、図28は、 OST 細胞異種移 植腫瘍を走査電顕で観察した標本であり、黒いライン はその観察面である蒸着部位を示している。

考 察

悪性細胞の最も大きな生物学的特徴は、異常増殖、 浸潤、転移性を示す事にあるが、これらは本質的には 細胞間相互作用に異常を来した結果であり、言いかえ れば細胞膜に何らかの異常性格が惹起されたためであ る、と解釈されている、その異常性格とは、1)運動 と増殖の接触抑制 (contact inhibition)の喪失¹⁾、 2)細胞相互結合力 (mutual adhesiveness)の低下 ¹⁾と、他物質への粘着力 (stickiness)の増大¹¹、3) 活発なアメーバ様運動 (amoebmoid mobility)¹⁰、 4)自己・非自己識別能力 (self-recognition)の喪 失⁹⁾、5)酵素に対する異常透過性 (leakiness)²⁶⁾、6) 膜の高い陰性荷電²⁰⁾、7) 癌特異抗原の存在¹⁶⁾、などに よって説明されている.

透過型電子顕微鏡を用いて悪性細胞と正常細胞の膜 微細構造を比較検討したものに,先づ Coman & Anderson⁶⁾の報告がある.彼等は replica 法を用 いて,癌細胞膜表面では30~300Åの不規則な粒子が あるのに反して,正常細胞では30~60Åの規則正しい 粒子の配列がある事を観察した.また Easty & Mercer¹⁰⁾は,腫瘍細胞では正常細胞に較べて,より microvilli が多い事を報告し,更に Cooper & Fisher⁸⁾は,悪性化と細胞表面の多毛性(hairiness-:即ち microvilli)の関係を示し,これが接触抑制 とも関係があると述べた.

一方、近年の走査電顕の進歩は、 replica や超薄 連続切片による形態観察の煩雑さを解決し、細胞表面 の超微構造を立体的に観察する事を可能とした.以来 *in vitro*における悪性細胞の研究もまた急速に進歩し つつある.先づ Hodges, G. M. (1969)¹³⁾ は、マ ウス腎由来の transformed cell (CBM17, CBM18 N)を用いて cellular contact と細胞表面形態の 観察について報告し、次いで Porter²⁰²¹⁾, et al. は Transformed chinese hamster ovary cell (CHO cells)を観察し, 1) 悪性化した細胞の表面に は microvilli や blebs, lamellipodia などの突 起構造が著明に見られるのに反して、その発生正常母 細胞には、これらの突起構造が少い、2) 悪性化した

Ħ

細胞には接触抑制機構が低下又は喪失している.3) 悪性化した細胞では、表面膜構造は cell cycle の phase により異っている、4) これらの表面膜構造 は また、細胞密度、培養液などの周囲環境によって異 る、ことなどを観察した. Boyde, A.⁴, Vesely, P.²⁰ らもほぼ同様の観察を行っている.しかし、in vivo の腫瘍組織を走査電顕で観察した報告は極めて 少い.即ち、Jordan et al.⁴⁰ の子宮頸部悤の表面 観察、Clark.⁵⁰ の膀胱癌の表面観察についての報告 などを散見するに過ぎない.

著者は in vitro における OST 細胞の超微細表 面構造や、細胞形態の経時的変化、悪性性格の有無を 走査電顕にて観察し、更に一歩進めて OST 細胞を マウスに異種移植し、in vivo で本細胞を形態学的 に観察し、in vitro のそれと比較した。先づ in vitro における OST 細胞の表面構造を検討するに以下 の如くであった。

a) microvilli: 直径約0.1µmの指状の細胞質突起 であり、一般の正常細胞にも認められるが、悪性化し た細胞の表面には著明であるとする報告が多い⁴⁶⁰⁸²⁰²¹¹ . OST 細胞に於ても同様であったが、特に培養初期 や細胞分裂期、及び colony 状態の細胞に microvilli の形成は著明であった.これらの事より microvilli は細胞代謝、即ち細胞の生命活動にとって基 本的な役割をなしており、このものの多寡は細胞表面 活動の程度と関係していると考えられると共に、細胞 活動を行う際の細胞表面積の増大変化のための予蓄表 現でもあり、周囲の環境に応じて以下に述べるような 細胞質突起に移行する基本構造であるとも推測され る.

b) blebs: 細胞表面から茎状突起をもって連絡す る球状の膨らみである.透過電顕では、 Price²¹⁾ は human epithelial cell の blebs に多くの polysome を認めたと報告しているが、走査電顕では Porter²¹⁾ が CHO cells を、その cell cycle と の関連において観察し、 blebs は cell cycle の 全ての時期に見られるが、特にG,期では著増してお り、且つ ribosome 濃度が高いことより、 代謝及 び細胞の機能と密接な関係があると推測した.本実験 では、図2に見る如くその形態、及びその存在部位よ り推察するに、この blebs は microvilli から必 要に応じて派生し、細胞の分泌又は pinocytosis に関与する機能を有していると思惟された.

c) filopodia: Vesely²⁸⁾, Parakkal¹⁹⁾らが microspikes と呼称しているものと同一物と考えられる. Parakkal は mononuclear phagocyte に Carbon 粒子を与えたところ、先づ多くの filopodia が Carbon 粒子を包み込むように伸展し、これらが次第 に癒合しつつ、ついには phagocytosis を完了する 事実を走査電顕で示し、filopodia は触手の如き働 きがあるとした、本実験では filopodia は、時間の 経過に従って microvilli より少し長いものから、 漸次、10µm以上に及ぶ長いものが観察され、しかも カバーグラス面や近隣細胞の方向に一致して発達して いる事より、filopodia は細胞が外部の刺激に反応 して現わすものか、或いは細胞が行動を始める際の探 索脚として microvilli が伸展し filopodia に成 長するものと考えられた、時に数本が癒合しつつ巾広 い形態をとるものが認められるが、これは lamellipodia に移行するものと考えられる、

d) lamellipodia: Abercrombie¹⁰ らによって導入された言葉で、薄い舌状又はシート状の細胞質突起が、細胞の辺縁より伸展しているものを指し、filopodia から発達したものもあれば、最初から blebs や microvilli より lamellipodia に伸展してくるものもある、本実験では、アメーバ様運動を行う際の運動方向の先端に認められる事から、細胞の進行方向に従って細胞質が lamellipodia へ流動するものと考えられた.この表面には microvilli や blebsを伴うものも多く、Porter²¹⁰ は lamellipodia 自身も多量の medium を pinocytosis として取り込んでいると報告している.

e) intercellular bridges : cell-to-cell contact の主役を演じているものと考えられ、先づ各近隣細 胞がお互いにひき寄せるかの如くにそれらの細胞から

filopodia を伸ばし、これらが接触し合って各細胞 間に intercellular bridges を形成するに至る、 と考えられた.一方, colony においても細胞は互 いに密な intercellular bridges を形成している ことより,このものは loss of contact inhibition や colony formation と深い関係をもっており、 細胞堆積に重要な貢献をしているものと考えられた.

f) microthreads, microthreads network: 図 9,12に見られた如く,OST 細胞の表面には250Å前 後の極めて繊細な "クモの糸。状の繊維様物質の網目 構造を認めた.その起点,終点は microvilli と関 係しているように観察された. Hodge¹³⁾は fibroblast において fine threads of cytoplasm を報 告したが、これは細胞辺縁より始まり、ガラス面に沿 って伸展し、太さもまちまちで網目構造を作らないこ とより、filopodia 又は intercellular bridges が過伸展したものと推測しているが、本実験での所見

とは異ったものである. 著者は本物質を "microthreads", その網目構造を "microthreads network" として, Hodge の言う "fine threads of cytoplsm"とは区別した.本実験は微細で,且つ立体的 に交叉していることから, 従来の透過電顕に於てこの 存在を知る事は不可能であったと考えられる.この物 質は、細胞の活発なアメーバ様運動によって Hodge の言う如く filopodia 又は intercellular bridges が極度に伸展し、更に交錯した結果のものと考 えられる一方, OST 細胞, 或いは一般に悪性細胞に 特有な, fibril と関係した物質又は, 悪性細胞の stickiness と関係した物質とも考えられる. O'Meara¹⁸⁾は、癌組織が増殖、浸潤していく際に、細胞の 間質形成に役立つ物質が分泌されているのではないか と考えて、この癌組織が増殖の場に必要な fibrin 沈着をおこすための因子を cancer coagulative factor と呼称したが、本実験で観察した microthreads network が、これと関係があるのか、細胞の運 動に関係して存在するものか, 或いは collagen 前 駆物質と関係するものか、これらの決定は今後の課題 である.

さて in vitro における OST 細胞を,1つの集団 に於て走杳電顕で観察した場合、悪性細胞としての態 度をどのように具現しているかを追求するに、細胞の 接触抑制機構の喪失 (loss of contact inhibition), と colony formation が認められた. contact inhibition とは Abercrombie¹⁾ が提唱した概念で あるが, 彼は in vitro でニワトリの fibroblast の運動性を観察し、正常細胞同志の場合には、互いの 接触によって amoebmoid movement が相互に抑 制を受け (c. i. of locomotion), やがて単層の シートを作り, 且つ規則的な配列を示して増殖が停止 する (c. i. of growth) が, 一方, 悪性化した細 胞はこのような性格を喪失しているために細胞は at randam に配列し、且つ、無制限に増殖を続けるため に、細胞がガラス面上で互いに重なり合う (piling up) という所見を観察した.現在では, かかる現象は in vitro における細胞の悪性化の指標の1つである と共に,悪性細胞が生体に於て示す増殖の基本的態度 を示唆する現象であると考えられている.

OST 細胞では図10に見られた如く、細胞の配列に は方向性、規則性がなく at randam であり、培養 7日目を過ぎて細胞密度が高くなると、図13に見られ た如く、細胞は単層で増殖を停止することなく、重な り合いながら増殖を続けることから contact inhibition を喪失していると考えられた。 また colony 形成能も contact inhibition と 関連した悪性化指標の1つと考えられているが、OS T 細胞は培養9日目には大小の colony を散在性 に形成していた(図14).一般に悪性細胞はお互いの 相互付着力 (mutual adhesiveness) は低下してい るが、他物質への粘着力 (stickiness) は高まってお り、これがために転移性を現わすと考えられている. OST 細胞の colony はこの性格の一端を示してお り、ガラス面に接している細胞はその接着力の故に、 容易に平担に伸展されるが、それより上層に積み重な っている細胞は loss of contact inhibition に よって増殖を続けるが、相互付着力が低下しているた めに、個々の細胞は培養後数時間以内における浮遊状 態に似た球形をとっているものと考えられた.

次に OST 細胞異種移植腫瘍について検討を加え ると、OST 細胞は全体的には卵円形のものが多く、 *in vitro* における colony の表面と類似しており、 局所表面微細構造も microvilli, blebs が殆んど を占めており、*in vitro* におけるものと類似してい たが、更に細胞間には、明らかな collagen fiber などの間質成分を認めず、専ら intercellular bridges が認められた.

以上の in vitro, in vivo における OST 細胞の 表面微細構造, colony 及び腫瘍組織の走査電顕像 を統括すると、次の様な結論に達する.

即ち、microvilli は細胞表面突起構造の基本形と 考えられ、必要に応じて、主として分泌代謝を行う blebs や、触手として働く filopodia に移行し得 るものである、細胞がアメーバ様運動を行う際には、 更に filopodia が lamellipodia に発達するが、 一方、近隣細胞との間にはお互いに引き合うように filopodia を伸ばしており、更に cell-to-cell contact を行うことにより情報交換が行われているもの と考えられる、その際に悪性細胞に於ては接触抑制機 構が失われているために、接触した filopodia は次 々と intercellular bridges になり、細胞堆積を 可能ならしめると考えられる。

ところで宿主側の正常細胞である fibroblast を 見ると、表面は殆んどが blebs であり、そこから collagen 前駆物質が分泌され、周囲にその蓄積であ る collagen fiber の network が形成され、機 能的分化能が旺盛である事を示していた.この fibroblast と OST 細胞を対比すると、OST 細胞の周 囲には何ら機能的分化能力を証明し得るような物質が なく、OST 細胞が脱分化の状態にあることは自明で ある、他方、OST 細胞は、旺盛な細胞増殖能力を示

Æ

しており、増殖した細胞は、周囲の細胞との間に intercellular bridges を形成することによって、 重なり合い、細胞の堆積を可能ならしめ、最終的には *in vitro* では colony を、*in vivo* では腫瘍塊 を形成するに至る、と推察された.文献では悪性細胞 に於ては microvilli が旺盛であるとされているが、 本実験でも *in vitro* において OST 細胞の subculture 直後の単離細胞に於て既に microvilli が多 く認められていた.このことは、恐らく既にその時点 より OST 細胞は intercellular bridges 形成能 を有しており、piling up の方向に向うべく性格を 保持している事を示していたものと考えられる.

反面,本細胞の表面に collagen 形成への process が in vitro, in vivo に於て,即ち培養の全経 過及び,異種移植腫瘍内に認められなかった事は, O ST 細胞では既に, manifest な collagen 形成能 が depress されており,長期間の培養によって, より末分化な方向に進行しているものと考えられる.

結 語

走査型電子顕微鏡を用いて、当教室で長期継代培養に 成功している人骨肉腫由来培養細胞(OST細胞)を *in vitro*で観察し,更に免疫抑制を行ったマウスに この細胞を異種移植し,形成した腫瘍の割断面を同様 に観察し,次の結論を得た.

1) in vitro のOST 細胞は、培養経過中に細胞質 突起構造の基本形である microvilli を著明に示す と共に、代謝、分泌機能に関係すると思われる blebs, アメーバ様運動の現れとしての filopodia 又は lamellipodia, cell-to-cell contact の主役をなす intercellular bridges などの突起を出しつつ形態 変化を行った.

2) in vitro の OST 細胞は、巾250Åの microthreads network を示したが、これが悪性細胞に見 られるものか、或いは OST 細胞に特有な物質なの かは不明であり、今後の検討を要する.

3) in vitro の OST 細胞は, 細胞密度が高くな るに従って contact inhibition の喪失による at randam arrangement, piling up, colony formation を示し, 悪性細胞としての態度を明らかにし た.

4) OST 細胞異種移植腫瘍の割断面では、細胞表 面は著明な microvilli, blebs, 細胞間は密な intercellular bridges を認め, *in vitro* における colony の細胞表面と類似していた.

5) in vitro, in vivo の OST 細胞表面に mic-

rovilli が多い事は, intercellular bridges 形成 能が旺盛である事を暗示しており,即ち細胞の堆積の 可能性を示すものと推察した.

6) 正常な fibroblast を in vivo で較べた結
 果, OST 細胞では既に collagen 形成能が depress されており,長期間の培養により,未分化な方向
 に進んでいるものと考えられた。

7) 腫瘍組織に凍結割断法を用いることによって, OST 細胞内の超微細構造への立体的観察の可能性を 示唆した.

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲の労を 賜りました恩師高瀬武平教授に衷心より謝意を捧げま す.また終始御指導いただきました当教室真鍋昌平講師 はじめ、三秋宏、山内四朗、山口昌夫、宮村秀一、大橋 光伸、竹林俊一郎7先輩及び学兄、御協力下さいました 安田俊久文部技官、本学部電子顕微鏡室各位に深甚なる 謝意を表します。

本論文の要旨は,第45回中部日本整形外科災害外科学 会にて発表した。

献

1) Abercrombie, M. & Ambrose, E.J. : Cancer Res., 22, 525 (1962).

文

2) Ayres, A., Allen, J. M. & Williams, A.E. : J. Microsc., 93, 247 (1971).

3) Boyde, A. : J. Ultrastruct. Res., 7, 159 (1962).

4) Boyde, A., Weiss, R. A. & Vesely, P.: Exptl. Cell Res., 71, 313 (1972).

5) Clark, M. A. & O'Connell, K. J. : Scanning Electron Microscopy, IIT Res. Inst., Chicago, 581, (1973).

6) Coman, D. R. & Anderson, T. F. : Cancer Res. 15, 541 (1955).

7) Coman, D. R. : Cancer Res. 21, 1436 (1-961).

8) Cooper, T. W. & Fisher, H. W.: J. Nat. Cancer Inst., 41, 789 (1968).

9) Curtis, A. S. G. : London Logos and Academic - Press. (1967).

10) **Easty G. C. & Mercer E. H.** : Cancer Res. **20**, 1608 (1960).

11) Fawcett, D. W. : J. Histochem. Cytochem 13, 75 (1965).

12) Hayes, T. L., Pease, F. W. & Mcdonald,
L. W. : Lab. Invest., 15, 1320 (1966).

13) Hodges, G. M. : Eur. J. Cancer, 6, 235	21) Porter K. R., Prescott, D. & Frye, J. : J.	
(1970).	Cell Biol. 57, 815 (1973).	
 Jordan, J. A. & Williams, A. E. : J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm. 78, 940 (1971). 15) 金島新一:日本臨床細胞学会雑誌, 13, 94 (1974). 	 22) Price, Z. H. : Exptl. Cell Res. 48, 82 (1967). 23) Purdom L. & Ambrose, E. J. : Nature 181, 1586 (1958). 	
16) Klein, G., Sjögren H. O., Klein, E. & Hellström K. E. : Cancer Res., 20 , 1561(1960).	24) Rubin R. W. & Everhart, L. P. : J. Cell Biol., 57, 837 (1973).	
17) Kubista T. P., Shorter, R. G. & Hallenbeck, G. A.: Cancer Res., 27 2072 (1967).	25) Sylven B. & Bois-Svensson, I. : Cancer Res., 25 , 458 (1965).	
 18) O'Meara R. A. Q. : Soc, Int. Chir. 23, 24 (1964). 19) Parakkal P. Pinta I & Hanifin I M : 1 	26) 高瀬武平・山崎安朗・井村慎一・安元三郎・布谷 猛・森田聖一・宮沢洋一・荒川弥二郎・高田克弘・山 田清夫: 中部整災誌,7,577 (1964).	
 Ultrastruct. Res., 48, 216 (1974). 20) Porter K. R. & Fonte, V. G. : Scanning Electron Microscopy, IIT Res. Inst., Chicago, 	 27) 田中敬一:細胞(走查電子顕微鏡Ⅱ)7,2 (1975). 28) Vesely, P. & Boyde, A.: Scanning Electron 	
683 (1973)	Microscopy, IIT Res. Inst., Chicago, 689 (1973).	

Abstract

The surface properties and intercellular contact of neoplastic cells have been suspected to be different from those of normal cells. Because neoplastic cells not only display the loss of contact inhibition or make colonies in vitro, but also have invasive and metastatic characters in vivo.

Applying the scanning electron microscopy, this experiment is intended to find out the surface and morphological characteristics of cultured human osteogenic sarcoma cells (OST cells) both in vitro and in vivo. As a result, OST cells in vitro show so interesting features during this subculture as, microvilli, blebs, filopodia, lamellipodia, intercellular bridges and microthreads network. They also show the loss of contact inhibition by haphazard arrangement or indefinite and piling-up growth.

As for in vivo, tumor is conducted by heterotransplantation of OST cells into mice under the treatment with Rabbit-Anti-Mouse-Thymus-Serum (RAMTS). By snapping off these materials in 100% aceton after fixation and dehydration, the surface of OST cells can be observed and many microvilli, blebs and intercellular bridges are seen. These findings resemble those of colony surface in vitro. On the other hand, by using frozen resin or aceton cracking method, intracellular microorganelle can be observed well.

It is concluded that microvilli could be the original form of cell protrusion and develop into many other deriverties. Especially a lot of them highly produce intercellular bridges which bring about tumor cell accumulation. Probably, the capability of forming collagen in OST cells has been depressed and such OST cells may grow into an undifferentiated stage during their long-term cultivation.



図1 "湖底のマリモ"様の細胞表面形態(培養直後)



図2 microvilli (↑) と blebs(會) (培養直後)



図 3 ruffled membrane (↑). 殆んどの細胞に filopodia が見られる. (培養6時間)



図4 filopodia (↑) と intercellular bridges (含) (培養6時間)



図5 放射状に伸展している filopodia (培養12時間)



図6 球形から小丘状,紡錘形状に形を変えつつある OST 細胞(培養1日目)



図7 分裂直後の OST 細胞(培養2日目)



図8 平坦化しつつある OST 細胞. ↑印は intercellular bridges (培養3日目)



図 9 細胞間に見る microthreads network (培養4日目)



図10 at randam な pavement を示す OST 細胞 (培養6日目)



2.67

図12 図11の一部強拡大像. microthreads は起点, 終点を microvilli にもっていると考えられる. (培養6日目)



図13 contact inhibition を喪失し piling up している OST 細胞(培養9日目)



図14 OST 細胞の colony formation (培養9日目)

図15 colony を形成しているOST 細胞. microvilli と intercellular bridges (↑) が著明である. (培養9日目)

図16 colony を形成する OST 細胞表面の microvilli の間を走行する microthreads(↑) (培養9日目)

図17 OST 細胞異種移植腫瘍のレ線像 (移植後3週目)

図19 OST 細胞異種移植腫瘍の割断像(移植後3週目)

microvilli, blebs, intercellular bridges (含), 限局せる microthreads network (↑)

図21 同上強拡大像. ↑印は microthreads network

図22 同腫瘍組織の樹脂包埋凍結割断面.大きな核,不規則な核膜,複数の核小体などから 悪性腫瘍である事を示している.

図23 同上拡大像. 数個の核小体, 顆粒状物質で満たされている核質を見る.

図24 aceton 包埋凍結割断面.細胞質内小器管が比較的良く保たれている.

図25 腫瘍周囲の線維性結合組織の割断像. 散在する fibroblast と collagen fiber の network を見る.

図26 fibroblast から周囲に collagen fiber が伸展している. (同上拡大像)

図27 幼若な fibroblast. collagen 成分が blebs より伸展しつつあるのを見る.

図28 ↑印の黒いラインは走査電顕観察部位(蒸着部)を示している. (OST 細胞異種移植腫瘍組織:H・E 染色)