

ヒト骨肉腫由来培養株化細胞の異種移植腫瘍における電子顕微鏡的研究

| | |
|-------|---|
| 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/2297/8616 |

ヒト骨肉腫由来培養株化細胞の異種移植腫瘍 における電子顕微鏡的研究

金沢大学医学部整形外科学教室 (主任: 高瀬武平教授)

宮 村 秀 一

(昭和50年12月26日受付)

体外で生体組織を培養する試みは、1885年 Roux¹⁾ が chick embryo の神経板を生理食塩水中で観察したことに始まり、Harrison²⁾ の神経線維の培養、Earle³⁾ のL細胞株の樹立を経て大きな発展を遂げ、特に1952年 Gey ら⁴⁾ が子宮頸部癌から HeLa 細胞株を樹立して以来、組織培養は癌の研究に重要な役割を占めるようになった。しかし骨腫瘍細胞の組織培養についての報告は少ない。Geyら⁵⁾、Morton⁶⁾、阿部⁷⁾、太田⁸⁾ が骨巨細胞腫の組織培養に成功したのに続き、1964年高瀬ら⁹⁾ は骨肉腫細胞の培養、株化に成功した。高瀬はこの細胞を OST 細胞と名付けた。この OST 細胞に関して、*in vitro* では、山崎¹⁰⁾ による細胞形態学的研究、三秋¹¹⁾、羽葉¹²⁾ による核学のおよび細胞動態学的研究、並びに高瀬ら¹³⁾¹⁴⁾、宮沢¹⁵⁾、一前¹⁶⁾ による各種薬剤・X線照射が OST 細胞に及ぼす影響についての研究などがなされ、さらに1969年以来、高瀬ら¹⁷⁾¹⁸⁾、真鍋ら^{19)~21)}、森²²⁾ は、OST 細胞をマウスへ異種移植し、Rabbit-Anti-Mouse-Thymus-Serum で処置することにより、移植腫瘍は退縮することなく増大し、ついに宿主マウスを腫瘍死に至らしめたと報告した。また、*in vitro* における OST 細胞の超微構造については、高瀬ら²³⁾、安土²⁴⁾、菊田ら²⁵⁾ によりすでに報告されているが、著者は、OST 細胞をマウスに異種移植して、形成された本異種移植腫瘍の特徴を電子顕微鏡で観察し、*in vitro* における OST 細胞のそれとの対比の上、異種移植による本細胞の超微構造上の変化、特に本異種移植腫瘍内に見られる骨および類骨の基質の起源について検討を加え、若干の知見を得たので報告する。

実験材料並びに実験方法

異種移植腫瘍についての観察と比較するため、異種

移植に用いた本細胞の一部、即ち、"OST cells *in vitro*" の観察も併せ行った。

1. ヒト骨肉腫由来培養株化細胞 (OST 細胞)

本実験に用いた OST 細胞は、15才女子の左大腿骨々幹部に発生した骨肉腫を、金沢大学医学部整形外科学教室において、下肢切断直後に剔出、細胞を分離、培養し、1964年6月に株化に成功したもので、established cell line として Osteogenic Sarcoma Takase Strain (OST 細胞) と名付けられ、現在なお継代培養続行中で、1975年11月現在550代に至っている。

2. 異種移植腫瘍

OST 細胞のマウスへの異種移植に先立ち、マウスの免疫反応を抑制するため、著者はまず、Kubistaら²⁶⁾ の方法に準じて Rabbit-Anti-Mouse-Thymus-Serum (以下、RAMTS と略す) を作製した。即ち、生後2週の雌 ddN マウスより胸腺細胞をとり、Hanks 液に浮遊させ、その5~10億個の細胞を2~3kgの家兎の耳静脈より注射し、2週間後更に同量の胸腺細胞を静注した。その後1週間を経て、この家兎から血液を採取し、血清を分離不活化した。

OST 細胞のマウスへの異種移植には、継代培養4日目の458~523代 OST 細胞を用いた。policeman で培養瓶のガラス面より本細胞を剥離し、充分 pipetting して単離細胞としたものを培養液に浮遊させ、その約1,000万個を生後3週の雄 ddN マウス大腿骨内へ注射針で移植した。即ち、生後2週の雄 ddN マウスの腹腔内に RAMTS 0.05ml を7日間注射した後、上記培養細胞を移植し、移植後も同様に RAMTS の処置を続け、1ヶ月間観察し、腫瘍形成の見られなかったものは移植不成功と判定した。移植成立のマウスでは、移植後2週で小豆大の腫瘍がマウス大腿

Electronmicroscopic studies on the xenografted tumors of cultured human osteogenic sarcoma cells. Shuichi Miyamura, Department of Orthopaedic Surgery (Director: Prof. B. Takase), School of Medicine, Kanazawa University.

骨の移植部に触知され、この腫瘍は3週で小指頭大から示指頭大に増大し、移植率は60% (15匹中9匹)であった。RAMTS 投与を続ける限り、腫瘍は退縮することはなく、RAMTS 投与下で経時的に観察したマウス3匹は平均46日 (各々33日、46日、58日)で腫瘍死し、本研究にはこれらの異種移植腫瘍のうち、移植後19~28日のものにつき観察した。

3. 電子顕微鏡的観察

1) OST 細胞の *in vitro* での検討

継代培養4日目の458~523代 OST 細胞、即ち、マウスへの異種移植用細胞の一部をこの観察に供した。policeman で培養瓶のガラス面から OST 細胞を剥離し、直ちにこれを800~1,000r.p.m. 5分間遠沈、上清を捨てた後、細胞の pellet を速やかに氷冷した0.1Mカゴジル酸ナトリウム緩衝2.5%グルタールアルデヒド液 (pH7.4) で2時間固定後細切0.2M底糖含有同緩衝液で水洗、さらに氷冷した0.1Mカゴジル酸ナトリウム緩衝1%オスミウム酸液 (pH7.4) で2時間の後固定を行った。ついでこれをアセトン系列で脱水、エボン812に包埋、ガラスナイフを付けたPorter-Blum MT-2型ミクロトームで薄切した。この超薄切片を酢酸ウラニル・クエン酸鉛で重染色し、日立 HU-11DS 型電子顕微鏡で観察、写真撮影した。

2) OST 細胞の *in vivo* での検討

異種移植後19~28日の小指頭大ないし示指頭大の腫瘍の辺縁部から腫瘍組織片を採取、細切し、氷冷した0.1Mカゴジル酸ナトリウム緩衝2.5%グルタールアルデヒド液 (pH7.4) で2時間固定、その後、上記の *in vitro* の場合と同様の方法で、オスミウム酸固定、アセトン脱水、エボン包埋を行った。ガラスナイフで薄切した超薄切片を酢酸ウラニル・クエン酸鉛で重染色し、日立 HU-11DS 型およびH-500型電子顕微鏡で観察、写真撮影した。

また、腫瘍組織内におけるカルシウムと思われる沈着物を解析するため、これを微小X線分析装置で検索した。即ち、1,000~2,000Åの切片を無染色のまま、日立H-500型電子顕微鏡に付属させた非分散型微小X線分析装置 (KEVEX) で検索した。

なお、異種移植腫瘍の一部を光顕的観察に用い、かつ、電顕用超薄切片作製に際し、連続して光顕用標本をとり、比較検討に供した。

実験成績

1. *in vitro* における OST 細胞の電顕像

1) 細胞の形および結合状態

in vitro の OST 細胞の形は類円形ないし多角形

を呈し、細胞表面にはかなり多数の microvilli が認められた (図1)。しかし、細胞が互いに密に隣接する部も多く、そのような部位では時に desmosome 様構造が観察された (図2)。細胞間隙に特別な物質は見出されなかった。

2) 核

OST 細胞の核は一般に大きく、その形は類円形ないし楕円形を呈したが、時に核膜の彎入、切れ込みにより不規則な形態を示すものも見られた (図2)。また核細胞質比は大であった。核小体は1~2個あり、時に紐状構造、所謂 nucleolonema の形状を呈した (図1)。chromatin は核内全体にびまん性に散在、あるいは島状や斑紋状に集積していた (図1)。

3) 糸粒体

OST 細胞では、一般に糸粒体は豊富であり、円形、楕円形、桿状または屈曲したものなど種々の形を呈した (図3)。cristae mitochondriales はややまばらで、その配列は不規則な傾向が見られた (図4)。

4) 小胞体

OST 細胞においては、小胞体は主に粗面小胞体から成り、発達は一般に不良であり、内腔の拡張したものも見られたが (図4)、多くは細管状の断面を呈した (図5)。粗面小胞体の内腔には、電子密度の低い無定形物質が見られた (図4、5)。粗面小胞体に付着する ribosome はまばらで不規則な配列を示した (図4、5)。

5) Golgi 装置

OST 細胞の Golgi 装置は、小胞体、糸粒体などの細胞小器官の多い細胞に見られたが、一般に発達は不良であり、Golgi 嚢や Golgi 小胞の内腔に特別な構造物は認められなかった (図3)。

6) ribosome

OST 細胞の ribosome は、粗面小胞体に付着したものは比較的少なく、多くは細胞質内に遊離して存在し、所謂 free ribosome の形として細胞質全域にわたって散在していた。free ribosome には、数個集合して polyribosome の形を呈するものがしばしば認められた (図5)。

7) intracellular filament

比較的多くの OST 細胞において、周期性の認められない直径50~70Åの filament が細胞質内に観察された。それらの filament は束をなして細胞小器官の間や細胞膜付近を走っていた (図3)。

8) lysosome

OST 細胞の細胞質内に、限界膜で境され、内部が高電子密度の均質な物質で充たされた lysosome

が見られた。そのほか、空胞内に数個の小胞を有する、所謂、multivesicular body や、細胞膜がフラスコ状に陥入し、液体摂取を行うとされている micropinocytotic vesicle が見られた (図3)。

9) 細胞外物質

OST 細胞の細胞外に、線維成分は認められなかった。

2. *in vivo* における OST 細胞

—異種移植腫瘍—の光顕像

異種移植された OST 細胞は移植後3週で示指頭大の、内に骨組織を有する腫瘍を形成した (図6)。移植後27日目の光顕像を見ると、OST 細胞 (以下、ここでは腫瘍細胞と呼ぶ) は種々の大きさの alveolar structure を示して増殖し、腫瘍細胞巢はいずれもマウス由来の帯状の結合組織でとり囲まれており、腫瘍細胞巢の中心部ではしばしば腫瘍細胞の壊死が見られた (図7)。骨組織は一般に結合組織帯内に、あるいは結合組織帯と腫瘍細胞巢との境界部に存在したが、時に腫瘍細胞巢内に骨組織が存在する場合もあった (図8)。また腫瘍細胞巢をとり囲む骨梁の一部に類骨組織と思われる強好酸性の部分が少量見られた (図9)。

なお、本異種移植腫瘍は alveolar structure を呈して増殖したが、鍍銀染色でこれを見ると、細線維が各腫瘍細胞間に見られたことから、本腫瘍は非上皮性のものと判断された。

3. *in vivo* における OST 細胞

—異種移植腫瘍—の電顕像

本腫瘍細胞巢の中心部に認められた壊死部以外の viable な腫瘍細胞がある部分につき検索した。

1) 細胞の形および結合状態

本腫瘍細胞は一般に多少の凹凸のある類円形ないし多角形を呈した (図10)。細胞間隙の広いところ、特に3つ以上の本腫瘍細胞が相接する部位では、細胞表面に多数の microvilli が見られ (図10)、開大した細胞間隙には所により微毛状ないし無定形の物質が少量認められた (図11)。細胞間隙の狭いところでは、細胞表面は平滑で、隣接する2つの腫瘍細胞の細胞膜はほぼ平行に走っており、このような部位では時に desmosome 様構造が観察された (図12)。

2) 核

本腫瘍細胞の核は一般に大きく、核細胞質比の増大を認めた (図10, 11)。その核の形は一般に類円形ないし楕円形であるが (図10)、核膜の種々の程度の嚙入や切れ込みも見られた (図13)。核小体は1~3個あり (図11)、紐状の構造を示す nucleolonema も

時に認められた (図14)。chromatin は、核内にはほぼ均等に分布するものが多いが、島状や斑紋状の分布を示すもの、あるいは核の辺縁部に集積するものなどが見られた。

3) 糸粒体

本腫瘍細胞では糸粒体は一般に豊富で、他の細胞小器官が少ない細胞でも糸粒体は比較的多数見られ、その形は円形、楕円形、桿状あるいは屈曲した形のものなど種々であった (図13)。cristae mitochondriales はまばらで、しばしば不規則な配列が見られた (図16)。しかし、糸粒体を含む細胞小器官のすべてが未発達な細胞も少数見られ、そのような細胞は核細胞質比が著しく大であった (図15)。

4) 小胞体

本腫瘍細胞の小胞体は主に粗面小胞体から成り、それは細胞質内に不規則に分布する細管状断面として見られた。粗面小胞体の発達の程度は細胞によって差異があり、多くの細胞では発達不良であったが (図13)、主に腫瘍細胞巢辺縁部において粗面小胞体がやや拡張傾向を示す腫瘍細胞があり (図22)、時に良く発達した腫瘍細胞も見られた (図16)。これらの良く発達した腫瘍細胞では、粗面小胞体は細胞質のほぼ全域に分布する網状構造を示し、不規則に拡大した内腔は電子密度の低い微毛状物質を少量有していた (図17)。

5) Golgi 装置

本腫瘍細胞の核付近に、種々の程度に発達した Golgi 装置が見られた。Golgi 嚢や Golgi 小胞の内腔に特別な構造物は認められなかった (図13)。

6) ribosome

粗面小胞体に付着する ribosome は少数で、大多数の ribosome は遊離の状態で存在し、細胞質全体にわたって散在していた。数個の free ribosome の集合から成る polyribosome も認められた (図18)。

7) intracellular filament

若干の本腫瘍細胞では、周期性のない直径50~70Åの filament が細胞質内に見られた。それらは束をなして、細胞膜付近や (図14)、核の周囲 (図19) を走っていた。

8) lysosome

本腫瘍細胞において、しばしば細胞質内に lysosome が見られた。それらは類円形ないし卵円形を呈し、内に電子密度の高い均質な物質を有しており、周囲は限界膜で包まれていた (図18)。

9) 多核巨細胞

腫瘍細胞巢内に、少数ながら多核巨細胞を認めた。

多核巨細胞の形は類円形で、細胞表面はほぼ平滑、microvilli は見られなかった。核は数個あり、核小体は nucleolonema の形状を示すものもあった。粗面小胞体はやや拡張し、多数見られた糸粒体は不整な形態を示していた。free ribosome も多数見られ、小規模な Golgi 装置や intracellular filament も認められた(図20, 21)。

10) 細胞外物質

腫瘍細胞巢内の腫瘍細胞が密集した部位では、細胞外に線維は認められなかったが、腫瘍細胞巢辺縁部では腫瘍細胞に接して平行または不規則に走る、500~700Åの幅を有する線維が多数見られた。これらの線維の一部には周期性が認められた。しかし腫瘍細胞巢辺縁部では、線維とともに宿主マウス由来の線維芽細胞、血管内皮細胞などが腫瘍細胞に近接して見られた(図22, 23)。また興味ある所見として、腫瘍細胞巢辺縁部の腫瘍細胞において、一部細胞膜の不明瞭な部位に線維が刷毛状に配列し、あたかも腫瘍細胞から線維が排出されているように見える像が得られた(図24)。

腫瘍細胞巢をとり囲むマウス由来の結合組織帯内で、周期性を示す成熟した膠原線維が密に束を成して走る部位にカルシウム沈着と思われる電子密度の高い不整形な物質が認められた(図25)。非染色標本による同部位の微小部X線分析において、カルシウムとリンが検出された(図26)。

考 察

1. 異種移植腫瘍における OST 細胞 (*in vivo*) の超微構造上の特徴、並びに *in vitro* における OST 細胞のそれとの比較。

本実験において、OST 細胞の形や結合状態については、*in vitro*, *in vivo* 共にほぼ共通の所見が得られた。即ち、細胞の形が類円形ないし多核形を呈すること、一般に microvilli を多数有すること、また隣接細胞と密に接している場合もあり、そのような場所では desmosome 様構造が見られることなどである。本実験において、OST 細胞に *in vitro*, *in vivo* で共に desmosome 様構造が認められたが、類似の所見として、Dudley ら²⁷⁾ は骨芽細胞に、北野²⁸⁾ は堀江肉腫に、武田²⁹⁾ は骨巨細胞腫の基質細胞および骨巨細胞腫由来培養細胞に desmosome 様構造を見出したと報告しており、また教室の安土²⁴⁾ は原発性骨肉腫および培養 OST 細胞の観察において、両者に desmosome 様構造を認めたと報告している。

OST 細胞の核および核小体の所見は *in vitro*,

in vivo において共にほぼ共通し、基本的な差異は認められなかった。かかる共通した所見、即ち、核膜の嚙入、切れ込みによる不規則な核形態は、一般に悪性腫瘍細胞全般に見られる特徴であり、細胞の核、細胞質間の物質交換の亢進を意味するとされている。

高瀬²³⁾、安土²⁴⁾ が述べているごとく、本実験においても *in vitro* の OST 細胞は糸粒体を豊富に持っていたが、この点に関し、特に菊田²⁵⁾ は、骨巨細胞腫細胞と骨肉腫細胞の培養実験において、両者とも長期に継代培養を重ねるほど糸粒体の数が増加する傾向を示すことを報告し、細胞は置かれた環境下に最も適した状態で増殖するように変化して行くど解釈した。また Dalton & Felix³⁰⁾ は糸粒体の形態の多彩性、cristae mitochondriales の配列の不規則性は、一般に悪性腫瘍細胞の特徴のひとつであることを指摘した。一方、高松³¹⁾によれば、癌細胞は、発生母細胞本来の分化した機能の一部をすでに失っているが、更に癌細胞になった後もかかる変化は進行し、最終段階では総べての分化した機能を失った未分化な細胞になるという。今回検討した異種移植腫瘍においては、本腫瘍細胞 (OST cells *in vivo*) は糸粒体を比較的多数含み、かつ、*in vitro* の OST 細胞で見られた糸粒体の形態の多彩性や cristae mitochondriales の配列異常などの傾向も同様に見られ、*in vitro* の OST 細胞の培養細胞としての、また悪性腫瘍細胞としての特徴を *in vivo* に良く受け継いでいた。しかし他方、本実験において *in vivo* の OST 細胞 (異種移植腫瘍細胞) では、糸粒体を含むすべての細胞小器官の未発達な細胞が見られ、そのような細胞では核細胞質比が著しく大きく、より未分化な細胞形態を示していた。*in vitro* で未分化な形態を示す OST 細胞が見られなかったことを考慮に入れると、このような *in vivo* の所見は、マウスへの異種移植により OST 細胞はより未分化な方向へ進むうことを示唆するように思われる。

次に、小胞体は多くの場合、細胞の分化した特異機能を表現しており、例えば、線維芽細胞の機能に関して、Ross ら³²⁾ は膠原線維の成分である proline-H³ をトレーサーとして電子顕微鏡的オートラジオグラフィを行い、grain が粗面小胞体と Golgi 装置に現れたと述べ、主に粗面小胞体が膠原線維前駆物質の合成貯溜の場であることを示した。Dudley ら²⁷⁾、倉橋³³⁾ は、骨芽細胞の形態学的観察において、発達した粗面小胞体の内部に電子密度のやや高い無構造物質が認められたと報告した。更に、安土²⁴⁾、Ghadially ら³⁴⁾、原田³⁵⁾、広田³⁶⁾、古屋³⁷⁾、吉川³⁸⁾、新

宮ら³⁹⁾は、骨芽細胞と同様に膠原線維を主体とする骨基質の前駆物質を産生する原発性骨肉腫細胞にも、粗面小胞体の発達が特徴的であったと述べ、特に安土⁴⁰⁾、原田³⁵⁾、広田ら³⁶⁾は原発性骨肉腫細胞において、粗面小胞体内部の電子密度は細胞質よりも高いことを報告した。しかるに、本実験における *in vitro* の OST 細胞では、粗面小胞体の発達は一般に不良であった。この事は本来の骨肉腫細胞が持つ膠原線維前駆物質生成の機能が *in vitro* の OST 細胞において抑制されていることを示すように思われる。更に、異種移植腫瘍細胞では、腫瘍細胞巢を占めるほとんどの細胞（中心部壊死細胞を除く）の粗面小胞体は発達不良で、*in vitro* のものより更に未分化な状態に変化していると考えられるが、一方、主として腫瘍細胞巢辺縁部には発達した粗面小胞体を有する腫瘍細胞が見られ、これらの腫瘍細胞は何らかの機能を持つと推測されるが、粗面小胞体内部の電子密度が低かったことから、直ちには膠原線維を主体とする骨基質前駆物質の生成能が本細胞にあるとは考えられ難い。

かくのごとく、本異種移植腫瘍細胞では、未分化な粗面小胞体を持つ腫瘍細胞と、比較的分化した粗面小胞体を持つ腫瘍細胞とが見られた。

OST細胞の細胞質内の free ribosome は *in vitro*, *in vivo* とも共通して多数見られ、このことは悪性腫瘍細胞のひとつの特徴を表現しており、また polyribosome も多数認められ cellular activity の旺盛さを示していると考えられた。

異種移植腫瘍細胞には頻度は少ないが、*in vitro* の OST 細胞におけると同様、束状の配列を示す、周期性の認められない直径50~70Åの filament が存在し、それらの filament は細胞質内、特に核周辺や細胞膜付近に見られた。このような形態を示す intracellular filament を、安土²⁴⁾、Ghadially³⁴⁾ は原発性骨肉腫細胞に、Jande ら⁴⁰⁾ は youngest osteocyte に認めたと報告した。更に Chapman⁴¹⁾ は線維芽細胞における intracellular filament を細胞外の膠原線維の前駆物質であろうと考えた。しかし梶川^{42)~44)}は、このような filament はコラーゲン合成能が無いと考えられる組織球や白血病細胞にも同様に認められることなどから、結局、この intracellular filament の存在を細胞外膠原線維と関係づけがたいと述べている。

次に multivesicular body の機能については未だ定説はないが、菊田ら²⁵⁾は、継代培養12代目に至った骨巨細胞腫由来培養細胞内に、それまで見られなかった multivesicular body が出現したと報告し、

また Fogh ら⁴⁵⁾は young culture の FL cell における多数の multivesicular body の出現を、この細胞の急速な成長と関係あるものと考えた。Robbins ら⁴⁶⁾、DeDuve ら⁴⁷⁾は multivesicular body が細胞の消化過程に関与すると考え、更に Smith ら⁴⁸⁾はラットの下垂体前葉に出現する multivesicular body は endogenous protein の消化にあずかると述べている。本実験における OST 細胞では、lysosome は *in vitro*, *in vivo* で共に認められたが、*in vitro* の OST細胞においてしばしば見られた multivesicular body や micropinocytotic vesicle は、異種移植腫瘍細胞には見られなかった。

異種移植腫瘍の腫瘍細胞巢内に、少数ながら多核巨細胞が見られたが、武田⁴⁹⁾は、一般に悪性腫瘍細胞は異常分裂の結果、しばしば染色体の倍加を伴う単核あるいは多核の巨細胞を形成するので、腫瘍組織は常にある率を以て巨細胞を含有すると述べた。また、多核巨細胞は単核細胞の融合の結果生ずるとする説もある。本異種移植腫瘍に見られた多核巨細胞は円形で、その表面に microvilli を有せず、超微構造上多数の糸粒体、豊富な ribosome, intracellular filament の存在など他の単核の本腫瘍細胞と共通した所見が多く認められた。しかし、これらの多核巨細胞が異常分裂によって生じたものか、単核細胞の融合によって生じたものかを決定することは困難であった。破骨細胞との区別は、本移植腫瘍中の巨細胞が多数の空胞状滑面小胞体を有しないこと、および骨に接していないことから可能である。

2. 異種移植腫瘍細胞と膠原線維

本異種移植腫瘍において、細胞の密に集合する腫瘍細胞巢内部では細胞外物質に乏しく線維の生成は認められなかった。一方、腫瘍細胞巢辺縁部では、時に粗面小胞体が良く発達した腫瘍細胞が認められたが、この事実から直ちには本細胞が膠原線維の前駆物質を生成するとは考え難い。また、腫瘍細胞巢辺縁部には500~700Åの幅を有する線維が多数腫瘍細胞に接して見られ、かつ、同部位に宿主マウス由来の線維芽細胞や血管内皮細胞、形質細胞などが多数混在することから、この腫瘍細胞巢辺縁部に認められた線維は宿主マウス由来のものか、腫瘍細胞由来のものかの判定は困難であった。

また、腫瘍細胞の一部細胞膜が不明瞭となった部位に、あたかも腫瘍細胞から排出されるがごとく刷毛状に配列した線維が観察された。この所見は細胞外膠原線維が腫瘍細胞に由来するもののように考えられる

が、薄切の方向により細胞膜の一部が不明瞭になったため、あたかも細胞質と細胞外の線維が直接連続したように見えたとも解せられる。

3. 異種移植腫瘍内に見られた骨および類骨の起源について

本異種移植腫瘍内の結合組織帯にカルシウムの沈着と思われる像がしばしば見られ、微小部X線分析の結果、この沈着物質はカルシウムとリンから成ることが判明した。このようなカルシウムとリンの沈着は、周期的な横紋構造を有する成熟した膠原線維が密に走行する部位にのみ観察され、腫瘍細胞巢内には見られなかった。膠原線維が密に見られる部分はいうまでもなく腫瘍細胞巢をとり囲む宿主マウス由来の結合組織帯であるところから、本異種移植腫瘍内に見られる骨および類骨は宿主マウス側の反応性骨形成によるものと考えられる。

結 語

ヒト骨肉腫由来培養株化細胞 (OST 細胞) を、抗胸腺血清を用いて免疫抑制したマウスに異種移植し、形成された腫瘍の特徴を電子顕微鏡で観察し、*in vitro* における OST 細胞のそれとの対比の上、異種移植による本細胞の超微構造上の変化、特に骨、類骨の基質の起源について検討を加えて次の結論を得た。

1. *in vivo* における OST 細胞 (異種移植腫瘍細胞) は超微構造上、多くの microvilli, desmosome 様構造の存在、核の不整形、多数の糸粒体、豊富な free ribosome, intracellular filament の存在など *in vitro* の OST 細胞の性格を良く受け継ぎ、また、細胞小器官の未発達な細胞が出現する点で *in vitro* のものよりさらに未分化の方向へ変遷すると思われる傾向があった。粗面小胞体に関しては、多数の異種移植腫瘍細胞が *in vitro* の OST 細胞におけるよりも未分化な形態の粗面小胞体を有する一方、少数ながら、比較的発達良好な粗面小胞体を有する異種移植腫瘍細胞も認められた。

2. 主として腫瘍細胞巢辺縁部の腫瘍細胞において、時に粗面小胞体が発達し、その拡大した内腔に微毛状物質が見られ、本異種移植腫瘍細胞の何らかの機能を暗示するが、かかる粗面小胞体の発達した細胞が、膠原線維をはじめとする骨基質の前駆物質生成に関与するかどうかは、直ちには断定出来ない。腫瘍細胞巢辺縁に多数見られた500~700Å幅を有する線維は、宿主マウス由来のものか、異種移植腫瘍細胞由来のものかを判定することは困難であった。

3. 宿主マウス由来の結合組織帯内で、成熟した膠原線維が密な走行を示す部位にのみ、カルシウムとリンの沈着像が得られた。このことより、レ線像や光顕所見で見られた本異種移植腫瘍中の骨および類骨は、宿主マウス側の反応性骨形成によるものと考えられる。

稿を終るにあたり、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謹んで深甚の謝意を表します。また終始御指導、御教示をいただきました真鍋昌平講師はじめ骨腫瘍研究班の諸先生方、御協力下さいました安田俊久文部技官、本学電子顕微鏡室各位ならびに電子顕微鏡その他の提供をいただきました日製産業株式会社に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Roux, W. : Zschr. Biol., 21, 411 (1885).
- 2) Harrison, R. G. : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 4, 140 (1906).
- 3) Earle, W. R. : J. Natl. Cancer Inst., 4, 165 (1943).
- 4) Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubicek, M. T. : Cancer Res., 12, 264 (1952).
- 5) Gey, G. O. & Gey, M. K. : Amer. J. Cancer, 27, 45 (1936).
- 6) Morton, J. J. : Cancer, 9, 1012 (1956).
- 7) 阿部光俊 : 日整会誌, 36, 125 (1962).
- 8) 太田丞一 : 日整会誌, 36, 521 (1962).
- 9) 高瀬武平・山崎安朗・井村慎一・安元三郎・高田克弘・山田清夫 : 中部整災誌, 7, 577 (1964).
- 10) 山崎安朗 : 十全医会誌, 71, 147 (1964).
- 11) 三秋 宏 : 中部整災誌, 16, 383 (1973).
- 12) 羽柴秀雄 : 中部整災誌, 11, 347 (1968).
- 13) 高瀬武平・山崎安朗・安元三郎・布谷 猛・宮沢洋一・高田克弘・山田清夫 : 中部整災誌, 9, 23 (1966).
- 14) 高瀬武平・山崎安朗・安元三郎・山田清夫・高田克弘・三秋 宏・羽柴秀雄・一前久芳 : 中部整災誌, 10, 415 (1967).
- 15) 宮沢洋一 : 中部整災誌, 9, 289 (1966).
- 16) 一前久芳 : 中部整災誌, 11, 639 (1968).
- 17) 高瀬武平・山崎安朗・真鍋昌平・安元三郎・三秋 宏・池本和彦・和島豊治・森 紀喜 : 日整会誌, 43, 923 (1969).
- 18) 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).

- 19) Manabe, S., Takase, B., Yamazaki, Y. & Miaki, H. : Excerpta Medica, Amsterdam. 95. (1972).
- 20) 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, 547 (1974).
- 21) 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).
- 22) 森 紀喜 : 中部整災誌, 13, 560 (1970).
- 23) 高瀬武平・井村慎一・武田正典・安土忠義 : 臨床整形外科, 2, 993 (1967).
- 24) 安土忠義 : 中部整災誌, 12, 605 (1969).
- 25) 菊田圭彦・石井清一・梅田弘敏 : 日整会誌, 49, 135 (1975).
- 26) Kubista, T. P. & Hallenbeck, G. A. : Cancer Res., 27, 2072 (1967).
- 27) Dudley, H. R. & Spiro, D. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 11, 627 (1961).
- 28) 北野正人 : 日整会誌, 41, 913 (1967).
- 29) 武田正典 : 中部整災誌, 11, 321 (1968).
- 30) Dalton, A. J. & Felix, Marie D. : Ann. New York Acad. Sc., 63, 1117 (1956).
- 31) 高松英雄 : 京大結研紀要, 10(2), 11 (1962).
- 32) Ross, R. & Benditt, E. P. : J. Cell Biol., 27, 83 (1965).
- 33) 倉橋和啓 : 細胞, 4(8), 25 (1972).
- 34) Ghadially, F. N. & Mehta, P. N. : Cancer, 25, 1457 (1970).
- 35) 原田裕朗 : 日整会誌, 35, 1119 (1962).
- 36) 広田耕三・渡辺教充・丸田意気夫・沼田 享・竹下雄二 : 整形外科, 12, 254 (1961).
- 37) 古屋光太郎・太田邦夫 : 日病会誌, 49, 735 (1960).
- 38) 吉川暢一 : 米子医誌, 13, 307 (1962).
- 39) 新宮彦助・吉川暢一・大谷幸史 : 日整会誌, 34, 1414 (1961).
- 40) Jande, S. S. & Belanger, L. F. : Cal. Tiss. Res., 6, 280 (1971).
- 41) Chapman, J. A. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 639 (1961).
- 42) Kajikawa, K. : J. Electronmicroscopy, 10, 131 (1961).
- 43) Kajikawa, K. : J. Electronmicroscopy, 12, 83 (1963).
- 44) 梶川欽一郎 : 実験形態学誌, 20, 1 (1966).
- 45) Fogh, J. F. & Edwards, G. A. : J. Natl. Cancer Inst., 23, 893 (1959).
- 46) Robbins, E. & Marcus, P. I. : J. Cell Biol., 21, 49 (1964).
- 47) De Duve, C. & Wataiaux, R. : Ann. Rev. Physiol., 28, 435 (1966).
- 48) Smith, R. E. & Farquhar, M. G. : J. Cell Biol., 31, 319 (1966).
- 49) 武田 進 : 新細胞学 (妹尾・高木編), 第8版, 694頁, 東京, 朝倉書店, 1973.

Abstract

The cultured human osteogenic sarcoma cells (OST cells), which had been established by Takase et al. in 1964, were successively transplanted into the intramedullary cavity of the femur of the mice treated with Rabbit-Anti-Mouse-Thymus Serum. Fine structure of tumors was observed by electronmicroscopy and was compared with that of OST cells *in vitro*.

The tumor cells (OST cells *in vivo*) as well as OST cells *in vitro*, showed microvilli, desmosomelike structures, rugged shaped nuclei, intracellular filaments, numerous mitochondria and abundant free ribosomes. But the finding that cells which had large nuclei and few intracellular organelles appeared in tumors, suggested that dedifferentiation of OST cells was induced by xenograft. On the other hand, compared with OST cells *in vitro*, tumor cells showed either proliferation or a decline of rough-surfaced endoplasmic reticulum.

The proliferative rough-surfaced endoplasmic reticulum suggested some secretory

activity of the tumor cells. And abundant collagen fibers were found at the peripheral portion of the tumors. But it was difficult to determine whether or not the collagen fibers were attributed to the tumor cells, because host-fibroblasts were near to the tumor cells wherever these collagen fibers were observed.

Deposition of Ca and P was found at collagen fibers in fibrous tissue which were originated from mouse. So, it was likely that host-fibroblasts elaborated the bone in these tumors.

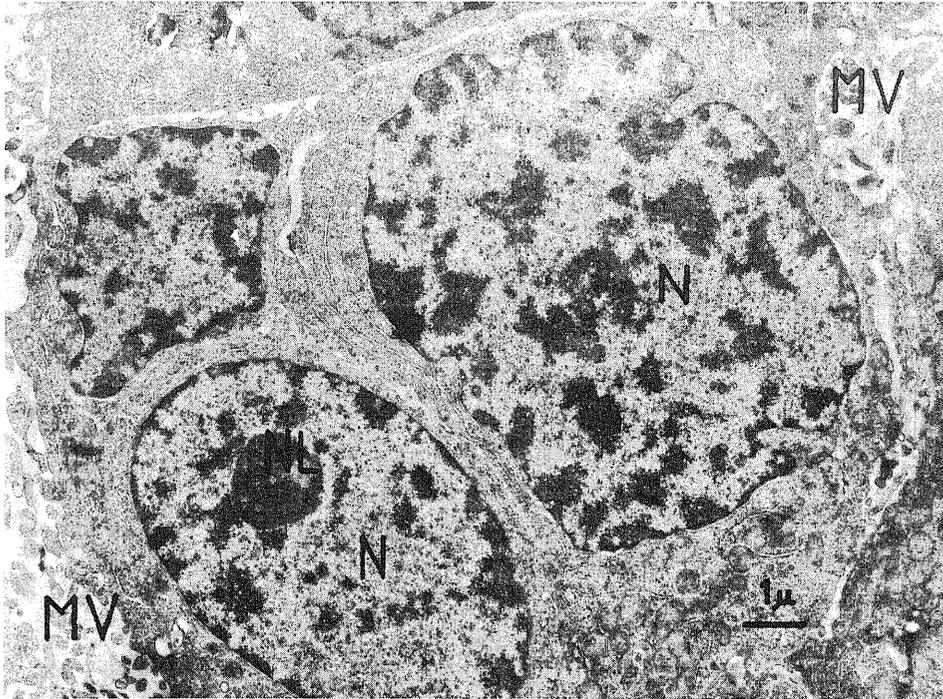


図1 *in vitro* OST 細胞の電顕像 細胞は類円形～多角形を呈し、多数の microvilli (MV) を有する。核小体 (NL) は nucleolonema の形状を呈し、核 (N) の chromatin は斑紋状の集積を示す。(× 8,400)

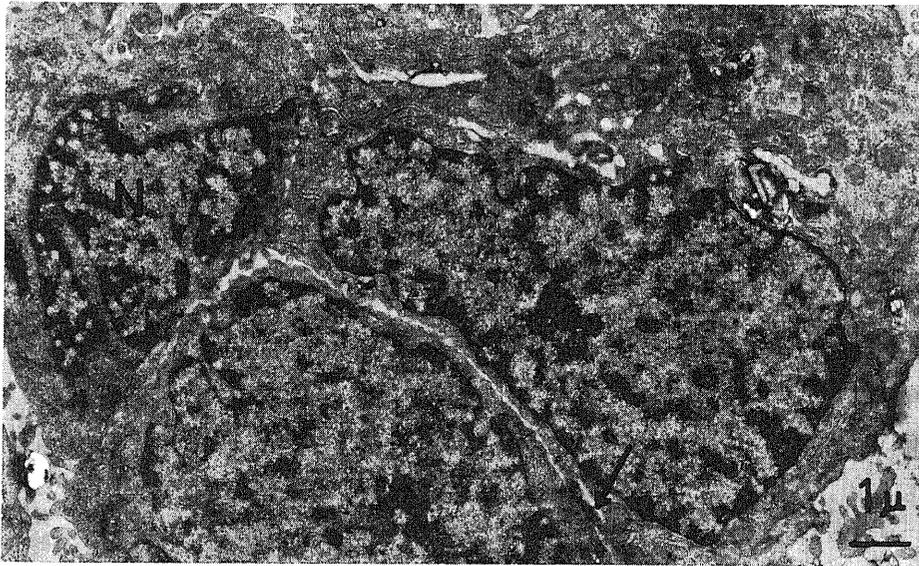


図2 *in vitro* OST 細胞の電顕像 desmosome 様構造 (↙) を見る。核 (N) は核膜の彎入、切れ込みにより不規則な形態を示す。(8,400)

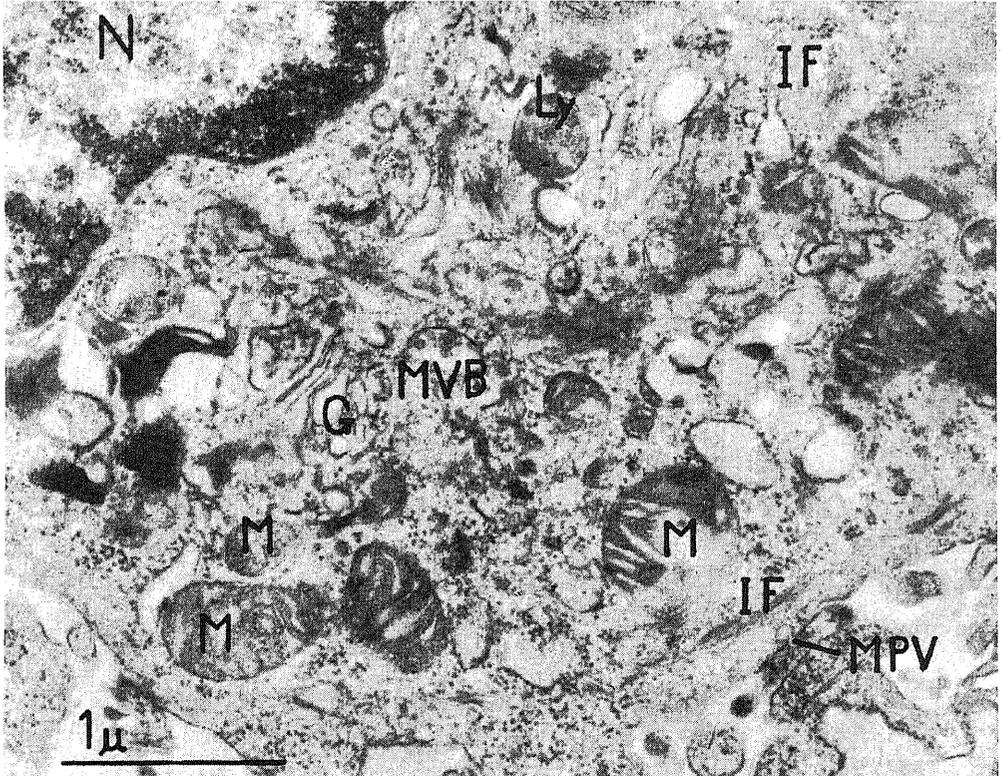


図3 *in vitro* OST 細胞の電顕像 細胞質内に、種々の形態の糸粒体 (M), Golgi 装置 (G), intracellular filament (IF), lysosome (Ly), multivesicular body (MVB), micropinocytotic vesicle (MPV) を見る。(× 30,000)

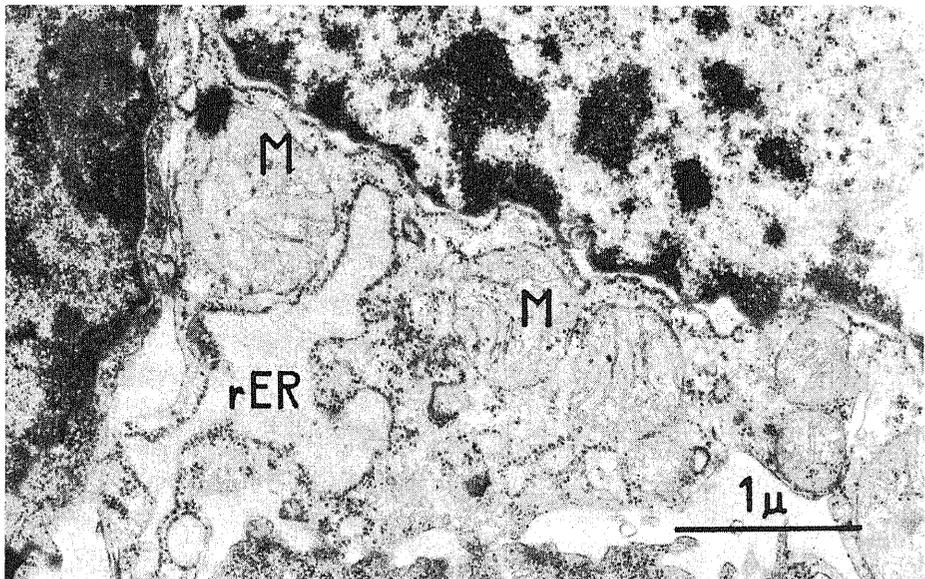


図4 *in vitro* OST 細胞の電顕像 糸粒体 (M) の cristae はまばらで、配列不規則である。拡張した粗面小胞体 (rER) を見る。(× 25,000)

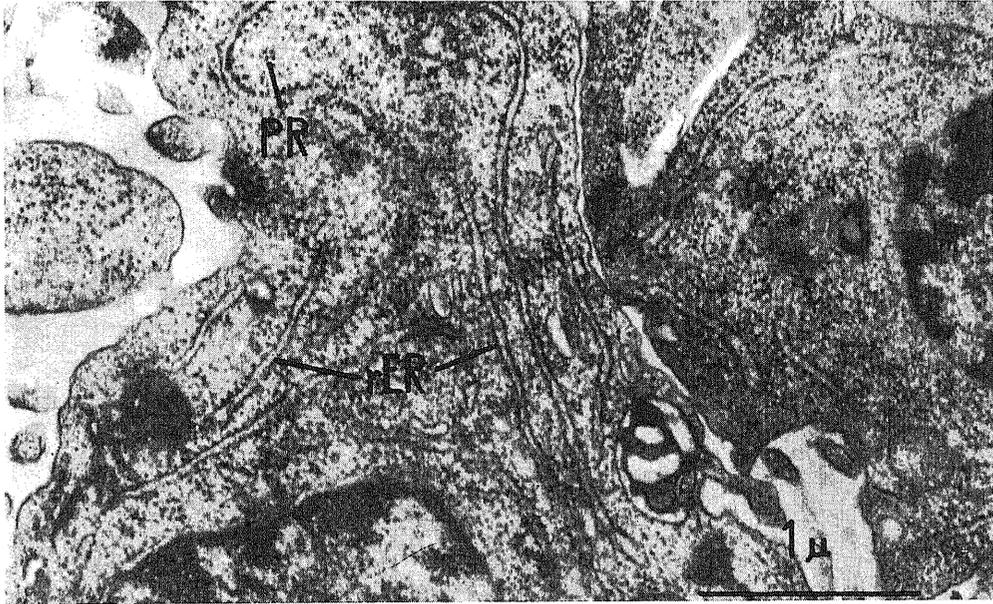


図5 *in vitro* OST 細胞の電顕像 比較的良く発達した細管状の粗面小胞体 (rER) を示す。free ribosome とそれらが数個集した polyribosome (PR) を見る。
(× 30,000)



図6 異種移植腫瘍のレ線像
腫瘍内に骨形成を見る (移植後21日目)。

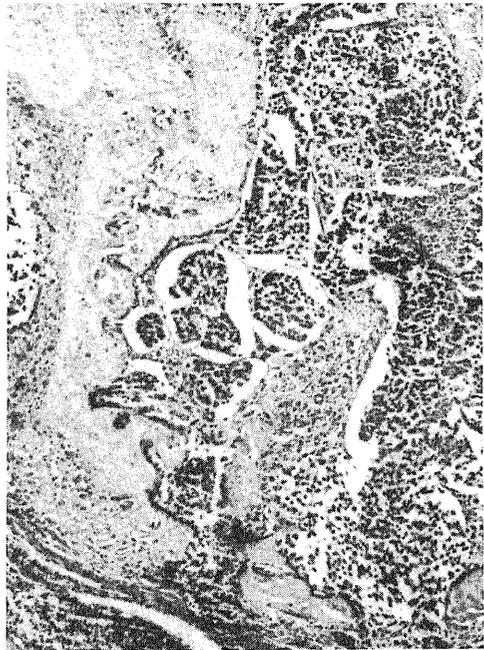


図7 異種移植腫瘍の光顕像
腫瘍組織は alveolar pattern を示し、中心部の細胞には壊死が見られる。骨組織は腫瘍細胞巣をとり囲む結合織帯内に存在する。
(× 100, 塩化シアンル固定, H-E染色)

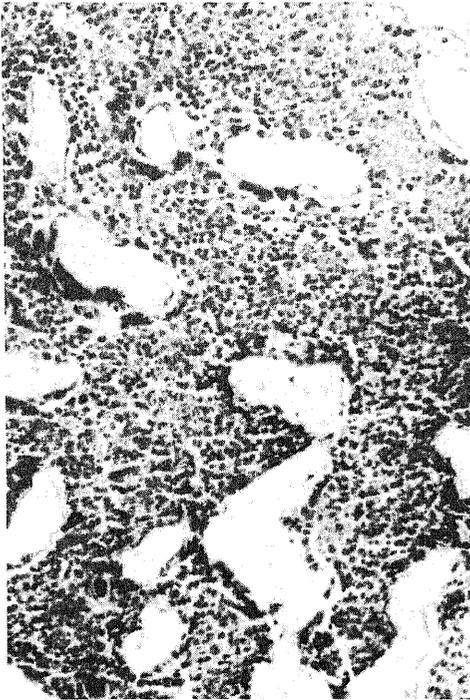


図8 異種移植腫瘍の光顕像 骨組織と腫瘍細胞が混在する部位も見られる。(× 250, 塩化シアヌル固定, H-E染色)



図9 異種移植腫瘍の光顕像 骨梁の一部に強好酸性の類骨と思われる部分を認める (↙)。(× 500, 塩化シアヌル固定, H-E染色)。

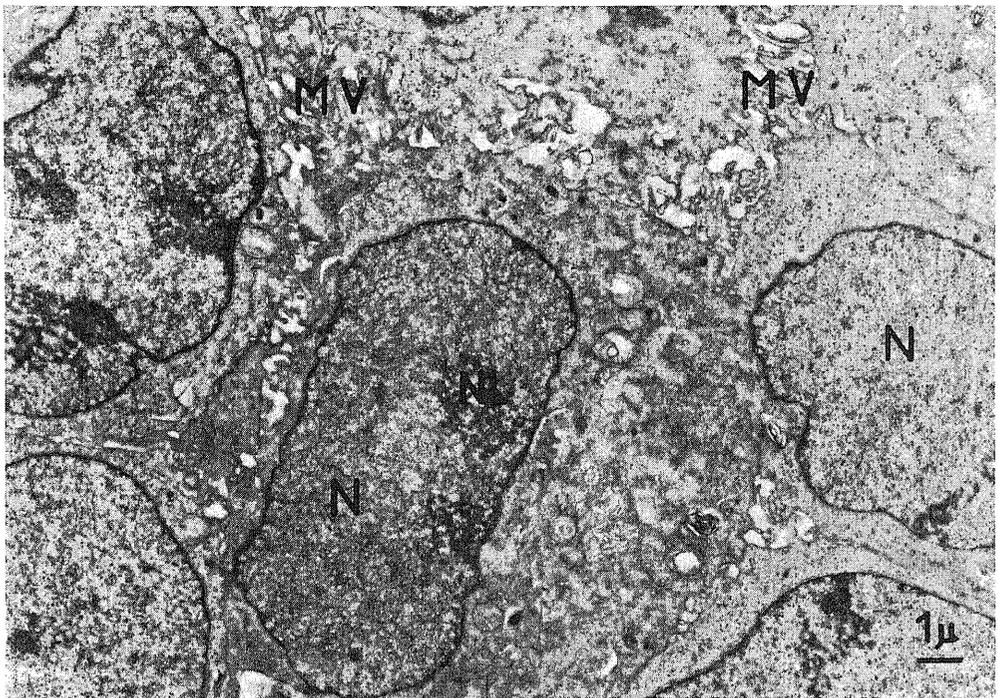


図10 異種移植腫瘍の電顕像 腫瘍細胞は類円形～多角形を呈する。開大した細胞間隙には多数の microvilli (MV) を見る。核 (N) と核小体 (NL) を示す。(× 6,000)

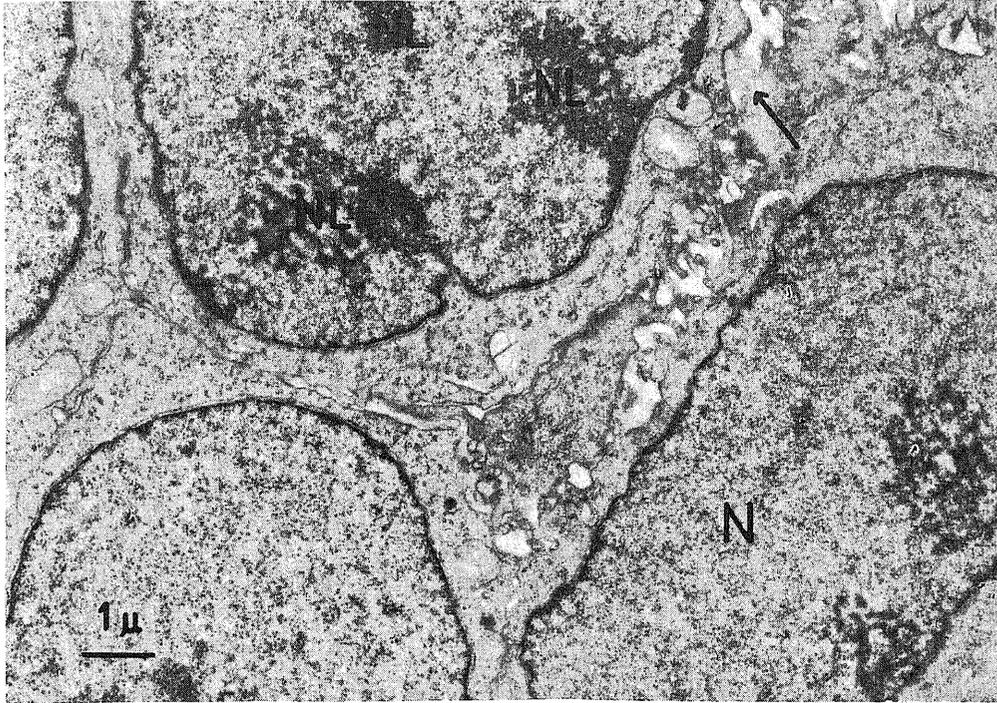


図11 異種移植腫瘍の電顕像 開大した細胞間隙に微毛状物質 (↑) がわずかに認められる。核 (N) は一般に大きく、核細胞質比の増大を認め、核小体 (NL) を3個認める。(× 10,000)

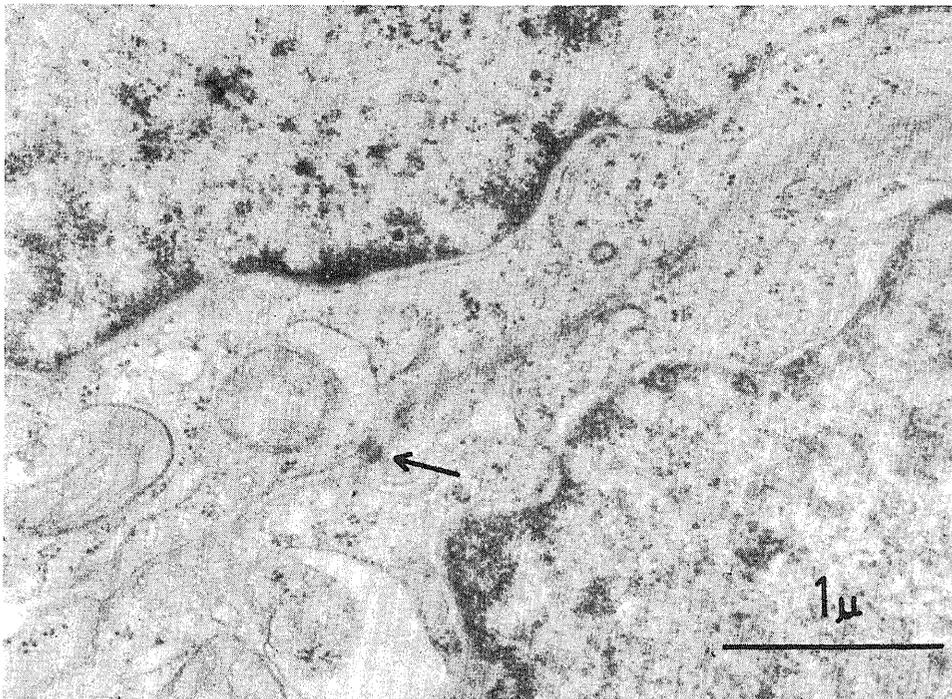


図12 異種移植腫瘍の電顕像 desmosome 様構造 (↑) を見る。(× 30,000)

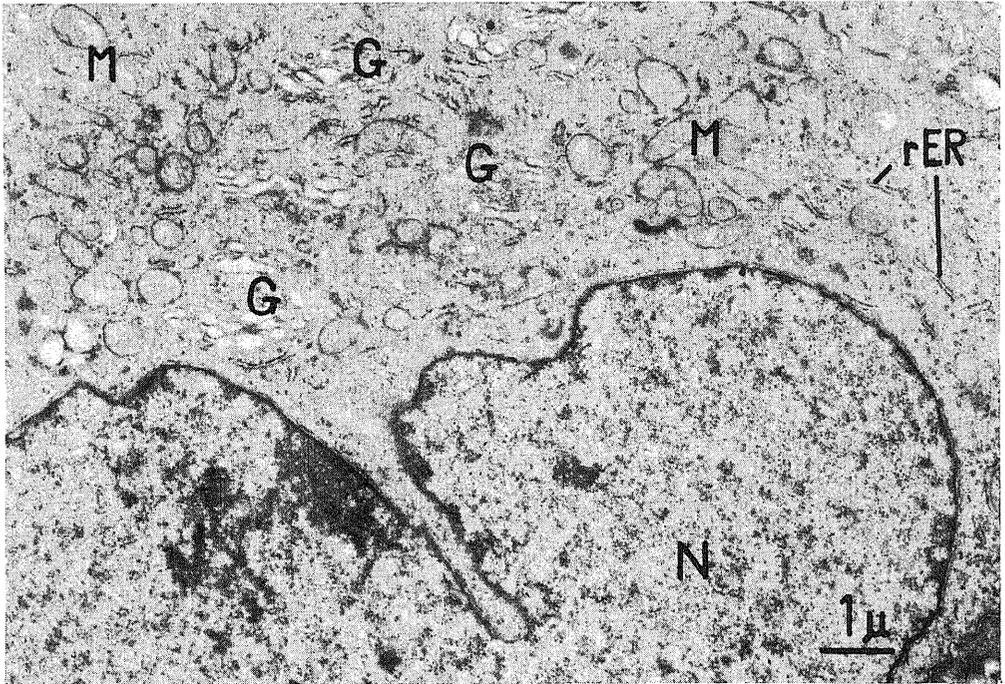


図13 異種移植腫瘍の電顕像 核膜の湾入、切れ込みが見られ、多数の形態種々の糸粒体 (M)、発達不良の粗面小胞体 (rER)、種々な程度に発達した Golgi 装置 (G) を認める。(× 10,000)

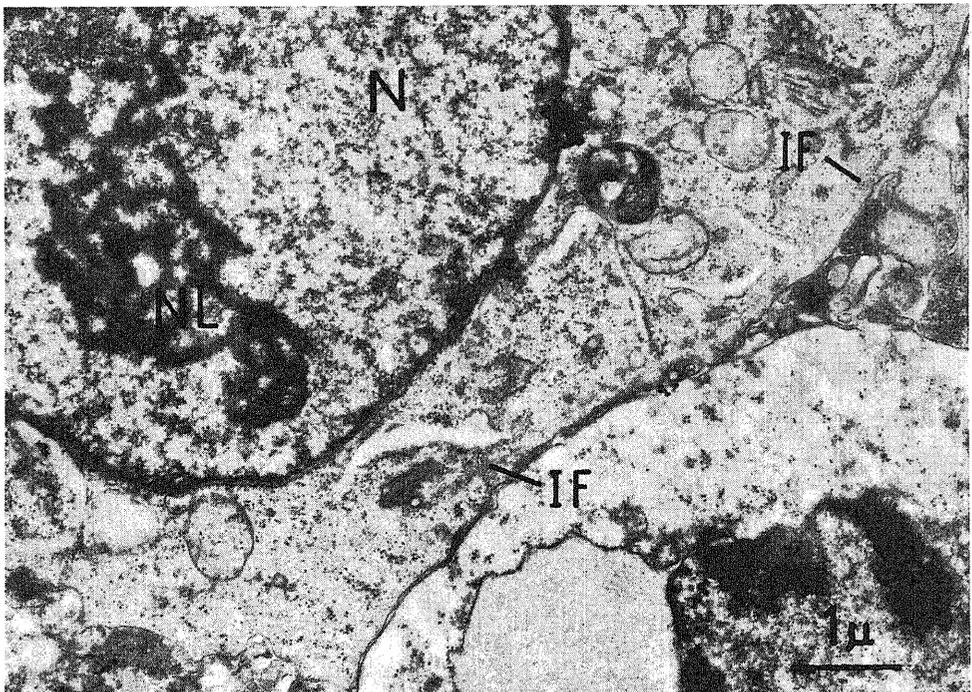


図14 異種移植腫瘍の電顕像 核小体 (NL) は nucleolonema の形状を示す。細胞膜付近に少量の intracellular filament (IF) を見る。(× 15,000)

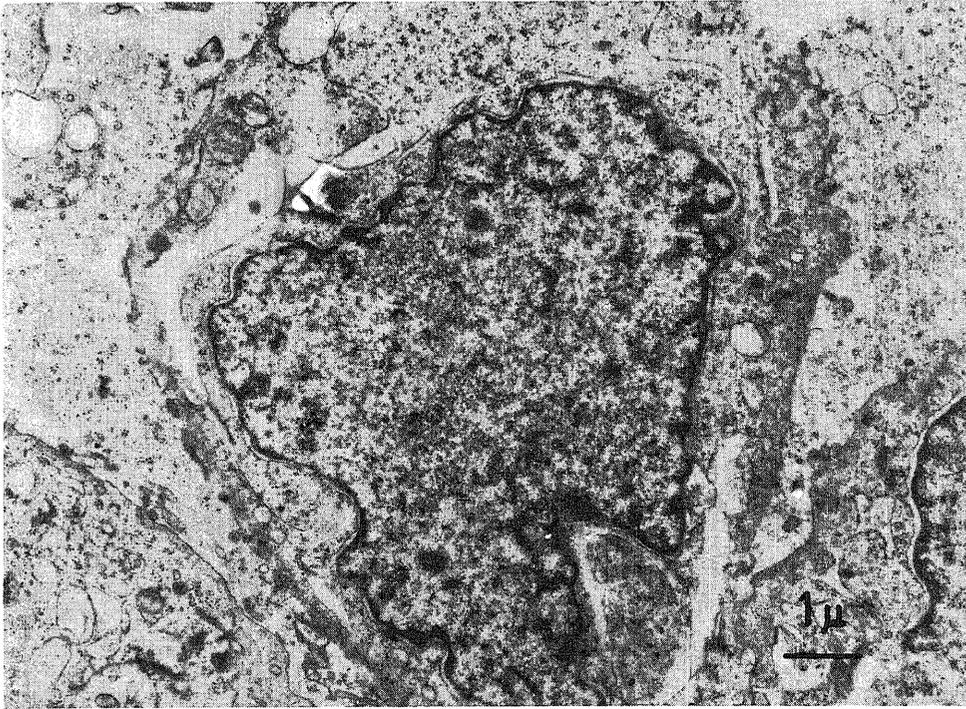


図15 異種移植腫瘍の電顕像 細胞のほとんどを核が占め、細胞小器官の発達の悪い未分化な細胞。(× 11,000)

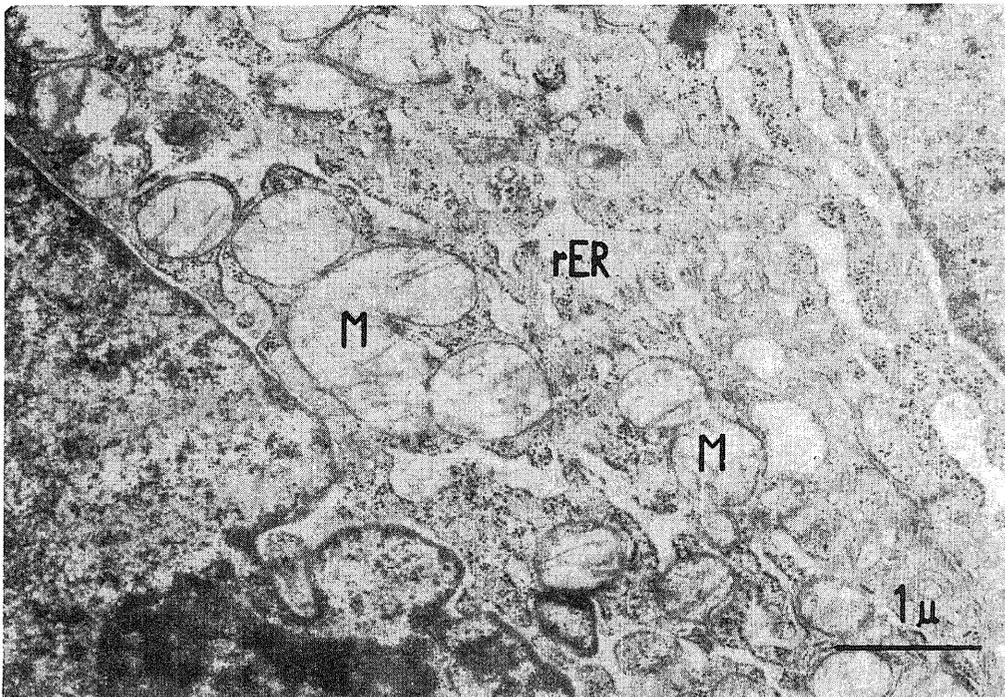


図16 異種移植腫瘍の電顕像 糸粒体 (M) は種々の形態を示し、cristae はまばらで配列不規則である。発達した粗面小胞体 (rER) を見る。(× 20,000)

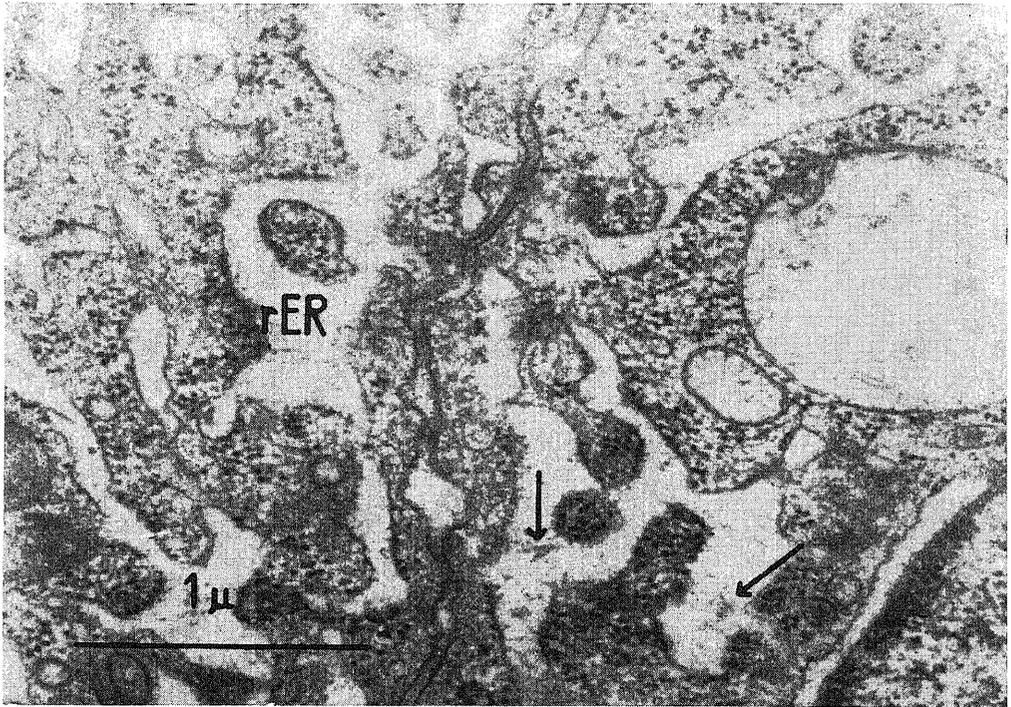


図17 異種移植腫瘍の電顕像 拡大した粗面小胞体 (rER) の内腔に微毛状物質 (✓) を認める。(× 40,000)

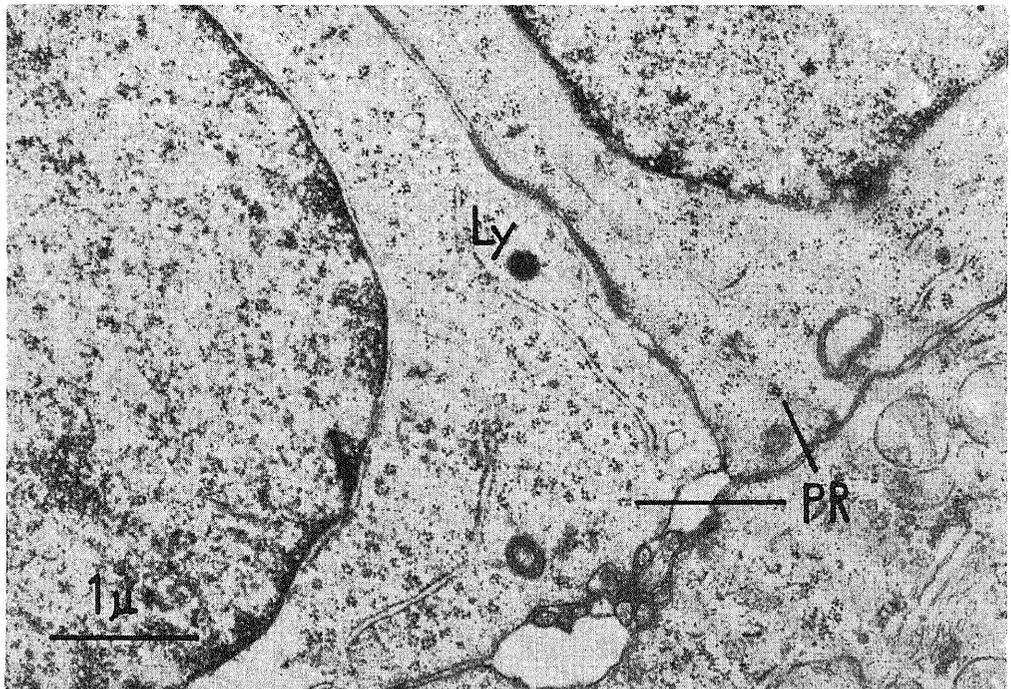


図18 異種移植腫瘍の電顕像 細胞質内に多数の free ribosome と、それらが数個集合した polyribosome (PR) を見る。lysosome (Ly) が見られる。(× 20,000)

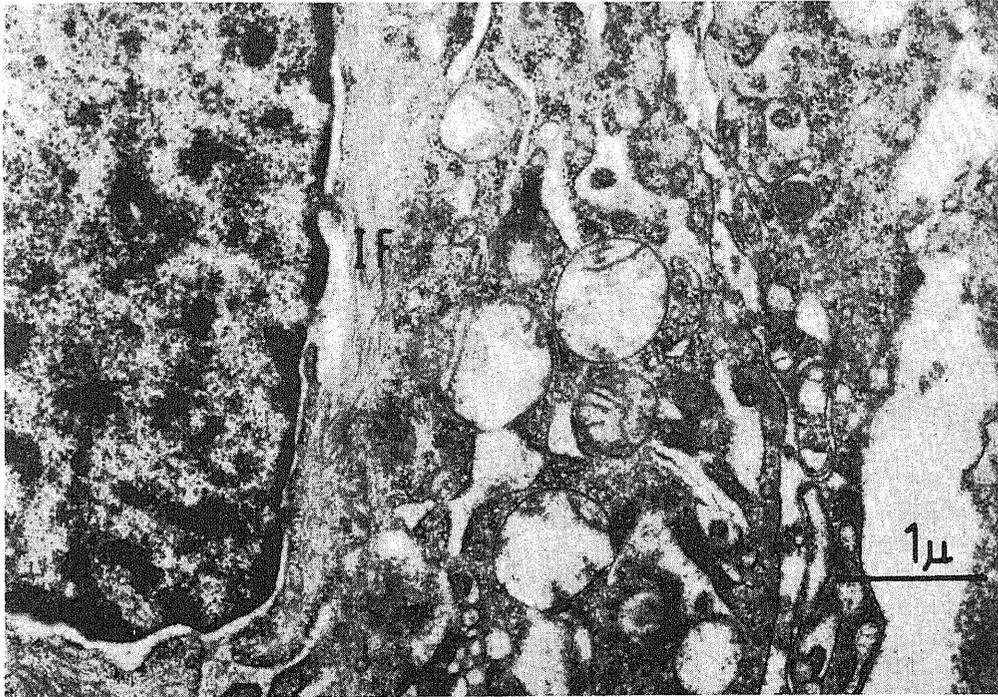


図19 異種移植腫瘍の電顕像 核周囲に束状の intracellular filament (IF) を認める。
(× 20,000)

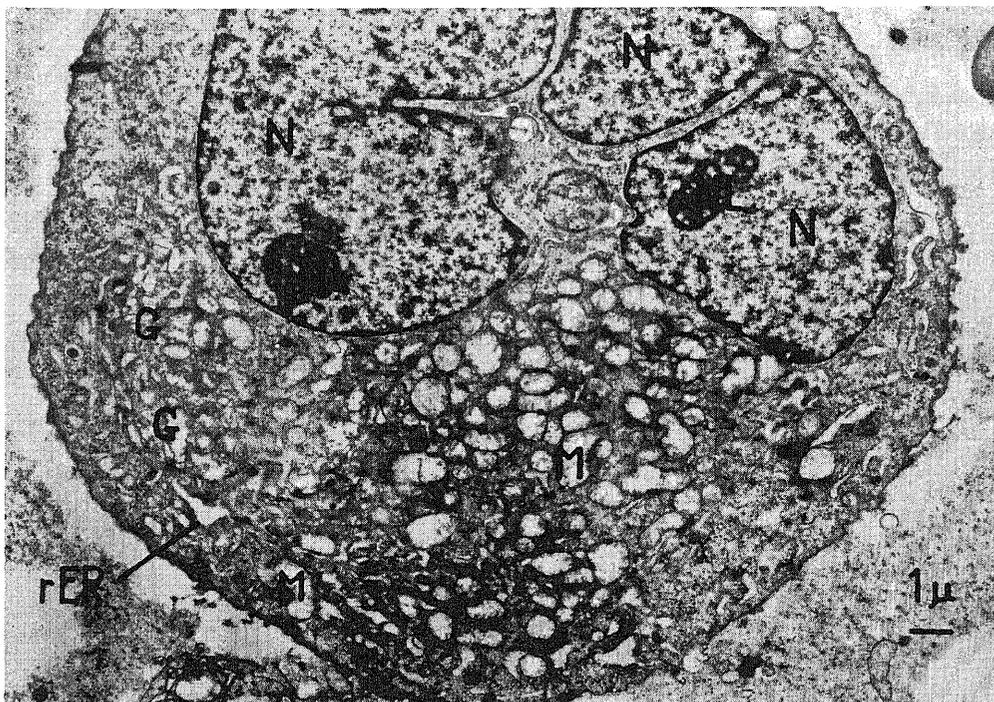


図20 異種移植腫瘍の電顕像 多核巨細胞。核 (N) は数個あり、核小体 (NL) は nucleolonema の形状を呈する。やや拡張した粗面小胞体 (rER)、多数の糸粒体 (M)、小規模な Golgi 装置 (G) を認める。(× 6,000)

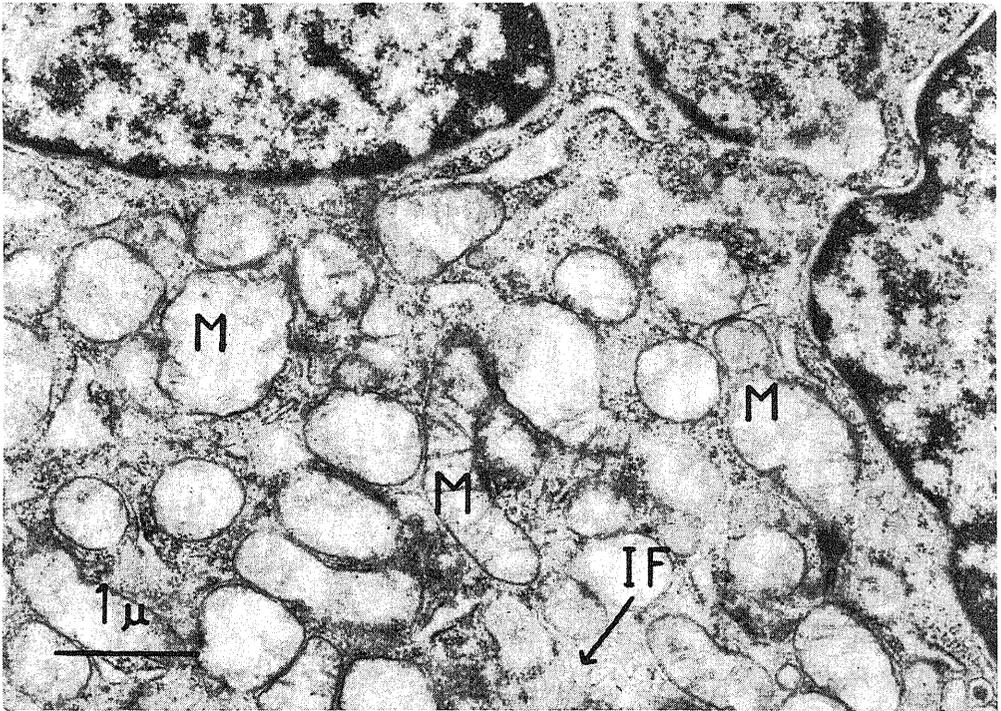


図21 異種移植腫瘍の電顕像 多核巨細胞。種々の形態をとる多数の糸粒体 (M) と intracellular filament (IF) が認められる。(× 20,000)

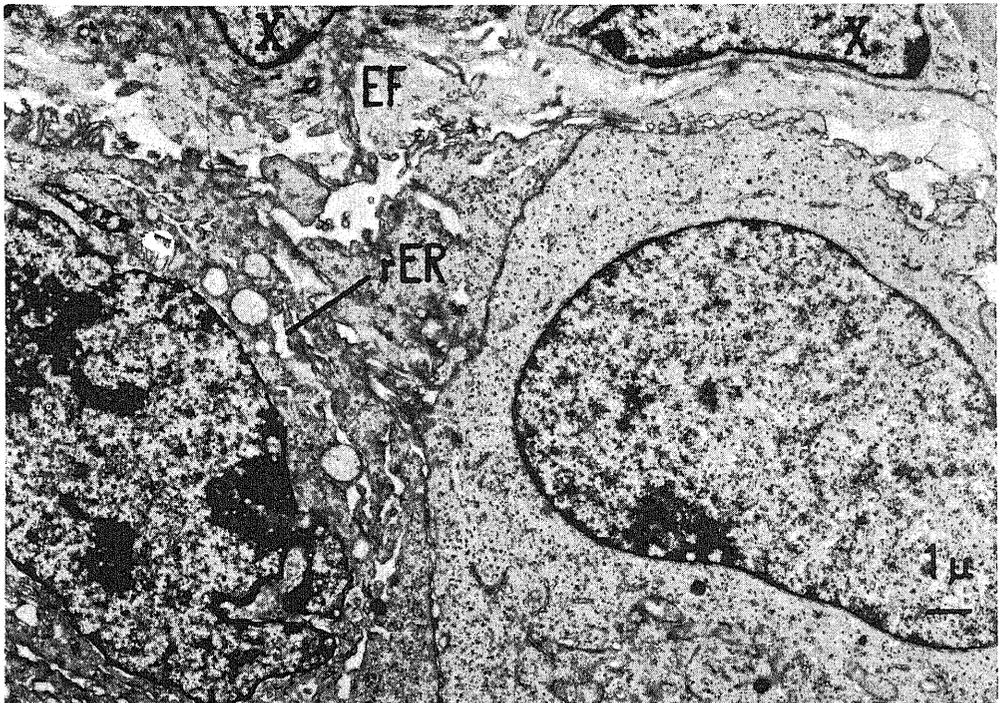


図22 異種移植腫瘍の電顕像 腫瘍細胞巣辺縁部。左の腫瘍細胞の粗面小胞体 (rER) はやや拡張している。細胞外線維 (EF) と宿主マウス側細胞 (X) を見る。(× 6,000)

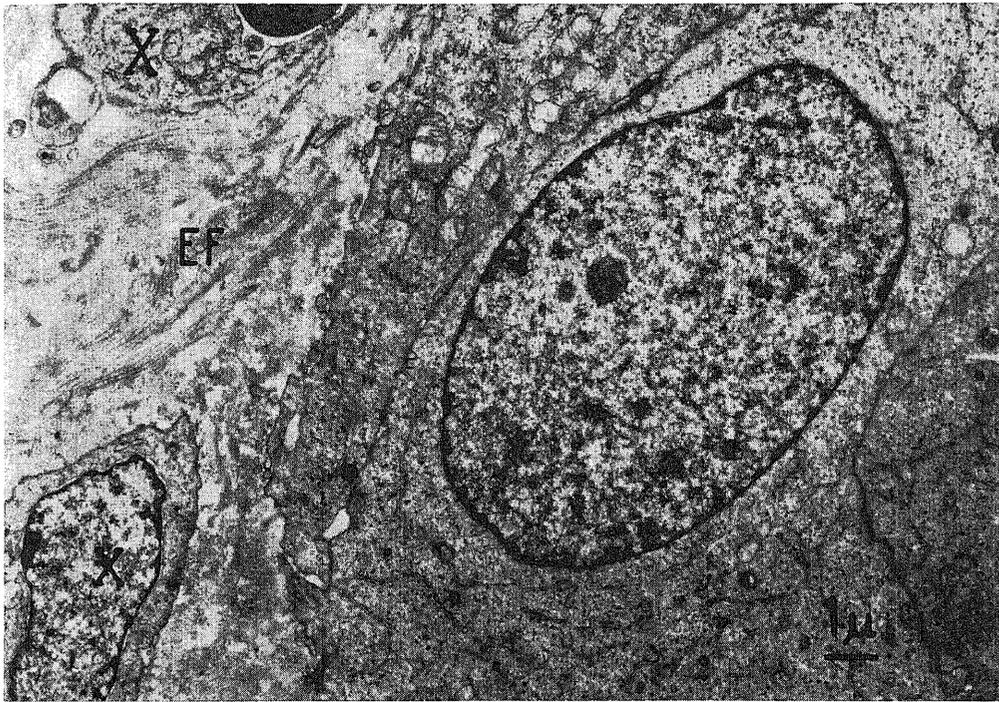


図23 異種移植腫瘍の電顕像 腫瘍細胞巣辺縁部。腫瘍細胞に接する多数の線維 (E F) と宿主マウス側細胞 (X) を見る。(× 7,000)



図24 異種移植腫瘍の電顕像 一部細胞膜の不明瞭な部位に線維が刷毛状に配列し、あたかも腫瘍細胞から線維が排出されているように見える。(× 30,000)

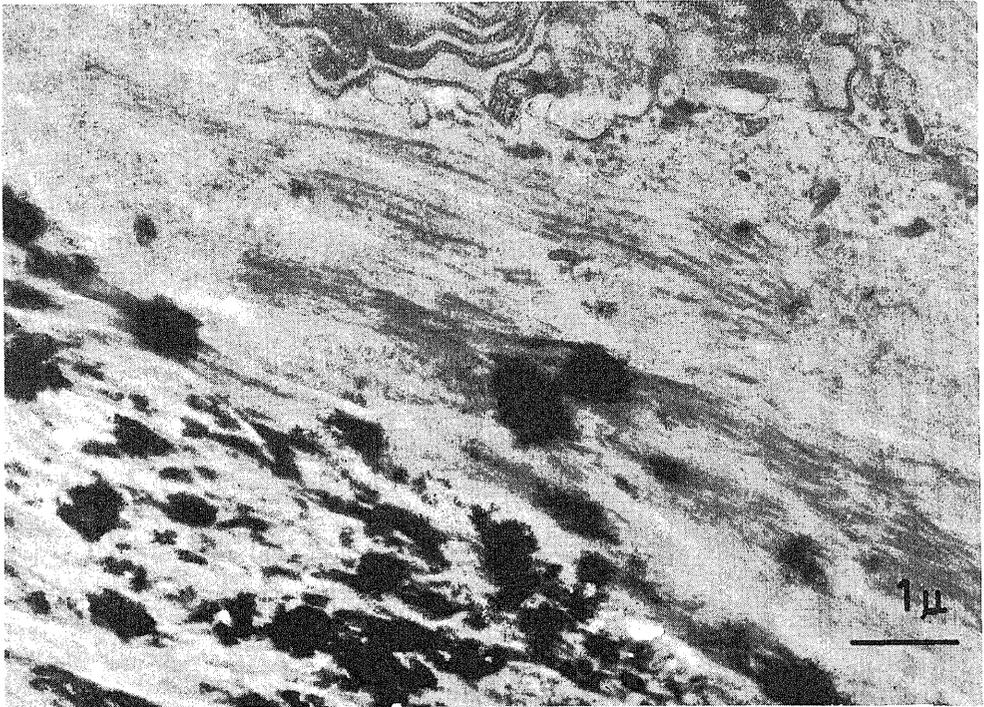


図25 異種移植腫瘍の電顕像 周期的な横紋構造を有する膠原線維上にカルシウムの沈着と思われる像を認める。(× 15,000)

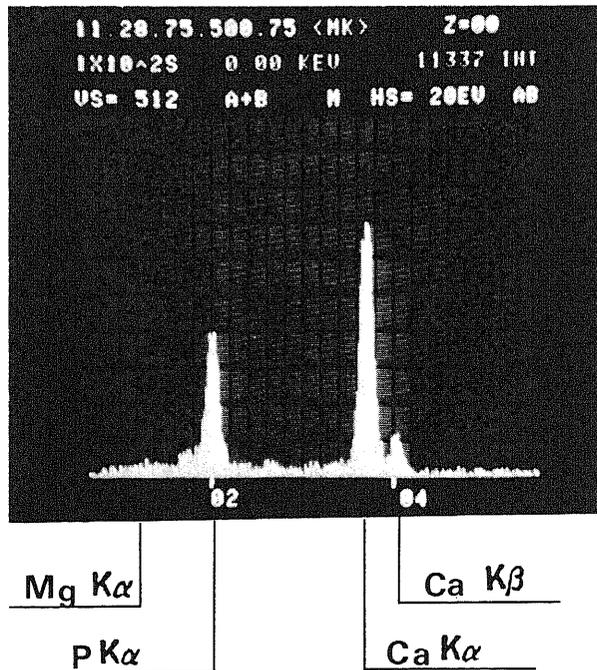


図26 沈着物の微小部X線分析の結果、カルシウムとリンが検出された。加速電圧：75 K V，試料電流： 5×10^{-11} A。未染色標本使用。