

ヒト骨肉腫由来培養細胞のマウス並びにラットへの 異種移植に関する実験的研究

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹林, 俊一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8611

ヒト骨肉腫由来培養細胞のマウス並びに ラットへの異種移植に関する実験的研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任：高瀬武平教授)

竹 林 俊 一 郎

生きたままの細胞を光顕レベルで動的に捉えようという発想のもとに始まった組織培養の歴史は、1885年 chick embryo の神経板を組織培養した Roux³²⁾ を創始者とし、1906年には Harrison¹²⁾ が神経線維の培養を試み、その後 Carrel¹³⁾ がはじめてヒト悪性腫瘍細胞 (紡錘形細胞肉腫) の組織培養を試み、つづいて Gey¹⁰⁾ がヒト線維軟骨肉腫の長期継代培養を行い、更に Gey¹¹⁾ は子宮頸部癌から HeLa 細胞株を樹立して以来、組織培養による腫瘍細胞の研究はめざましく躍進した。

骨腫瘍細胞の組織培養に関して、阿部²⁾、太田³⁰⁾ が骨巨細胞腫の組織培養に成功したのにつづき、1964年高瀬³⁷⁾ は骨肉腫患者の切断肢より骨肉腫細胞の培養、株化に成功し、これを OST 細胞と命名した。この OST 細胞に関して形態学的観察²⁹⁾³⁷⁾⁴³⁾、増殖サイクル¹³⁾、X線²⁵⁾ 及び各種薬剤に対する影響¹⁵⁾²⁷⁾³⁶⁾ などについて数々の研究がなされ、更に OST 細胞を Rabbit anti-Mouse-Thymus Serum で処理したマウスに異種移植しマウスを腫瘍死させることに成功した^{20)~23)28)38)39)}。

他方、1974年に金沢大学医学部整形外科学教室に於て、新たに骨肉腫患者より骨肉腫細胞の継代培養に成功し、これを OST II 細胞と呼称し、現在44代に継代培養されている。著者はこの継代培養初期の OST II 細胞について *in vitro* での細胞の性状及び形態学的観察を行うとともに OST II 細胞をマウスに異種移植を試みた。更に OST 細胞と OST II 細胞を Rabbit anti-Rat-Thymus Serum で処理したラットに異種移植を行うとともに生後24時間以内の新生児ラットに両細胞を静注し、肺に移植を成立させ、これら2種類の骨肉腫細胞についてその移植性、類骨形成能、悪性度などを比較検討して若干の知見を得たので報告する。

Experimental studies on the heterologous transplantation of two kinds of cultured human osteogenic sarcoma cells into mice and rats. Shun-ichiro Takebayashi, Department of Orthopaedic Surgery (Director : Prof. Buhei Takase) School of Medicine, Kanazawa University.

I. 実験材料

1. 骨肉腫由来培養細胞

1) OST 細胞

1963年10月28日に金沢大学医学部整形外科学教室に於て15才女子の左大腿骨幹部に発生した骨肉腫を (写真1, 2), 左下肢切断後、これを摘出、分離して組織培養を行い、継代培養後1964年6月に株化細胞となり、Osteogenic Sarcoma Takase strain (OST 細胞) と命名したもので、1975年11月現在549代で長期継代培養中である。

2) OST II 細胞

10才女児の左大腿骨下端部に発生した骨肉腫を (写真3, 4), 1974年12月23日金沢大学医学部整形外科学教室で切断後、摘出、分離し直ちに初代培養を行い、その後、継代培養に成功し、1975年11月現在44代で継代培養続行中で、これを OST II 細胞と呼称した。

2. 移植動物

上記の細胞の異種移植にラットとマウスを使用した。即ち、大腿骨部移植には生後24時間以内の新生児、生後1週、生後2週の Wistar 系雄ラットを、静注移植には生後24時間以内の Wistar 系雄新生児ラットを各々使用した。また OST II 細胞を生後2週 ddN 雄マウス的大腿骨部に移植した。

II. OST 細胞及び OST II 細胞の *in vitro* での実験

OST 細胞に関しては既に報告されているので¹³⁾¹⁵⁾²²⁾²⁵⁾²⁹⁾³⁷⁾⁴²⁾⁴³⁾ 主として OST II 細胞の実験につき記載する。

実験方法

1. OST II 細胞の初代培養

OST II 細胞の初代培養には高瀬ら³⁵⁾の方法に従い、採取した腫瘍組織を生理的食塩水で数回洗浄した後、無菌的に鋏で細切し、ガーゼで濾過した。また細切後

0.25% trypsin を加えて15分間 pipetting して trypsinization させた後、磷酸緩衝食塩水で trypsin 作用を阻止し、ガーゼで濾過した。それぞれに Hanks 液を加えて細胞浮遊液とし、1,000r.p.m. 5分間遠心にかけた。沈澱細胞を TC Medium 199 に牛胎児血清20%含有の培養液に 10^5 個/mlとなるように入れた後、角型大培養瓶にこの細胞浮遊液10mlを注入、37°Cで静置、毎日観察した。

2. OST 細胞及び OST II 細胞の形態学的観察

OST 細胞は545代目、OST II 細胞は2代目、4代目、40代目のものを使用した。短冊を入れた小培養瓶に培養液1mlづつ 5×10^5 個の細胞を注入し、培養後経時的に取り出し、Giemsa 染色及び H-E 染色を行い観察した。

3. OST 細胞及び OST II 細胞の細胞数変化

OST 細胞は545代目、OST II 細胞は40代目のものを使用した。両細胞を EDTA で剥離後、充分 pipetting し単個の細胞としたのち、培養液1mlにつき細胞数 10^5 個となるように調整し、細胞培養液を正確に1mlづつ小培養瓶に分注し培養した。経時的に5本の小培養瓶を取り出し EDTA で剥離、pipetting の後、血球計算板を用いて細胞数を計測した。各

時毎の5本の培養瓶中、細胞数の最大のものと最小のものを捨て、中間の3本の培養瓶中、細胞数の平均値をとった。

4. OST II 細胞のコロニー形成能

OST II 細胞3代目のものを使用した。EDTA と 0.2% trypsin 等量液で4分間 trypsin 作用の後、充分 pipetting して単離細胞とした。50個の OST II 細胞をシャーレに植えこみ、CO₂-incubator で培養し、2週後にコロニー形成の数を観察した。

5. OST II 細胞の染色体構成の観察

OST II 細胞3代目のものを使用し、空気乾燥法²⁵⁾施行後、染色体染色を行い、分裂細胞の染色体数を算定した。

6. オートラジオグラフィーによる OST II 細胞の Cytokinetics の検討

OST II 細胞8代目の細胞につき継代培養48時間後に ³H-Thymidine (³H-TdR と略す)を用いて cumulative labeling method, single pulse-mitosis chase method により本細胞の cytokinetics を検討した。

1) Cumulative labeling method では、³H-TdR を0.1 μ C/mlの濃度で持続的に培養液に添加し、添加48時間後まで3時間毎に標本を取り出した。

2) Single pulse-mitosis chase method では上記と同濃度で ³H-TdR を30分間だけ作用させ、

表1 OST II 細胞の継代培養の経過

代	継代までの 所要日数	通 算 所要日数	継代年月日	備 考
初 代	> 19日		1974. 12. 23	
2 代	> 14	19日	1975. 1. 11	
3 代	> 11	33	1. 25	1. 27 コロニー培養 1. 28 走査電顕 電 顕
4 代	> 6	44	2. 5	1. 31 初代細胞を 窒素冷凍 2. 3 染色体染色
5 代	> 5	50	2. 11	
6 代	> 4	55	2. 16	
7 代	> 7	59	2. 20	2. 20 4代, 5代を マウスに異種 移植
8 代	> 7	66	2. 27	
9 代	> 6	73	3. 6	
10 代	> 6	79	3. 12	

その後51時間目まで3時間毎に標本を取り出した。

以上の如く ^3H -TdR でラベルした標本を Hanks 液で数秒間洗浄後、乾燥、メタノール固定を施し、dipping 法によるオートラジオグラフィ操作¹³⁾を行った。以上の方法で得た標本を Giemsa 染色を施し観察したが、なお検鏡に際しては、1個の細胞核上に5個以上の感光粒子を有するものを labeled cell とした。

実験結果

1. OST II 細胞の初代及び継代培養の経過

初代培養を行った OST II 細胞は24時間目にはガラス面に紡錘形の細胞となり定着し始め、2日目には細胞突起をのびて広がり、浮上細胞と定着細胞が明確に別れた3日目及び更に7日目に培養液の交換を行った。7日目より細胞は増殖傾向を示し、2週後では細胞は旺盛に増殖したので(写真5)、19日目に2代目の継代培養を行った。2代培養14日目には3代目の継代培養が可能となり、3代目継代培養7日目で aggregation 形成をみた。4代目に至っては継代培養4-5日目でガラス面いっぱいに細胞が増殖した。その

後の継代培養で本細胞は安定した増殖を示し(表1)現在に至っている。

2. OST 細胞と OST II 細胞の形態学的観察

各継代培養後12時間で両細胞とも球状の細胞形態で定着し始め、24時間で紡錘形を呈し、48時間では紡錘形が更に明瞭となり、原形質の両端に長い突起を認めるものも出現した(写真6)。4日目より星状または多角形に細胞は融合しあって上皮細胞様形態を示して旺盛に増殖した(写真7)。7日目以後では、両細胞は重なりあって aggregation を形成し、個々の細胞の判別が困難となった。

3. OST 細胞及び OST II 細胞の細胞数変化

両細胞系とも細胞数は培養後12時間で一旦減少を示し、以後増加し48時間では培養開始時とほぼ同数になり、以後更に増加を示した。4日目で両細胞の細胞数は最高となり、以後減少した(図1)。

4. OST II 細胞のコロニー形成能

50個の植え込みで平均46.4%のコロニーを形成した(写真8)。また5個のシャーレの総数116個のコロニーは全ては円形を呈し、各コロニーの細胞は上皮細胞様であり(写真9)、所々散在性に多核巨細胞の出現をみた。

5. OST II 細胞の染色体構成

OST II 細胞3代目について検討した結果、染色体数の頻度分布は図2の如くであった。即ち OST II 細胞は染色体数28個~306個と広範な染色体数変異を呈し、染色体数モードは71個であった(写真10)。

6. OST II 細胞の Cytokinetics

1) Cumulative labeling method では各標本につき細胞数1,000個を数え、この中の labeled

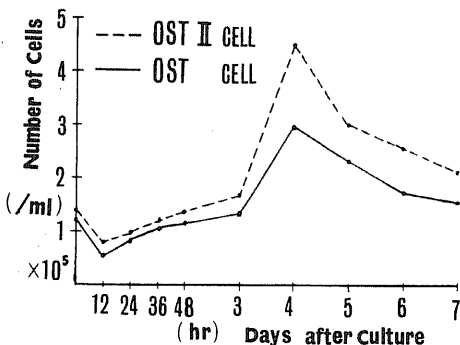


図1 OST 細胞及び OST II 細胞の増殖曲線

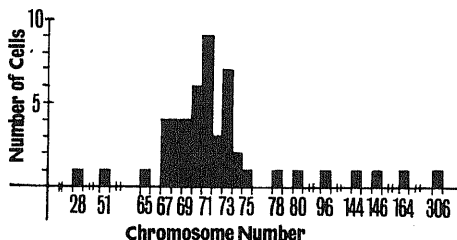


図2 OST II 細胞の染色体構成

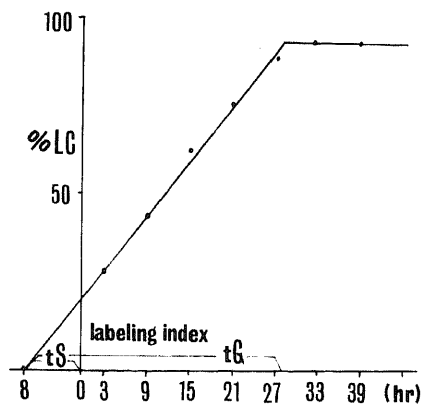


図3 OST II 細胞
in vitro cumulative labeling method

cell (写真11) の百分率 (%LC と略す) を求め経時的にプロットした (図3)。%LC は直線的に増加し、ラベル開始後27.5時間で93%に達し、以後プラトーを示した。図から DNA 合成時間 (t_S と略す) は8時間、細胞の generation time (t_G と略す) は35.5時間、labeling index (LI と略す) は20%であった。

2) Single pulse-mitosis chase method では、施行した標本の分裂期細胞を100個数え、その中のラベルされた分裂期細胞 (写真12) の比率 (%LM と略す) を求めた。 $^3\text{H-TdR}$ 添加後3時間で labeled mitosis は4%に出現がみられ、9時間後では82%と最高値に達し、以後減少し36時間で最低値を示したあと、再び %LM は増加し45時間後に25%に達した。以上をプロットした結果 (図4)。 t_G は36時間、 t_S は8時間、premitotic time (t_{G_2} と略す) は6時間、また mitotic time (t_M と略す) は (mitotic index)/100 $\times t_G$ より0.9時間、presynthetic time (t_{G_1} と略す) は $t_G - (t_{G_2} + t_S + t_M)$ より21.1時間と計算された (表2)。即ち、 t_G 、 t_S については cumulative labeling method, single pulse-mitotic chase method の両者から得られた解析値は互いに良く一致していた。

Ⅲ. OST 細胞及び OST II 細胞の異種移植 における実験

実験方法

1. OST II 細胞のマウスへの異種移植

1) Rabbit anti-Mouse-Thymus Serum (以下

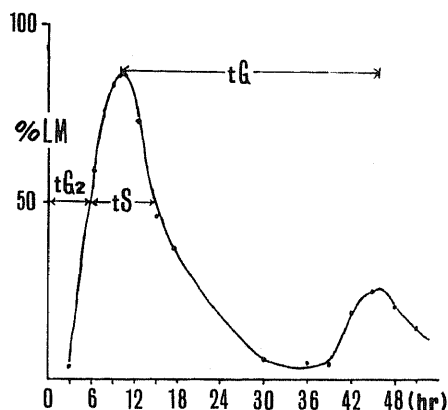


図4 OST II 細胞
in vitro single pulse-mitosis chase method

RAMTS と略す) の作製方法

RAMTS は Kubista ら¹⁸⁾ の方法に準じて作製した。即ち、生後2週の ddN 雌マウスの胸腺を取り出し、表面に付着せる血液凝固塊を除去し、次いで缺で細切し、Hanks 液で2回洗浄後、再び Hanks 液に浮遊させた。この胸腺細胞 $5 \sim 10 \times 10^8$ 個を体重 $2 \sim 3$ kg の家兎の耳静脈へ注射し、2週後同量の胸腺細胞を再度静注した。2回目の注射から1週間後、家兎の頸動脈から無菌的に採血し、その血清を 56°C 30分間加温不活化後、使用時まで -20°C で凍結保存した。

2) OST II 細胞のマウスへの移植方法

継代培養4~5日目の OST II 細胞4代目と5代目のものを使用した。培養細胞を policeman にて培養瓶のガラス面より剥離し、pipetting にて単離細胞とした後、細胞濃度が $20 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ となる様、培養液に浮遊させたものを移植に用いた。即ち、生後2週 ddN 雄マウスに上記 RAMTS 0.05ml を7日間毎日腹腔内に注射した後、培養細胞 10×10^6 個をその左大腿骨部に移植した。移植後も同様に毎日、RAMTS の処置を続け、経時的にレ線学的、肉眼的及び組織学的に腫瘍形成状態を観察した。組織学的検索には H-E 染色を行った。

2. OST 細胞及び OST II 細胞のラット大腿骨部への異種移植

1) Rabbit anti-Rat-Thymus Serum (以下 RARTS と略す) の作製方法

上記の Kubista ら¹⁸⁾ による RAMTS の作製方法と同様に行った。即ち、生後2週の Wistar 系雌ラットより胸腺細胞を取り Hanks 液に浮遊させ、その $5 \sim 10 \times 10^8$ 個の細胞を $2 \sim 3$ kg の家兎の耳静脈より注射し、2週後に更に同量の胸腺細胞を静注した。その1週後にこの家兎から採血し、血清を分離、不活化した。

表2 OST II 細胞及び OST 細胞の Cyto-kinetics (mitosis chase method による)

	OST II cell	OST cell*
t_G hr	36	32
t_{G_1} hr	21.1	9
t_S hr	8	10
t_{G_2} hr	6	12
t_M hr	0.9	1

* 真鍋ら²²⁾ による

2) OST 細胞及び OST II 細胞のラット大腿骨部への異種移植方法

継代培養 4～5 日目の両細胞を policeman を用いて培養瓶から剥離, 充分 pipetting し単離細胞とした。新生児, 生後 1 週, 2 週の各 Wistar 系雄ラットに上記 RARTS 0.1ml を 1 週間腹腔内に連日注射した後, その左大腿骨部に OST 細胞, OST II 細胞をそれぞれ 1.5×10^7 個を移植した。移植後も同量の RARTS を連日注射し, 経時的にレ線的, 肉眼的及び組織学的に検索した。組織学的形態観察には H-E 染色及び鍍銀染色を行った。

3. OST 細胞及び OST II 細胞の静脈からの異種移植方法

継代培養 4～5 日目の両細胞を EDTA でガラス面より剥離, 充分 pipetting してこれらを単個の細胞とした後, 1,000r.p.m. 5 分間遠心をかけ, Hanks 液で 2 回洗浄した後, 生後 24 時間以内の新生児 Wistar 系雄ラットの lateral tail vein から両細胞各々 10^6 個を Hanks 液浮遊液にして注射した。その後, 経時的にラットを殺し, 移植腫瘍の臓器への移植状態を肉眼的, 組織学的に観察した。組織学的には H-E 染色, 鍍銀染色を行って検索した。

実 験 結 果

1. OST II 細胞のマウスへの移植

OST II 細胞を 5 匹のマウスの左大腿骨部に移植した。5 匹中 5 匹全例に移植後 1 週で小豆大の腫瘍形成が見られ, 移植 3 週後では指頭大の腫瘍となった。この中 2 匹はその後 RAMTS の投与を続け, 6 週後に RAMTS を中止して放置観察したところ腫瘍は指頭大となり, それぞれ 65 日, 74 日目に死亡した (写真 13)。

レ線所見では移植部大腿骨にヒト骨肉腫によく類似

した spicula 形成を有する腫瘍が認められた (写真 14)。

組織学的には腫瘍細胞巢は周囲に proliferating fibrous tissue に囲まれて島状に alveolar structure を形成して増殖し (写真 15), 各細胞は大小不同, 原形質は少く, 核は濃染し, 円形または楕円形を呈していた。移植後 3 週をすぎると各々の腫瘍細胞巢に central necrosis が見られる様になり, また腫瘍細胞間には反応性と思われる類骨組織が見られたが (写真 16), 腫瘍性類骨組織と思われるものは認められなかった。

2. OST 細胞及び OST II 細胞のラット大腿骨部への移植

1) 腫瘍形成状態

新生児, 生後 1 週, 2 週のラット腹腔内に RARTS を連日投与し, その 1 週間後に両細胞をラット大腿骨部に移植した場合, 移植後 3 週で腫瘍形成の有無を観察すると表 3 の如き結果を得た。この表より腫瘍形成率は OST 細胞, OST II 細胞の間には有意の差は認められなかったが, 若年令ラットに移植した場合, 腫瘍形成率は高い傾向を示した。

両細胞移植により腫瘍形成が成立した場合, 各年令ラットに於て, 腫瘍は移植後 1 週から 2 週にかけて触知可能となり, 3 週後には小豆大から大豆大, 4 週後には大きいものでは拇指頭大にまで増大したが, その後漸次, 発育は緩徐となった。その後も RARTS の投与を続けたが 5 週後には腫瘍の発育は停止し, 硬度も弾性硬となり, 移植 6 週頃以後では腫瘍は縮小し始め, 移植 9 週後には腫瘍は触知し得なかった。因に移植直後, または移植 1 週後より RARTS を 0.2ml に増量して経過観察したにもかかわらず腫瘍の発育状態は RARTS 0.1ml 投与ラットの場合と同様に腫瘍は移植後 5 週まで増大したが 6 週以後 regression を

表 3 OST 細胞及び OST II 細胞のラット大腿骨部異種移植後の腫瘍形成状況
(RARTS 0.1ml 連日投与, 1 週後に両細胞移植し, 移植後 3 週での観察)

血清開始 時 期	OST cell			OST II cell		
	tumor innoculation	tumor formation	rate	innoculation	tumor formation	rate
新 生 児	9 匹	8 匹	89%	5 匹	5 匹	100%
生後 1 週	14 匹	11 匹	79%	4 匹	4 匹	100%
生後 2 週	17 匹	12 匹	71%	5 匹	3 匹	60%
Total	40 匹	31 匹	78%	14 匹	12 匹	86%

示した。これらのラットについて、肺、肝、腎、脾を検索したが、いずれにも肉眼的、組織学的に転移巣は認められなかった。

2) レ線所見

両細胞の移植後7日目ではレ線上特記すべき所見は見られないが、2週後では腫瘤形成の認められたラットの移植部大腿骨皮質に虫喰状の破壊と雲絮状の造骨性変化が見られた(写真17)。3～4週では両細胞移植の場合とはともに移植部大腿骨の雲絮状骨新生は大きくなるが(写真18)、5週では上述の骨新生はscleroticとなり、6週以後では骨新生の発育は停止し、新生骨は縮小し、且つ骨様に硬化した(写真19)。

3) 肉眼的所見

両細胞移植により腫瘤の認められたラットでは、移植2～4週後で腫瘤は小豆大或は大豆大で球形ないし橢円形を呈し、表面は平滑で被膜に包まれ、且つ周囲組織と容易に剥離できた(写真20)。硬度は弾性硬で断面は黄白色を呈していた。6週以後では、腫瘤は硬い被膜に包まれ、軟骨様または骨様硬度であった。

4) 組織学的所見

OST細胞移植の場合もOST II細胞の場合もほぼ同様の組織学的変化を示した。即ち、移植後1週の所見では、移植した両細胞は島状の小結節を形成して散在し、各小結節の周囲はラット側からの強いfibrous tissueの増殖がみられ、それ故、腫瘍はalveolar patternを示した(写真21)。

移植2週後では腫瘍細胞は島状に結節を形成して増殖して来るが、その周囲のfibrous tissueの増生は依然旺盛であった(写真22)。大きい細胞巣の増殖部ではcentral necrosisを起しているものも見ら

れた(写真23)。これら腫瘍細胞は多角形で異型性が強く、核は大きくクロマチンに富み、円形または橢円形を呈し、2～3個の核小体を持ち、原形質は比較的少く、mitosisを起している細胞もよく散見された(写真24)。反応性のosteoid形成がfibrous tissue中に認められた。

移植3週後になると島状の腫瘍細胞巣は更に増殖する反面、腫瘍周囲のfibrous tissueが減少し、束状のfibrous tissueとなり、これが腫瘍組織巣を囲み、いわゆるalveolar structureの所見を呈し(写真25)、このfibrous tissueの中に反応性osteoid形成が豊富に見られた(写真26)。またOST細胞移植群では腫瘍細胞巣の中に腫瘍性と思われる類骨組織が認められた(写真27)。腫瘍細胞の形態は2週後の所見とほぼ同様であるが、mitosisを起している細胞が多く見られた。以上の如く、これらの異種移植腫瘍はalveolar patternを示して増殖して来るが、かかる標本につき鍍銀染色で観察すると、腫瘍細胞巣を取り囲むfibrous tissueに太い銀線維が見られ、各腫瘍細胞間にも細い線維が密に入り込んでいるのが認められた。この事からこれらの腫瘍は非上皮性腫瘍と思われた(写真28)。

移植4週以後では腫瘍細胞巣は更に増殖し、central necrosisも広範囲に見られたが、またOST細胞移植の場合では所々に腫瘍性と考えられる類骨形成が見られた。6週以後になるとfibrosisに囲まれた各腫瘍細胞巣は縮小し(写真29)、一方fibrous tissue及び反応性類骨、骨組織の新生が著明となって来るのが認められ、且つ腫瘍細胞に変性が見られた。

表4 OST細胞及びOST II細胞の新生児ラット異種移植後の腫瘍形成状況
(静注移植の細胞数 10^6 個、大腿骨部移植の細胞数 10^7 個)

	OST cell			OST II cell		
	tumor inoculation	tumor formation	rate	tumor inoculation	tumor formation	rate
静注による肺腫瘍形成	33匹	4匹	12%	41匹	12匹	29%
大腿骨部移植後 RATS 開始	5匹	3匹	60%	5匹	3匹	60%
大腿骨部移植後 無処理	5匹	0匹	0%	5匹	0匹	0%

以上の形態学的経時的所見は OST 細胞を異種移植した場合も、OST II 細胞を異種移植した場合もほぼ同様であったが、腫瘍性類骨形成は OST 細胞移植群にのみ認められた。

3. OST 細胞及び OST II 細胞の新生児ラット移植群

A. 静脈からの移植群

1) 移植性について

両細胞を新生児ラットの静脈から移植した結果、OST 細胞は33匹中4匹(12%)、OST II 細胞は41匹中12匹(29%)に肺腫瘍形成をみた(表4)。肺移植成立ラットは移植後3週頃より体重減少が見られ、cachexia の症状を呈し、4週では cachexia は著明となり、殺さずに放置した3匹は各々30日、31日、38日で死亡した(表5)。

2) 肉眼的所見

両細胞移植により形成された肺腫瘍は、左右両肺野

全体に白色、粟粒大の腫瘍が無数に認められたが(写真30)、肝、脾、腎、副腎、脳などの臓器に於て、肉眼的には腫瘍形成を認めなかった。

3) 組織学的所見

両細胞移植成立ラットの肺腫瘍は島状の腫瘍細胞巣をつくって増殖し、その細胞巣は alveolar structure を呈していた(写真31)。大きい腫瘍細胞巣には central necrosis も見られ(写真32)、両移植細胞はともに多角形で異型性が強く、核はクロマチンに富み大型で、円形または楕円形を呈し、2~3個の核小体を有し、mitosis もよく散見された(写真33)。osteoid 形成は肺移植腫瘍には認められなかった。鍍銀染色では両細胞移植腫瘍に於て、各々腫瘍細胞間に細い銀線維が入り込んでいることから、この腫瘍細胞は非上皮性腫瘍と思われた(写真34)。更に他臓器の検索では OST II 細胞の2匹に於て1側腎に腫瘍形成があり(写真35)、3匹には1側副腎に(写真36)。

表5 OST 細胞及び OST II 細胞の新生児ラット静注後、肺移植成立例及び臓器移植状況
(OST 細胞移植33匹中4匹に成立、OST II 細胞移植41匹中12匹に成立)

ラット No	移植細胞	観 察 日	肺	臓 器 移 植 状 況				
				肝	脾	腎	副腎	脳
1	OST	10日 殺	+	-	-	-	-	-
2	"	31日 死	+	-	-	-	-	-
3	"	32日 殺	+	-	-	-	-	-
4	"	42日 殺	+	-	-	-	-	-
5	OST II	10日 殺	+	-	-	-	-	-
6	"	" 殺	+	-	-	-	-	-
7	"	14日 殺	+	-	-	-	-	-
8	"	18日 殺	+	-	-	-	-	-
9	"	24日 殺	+	-	-	-	-	-
10	"	" 殺	+	-	-	+	+	+
11	"	" 殺	+	-	-	-	+	-
12	"	28日 殺	+	-	-	-	-	-
13	"	" 殺	+	-	-	-	-	-
14	"	30日 死	+	-	-	-	-	+
15	"	35日 殺	+	-	-	+	+	-
16	"	38日 死	+	-	-	-	-	+

3匹には脳に腫瘍形成が認められた(写真37, 表5)。

B. 大腿骨部への移植群

1) 新生児ラット大腿骨部への OST 細胞及び OST II細胞移植後 RARTS 投与

新生児 Wistar 系雄ラット大腿骨部に両細胞をそれぞれ 10^7 個を移植し, 移植後 RARTS 0.1mlを連日投与し, 経時的にレ線学的, 組織学的に検索を行った。

両細胞移植は各々5匹のラットに行い, OST 細胞移植ラットでは5匹中3匹, OST II細胞移植ラットでは5匹中3匹に移植後2週より腫瘍形成をみた(表4)。腫瘍形成の得られたラットは移植4週後で腫瘍は大豆大となり, 移植後5週で腫瘍は指頭大に増大したが, 6週以後では腫瘍は縮小した。

レ線学的に移植腫瘍は移植後2週より骨新生を認め, 3週後に雲翳状骨新生を呈し, 移植後5週以後では骨新生は硬化した。

組織学的には, 移植後3週で腫瘍細胞は島状結節を形成して増殖し alveolar pattern を呈し, 類骨組織の形成が認められた。腫瘍細胞は多角形, 核は大きくクロマチンに富んでいた。

2) 新生児ラット大腿骨部への OST 細胞及び OST II細胞移植, 以後無処置

両細胞 10^7 個を新生児 Wistar 系雄ラット大腿骨部に各々5匹づつ移植し, 移植後 RARTS 投与を行わず経時的に検索したが, 腫瘍形成は認められなかった(表4)。

考 察

Carrel⁵⁾によるヒト悪性腫瘍細胞の継代培養以来, 幾多の腫瘍細胞の組織培養が行なわれて来たが, 今日悪性腫瘍の研究にとって組織培養により腫瘍細胞の病理形態学的, 生物学的, 或いは核学的態度を把握することは欠くべからざる有力な手掛りとなって来た。ヒト骨腫瘍細胞の組織培養は Gey¹⁰⁾による骨巨細胞腫及び骨肉腫の組織培養の試みに始まるが, かかる骨腫瘍細胞培養は軟部組織と違い分離細胞を得ることが困難で, たとえ初代培養に成功してもこれを継代培養し cell line に至らしめる事は極めて難かしいと云われて来た。最近, 培養液や培養方法の進歩によりこれら細胞の長期継代培養が可能となって来たとは言え, ヒト骨腫瘍細胞を長期継代培養に成功, 株化細胞とならしめたものは少なく, 即ち太田³⁰⁾による骨巨細胞腫由来の2 cell lines, 高瀬³⁷⁾による骨肉腫細胞由来の cell line (OST cell line) が見られるにすぎない。

さて, 長期継代培養の悪性腫瘍細胞では, その染色体構成が変動し²⁵⁾⁴³⁾, cellular differentiation が失われ⁴⁵⁾, original の性格, 即ち organ 形成能が見られず, 且つその細胞が上皮性か非上皮性か, 良性か悪性かの判別も不可能となって来る。しかし, これらの培養細胞を *in vivo* へ異種移植することが可能ならばその細胞の生物学的, 形態学的特性を知る事が出来, その細胞がなお original の腫瘍細胞の性格を保持しているかの判定に大きな手掛りになると思われる。

1974年, 著者らが新たに継代培養に成功した OST II細胞の継代培養初期の *in vitro* での特長をあげると, 1) 形態学的に他の長期継代骨腫瘍細胞, 即ち骨肉腫由来株化細胞(OST細胞)及び骨巨細胞腫細胞と類似していた³⁰⁾⁴³⁾, 即ち subculture 後3日まで細胞は fibroblast-like cell であったが, subculture 4~5日目より epithelial-like cell に変化して増殖した。2) OST II細胞は46.4%のコロニー形成率を示し, 悪性腫瘍細胞の性格を表現した¹⁾⁴²⁾, 3) OST II細胞初期継代培養での染色体構成は広範な変異を呈し, 且つ, diploid cell, tetraploid cell がみられず継代培養に適した heteroploid cell からなっていた¹⁴⁾, 4) cell cycle に関しては, OST II細胞は長期継代のOST細胞に類似せる transit time を有していた²²⁾(表2)。

次に OST II細胞が悪性細胞としての性格を保持しているかどうかの問題であるが, これは即ち, 宿主の腫瘍死の問題と直結する。Foley et al¹⁹⁾は neoplastic cell line は heterotransplantability が強いと述べ, Manuelidis²⁴⁾及び Stanbridge²⁵⁾は human non-neoplastic cell はいかなる場合も異種移植の成立を見なかったと報告した。本実験では高瀬³⁸⁾³⁹⁾, 真鍋^{20)~23)}, 森²⁸⁾, 山内⁴⁴⁾の報告した異種移植方法にもとずき OST II細胞を RAMTS で処理したマウスに異種移植を行ったところ, マウスの大腿骨に巨大な腫瘍形成が認められ, host は腫瘍死した。異種移植による細胞の悪性度の判定に際し, 特に問題となる点は cultured cell の異種移植の場合で, かかる場合 recipient での細胞増殖の有無をもってその悪性度が判断されるべきではなく, recipient の腫瘍死の有無をもってその判定がなされるべきで, この観点より本実験に於てマウスへの異種移植結果は, OST II細胞が生物学的に悪性度の高い腫瘍細胞であると判定して異論はないと思われる。

次に OST細胞, OST II細胞のマウス或いはラット大腿骨部への異種移植の問題であるが, 現在までにラッ

ト皮下への異種移植を行った実験に関して、Ehrlich⁸⁾、Russell³³⁾、Toolan⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾、石井¹⁶⁾の報告があるが、これらはいずれも腫瘍細胞が異種生体内に於て増殖したにとどまり腫瘍が host を死に至らしめてはいない。次いで Miller²⁶⁾の胸腺摘出実験が移植免疫機構を明らかにして以来、anti-lymphocyte serum、anti-thymocyte serum が異種移植実験に際し、immunological suppression を惹起させるために使用されるに至った。この観点に立ち、Kubista et al¹⁸⁾、高瀬³⁹⁾、真鍋²⁰⁾⁽²²⁾、森²⁸⁾、山内⁴⁴⁾の方法に従い、Rabbit anti-Mouse-Thymus Serum を作製し、マウスに投与して免疫反応阻害を期待した。この手技を用いた本実験に於て、異種移植腫瘍は host が死亡するまで増殖を続ける事、及び腫瘍形成後 RAMTS の投与を中止しても腫瘍は増殖し、マウスが腫瘍死する事を確認した。即ち、この事実は RAMTS がマウスに対し充分に immunological suppression を惹起している事を示すものと考えられる。

しかし一方、マウスの場合と同様な考えによりラットに於て Rabbit anti-Rat-Thymus Serum 処理下で OST細胞及び OSTⅡ細胞を大腿骨部に異種移植したが、生後6～8週以前では腫瘍細胞の増殖が認められ、それ以後では RARTS の投与にもかかわらず腫瘍は regression された。この現象はラットへの RARTS 投与開始時期に無関係であった事実から、antisera に対するラットの immunological depletion の態度がマウスのそれと根本的に異なるものがあると考えざるを得ない。この問題に関連して Dabrowski⁷⁾は neonatally thymectomized rat は neonatally thymectomized mouse より、より軽度の wasting disease を示し、且つ死亡せず、lymphocyte responsiveness in graft-versus-host reaction の障害は neonatal thymectomy 後、即ち生後3ヶ月間にのみ見られると述べている。即ち immunological suppression をラットに求める場合は antisera の作製にあたり、Thymus の果す役割とそれが他の免疫担当細胞に影響を及ぼす時期的関係を考慮しなければならない。

他方、not conditioned neonatal rat への移植については Southam³⁰⁾、菊地¹⁷⁾の静脈内移植の報告があり、neonatal rat では比較的容易に異種移植されやすいという事実がある。本実験における OST細胞、OSTⅡ細胞のかかる静脈内投与の目的は 1) 肺に腫瘍を作らせる事、2) 出来た肺腫瘍に於て、腫

瘍性類骨が形成されるか否かを観察する事にある。neonatal rat へ異種の細胞を移植すると、ラットはその時期では異種の細胞を not self として recognition せず、self recognition が行われ、それ故に静脈内に投与された OST細胞、OSTⅡ細胞は容易に肺に於て腫瘍を形成し、ラットを腫瘍死に至らしめる事が出来た。同様に大腿骨部にこれら細胞を移植しても容易に移植が成立するはずであるが、本実験で示された如く、結果はこの考えと反対であった。即ち neonatal rat の大腿骨部への OST細胞、OSTⅡ細胞の移植は "take" されなかった。この相反する事実から移植部と neonatal な免疫学的寛容状態との間に host の not-self recognition、self recognition と云う認識度の程度の差が存在するものと考えられる。このような考えは Bullock⁴⁾、Cheorghiu⁶⁾、が予想していた事で Patti³¹⁾は Mouse Sarcoma 180 を neonatal rat の腹腔内に移植し、これを成功させ rat を腫瘍死せしめた。更に Southam³⁴⁾は immunological tolerance の状態の neonatal rat に於て、静脈内、腹腔内、皮下の順に異種細胞が移植され易い事を確認し、皮下異種移植を成功させるためにはより大量の細胞を接種する必要がある事を述べている。

本実験の目的の一つは異種移植腫瘍内の腫瘍性類骨形成の有無の確認である。この問題に関連して Patti et al³¹⁾は Sarcoma 180 を組織培養という操作を経ずにラットに異種移植を行い、腫瘍の形態学的変化を来たさない事を見ており、また Kubista et al¹⁸⁾も Walker 腫瘍を同様にマウスに移植して組織学的変化を来たさない事を報告した。1975年、Stanbridge et al³⁵⁾は本実験と同様に antithymocyte serum 投与と thymectomy のマウスに human cancer cell の直接異種移植を試み、出来た tumor nodule を形態学的に検討し、結論として "These tumors retain the organization of the original tumor in the human host" と述べた。因に Stanbridge のこの実験で移植腫瘍は host を死亡させてはいない。更に Adam et al³⁾は human leukemia cell の培養細胞を intact newborn syrian hamster に移植して lymphosarcoma の像をみている。一方、Manuelidis²⁴⁾はヒト glioblastoma multiforme 由来の glioma TC 178 の培養細胞を mouse、hamster へ移植するとその腫瘍は epithelial-like pattern を呈することを観察し、neoplastic cell を conditioned animal へ異種移植すると tumor を形

成するが、その tumor は organization または parent tumor への類似性を示すものは少ないと述べている。さて、OST細胞の conditioned mouse 大腿骨へ異種移植せしめ host を腫瘍死させた高瀬ら³⁹⁾、真鍋ら²⁰⁾⁽²²⁾、森²⁸⁾の実験に於て、腫瘍性と思われる類骨組織がこの異種移植腫瘍に見られたと報告し、更に kuga et al¹⁹⁾も nude mouse 皮下に OST細胞を移植し、腫瘍性類骨を認めたと報告したが、本実験に於て、OST細胞のラット大腿骨部移植群では腫瘍性と考えられる類骨組織の形成が見られたが、OST II細胞のマウス及びラットの大腿骨部への移植の場合、腫瘍性と思われる類骨組織の形成は認める事が出来なかった。ここでこの両者の形態学的差異に関して考えなければならないのは、この両細胞の origin である haman osteosarcoma の所見である。即ち、OST細胞 origin の sarcoma では腫瘍性類骨形成が著明であるに反し、OST II細胞 origin のそれに於ては腫瘍性類骨組織は比較的少ない、という事実から組織培養という操作を経てもなお、これら細胞は original tumor cell の character をある程度維持していると考えたい。

しかしながら、本実験の neonatal rat 尾静脈からの異種移植では、出来た肺腫瘍に於て、或は脳、腎、副腎の腫瘍に於て、OST細胞、OST II細胞移植群とも腫瘍性類骨、或は類軟骨組織は認められなかった。この事実から直ちに、これら両細胞は類骨形成能を失い、既に dedifferentiation してしまっていたとは断定し難く、それは osteogenic capacity を持った細胞がその環境によって bone induction を起す場合もあり、起さない場合もあるからである。即ち、OST細胞、OST II細胞の類骨形成能があるかどうかの問題に関しては今後更に検討されなければならない。

最後に本実験で得られた異種移植腫瘍の形態学的特長である epithelial pattern の問題であるが、これは次の如くに解せられる。即ち OST細胞、OST II細胞ともその異種移植により形成された腫瘍に於て、宿主側の反応として fibrosis が見られ、且つ、この fibrous tissue が腫瘍細胞巣を取り囲んでおり、即ち、移植された細胞は host 側からのこの fibrosis にうち勝って腫瘍組織として増殖し、且つ、腫瘍細胞巣は移植時より散在性で互いに独立して fibrosis の中に増殖し、そのためにこれら異種移植腫瘍の形態学的特長である alveolar structure の像を呈するに至ったものと解せられる。これを鍍銀染色で観察すると、各腫瘍細胞間に細線維形成が見ら

れ、それ故、alveolar structure の像にもかかわらず、これら腫瘍は非上皮性のものと判断された。

結 語

2種類のヒト骨肉腫由来培養細胞、即ち長期継代培養株化細胞(OST細胞)と継代培養に成功した初期の細胞(OST II細胞)について、*in vitro*の実験及びマウスとラットへ異種移植実験を行い、次の結果を得た。

1. OST II細胞は初代培養及び継代培養にも成功し、旺盛な増殖を示して44代でなお継代培養続行中である。

2. OST II細胞は *in vitro* で経時的形態学的変化、細胞数変化、コロニー形成率、染色体構成、cell cycle を検討し、OST II細胞の性格を明らかにした。

3. OST II細胞は RAMTS 処理したマウスの大腿骨部に異種移植が成立し、マウスは腫瘍死したので OST II細胞は悪性細胞であると判定された。

4. 両細胞を RARTS 処理したラットの大腿骨部異種移植の結果、4～5週まで腫瘍の増大をみたが、6週以後、腫瘍は退縮し、ラットは腫瘍死しなかった。

5. 新生児ラットへ両細胞を経静注異種移植したところ、OST細胞は12%に、OST II細胞は29%に肺移植が成立し、ラットの腫瘍死が得られた。OST II細胞の肺移植成立ラットにおいて、腎、副腎、脳に移植腫瘍が認められた。他方、両細胞の新生児ラット大腿骨部移植では腫瘍形成は見られなかった。

6. OST細胞のラット大腿骨部移植腫瘍組織において、腫瘍性と思われる類骨形成が認められたが、OST II細胞のマウス及びラット大腿骨部移植腫瘍組織には腫瘍性類骨は認められなかった。一方、両細胞の肺移植腫瘍組織には類骨形成をみなかった。これらのことは各々細胞の origin の性格または移植された細胞環境に原因しているものと思われた。

7. 両細胞のマウス及びラットの大腿骨部移植腫瘍、ラットの肺移植腫瘍は組織学的に alveolar pattern を呈して増殖したが、両細胞のラット大腿骨部移植腫瘍及び肺移植腫瘍は鍍銀染色で各腫瘍細胞間に銀線維がみられたので、これら異種移植腫瘍は非上皮性腫瘍細胞と判定された。

稿を終えるに臨み、御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師高瀬武平教授に衷心より深甚の謝意を表します。また終始御指導をいただきました真鍋昌平講師はじめ、三秋宏先生、山内四朗先生、山口昌夫先生、大橋光

伸先生、宮村秀一先生、富田勝郎の諸先輩及び学兄に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Aaronson, S. A., Todaro, G. J. & Freedman, A. E. : *Exptl. Cell Res.*, **61**, 1 (1970).
- 2) 阿部光俊 : *日整会誌*, **36**, 125 (1962).
- 3) Adam, R. A., Foley, G. E., Farber, S., Flowers, A., Lazarus, H., Hellsstein, E. E. : *Cancer Res.*, **27**, 772 (1967).
- 4) Bullock, W. E. : *Lancet*, **1**, 701 (1915).
- 5) Carrel, A. & Burrows, M. T. : *J. Amer. Med. Assoc.*, **5**, 1732. (1910).
- 6) Cheorghiu, J. : *J. Path. & Bat.*, **29**, 171, (1926).
- 7) Dabrowski, M. P. : *Transpl.*, **18**, 531 (1974).
- 8) Ehrlich, P. : *Arb. a. d. k. Inst. f. exper. Therap.*, **1**, 77 (1906).
- 9) Foley, G. E., Handler, A. H. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **94**, 661 (1957).
- 10) Gey, G. O. & Gey, M. K. : *Amer. J. cancer*, **27**, 45 (1936).
- 11) Gey, G. O. & Gey, A. O. : *Cancer Res.*, **12**, 264 (1952).
- 12) Harrison, R. G. : *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **4**, 140 (1906).
- 13) 羽柴秀雄 : *中部整災誌*, **11**, 347 (1968).
- 14) Hayflic, L. : *Exp. cell Res.*, **25**, 585 (1961).
- 15) 一前久芳 : *中部整災誌*, **11**, 639 (1968).
- 16) 石井清一 : *日整会誌*, **40**, 795 (1966).
- 17) 菊地芳彦 : *日整会誌*, **49**, 87 (1975).
- 18) Kubista, T. P., Shorter, R. G., Hallenbeck, G. A. : *Cancer Res.*, **27**, 2072 (1967).
- 19) Kuga, N., Koshida, Y., & Nomura, T. : *Gann*, **66**, 547 (1975).
- 20) Manabe, S., Takase, B., Yamazaki, Y., Miaki, H. : *Excerpta Medica*, Amsterdam, **95**, (1972).
- 21) 真鍋昌平, 山崎安朗, 三秋 宏, 加藤日出治, 島 巖, 山内四朗 : *癌の臨床*, **18**, 325 (1972).
- 22) 真鍋昌平, 高瀬武平, 山崎安朗, 三秋 宏, 山内四朗, 山口昌夫, 富田勝郎 : *中部整災誌*, **17**, 54 7 (1974).
- 23) 真鍋昌平, 高瀬武平, 三秋 宏, 山内四朗, 富田勝郎 : *癌の臨床*, **21**, 599 (1975).
- 24) Manuelidis, E. E. : *Cancer Res.*, **21**, 876 (1961).
- 25) 三秋 宏 : *中部整災誌*, **16**, 383 (1973).
- 26) Miller, J. F. A. P. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **99**, 340 (1962).
- 27) 宮沢洋一 : *中部整災誌*, **9**, 289 (1966).
- 28) 森 紀喜 : *中部整災誌*, **13**, 560 (1970).
- 29) 森田聖一 : *十全医会誌*, **71**, 315 (1965).
- 30) 太田丞一 : *日整会誌*, **36**, 521 (1965).
- 31) Patti, J., Moore, A. E. : *Cancer Res.*, **10**, 674 (1950).
- 32) Roux, W. : *Zsch. Biol.*, **21**, 411 (1885).
- 33) Russell, B. R. G. : *Third Sci. Res. Imperial. Cancer Res. Fund, London*, **3**, 341 (1958).
- 34) Southam, C. M. : *Cancer Res.*, **26**, 2496 (1966).
- 35) Stanbridge, E. J., Boulger, L. R., Franks, C. R., Garrett, J. A., Reeson, D. E., Bishop, O. & Perkins, F. T. : *Cancer Res.*, **35**, 2303 (1975).
- 36) 高田克弘 : *中部整災誌*, **11**, 17 (1968).
- 37) 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).
- 38) 高瀬武平, 山崎安朗, 真鍋昌平, 安元三郎, 三秋 宏, 池本和彦, 和嶋豊治, 森 紀喜 : *日整会誌*, **43**, 923 (1969).
- 39) 高瀬武平, 山崎安朗, 真鍋昌平, 三秋 宏, 森 紀喜 : *癌の臨床*, **17**, 134 (1971).
- 40) Toolan, H. W., : *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, **77**, 572 (1951).
- 41) Toolan, H. W. : *Cancer Res.*, **14**, 660 (1967).
- 42) 山口昌夫, 高瀬武平, 真鍋昌平, 三秋 宏, 島 巖, 山内四朗, 大橋光伸, 宮村秀一, 富田勝郎, 舟木清忠, 竹林俊一郎 : *中部整災誌*, **17**, 744 (1974).
- 43) 山崎安朗 : *十全医会誌*, **71**, 147 (1965).
- 44) 山内四朗 : *中部整災誌*, **16**, 1037 (1973).
- 45) Yoshida, T., Isaka, H., Satoh, H. : *Drug Res. (Arzmeim-Forsh)*, **14**, 735 (1964).

Abstract

Morphological studies on cultured human osteogenic sarcoma cells, i. e. OST cells and OST-II cells, were performed *in vitro* and *in vivo*.

Not only histological and proliferating changes of OST cells and OST-II cells, but also colony formation, chromosomal and cytokinetic analyses of OST-II cells were studied *in vitro*.

OST-II cells were heterotransplanted into the femurs of mice treated with anti-thymocyte serum. Tumor formation was observed a week after the transplantation, and 9-10 weeks later huge tumors were formed on the transplanted sites, leading to the death of the mice. This fact showed that OST-II cells had a malignant character.

Both OST cells and OST-II cells were heterotransplanted into femurs of rats treated with anti-thymocyte serum. The tumors grew fingertip-sized till the end of 5 weeks after transplantations, but then these tumors began to regress, and therefore the rats did not die.

After both cells were transplanted into newborn rats intravenously, tumors were observed in their lungs, and these rats died 30-40 days after transplantations. In several rats, in which pulmonary tumors had been observed, tumors were histologically recognized in kidneys, adrenals and brains.

In tumor tissues produced by transplantations of OST cells into femurs of rats, tumorous osteoid formation were recognized, but not recognized in the case of OST-II cells. In pulmonary tumors of both cells, osteoid tissues were not recognized.

These tumors which originated in OST cells and OST-II cells histologically showed alveolar pattern, but by silver impregnation it was revealed that these tumors were nonepithelial.

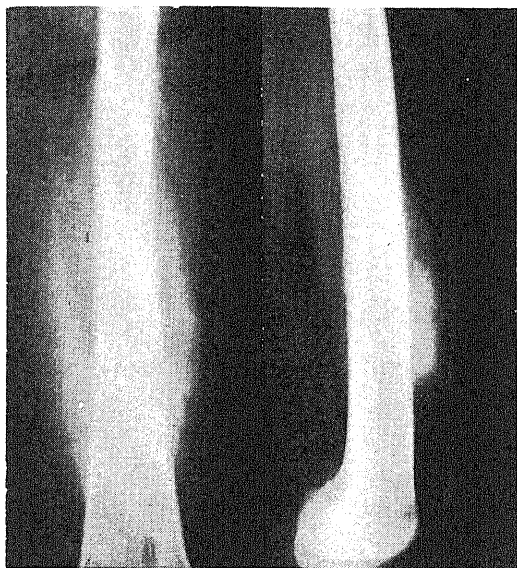


写真1. Original human osteosarcoma of OST cells (X-ray findings)

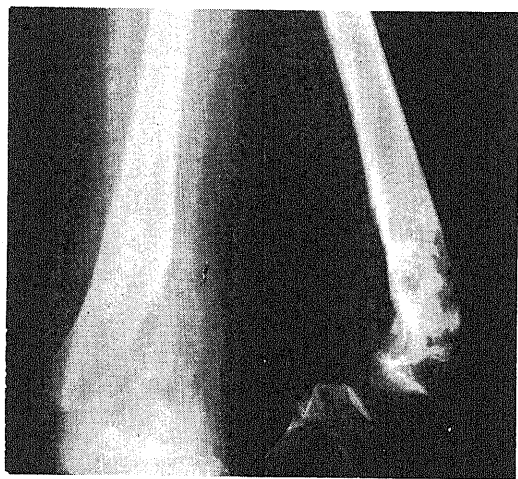


写真3. Original human osteosarcoma of OST II cells (X-ray findings)

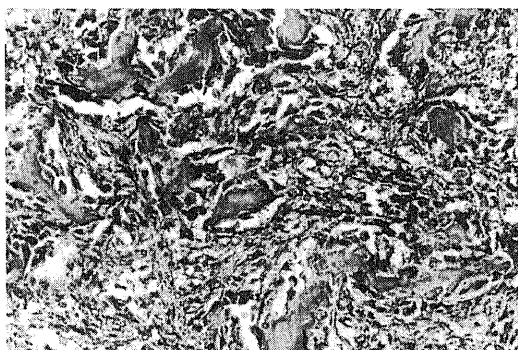


写真2. Original human osteosarcoma of OST cells (H-E stain, ×200)

紡錘形または多角形の細胞が増殖し、核は濃染している。類骨形成が豊富にみられる。

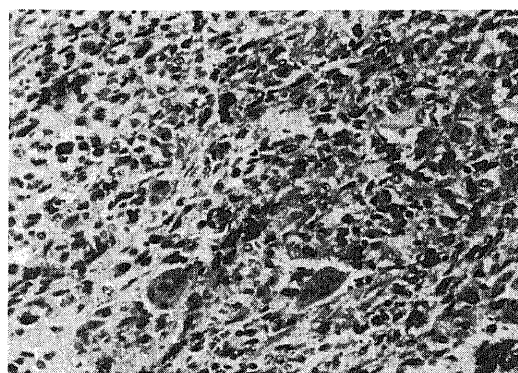


写真4. Original human osteosarcoma of OST II cells (H-E stain, ×200)

不規則な多形性細胞で、核はクロマチンに富み卵円形または紡錘形を呈す。多核巨細胞もみられ、osteoid 形成は比較的少い。

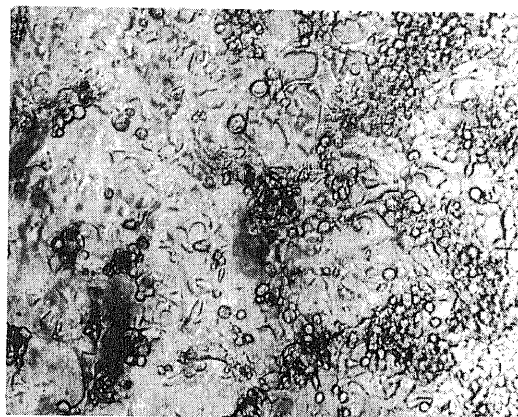


写真5. OST II 細胞 初代培養15日目 (倒立顕微鏡所見, ×150)

細胞は紡錘形または星状形に突起をもって増殖している。

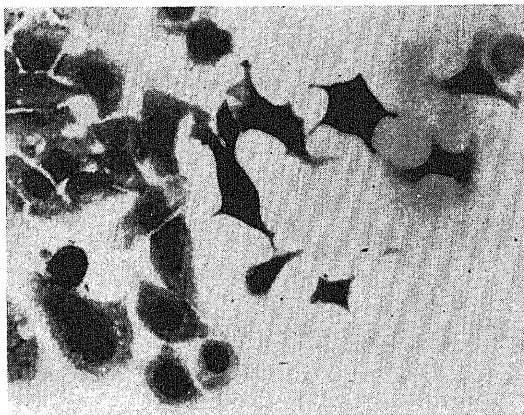


写真6. OST II 細胞 継代培養2代,2日目
(Giemsa 染色, $\times 300$)
紡錘形の細胞が比較的多く, 多核巨細胞もみ
る。核は大きくクロマチンに富んでいる。

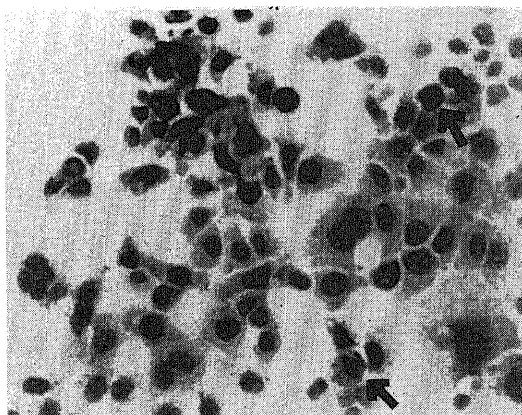


写真7. OST II 細胞 継代培養2代, 4日目
(H-E 染色, $\times 200$)
上皮細胞様に増殖し, mitosis(↑) もみられる。

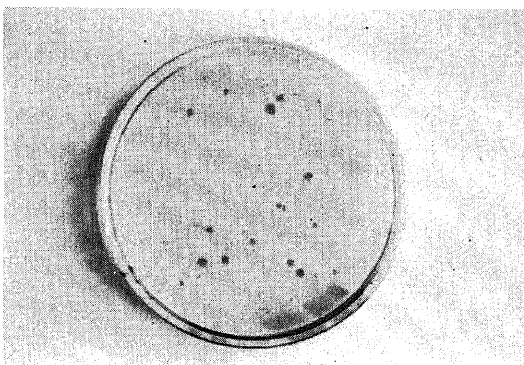


写真8. OST II 細胞のコロニー形成(14日目)
コロニー形成率46%を示す。

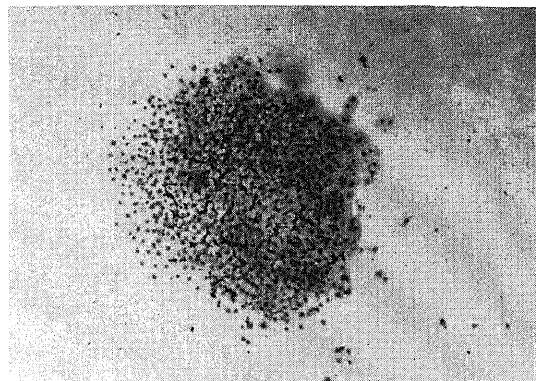


写真9. OST II 細胞 コロニーの組織所見
(Giemsa 染色, $\times 20$)
上皮様細胞が敷石様に並び円形のコロニーを
形成している。

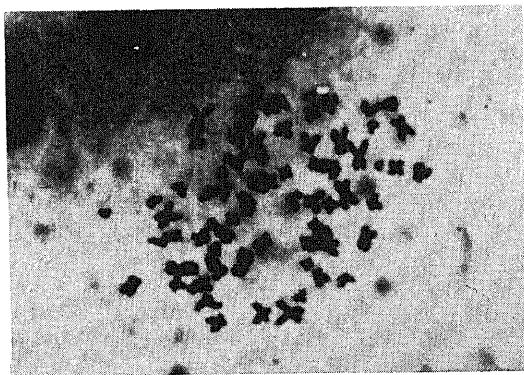


写真10. OST II 細胞3代目の染色体構成
(Giemsa 染色, $\times 600$)
71個の chromosome を有する核分裂細胞

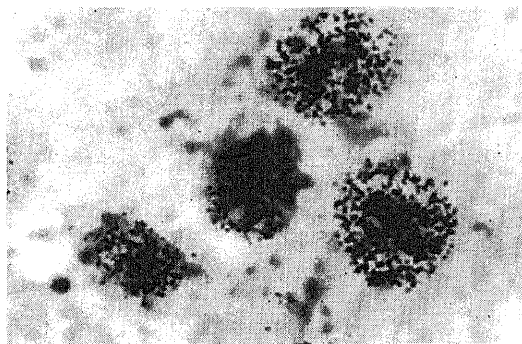


写真11. OST II 細胞 cumulative labeling
method による labeled cell を示す。
(Giemsa 染色, $\times 1,000$)

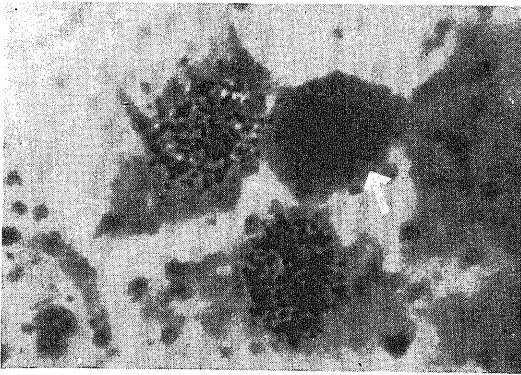


写真12. OST II 細胞 single pulse-mitosis chase method による labeled mitotic cell (↑) を示す
(Giemsa 染色, $\times 1,000$)

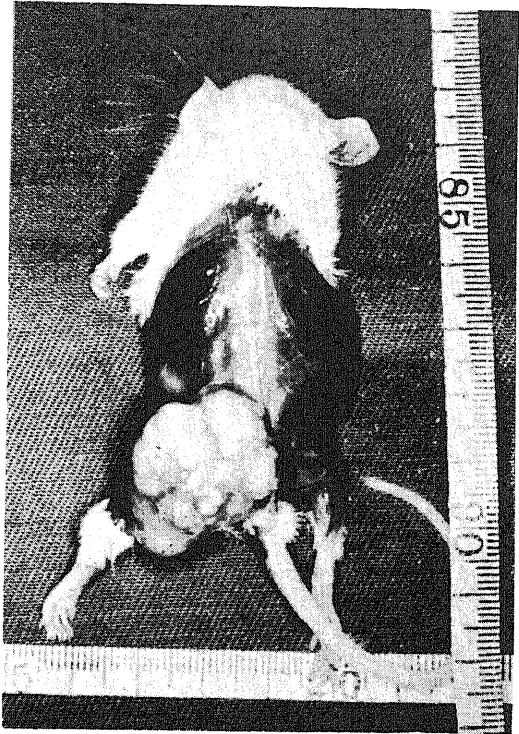


写真13. OST II 細胞 マウス大腿骨部異種移植74日目, 死亡時の腫瘍を示す。

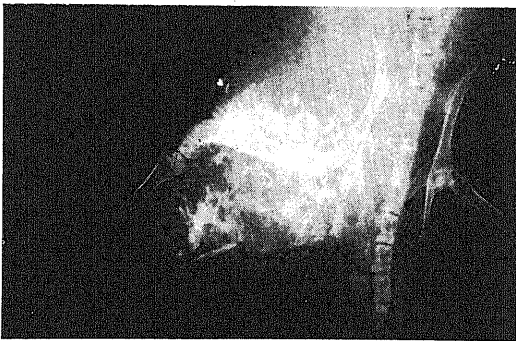


写真14. OST II 細胞 マウス大腿骨部異種移植32日目のレ線所見
造骨性腫瘍と spicula 形成をみる。

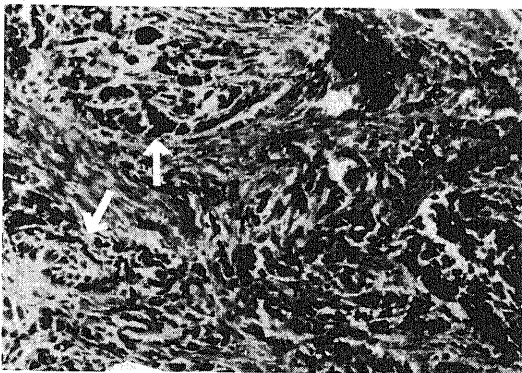


写真15. OST II 細胞 マウス大腿骨部異種移植22日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 150$)
OST II 細胞は alveolar structure を形成して増殖。(↑) は腫瘍細胞巣 (OST II 細胞の増殖) を示す。

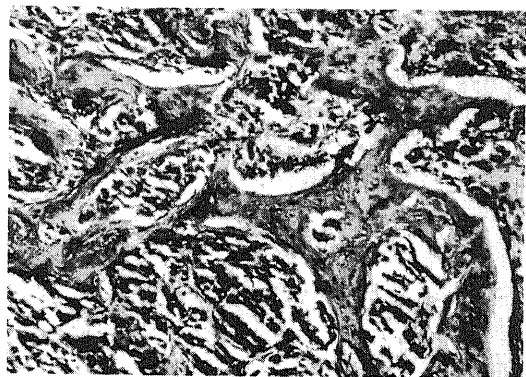


写真16. OST II 細胞 マウス大腿骨部異種移植15日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 150$)
反応性 osteoid の形成をみる。

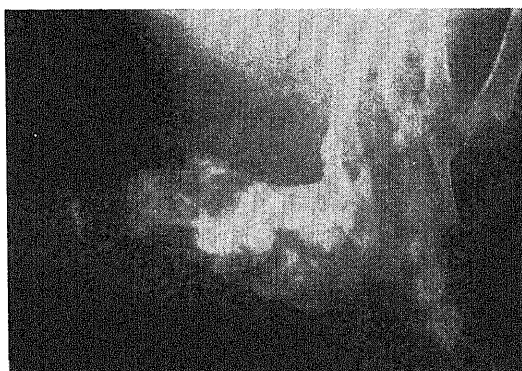


写真17. OST II 細胞 ラット大腿骨部異種移植15日目のレ線所見。
雲絮状の骨新生をみる。

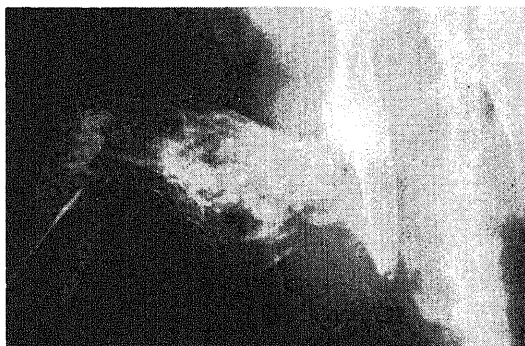


写真19. OST II 細胞 ラット大腿骨部異種移植58日目のレ線所見
骨新生は骨様に硬化している。

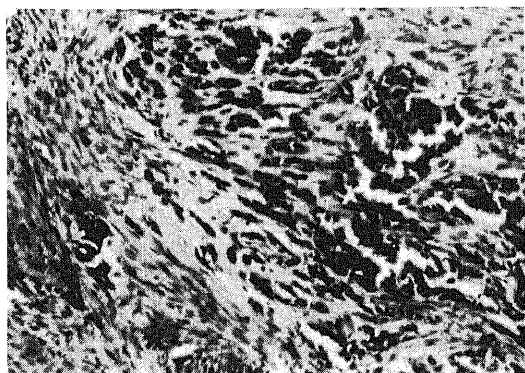


写真21. OST II 細胞 ラット大腿骨部異種移植9日目の組織所見 (H-E 染色, ×150)
fibrous tissue の増殖が強く腫瘍細胞巣は小さい。



写真18. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植21日目のレ線所見
雲絮状骨新生をみる。

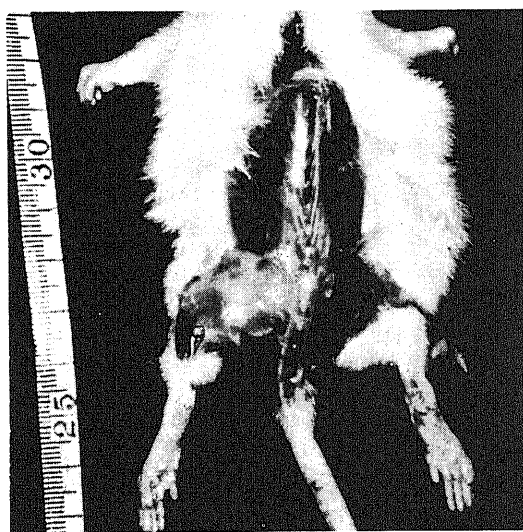


写真20. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植32日目の所見
拇指頭大の腫瘤を形成している。

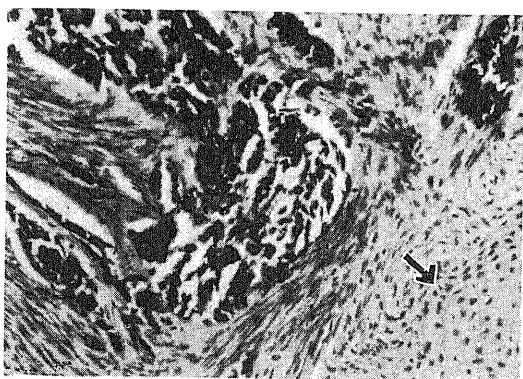


写真22. OST II 細胞 ラット大腿骨部異種移植13日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 150$)
腫瘍細胞巣はやや増大し, fibrous tissue 中に軟骨組織 (↑) もみられる。

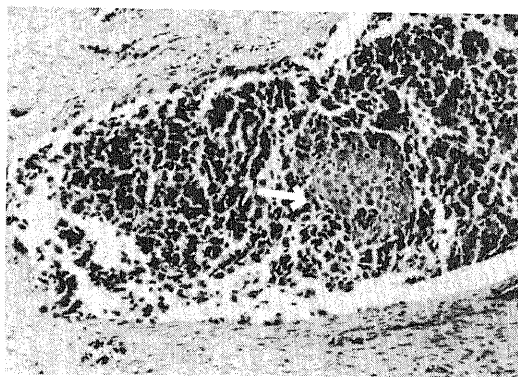


写真23. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植15日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 100$)
大きい腫瘍細胞巣の中心部に necrosis がみられる (↑)

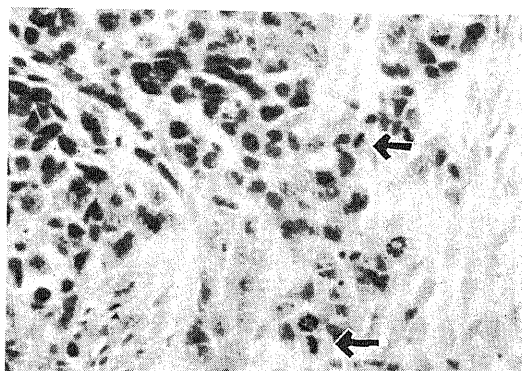


写真24. OST II 細胞 ラット大腿骨部異種移植18日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 400$)
腫瘍細胞は円形または卵円形を呈し, 核は大きくクロマチンに富み, mitosis も多くみられる (↑)

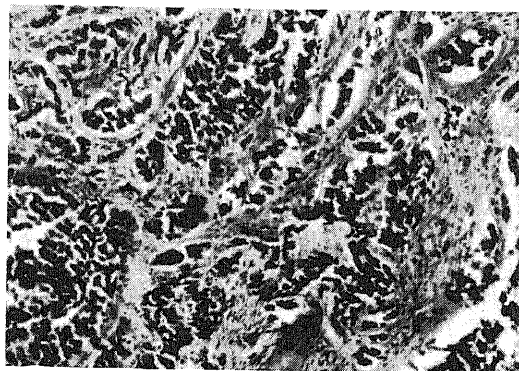


写真25. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植21日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 150$)
腫瘍細胞巣は alveolar structure を呈して増殖している。

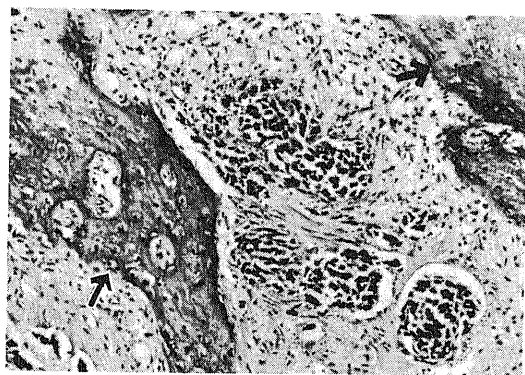


写真26. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植18日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 100$)
反応性と思われる osteoid 形成をみる (↑)

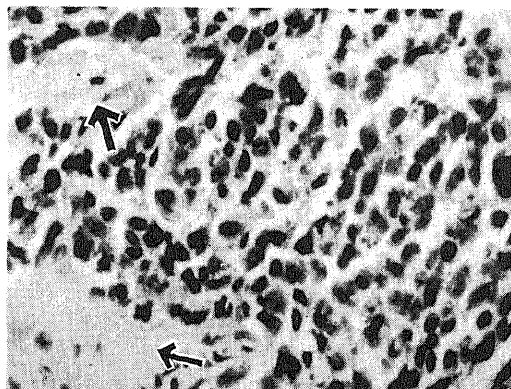


写真27. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植21日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 300$)
腫瘍性と思われる類骨組織が見られる (↑)

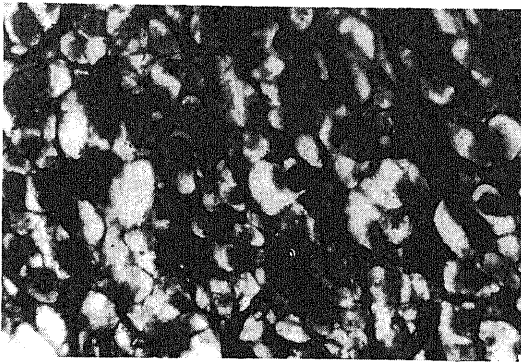


写真28. OST II 細胞 ラット大腿骨部異種移植21日目の組織所見 (鍍銀染色, $\times 600$)
細い銀線維が各腫瘍細胞間に密に入り込んでいる。

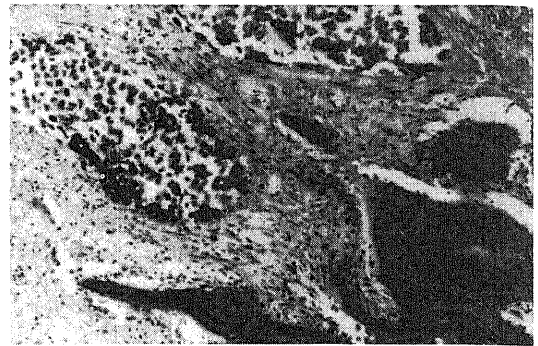


写真29. OST 細胞 ラット大腿骨部異種移植43日目の組織所見 (H-E 染色, $\times 100$)
腫瘍細胞巣は縮小し, fibrous tissue が多くなる。



写真30. OST 細胞 静注異種移植32日目の肺腫瘍 (ラット №3)
左右全肺野に亘って粟粒状の腫瘍をみる。

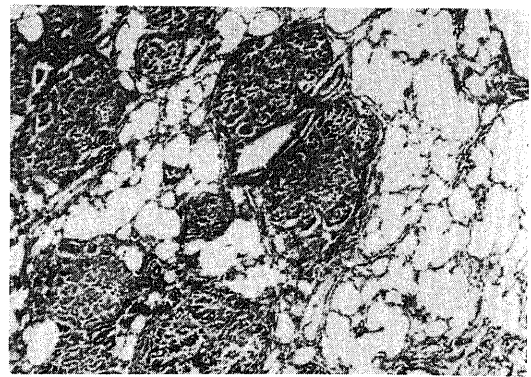


写真31. OST 細胞 静注異種移植32日目の肺腫瘍組織所見 (ラット №3, H-E 染色, $\times 75$)
島状の腫瘍細胞巣が散在し, 各腫瘍細胞巣は alveolar structure を呈する。

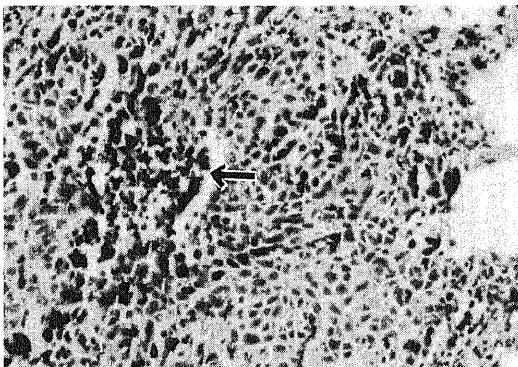


写真32. OST II 細胞 静注異種移植24日目の肺腫瘍の組織所見 (ラット №9, H-E 染色, $\times 150$)
大きな腫瘍細胞巣では central necrosis (\uparrow) をみる。

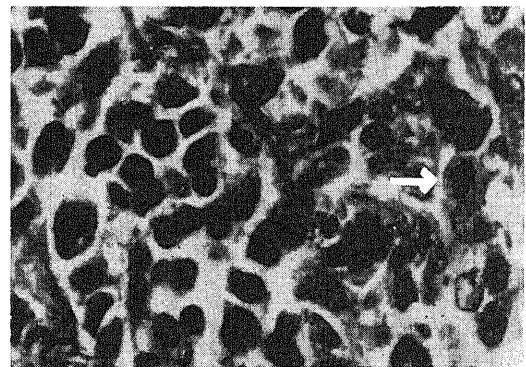


写真33. OST II 細胞 静注異種移植35日目の肺腫瘍の組織所見 (ラット №15, H-E 染色, $\times 600$)
腫瘍細胞は多形で核は大きくクロマチンに富み, mitosis (\uparrow) もみられる。

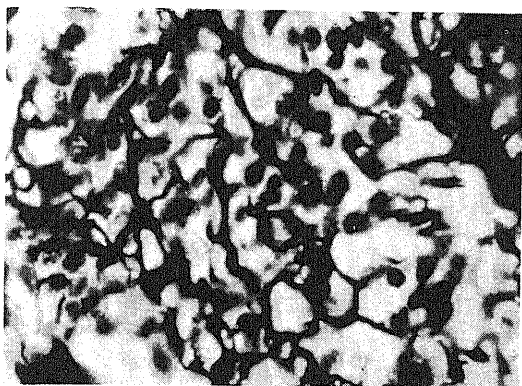


写真34. OST 細胞 静注異種移植32日目の肺
腫瘍の組織所見
(ラット №3, 鍍銀染色, $\times 400$)
銀線維が各腫瘍細胞間をとり囲んでいる。

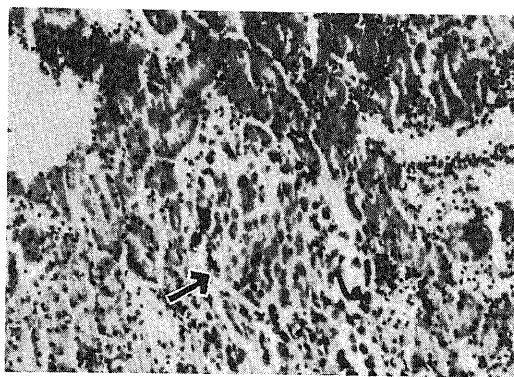


写真35. OST II 細胞 静注異種移植35日目の
腎腫瘍組織所見
(ラット №15, H-E 染色, $\times 150$)
腎尿細管中に浸潤性腫瘍組織をみる (↑)

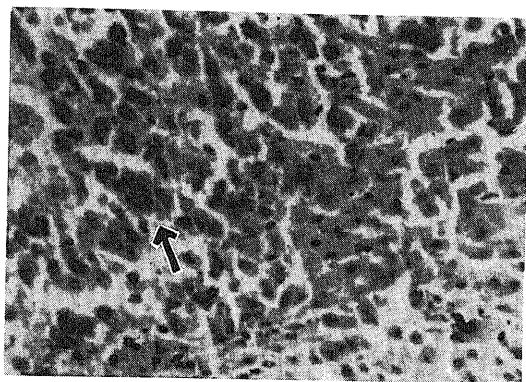


写真36. OST II 細胞 静注異種移植35日目の
副腎皮質に浸潤せる腫瘍 (↑)
(ラット №15, H-E 染色, $\times 300$)

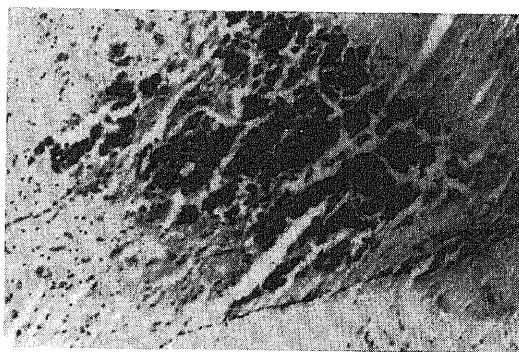


写真37. OST II 細胞 静注異種移植24日目の
脳に浸潤せる腫瘍
(ラット №10, H-E 染色, $\times 100$)