

ヒト骨肉腫由来培養細胞(OST細胞)のクローン系における細胞動態学的研究

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/2297/8607

ヒト骨肉腫由来培養細胞 (OST 細胞)の クローン系における細胞動態学的研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 高瀬武平教授)

山 口 昌 夫

1952年 Gey⁵⁾ が初めてヒトの子宮頸部癌より HeLa細胞の分離に成功して以来、ヒト組織由来の細胞株が多数確立され、更に1955年 Puckら¹⁸⁾ による単離細胞培養法の開発は単一細胞由来の細胞集団即ちクローン系細胞の分離を可能ならしめた。その後培養細胞株からのクローン系細胞の分離は、細胞株の性状決定に定量的なシステムを導入せしめ、更に変異株の分離は病理学的遺伝学的研究に寄与するようになった。

1964年高瀬ら²³⁾³¹⁾ によって株化に成功したヒト骨肉腫由来培養細胞 (OST 細胞) は現在も継代培養が続けられており、現在まで本細胞に対する制癌剤¹³⁾、ホルモン剤⁸⁾²⁶⁾、非制癌性抗生物質⁸⁾¹⁰⁾、X線照射²⁴⁾¹²⁾等の影響に関する検討がなされ、更に又本細胞の異種移植に関する研究²⁵⁾等が報告されてきた。著者は更に OST 細胞の特性を追求すべく、コロニー性クローン分離法によって得られた OST 細胞のクローン系細胞について、形態学的観察、細胞動態学的観察、更に染色体構成の面から検討し、いささかの知見を得たので報告する。

実 験 材 料

I. 使用細胞

1963年10月に金沢大学医学部整形外科で、15才女子の左大腿骨々肉腫から分離培養された骨肉腫細胞は、1964年6月に株化細胞となり、Osteogenic Sarcoma Takase Strain (OST 細胞) と名づけられた。現在なお継代培養続行中で1975年9月現在546代に達した。この継代培養456代から477代までの OST 細胞を本実験に使用した。

II. 培養条件

培養液は Difco 製の TC Medium 199 に仔牛血清 (56°Cで30分間加温不活化) 10%を加えたものを用いた。継代培養法は1964年高瀬ら²³⁾ が報告した方法に

準じ、培養細胞を EDTA 処理後、1000rpmで遠心沈澱した後、培養液で $1 \sim 2 \times 10^7$ /mlの濃度になる細胞浮遊液を作り、その10mlを角型大培養瓶に注入して37°Cにて静置培養した。

実 験 方 法

I. クローニング法

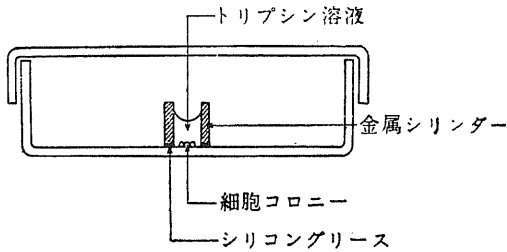
コロニー性クローン分離法に従った³²⁾。継代培養後48時間の培養瓶から培養液のみを除去し、0.2% Trypsin 溶液と EDTA の等量混合液 5 ml で OST 細胞の定着増殖している培養面を洗浄した後、あらたに同液 5 ml を注入して37°Cで7分間放置した。細胞の剥離を確認してから Pipetting で細胞を分散させた後、更に10%仔牛血清加培養液 5 ml を加え、Trypsin の作用を阻止した。以上の処理によって95~100%の単離細胞率をもつ細胞浮遊液を得ることができ、細胞数の算定を行った。次にこの細胞浮遊液を培養液で稀釈した後、20又は40個の単離細胞を予め 5 ml の10%仔牛血清加培養液を入れた径60mmの Petri Dish に植え込み、37°C、5% CO₂-incubator で培養した。14日後に形成されたコロニーの中から分離すべきコロニーを選び、Dish の裏面よりこのコロニーをガラス鉛筆で囲み印をつけた。次に培養液を除去した後ステンレス製シリンダー (外径10mm、高さ10mm、壁厚1mm) の一端にシリコングリースを塗り、これを Dish の底面に固着させてガラス鉛筆にて印をつけた目的のコロニーを囲み、その中に数滴の Trypsin 溶液を入れて細胞を剥離分散した (図1)。かくして得られた細胞浮遊液を再び Petri Dish に植え込み同様に培養した。この操作を図2の如く3回繰返してクローン1, 2, 3, ……14の計14のクローン系細胞を得た。このうちクローン1, 3, 10は分離後長時間を経過していたため、今回の実験から省き、残り11種のクローン系細胞を実験に供した。

Cytokinetic studies on clones of OST cells derived from human osteogenic sarcoma in tissue culture Masao Yamaguchi Department of Orthopedic Surgery (Director : Prof. B. Takase) School of Medicine, Kanazawa University.

以下、これらのクローン系細胞を略して CL2, CL4, ... CL14 と記す。又 OST 細胞母集団を非クローン系 OST 細胞と記す。

II. 形態学的観察

非クローン系 OST 細胞及び各クローン系細胞の形態学的観察には小型培養瓶の coverslip 又は Lab-Tek Tissue Culture Chamber Slide (Miles Laboratories 図 3) を用いた。細胞定着面を磷酸緩



コロニー性クローン分離法 (山田)

図 1

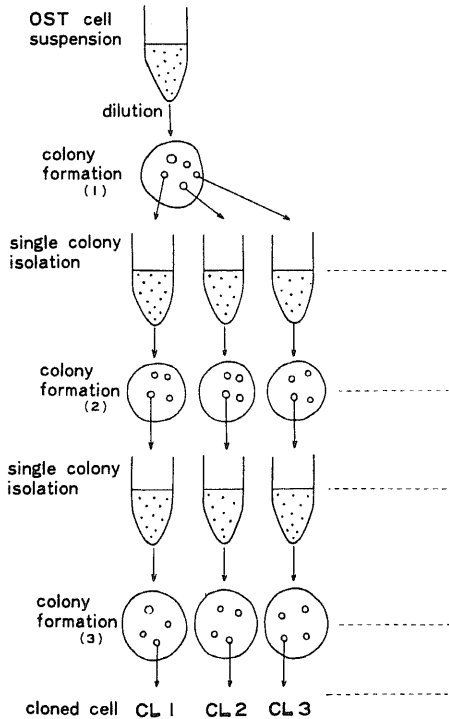


図 2 Procedures of OST cell cloning

衝液で数秒間洗い、メタノールで5分間固定した後乾燥し、15~20分間ギムザ染色を施した。

III. オートラジオグラフィによる検討

非クローン系 OST 細胞と各クローン系細胞に対して、 ^3H -Thymidine (以下 ^3H -TdR と略す) を用い、Cumulative labeling method と Pulse labeling method を施行して細胞動態の分析を行った。即ち上記各細胞系の細胞を細胞数 $10 \times 10^4/\text{ml}$ となるように10% 仔牛血清加培養液に再浮遊させ、その 1 ml を Tissue Culture Chamber Slide (図 3) の各 Chamber に分注して、 37°C 、5% CO_2 -incubator で培養した。培養後60時間目のこれらの細胞に、Cumulative labeling method に従い、 ^3H -TdR を $0.1 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ の濃度になる様培養液に添加し持続的に作用させ、48時間まで6時間毎に標本を取り出した。Pulse labeling method では同濃度の ^3H -TdR を30分間作用させた後更に培養を続け、48時間又は60時間まで3時間毎に標本を取り出した。これら ^3H -TdR でラベルされた標本を磷酸緩衝液で数秒間洗浄し、メタノール固定、乾燥後、Dipping 法によるオートラジオグラフィ操作を行った。即ち 40°C に加温した感光乳剤 (さくら NR-M₂) に標本を浸し、室温乾燥後防湿剤挿入の暗箱に密封し、 4°C 2週間の露出後 20°C のレンドールで4分間現像、フジフィクスで10分間定着、30分間水洗し、ギムザ染色を施した。オートラジオグラムでの細胞の算定に当っては、細胞核1個につき5個以上の感光粒子を有する細胞を Labeled Cell (L.C. と略す) とし、同様に分裂細胞を Labeled mitosis (LM と略す) とした。

IV. 染色体染色

非クローン系 OST 細胞及びクローン系細胞を型

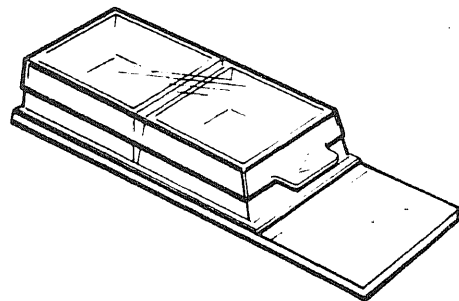


図 3 Lab-Tek, Tissue Culture Chamber Slide. 2 Chamber Slide (各 Chamber の底面積は $20\text{mm} \times 20\text{mm}$ である。)

通りにコルヒチン処理後、水又は低調液で処理した後カルノア液で固定し、2~3回新鮮なカルノア固定液にかえて後細胞浮遊液を作り、空気乾燥法により染色体染色を行った。クローン系細胞では CL2 の 5 代、10代、16代、CL13 の 4代、CL14 の 2代の細胞に対して染色体の観察を行った。

実験結果

I. コロニー形成について

単離細胞の植え込み後 5 日目には、10数個の細胞をもつコロニーが倒立顕微鏡下で容易に観察できるようになり(写真1)。11日目には辺縁はやゝ不整であるがほぼ円形のコロニーが見られ、このコロニー内では細胞は相互に連結して敷石状の配列を示した(写真2)。かかるコロニーは肉眼的にも観察可能となった。単離細胞の植え込み後約14日目では、ギムザ染色を施して観察すると、全てのコロニーは上述の如く細胞が敷石状の配列を示し、上皮細胞性細胞株のコロニーに類似した形態を示した(写真3)。従ってこれらコロニーは線維芽細胞株でみられるコロニーとは全く異っていた。植え込み後14日以上経過すると、コロニーは大きくなるとともにその中心部で細胞が密となり数層に盛り上がってきて、肉眼的にも中心部の濃い部分と周辺部の淡い部分が判別されるようになった。即ちコロニーの状態でも OST 細胞は Contact inhibition を起さないことが観察された(写真4)。

単離細胞40個を植え込んだ場合、平均24個のコロニーが形成され、コロニー形成率は約60%であった(写真5)。

一方同じ敷石状の細胞配列を有するコロニーの中に、約10%の割合で辺縁が明瞭で小さいコロニーが散見され、成長が遅い割に中心部に細胞の盛り上がり早くから観察された。かかるコロニーは肉眼的にも鮮明で濃く小さいコロニーとして観察され、ギムザ染色を施して観察すると細胞密度が高く、コロニー周辺への細胞の伸展が少く運動性が低い傾向を示した(写真6)。かかるコロニーから分離されたクローン系細胞は CL14 であった。

又多核巨細胞を多く含むコロニーも観察されたが、かかるコロニーは一般に発育が悪く、クローニングの操作の途中で消滅し分離することができなかった(写真7)。

II. 形態学的観察

1. 非クローン系 OST 細胞

継代培養後48時間までは線維芽細胞様の形態を示す細胞が散見されたが(写真8a)、継代培養後4日目に

は殆んど上皮細胞様の形態を示した(写真8b)。核は類円形又は楕円形を呈し、やゝ大小不同を認めた。多核巨細胞は算定細胞数1000個中1個を数える程度であった。

2. 各クローン系細胞

CL2 の分離後 5 代目の細胞において、継代培養後 48 時間以内では線維芽細胞様の細胞が稀に観察されたが(写真9a)、継代培養後48時間を過ぎると上皮細胞様の形態を示す細胞で占められるようになった。核は類円形又は楕円形を呈し軽度の大小不同性を示し、細胞質に軽度の空胞形成を認めた(写真9b)。この所見は CL4, CL5, CL7, CL8, CL9, CL11, CL12, CL13 の各クローン系細胞においても同様に観察され、多核巨細胞(写真10)の出現頻度の違いを除けば、非クローン系 OST 細胞の形態学的特徴と類似していた。CL6, CL14 については興味ある所見を呈したので後に別記する。2核以上の多核巨細胞は各クローン系の細胞に多く観察され、非クローン系 OST 細胞より高い頻度で出現した(表1)。特に非クローン系 OST 細胞の培養の場合多核巨細胞が算定細胞数1000個中1個であったのに対し、CL6 では289個、CL8 では24個、CL9 では34個、CL11 では29個と多核巨細胞が高頻度で出現していた。

CL6 に関しては、クローン分離後 2~3 代目から多核巨細胞の増加が目立ち、5代目では算定細胞数1000個中289個を数え、著しく高い頻度を示した(写真11)。CL6 の多核巨細胞の核数による分布状態は表2の如くで、算定多核巨細胞数200個中2核細胞は88個(44%)、3核細胞は43個(21.5%)、4核細胞は27個(13.5%)、5核細胞は18個(9%)と核数が多くなるに従って出現率は減少する傾向を示した。9核以上の多核巨細胞も存在したが一般に核数が多くなると一個一個の核の確認が困難となる場合が多く、正確に核数を算定することができなかった(写真12)。核数の

表1 多核巨細胞の出現頻度
(算定細胞数1,000個中の多核巨細胞数)

OST cell	1	CL 8	24
CL 2	9	CL 9	34
CL 4	4	CL 11	29
CL 5	9	CL 12	8
CL 6	289	CL 13	2
CL 7	11	CL 14	4

多い多核巨細胞では同一細胞内における核の大小不同性が強く、micronuclei も混在したが、2核、3核、4核の多核巨細胞では同一細胞内における核の大きさは比較的等しく、micronuclei を殆んど認めなかった。又 CL6 の細胞では各細胞間における核の大小不同性も著しく、単核細胞の核に比べ直径が2~3倍大の核を有する細胞が散見された(写真13)。

一方 CL6 の細胞には分裂期の細胞に3極、4極等の多極分裂が多く観察された。その分裂中期及び後期の分裂細胞を100個算定し、その極数によって分類すると2極分裂を呈する細胞が74%、3極分裂が16%、4極分裂が8%、5極分裂が2%であった(写真14)。

表2 CL6における多核巨細胞の核数による分布

核数	多核巨細胞数
2核	88(44%)
3核	43(21.5%)
4核	27(13.5%)
5核	18(9%)
6核	7(3.5%)
7核	8(4%)
8核	2(1%)
9核以上	7(3.5%)
計	200(100%)

即ち他のクローン系細胞と比較すると表3の如く、CL6の細胞では多極分裂の出現頻度が高いことが明らかとなった。このCL6の細胞は継代培養9代目で細胞増殖が悪くなったが、13代目頃より再び増殖が活発となり継代培養を行うことができ、継代培養を重ねるにつれて多核巨細胞は減少し、52代目では算定細胞数1000個中4個を数えるに至った。

次に、CL14の細胞は辺縁が明瞭で小さいコロニーから分離されたクローン系細胞であるが、その細胞形態も他のクローン系細胞と異った態度を示した。即ちクローン分離後2代目において、培養後2日目で細胞は突起のない円形に近い形を呈し、nucleocytoplasmic ratio が高い傾向を示した。因みに他のクローン系細胞ではこの時期には既に短い突起を出し、ガラス面に付着している形を示すが、CL14ではそのような形態は認められなかった(写真15)。しかしCL14の細胞の培養後3日目では、細胞質は短い突起を出し、ようやくガラス面に付着し(写真16)、培養後5日目では島状に点在する細胞集落が観察され、その中心部では細胞が数層に盛り上がり、このクローン系細胞の起源となったコロニーの形態に類似した(写真17)。

III. 細胞動態の分析

1. Cell Cycle の決定

Cumulative labeling method を施行した標本では細胞1000個を数え、Labeled cell の百分率(%LC と略す)を求め、経時的に%LC をプロットすると一般に図4aの如く%LC は直線的に増加し、一定時間以後プラトーを示すものである。この図から

表3 各クローン系細胞における分裂細胞の極数による分布

	2極分裂	3極分裂	4極分裂	5極分裂
CL2	96%	3%	1%	—
CL4	97%	3%	—	—
CL5	97%	2%	1%	—
CL6	74%	16%	8%	2%
CL7	94%	5%	1%	—
CL8	93%	6%	1%	—
CL9	89%	8%	3%	—
CL11	95%	5%	—	—
CL12	96%	3%	1%	—
CL13	97%	3%	—	—
CL14	97%	2%	1%	—

分裂中期、後期の細胞を100個算定

Generation time (t_G と略す) は $b+c$, DNA synthetic time (t_S と略す) は c , Labeling index は a , Growth fraction は d となり, 且つ Labeling index/ t_S の式から Cell birth rate を求めることができる. 又 Pulse labeling method を施行した標本では, 分裂期の細胞を100個数え, Labeled mitosis の百分率 (%LM と略す) を求め, %LM を時間的に chase すると図 4b の如き曲線が得られ, この曲線から t_G , t_S , 更には Postsynthetic resting time (t_{G_2} と略す) を求めることができる. 又 Mitotic index (MI と略す) を算定することにより Mitotic time (t_M と略す) = $t_G \times MI$ の式から t_M を求め得, 従って Presynthetic resting time (t_{G_1} と略す) は $t_{G_1} = t_G - (t_{G_2} + t_M + t_S)$ の式から計算することができる.

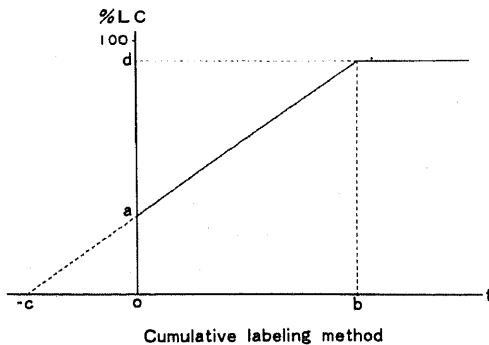
2. 非クローン系 OST 細胞の細胞動態

Cumulative labeling method では図 5a の如く

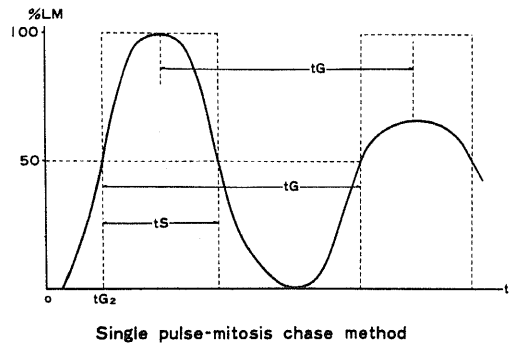
%LC は直線的に増加し, $^3\text{H-TdR}$ 添加後24時間で83%に達し以後プラトーを示した. この図から t_G 32時間, t_S 8時間, Growth fraction 0.83, Birth rate 2.5%/hr なる値を求めることができた. Pulse labeling method では %LM は図 5b の如き曲線を示し, この曲線を解析して, t_G 32時間, t_{G_2} 12時間, t_S 10時間, t_{G_1} 9時間, t_M 1時間なる値を得た.

3 各クローン系細胞の細胞動態

CL2, CL11 の2クローン系細胞はクローン分離後16代で, 他のクローン系細胞は2代から6代にわたり細胞動態学的分析を行った. CL6 の場合はクローン分離後52代目に再び細胞動態的分析を行った. 次に代表として CL4 の結果について詳述する. CL4 の4代目の Cumulative labeling method では (図 6a), %LC (写真18) は直線的に増加し, $^3\text{H-TdR}$ 添加後22時間で94%に達し以後プラトーを示した. 図か



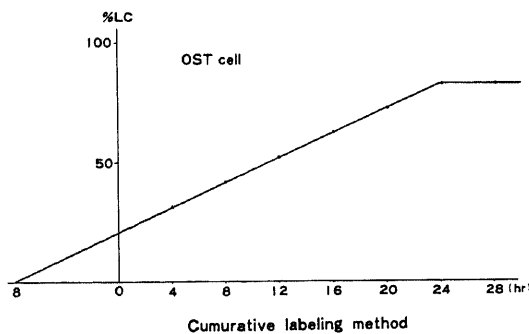
a



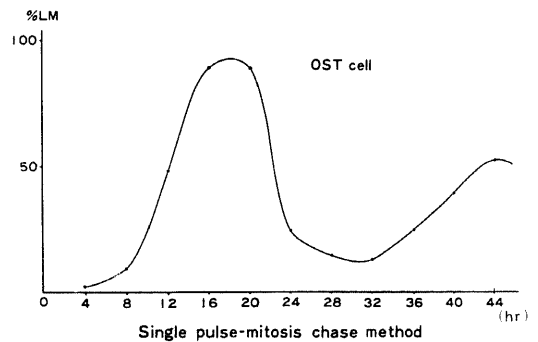
b

図

4



a



b

図

5

ら tG 28時間, tS 6時間, Growth fraction 0.94, Birth rate 3.3%/hr なる値を得た. Pulse labeling method では %LM (写真19) は図 6 b の如き類正弦曲線を描いた. この図から tG 28時間, tS 10時間, tG₂ 7時間, tG₁ 10.2時間, tM 0.8時間の解析値を得た.

この CL4 のように他のクローン系細胞に対しても細胞動態学的分析を行い, 表 4 の如き解析値を得た.

しかし多核巨細胞が高頻度に出現した CL6 の 5 代目の場合, Cumulative labeling method では多核巨細胞を含めた %LC はやはり直線的に増加するが, ³H-TdR 添加後27時間で80%に達した後, 増加速度が低下して直線の勾配はゆるやかになり, 38時間後89%に達して以後プラトーを示した (図 7 a). 同じく Pulse labeling method では %LM の描く curve はゆるく, 且つ第 1 の curve の最高値

が約60%と低く, 且つプロットした点が連続性を欠き, 曲線の歪みが著明であった (図 7 b). この曲線から tG 35時間の測定値が得られたが, tS, tG₂ の値は精密性を欠くため求めなかった. Cumulative labeling method で得られた結果から, CL6 の Generative cell compartment はS期への流入速度の異なる 2 種類の細胞集団から成っていることが示唆された. その第 2 の細胞集団が多核巨細胞である可能性が考えられたので, 同じ CL6 の Cumulative labeling method を施した標本で, 単核細胞のみを対象としてその %LC を求め再び細胞動態の解析を行った. 即ち %LC は直線的に増加し, ³H-TdR 添加後27時間で92%に達し以後プラトーを示した (図 8). 従ってS期への流入速度が遅い細胞集団は多核巨細胞の集団であることが明確となり, この単核細胞の tG は33.5時間, tS 6.5時間, Growth fraction

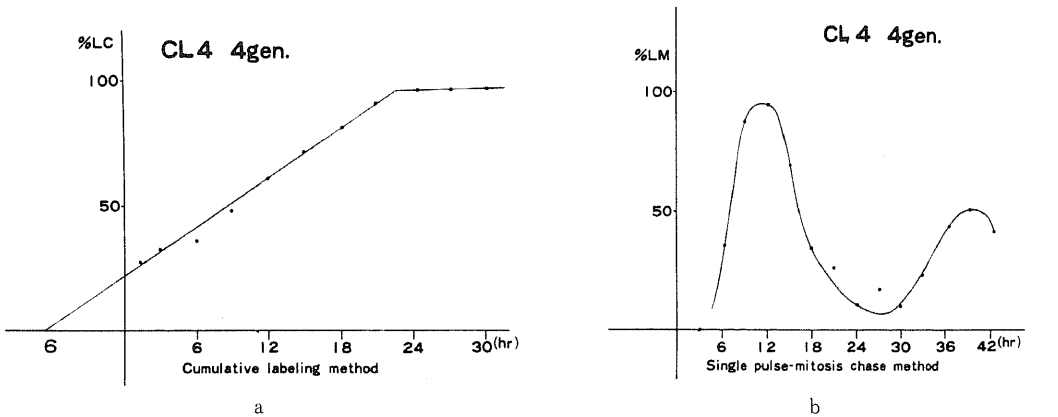


図 6

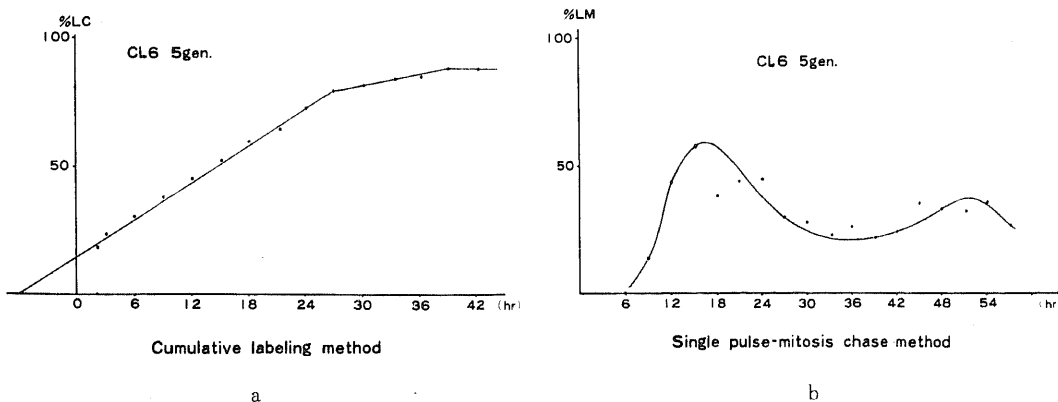


図 7

表4 細胞動態の解析値

	tG (hr)	tS (hr)	tG ₂ (hr)	tM (hr)	tG ₁ (hr)	G.F.	B.R. %/hr
OSTcell	32(32)	10(8)	12	1	9	0.83	2.5
CL 2	29(29)	9(7)	8	0.7	11.3	0.93	3.0
CL 4	28(28)	10(6)	7	0.8	10.2	0.94	3.3
CL 5	32(31.5)	10(6)	6	1.0	15.0	0.96	2.8
CL 6	35(—)	—(6)	—	0.7	—	0.89	2.3
CL 7	32(32)	11(7)	8	1.0	12.0	0.95	2.8
CL 8	32(32)	10(9)	8	0.7	13.3	0.93	3.0
CL 9	33(30)	9(8)	8	0.8	15.2	0.90	3.0
CL 11	31(31)	12(7)	8	0.6	10.4	0.90	2.7
CL 12	31(30)	10(6)	7	0.8	13.2	0.95	3.2
CL 13	36(35)	10(6)	6	1.2	18.8	0.93	2.5
CL 14	38(35)	19(14)	5	0.6	13.4	0.93	2.7

G.F. : Growth fraction B.R. : Birth rate
() 内はcumulative labeling による値

0.92, Birth rate 2.6%/hr であることが判明した。以上のことから多核巨細胞は tG が長く, Growth fraction が低いことが考えられた。更に CL6 はクローン分離後52代目で多核巨細胞が殆んど消失したので, その52代目で細胞動態の解析を行った。即ち Cumulative labeling method では, %LC は直線的に増加し, ³H-TdR 添加後30時間で93%に達し以後プラトーを示した(図9)。図9から tG 36時間, tS 6時間, Growth fraction 0.93, Birth rate 2.7%/hr なる値を得た。

かかる CL6 の細胞を除いて, 表4に示した各細胞系の解析値を検討すると, 最も長い世代時間を示した CL14 は他のクローン系細胞に比べその tS も19時間と著明に長く, tG の延長の要因となっていた。一方 CL14 以外の各クローン系細胞においては, tG が長いクローン系細胞はその tG₁ も長い傾向を示した。各クローン系細胞の Growth fraction はいずれも非クローン系 OST 細胞の Growth fraction より高い値を示したが, 1.0に達するクローン系細胞はなかった。

IV. 染色体構成

1. 非クローン系 OST 細胞

非クローン系 OST 細胞の分裂中期の染色体数の変異の巾は低2倍体より高4倍体に亘り, Stem cell の染色体数は67個であり, 図10の如く Stem cell の出現頻度は低かった。

2. クローン系細胞

CL2 の5代, CL13 及び CL14 の細胞では, 染色体

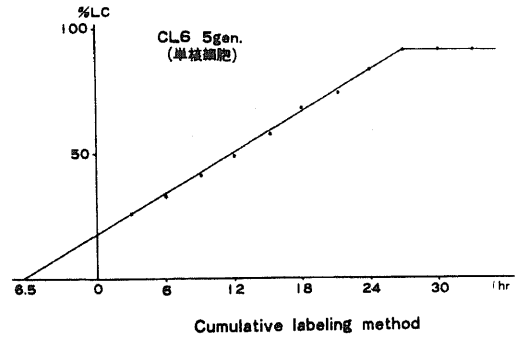


図 8

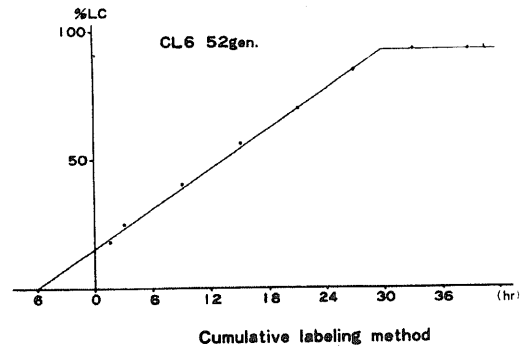


図 9

数の変異の巾は低3倍体から低4倍体に亘り, 非クローン系 OST 細胞のそれと比べて変異の巾が狭かった。Stem cell の染色体数は CL2 では67個, CL14 では69個(写真20)でその出現頻度は高い値を示した。CL13 では Stem cell の出現頻度は低く, modal number に変動を示した(図10)。

CL2 の10代, 16代の染色体数の変異は図11に示す如く, mode の著しい変動は観察されなかったが, いずれの代においても four strand の染色体としてみられる endomitotic reduplication の像が観察された(写真21)。

考 按

長時間継代培養を繰返して, 一応安定した増殖を示すようになっても, 培養癌細胞に多形性が認められる。大塚¹⁶⁾は腹水肝癌において, 個々の細胞は形態学的にも組織化学的にも相違があって, 各細胞はそれぞれ独立した物質代謝を行っており, その細胞廻転, 更には染色体の変異にも多様性が認められることを示した。かかる培養細胞に対し, 病理形態学的にも生物学

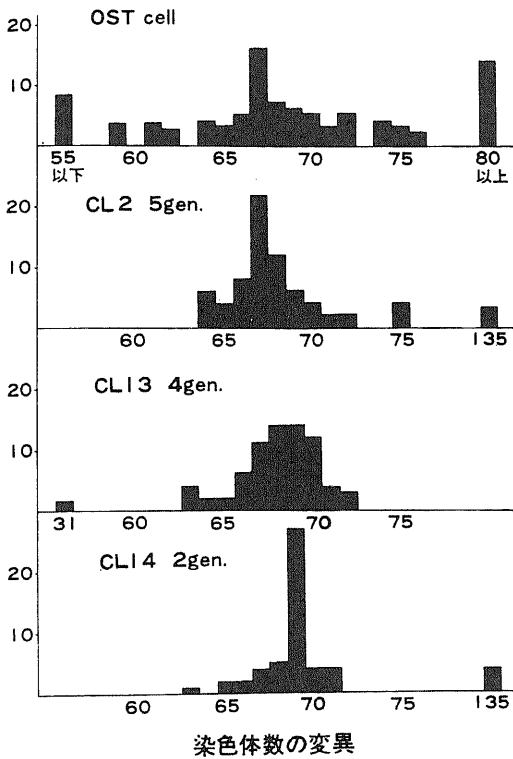
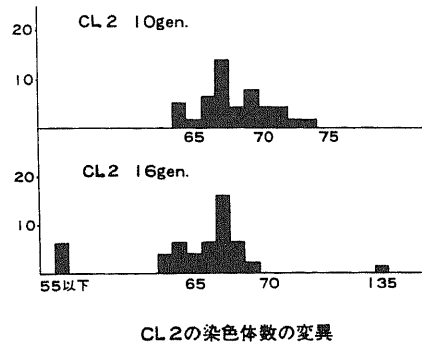


図 10

的にも可及的均一な性格を有する細胞集団を得る目的で、1948年 Sanford ら²¹⁾はL細胞株を使用して1個の細胞を培養することを試みこれに成功し、更に1955年 Puck ら¹⁸⁾がコロニー形成法による single cell culture を紹介してから、クローニング法の技術が確立された。以来かなり広い範囲の培養細胞から単個の細胞に由来する均一な細胞集団を得ることが可能になり、培養細胞の性格決定に定量的な要素が加味されるようになった。

培養細胞のコロニー形成について、Puck ら¹⁹⁾²⁰⁾は、feeder layer と CO₂-incubator を使用して HeLa細胞のコロニー形成に成功したが、後に feeder layer を使用することなく高いコロニー形成率をもたらす培養液を作製し、80~100%のコロニー形成率を得た。1970年 Aaronson ら¹⁾は正常組織由来の培養線維芽細胞の monolayer の上で、ヒトの種々の肉腫細胞株のコロニー形成能について検討し、18細胞株の中でコロニー形成をみたのは8株44%であり、コロニー形成能と細胞株の悪性度との間に相関々係があることを示唆し、又骨肉腫由来の細胞株のコロニー



CL 2 の染色体数の変異

図 11

形成率は10~20%であったと報告した。一方 ATCC (American Type Culture Collection) に登録されている代表的なヒト癌細胞株のコロニー形成率は、継代培養に使われている培養液を使用した場合、HeLa細胞株で45%、KB株で64%、Detroit-6株で42%、HEp-2株で44% (但し仔牛血清濃度20%)、RD株では1%以下、BeWo株で0%であると記載されている。本実験において、OST細胞は継代培養に使用している培養液で、約60%のコロニー形成率を得ることができ比較的高い値を示した。又一方1971年高瀬ら²⁵⁾はOST細胞をマウスへ異腫移植し、宿主が死に到るまで腫瘍が増殖することを報告したが、この2点から、コロニー形成能はその細胞株の悪性度と関係あると思われ、OST細胞は悪性度の高いものと判断される。

又大星¹⁴⁾は培養人癌細胞の同定の項目に、経験的に癌細胞は単層性増殖の中心部に細胞の重層性増殖を示すことが多い事実を挙げている。事実、本実験においてOST細胞はコロニーの成長にともなって、その中心部に多層に盛り上がってくる現象が観察され、この点からもOST細胞の悪性の性格を知ることができる。

単層培養細胞の代表的なコロニーの形態として、山田³²⁾³³⁾は上皮細胞性のコロニーと線維芽細胞性のコロニーを挙げている。前者はHeLa-S₃細胞に代表される如くコロニー形成率は高く、後者はヒト2倍体細胞にみられる如くコロニー形成率は一般に低いとされている。本実験においてはOST細胞は全て上皮細胞性のコロニーを形成し、そのコロニー形成率は高い値を示した。

OST細胞より分離されたクローン系細胞は形態学的特徴の違いから次の如くに分類される。即ち、1) C

L6 の如き多核巨細胞が高頻度に出現した細胞、2) CL14 に見られる如く細胞の運動性が低く、細胞集落を作り易い性格を有する細胞、3) CL2, CL4, CL5, CL7, CL8, CL9, CL11, CL12, CL13 の如く非クローン系 OST 細胞とは形態学的に大きな差異を認めない細胞、以上の3種類に分けることができる。

最初に CL6, CL14 を除いた残りのクローン系細胞について述べるが、それらの細胞の生物学的性状はほぼ OST 細胞の性格を表わしていると思われる。先ず、かかるクローン系細胞のオートラジオグラフィにおいて、%LC がラベル後直線的に増加することが見られたが、この事はクローン分離後4代目で既にその構成細胞は Cell cycle の random phase に分布することを示し、%LM が類正弦曲線を描くこと及び Growth fraction が1.0に達しないことは、既にクローンとしての均一性を失っていることを示すものである。かかるクローン系細胞の増殖態度は母集団である OST 細胞の個々の細胞においても同様で、OST 細胞の増殖性についての多様性を示すものである。又かかるクローン系細胞において、世代時間は CL4 が28時間と最も短く、CL13 が36時間と最も長い値を示し、平均は31.5時間で非クローン系 OST 細胞の世代時間に近似した値を示した。従ってかかるクローン系細胞が母集団である OST 細胞のすべての細胞を代表しているとは勿論断定できないが、少なくとも28時間から36時間間の世代時間を有する OST 細胞が増殖細胞の多数を占めていることは十分に考え得ることである。このクローン系細胞間における世代時間の長短の差は、主として tG_1 に依存し、且つ tG_1 が最も変動し易いパラメーターであると言う事ができる。

次に形態学的に興味ある点は、CL6 において多核巨細胞が算定細胞数1000個中289個の高頻度で出現したことである。従来多核巨細胞の成因について、原形質に関係なく核分裂が繰返された結果生ずるとする説と、単核細胞の融合した結果生ずるとする説がある。Schajowicz²²⁾ は組織培養で核分裂により直接多核巨細胞ができるものと推定し、又、太田¹⁵⁾ も骨巨細胞腫の培養で紡錘形の細胞から多核巨細胞が形成される可能性があると報告した。これに対し、阿部²⁾ は巨細胞腫の培養で合胞体によって多核巨細胞ができると述べ、Thomison²⁷⁾ は小型で核数が少ない多核巨細胞は細胞融合によって形成されるとし、更に Tonna²⁸⁾ らはオートラジオグラフィを使用した *in vivo* の実験で骨髄内単核細胞の融合によって多核巨細胞が生ずるとし、Fujiwara⁴⁾ も *in vitro* における骨

巨細胞腫の細胞について同様の結果を報告した。又ウイルスの感染により多核巨細胞が形成される事実も報告されており、特に岡田¹⁷⁾ の HVJ ウイルスによる細胞融合はよく知られている。一方 Troise²⁹⁾ は多核巨細胞の形成のメカニズムには細胞融合及び細胞質分裂を伴わない核分裂の現象が複合混在すると述べた。本実験において、CL6 の Pulse labeling method を施行した2時間目の標本で、2核細胞の Labeled cell について検討すると、2核ともラベルされていない細胞、1核のみがラベルされている細胞、2核ともラベルされている細胞の割合はそれぞれ66%、8%、26%であった(写真22)。分裂説に従って述べれば、2核ともラベルされていない細胞及び2核ともラベルされている細胞は原形質に無関係に起きた核分裂の結果生じたとも考えられるが、1核のみがラベルされている細胞はS期の核と G_0 , G_1 又は G_2 期の核との組合せが考えられ、非同調性の核を有する細胞である。しかし、核分裂によって生じた2核細胞は形成直後2核とも G_1 期にあり当然同調性の核を有する細胞であり、又岡田¹⁷⁾ は HVJ ウイルスによって G_1 期の細胞とS期の細胞が強制的に融合させられた場合でさえも、各核は同調する傾向が強く、 G_1 期の核はすぐにS期に入ることを示している。従って本実験で観察された8%の非同調性の2核細胞の形成は、分裂説によって説明され難く、異った世代周期にあった細胞が融合されたことを示唆するものであり、CL6 の2核細胞の発生に関しては細胞融合によって形成されたと考えるのが妥当であると思われる。

又 CL6 には3極分裂、4極分裂等の多極分裂を呈する細胞が他のクローン系細胞より多く観察され、且つ3核、4核の多核巨細胞がそれぞれ、21.5%、13.5%の頻度で認められたことは、多核巨細胞が細胞融合により起ると考えられる他に、核の異常分裂の結果形成される可能性がある事も勿論考えねばならない。Troise²⁹⁾ は骨巨細胞腫の培養で観察された3極分裂、4極分裂等の多極分裂は2核細胞が同調して分裂期に入って生ずるとし、多極分裂の娘細胞は結局融合して合胞体を形成し、更に核数の多い多核巨細胞に成長すると推定した。一方 Hsu⁹⁾ は HeLa 細胞において3極分裂の娘細胞の大部分は致死性であると報告した。本実験では多極分裂の運命或はその娘細胞が単核細胞となるか多核細胞となるかについての明確な所見が得られず、多極分裂と多核細胞との因果関係を明らかにすることはできない。

次に多核巨細胞の運命について、阿部²⁾ は培養後の合胞体と思われる多核巨細胞は高い vitality を有

していたと報告し、Schajowicz²²⁾、太田¹⁵⁾は培養日数に従いこれら多核巨細胞は認められなくなると述べた。岡田¹⁷⁾はHVJ ウイルスにより融合された多核巨細胞では、核数が少い程融合による制御の乱れをよく回復して Generative compartment へ入っていくが、核数が増加するにつれて分裂しにくくなり変性してゆくことを観察した。又 Kato ら¹¹⁾は自然発生の多核巨細胞において、非同調性に分裂する核は染色体の細片化現象を引き起こし、正常な核を形成しないことを報告した。CL6 の場合も核数が多くなるに従い同一細胞内の核の大小不同が著しく、micronuclei の混在を認め、又細胞動態の解析からも多核巨細胞の tG が長いこと、Growth fraction が低いことが認められた。事実 CL6 では継代培養を重ねるに従い多核巨細胞が減少し、52代目では殆んど消失していた。即ち多核巨細胞は変性の方向へと進むものと解したい。

次に、CL14 の細胞は運動性の低下或は細胞相互の接着性の増強を思わせる動的形態を示し、細胞動態では世代時間が38時間とクローン系細胞の中で最も長く、それは DNA 合成時間の延長が原因となっており、且つ染色体構成では modal number が69で非クローン系 OST 細胞或は他のクローン系細胞の modal number より高い値を示した。ここで重要な点は DNA 量と Cell cycle の問題であるが、Basergera ら³⁾は Ehrlich 腹水癌細胞のS期は Tetraploid で12時間、Diploid で7時間であったと報告し、Van't Hof³⁰⁾はS期の長さは DNA 量に比例すると述べ、又 Grosset ら⁷⁾は4種類の脊椎動物の Erythroblast において、DNA 量とS期は関連々係を示したと述べたが、一方 Graham⁶⁾は染色体数が2倍になってもS期の変動はないと報告した。本実験では他のクローン系細胞に比べ CL14 のS期の延長と染色体数の増加を認め、CL14 の染色体構成の変異はその細胞動態特にS期と関連することが推定された。染色体の形態学的変化の生物学的意義については、現在なお未解決な問題が多く今後の研究が期待される。

一方培養細胞ではその細胞がその環境条件に合致するように染色体の変異が起り、細胞の増殖性が確立されるが、それら培養細胞の染色体は一般にはその modal number が低4倍体より3倍体の周辺にあり、その変異の巾が正常細胞に比べ広いということが解明されている。本実験のクローン系細胞においても、クローン分離後早く CL14 の2代目に既に染色体の変異の細胞が出現しており、この事からクローニング開始と同時に染色体数の変異が起っていること

が推察される。しかし、クローン系細胞では染色体数の変異の巾が、非クローン系 OST 細胞より狭いことは、クローニングの特性と関連して特に意味があると思われ、又 CL2, CL14 において Stem cell の高い頻度が認められたことはクローニングにより OST 細胞の染色体数の変異に均一性をもたらしめたことを示していると思われる。

最後に、CL2 に endomitotic reduplication の染色体が観察されたが、これは高倍体(低6倍体即ち染色体数135)の細胞の発生と関連があるものと思われる。

結 語

OST 細胞(ヒト骨肉腫由来培養細胞)から、コロニー性クローン分離法によって得られた11種類のクローン系細胞について、その細胞形態、細胞動態及び染色体構成について検索し次の如き結果を得た。

1. OST 細胞は10%仔牛血清加培養液で、上皮細胞性コロニーの形成が可能で、そのコロニー形成率は60%であった。

2. 多核巨細胞が高頻度に出現したクローン系細胞(CL6)において、2核細胞の³H-TdR による標識状態から、2核細胞の成因は細胞融合であろうと推定した。又多核巨細胞は継代培養を重ねるに従い減少し、52代目では殆んど消失していた。

3. 細胞の運動性が低く、細胞集落を形成し易い性格を有するクローン系細胞(CL14)では世代時間が38時間、S期が19時間で、クローン系細胞の中で最も長い値を示した。更に染色体の modal number は69で、非クローン系 OST 細胞或は他のクローン系細胞より高い値を示し、S期の長さや染色体数との関係を検討した。

4. CL6, CL14 以外のクローン系細胞は形態学的には非クローン系 OST 細胞と類似し、その世代時間は CL4 が28時間で最も短く、CL13 が36時間で最も長かった。又 tG は tG₁ の長さに依存する傾向が認められた。

5. クローン系細胞の染色体数の変異の巾は非クローン系 OST 細胞のそれより狭く、CL2, CL14 では Stem cell の出現頻度の高い事が特長的に認められた。又 CL2 において、endomitotic reduplication の染色体が観察され、高倍体の細胞の発生と関連するものと思われた。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導と御校閲を賜わ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。また数々の御教示と御助力をいただきました真鍋昌平講師をはじめ、三秋宏先生、山内四朗先生に深く感謝致します。更に惜みない御協力をいただいた大橋光伸、宮村秀一、富田勝郎、竹林俊一郎の諸学兄、並びに安田俊久文部技官に感謝の意を表します。

なお本論文の一部は第42回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

文 献

- 1) Aaronson, S. A., Todaro, G. J. & Freeman, A. E. : *Exptl. Cell Res.*, **61**, 1 (1970).
- 2) 阿部光俊 : *日整会誌*, **36**, 125 (1962).
- 3) Baserga, R. : *Cancer Res.*, **25**, 581 (1965).
- 4) Fujiwara, J. : *Arch. jap. Chir.*, **36**, 803 (1967).
- 5) Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubick, M. T. : *Cancer Res.*, **12**, 264 (1952).
- 6) Graham, C. F. : *Exp. Cell Res.*, **43**, 13 (1966).
- 7) Grosset, L. & Odartchenko, N. : *Cell Tissue Kinet.*, **8**, 81 (1975).
- 8) 羽柴秀雄 : *中部整災誌*, **11**, 347 (1968).
- 9) Hsu, T. C. & Moorhead, P. S. : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **63**, 1083 (1956).
- 10) 一前久芳 : *中部整災誌*, **11**, 639 (1968).
- 11) Kato, H. & Sanderberg, A. A. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **41**, 1117 (1968).
- 12) 三秋 宏 : *中部整災誌*, **16**, 383 (1973).
- 13) 宮沢洋一 : *中部整災誌*, **9**, 289 (1966).
- 14) 大星章一 : *人癌細胞の培養* (大星、管野編), 97頁, 東京, 朝倉書店, 1975.
- 15) 太田丞一 : *日整会誌*, **36**, 521 (1962).
- 16) 大塚陽一郎 : *熊医会誌*, **43**, 297 (1969).
- 17) 岡田善雄 : *細胞融合*, 東京, 朝倉書店, 1971.
- 18) Puck, T. T. & Marcus, P. I. : *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **41**, 432 (1955).
- 19) Puck, T. T., Marcus, P. I. & Cieciora, S. J. : *J. Exper. Med.*, **103**, 273 (1956).
- 20) Puck, T. T., Cieciora, S. J. & Robinson, A. : *J. Exper. Med.*, **108**, 945 (1958).
- 21) Sanford, K. K., Earle, W. R. & Likely, G. D. : *J. Nat. Cancer Inst.*, **9**, 229 (1948).
- 22) Schajowicz, F. : *J. Bone and Joint Surg.*, **43-A**, 1 (1961).
- 23) 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).
- 24) 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).
- 25) 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).
- 26) 高田克弘 : *中部整災誌*, **11**, 17 (1968).
- 27) Thomison, J. B. : *Lab. Invest.*, **11**, 211 (1962).
- 28) Tonna, E. A. & Cronkite, E. P. : *Lab. Invest.*, **19**, 510 (1968).
- 29) Troise, G. D., DE Lustig, E. S., Schajowicz, F. & Gallard, H. : *Oncology*, **28**, 193 (1973).
- 30) Van't Hof : *Exp. Cell Res.*, **39**, 292 (1963).
- 31) 山崎安朗 : *十全医会誌*, **71**, 1 (1964).
- 32) 山田正篤 : *組織培養* (中井ほか編) 110頁, 東京, 朝倉書店, 1964.
- 33) 山田正篤 : *細胞*, **2(7)**, 22 (1970).

Abstract

After the colonial cloning of OST cells derived from a human osteogenic sarcoma, cytokinetics on eleven clones (CL2, CL4, CL5, CL6, CL7, CL8, CL9, CL11, CL12, CL13, CL14) was analysed in connection with cytomorphology and chromosomal constitution.

OST cells formed colonies with high efficiency (60%) which were similar to the colony of epitheloid cell line.

In CL6, many multinucleated giant cells were observed and the autoradiogram of binucleated cells suggested that binucleated cells were formed by fusion of mononuclear cells.

In CL14 which had low cellular motion and was characterized by easy colony

formation, the generation time was 38 hours and DNA-synthesis time was 19 hours which was the longest of all the clones in this experiment. CL14 had a modal number of 69 chromosomes which was higher than those of other clones and uncloned OST cells, therefore it was suggested that the length of DNA-synthesis time was responsible to the DNA content.

Other clones except CL6 and CL14 were cytomorphologically similar to uncloned OST cells. Among these clones, the minimum generation time was 28 hours in CL4 and the maximum generation time was 36 hours in CL13. The change of generation time depended on the length of presynthetic resting time.

In the chromosomal constitution of three clones (CL2, CL13, CL14), the variation ranges of chromosome number were narrow and their stem cells appeared with high frequency compared with uncloned OST cells.

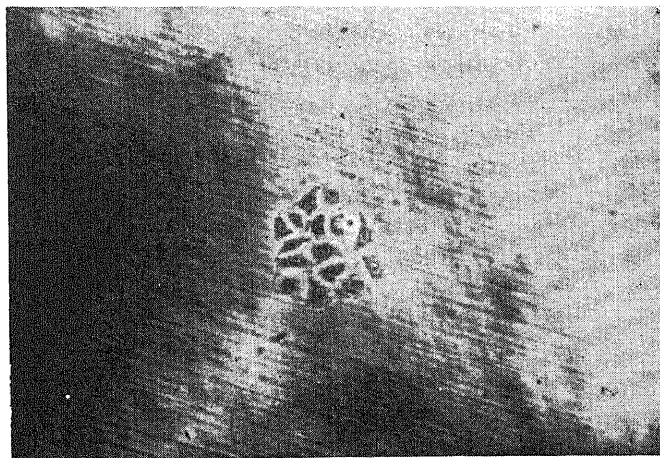


写真1 単離細胞植え込み後5日目のコロニー。位相差顕微鏡写真。

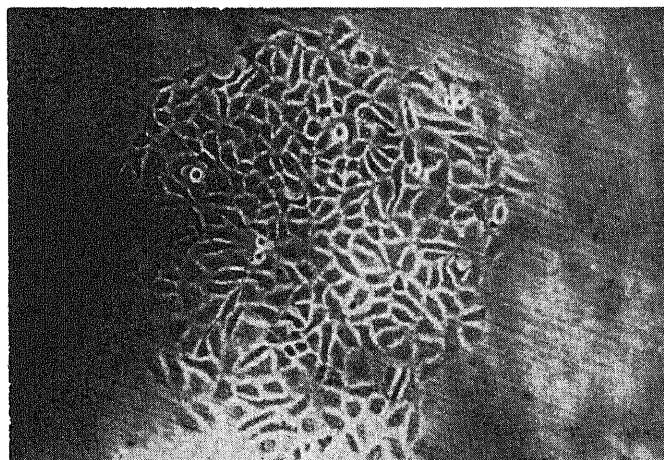


写真2 単離細胞植え込み後11日目のコロニー。位相差顕微鏡写真

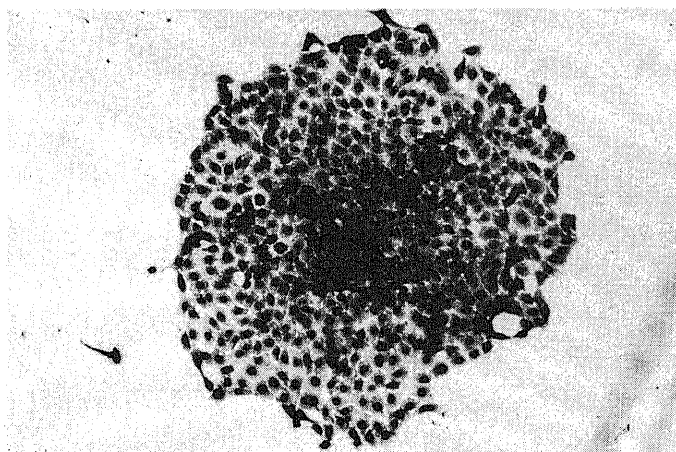


写真3 単離細胞植え込み後14日目のコロニー。ギムザ染色×20

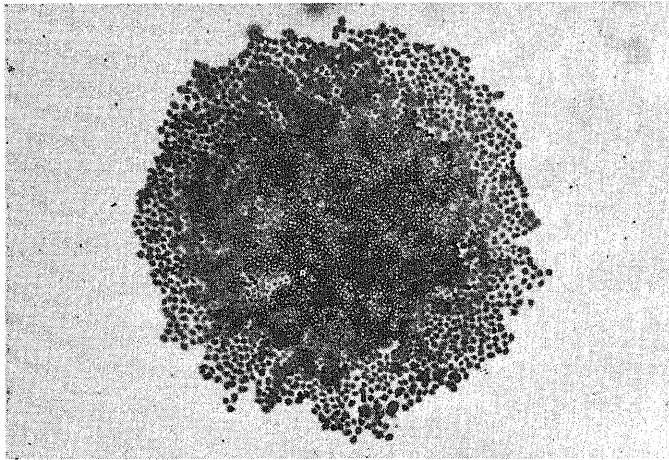


写真4 単離細胞植え込み後3週間目のコロニー。中心部に細胞の重層性増殖を示す。ギムザ染色×12

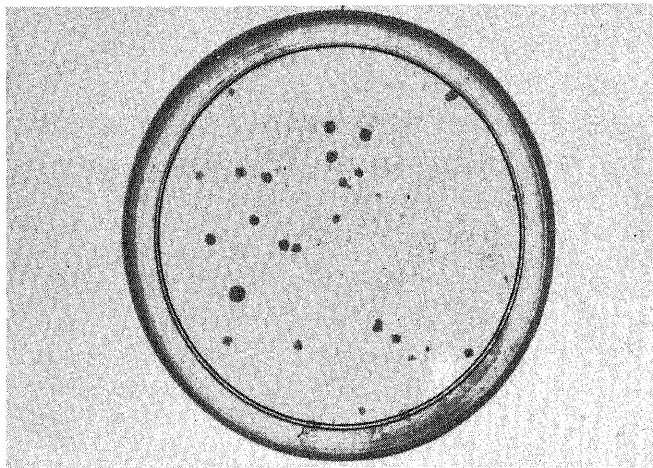


写真5 単離細胞40個を植え込んだ Petri Dish. ギムザ染色。

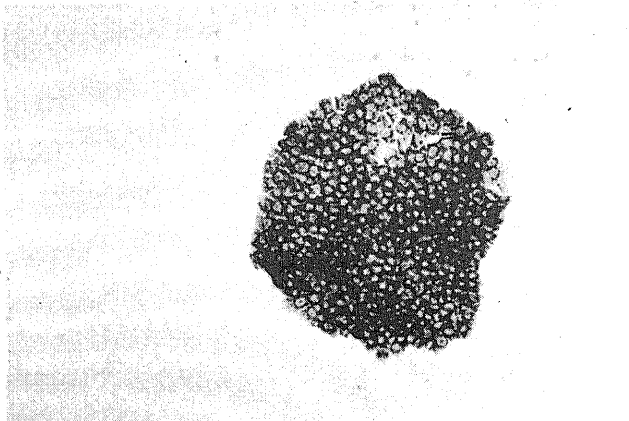


写真6 辺縁が明瞭で小さいコロニー。ギムザ染色×22

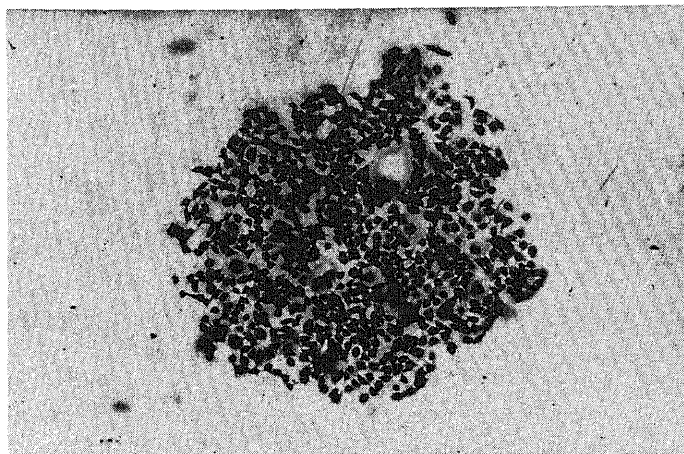
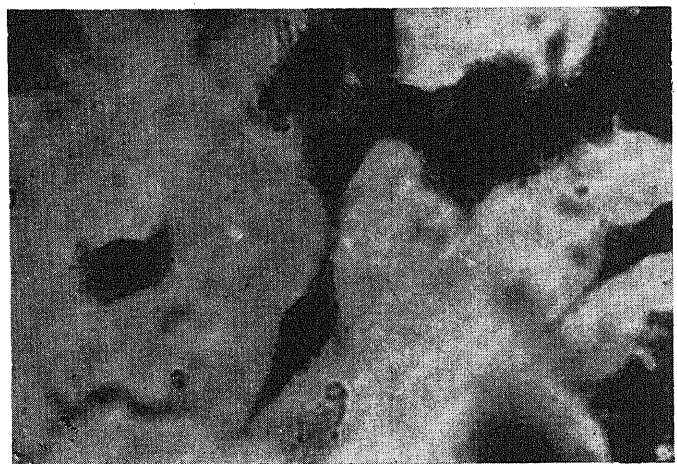
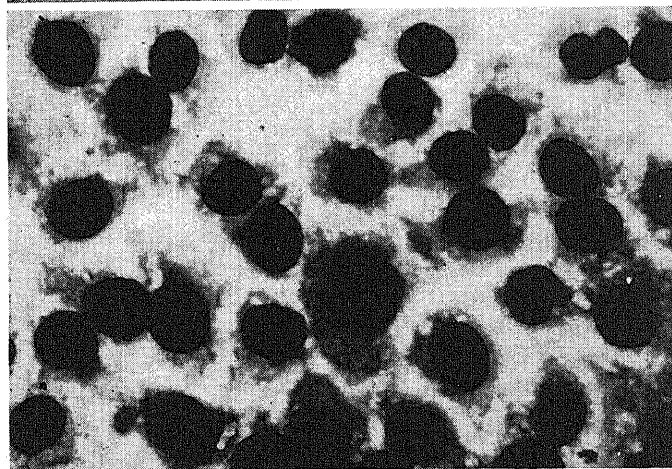


写真7 多核巨細胞を多く含むコロニー。ギムザ染色×15



a



b

写真8 OST細胞, a: 継代培養後48時間。
b: 継代培養後4日目。ギムザ染色×400

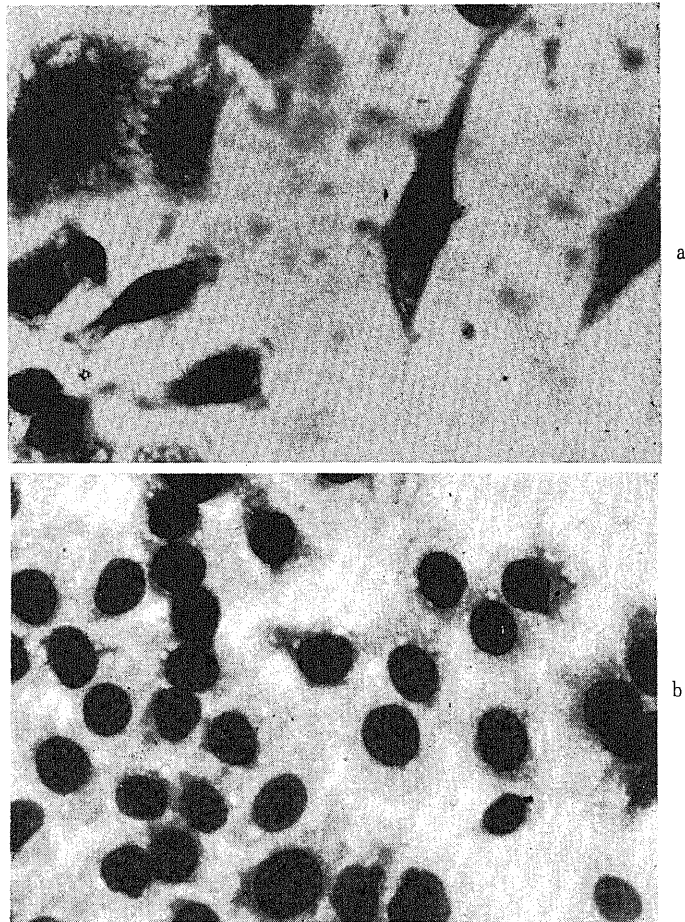


写真9 CL 2, 5代目, a: 継代培養後48時間, b: 継代培養後3日目。ギムザ染色
×400

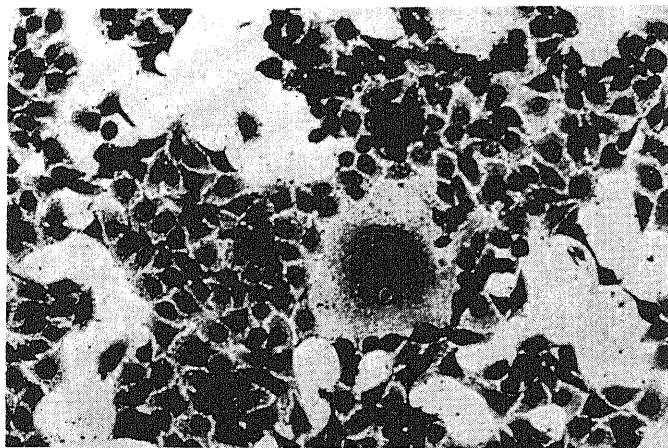


写真10 CL 4, 4代目, 継代培養後60時間の多核巨細胞。ギムザ染色×100

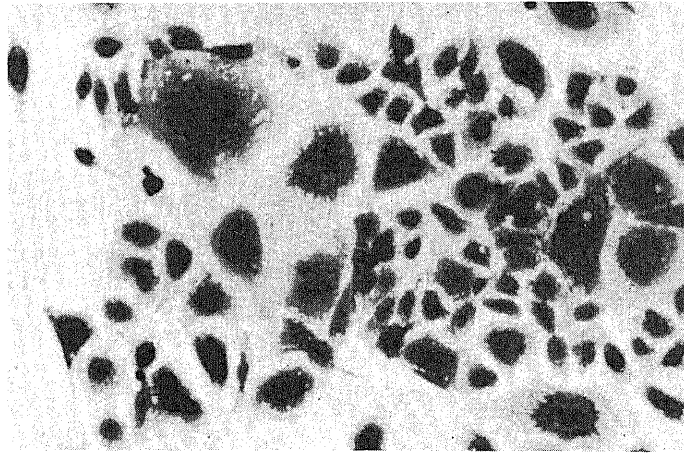


写真11 CL6 5代目，継代培養後3日目。
多核巨細胞が著しく多い。ギムザ染色×100

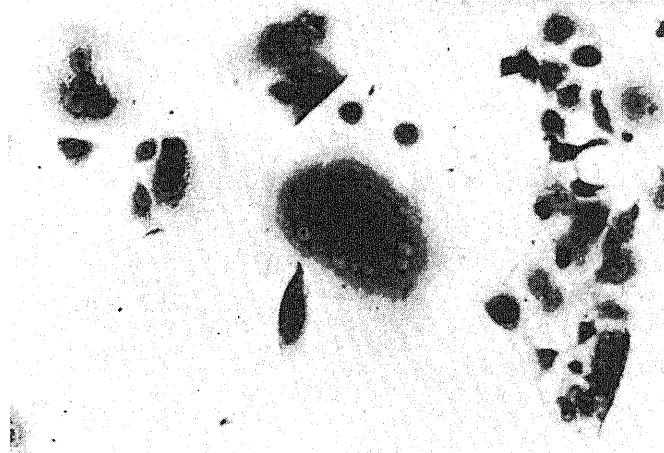


写真12 CL6,5代目，継代培養後3日目。
核数の多い多核巨細胞で中に micronuclei を
見る。ギムザ染色×100

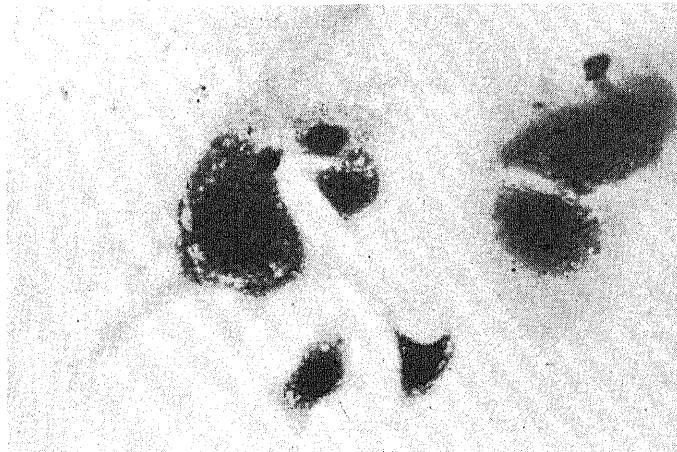


写真13 CL6, 5代目，継代培養後3日目。
核の大小不同が著しい。ギムザ染色×100

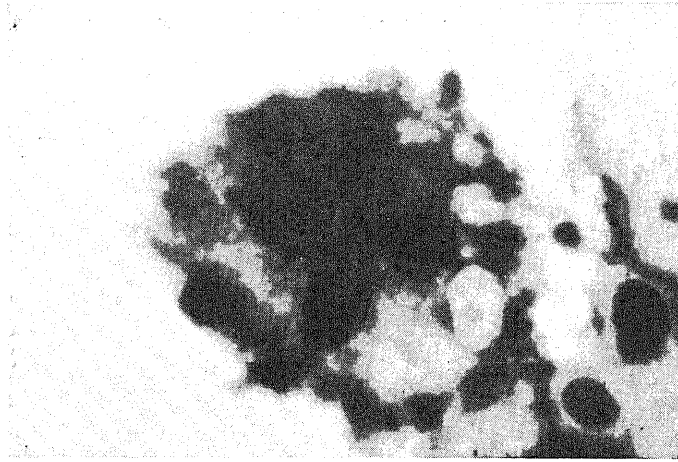


写真14 CL6, 5代目, 継代培養後3日目,
4極分裂の細胞。ギムザ染色×1000



写真15 CL14, 2代目, 継代培養後48時間,
細胞は突起がなく円形を呈し, nucleocyto-
plasmic ratio が高い。ギムザ染色 a : ×100
b : ×400

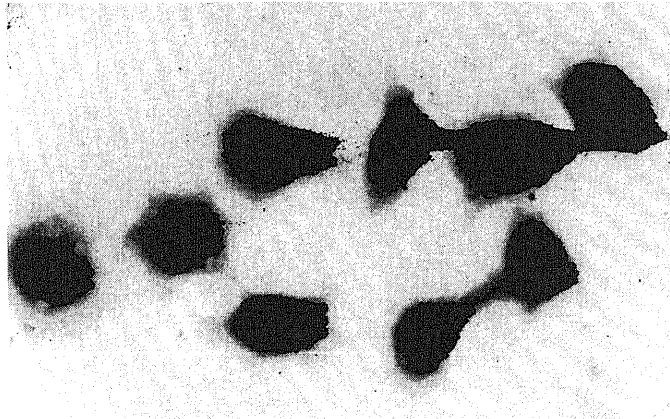


写真16 CL14, 2代目, 継代培養後3日目
細胞は短い突起を出し, ガラス面に付着した
形を呈する。ギムザ染色×400

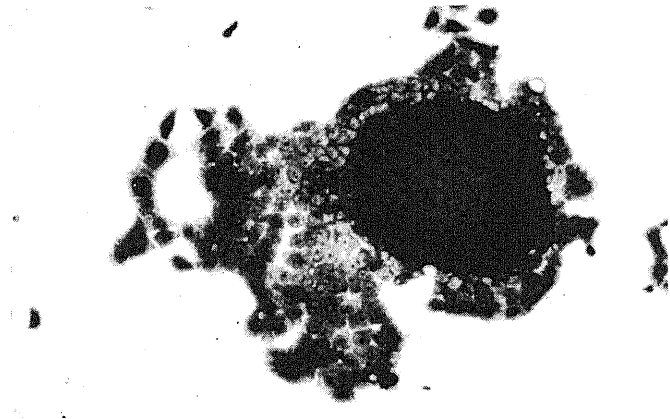


写真17 CL14, 2代目, 継代培養後5日目
細胞集落を形成し, 中心部で細胞が盛り上
ってくる。ギムザ染色×100

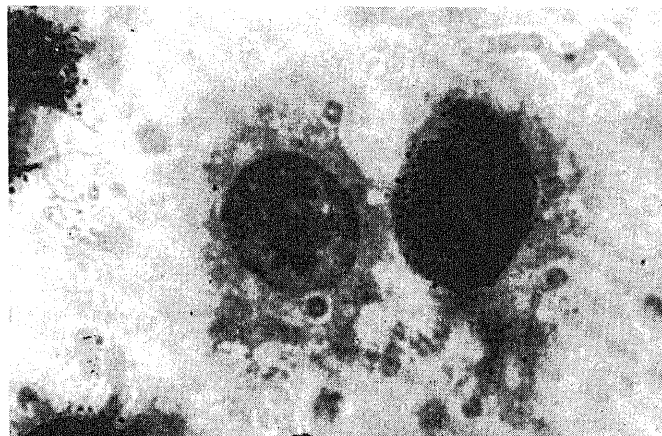
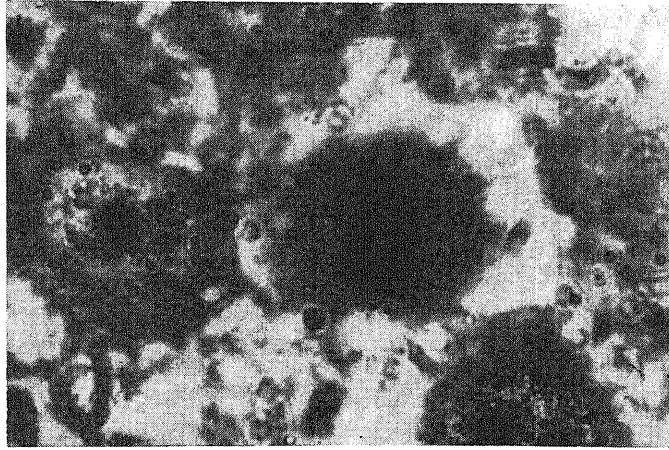


写真18 CL4, 4代目 Cumulative label-
ing methodによる Labeled cell (右) ギ
ムザ染色×1000



写19 CL4, 4代目, Pulse labeling methodによる Labeled mitosis ギムザ染色×1000

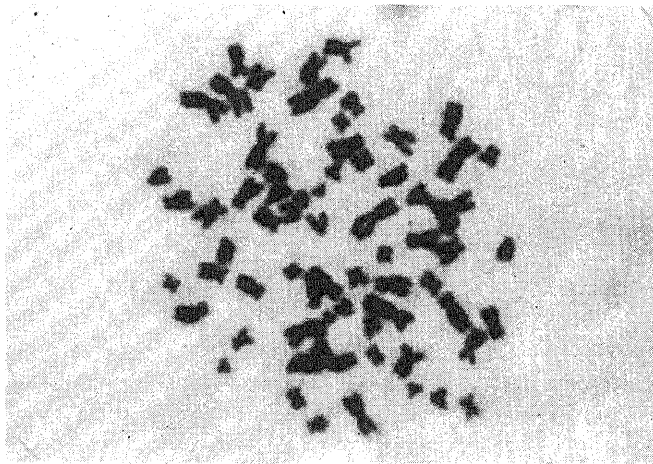


写真20 CL14, 2代目の染色体, 染色体数69個

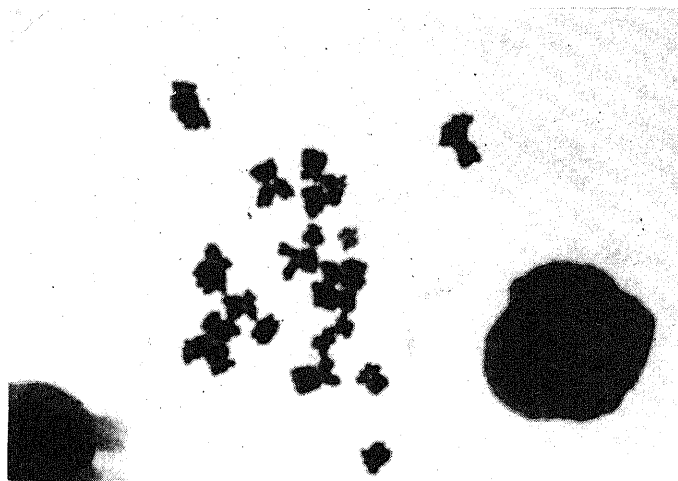


写真21 CL 2, 16代目, endomitotic reduplication
の像を呈する染色体。

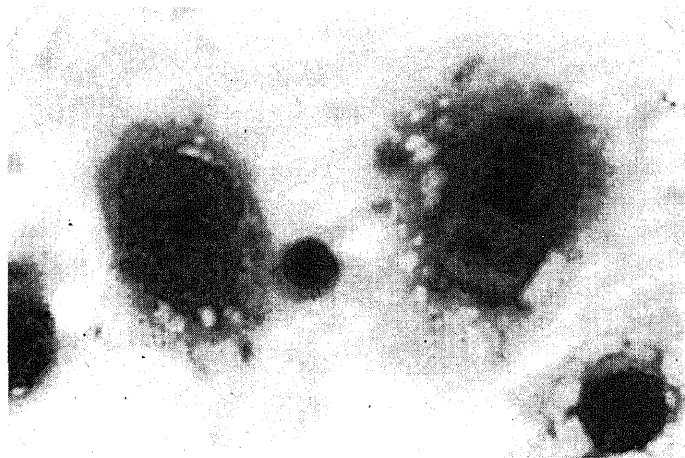


写真22 CL 6, 5代目, 継代培養後3日目。
非同調性の核を有する2核細胞(右)と同調
性の核を有する2核細胞(左) ギムザ染色×400