

## ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察

金沢大学医学部整形外科教室(主任 高瀬武平教授)

山 崎 安 朗

(昭和39年12月17日受付)

本論文の要旨は昭和39年10月2日第23回中部日本整形外科災害外科学会にて発表した。

1885年 Roux が初めて生体組織を体外で培養することを試みて以来、今日まで種々の培養法の考案と共に、生物科学分野に広く利用され、近年特に動物の実験腫瘍や、HeLa 細胞、L 細胞等の株化細胞を用いての組織培養法による腫瘍の研究が盛んになって来た。

殊に悪性腫瘍の特異性はその異常に高い増殖性に基づくものであつて、最近形態学的或いは細胞化学的検査より、この異常に高い増殖性を与える直接の根拠を指摘せんと試みられているが、静的な病理組織学的所見では、その一面を形態学的に把握し得るに過ぎず、この増殖性を解析するには不十分であり、且つ生体内における各種因子の関与などを考えると、腫瘍細胞を動的状態で把握出来るならば理想的である。このため関与する因子を任意に調節出来、しかも腫瘍細胞を適当な増殖状態におくことの出来る組織培養法は悪性腫瘍の特異性を研究する上に重要な意義を有するものと考えらる。

さて現在腫瘍組織より分離出来た株化細胞の報告をみるに、その殆んどが動物またはヒトの軟部腫瘍由来の細胞で、人体に発生した骨腫瘍由来細胞の培養成功の報告は殆んどなく、僅かに海外では Carrel, Gey らが骨肉腫由来の細胞を血漿包埋法で行なっているが、長期の継代培養には失敗している。本邦では骨巨細胞腫由来の細胞を阿部は血漿包埋法で、また太田は単層培養法でそれぞれ組織培養を行ない、太田のみが長期継代培養に成功している。更に彼は骨肉腫由来細胞についても単層培養法にて、培養を試みてはいるが、長期継代培養は不成功に終つている。これは現在の培養技術では軟部腫瘍組織と異なり、骨腫瘍組織よりの細胞培養は分離細胞を得ることが甚だ難しく、たとえ母組織より細胞を分離し得たとしても、長期間に亘り細胞を増殖、継代することが極めて困難なためであろう。著者は最近ヒト骨肉腫由来細胞の単層培養

を試み、細胞の長期継代培養に成功し、この分離細胞の培養経過中における増殖性、形態学的性状並びに染色体の構成などにつき聊かの知見を得たので報告する。

## 文献的考察

組織培養は1885年 Roux が体外で生体組織を培養したことに端を発し、1907年 Harrison によつてその基礎が築かれた。その後 Carrel, Fischer らにより組織培養の研究は急速な進歩を遂げ、形態学、発生学、ウイルス更には癌などの研究に広く応用されるようになった。一方腫瘍組織の培養については1910年 Carrel & Burrows によつて鶏の sarcomatous tissue の培養が血漿包埋法で初めて行なわれ、更に同年、彼らはヒト下腿部に発生せる腫瘍の切除後に再発生せる肉腫様組織の培養を同一方法で行ない、培養の可能性を報告している。その後にも Volpino のマウス癌の培養など多くの報告があるが、しかしいずれも培養細胞の生存期間は極めて短時日であつた。

1926年 Fischer は腫瘍細胞を培養し、培養細胞が或程度發育した時、これに接して正常組織片を併置するならば Ehrlich マウス癌或いは Rous の家鶏肉腫などを長期に亘り培養出来ると述べている。

1936年 Gey は種々の腫瘍組織を培養し、長期の培養成績について報告しているなかで、骨肉腫由来細胞の最も長く培養できたものは191日であつたと述べているが、これらはすべて血漿包埋法であるため、細胞の増殖の程度或いは形態学的所見については明瞭な成績が得られていない。

1945年 Earle らはマウスの皮下組織より血漿などの支持体なしで線維芽細胞の培養に成功し、これにL株細胞と名付け今日まで継代培養されている。また彼らはこの細胞が鶏胚抽出液と血清の限外濾液で増殖す

Establishment of Cell Strain of Human Osteogenic Sarcoma Cells and Histological Appearance of This Strain in Tissue Culture. Yasuaki Yamazaki, Department of Orthopaedic Surgery, (Director; Prof. B. Takase), School of Medicine, Kanazawa University.

ることを知り、これらの中へ分析可能な無機物或いは有機物などの物質を加えて合成培地を作った。爾来この細胞は多くの研究者により合成培地作製の研究に広く用いられている。

かくて生化学的見地より組成の明らかな化学物質のみを組合せて培養液を作らうとの試みは、1950年 Morgan, Morton & Parker により TCMedium 199 として発表された。これはアミノ酸、糖類、ビタミン、各種塩類が一定比率に含まれており、代表的な培養液として市販されている (Difco 製)。

1952年 Gey らはヒト子宮頸部癌より細胞培養に成功し、これに HeLa 株細胞と名付けたが、これは L 株細胞と同様何ら支持体の助けなしでガラス面に定着出来、現在まで継代培養されているもので、今日発癌機構の解明に広く用いられている。

その他ヒト腫瘍由来の株化細胞では、1954年 Moore らは喉頭癌、咽頭癌より HEp # 1, 2 及び 3 株化細胞を、1955年 Eagle はヒト下顎に発生した epidermoid carcinoma より KB 株化細胞を、1957年 Baron らはヒト肺に発生した腺癌より LAC 株化細胞をそれぞれ分離し、継代培養に成功している。なかでも Baron らは分離培養した LAC 株化細胞を rat の皮下或いは腹腔内へ移植して腫瘍の発生をみたと報告している。

一方本邦においては1959年日本組織培養学会に登録されたものは、勝田らのラット腹水肝癌由来の株化細胞 2 種、浜本らのヒト羊膜由来のもの、高木らの Wistar 系ラット心由来のもの、清水らのイヌ腎由来のもの、山田らの Wistar 系ラット肝由来のものそれぞれ 1 種ずつである。1962年太田はヒト骨巨細胞腫由来の株化細胞を 2 種報告し、更に最近第18回組織培養研究会において、奥村らはハムスター肺由来の細胞株の樹立を、また山根らはハムスター胎児細胞の分離培養の成功を報告している。以上報告された代表的な株化細胞をみても骨腫瘍、就中ヒト骨肉腫由来細胞の株化樹立、更にはその長期継代培養経過における詳細な報告は殆んどない。

## 研究材料

昭和37年4月より昭和39年10月までの間に金沢大学医学部整形外科を訪ずれた骨肉腫患者 9 例の外科的切断肢より得た腫瘍組織を用いた、このうち長期継代培養に成功したのは 1 例で、15歳、女子高校生の左大腿骨々幹部に発生せる骨肉腫で、その X 線像及び組織像は図 1 及び 2 の a, b に示す通りである。なおこの患者は術後 4 カ月目に肺転移を伴って死の転帰をとった。

## 研究方法

組織培養の一般的手技或いは使用器具については、種々の報告があり多少の相違はあるが、著者は主として堀田及び大山の方法に準じていくらかこれを modify して培養を行なった。著者の用いた方法は次の如くである。

### I. 培養器具

#### 1. ガラス器具

##### 1) 培養瓶

それぞれ実験の目的で大小種々の型のものが作られているが、著者は池本理化学工業株式会社製の角型大培養瓶 50×50×100mm、及び角型小培養瓶 15×15×40 mm をそれぞれ用い、前者を培養細胞の維持並びに継代培養に、後者を生標本の顕微鏡写真撮影に、更にはこれに短冊 (10×30mm のカバーガラス) を入れ、細胞増殖の適当な時期に取り出して染色標本を作った。

##### 2) ピペット並びに遠心沈澱管

堀田、大山の報告に詳しく記載があり、著者も大体それに準じたものを利用した。

#### 2. ゴム栓

良質のものを用い、洗滌法は後述のガラス器具洗滌法に準じた。

#### 3. ガラス器具の洗滌

アルカリ、金属イオン等は細胞の定着、増殖に影響があるため著者はガラス器具の洗滌には特に細心の注意を払った。即ち新しいガラス器具は先ず中性洗剤で洗つてのち水洗する。また使用したガラス器具は直ちに水またはクレゾール石鹼液に浸し、有機性物質が附着乾固するのを防ぎ、のち中性洗剤にて充分洗滌水洗する。続いて水道水 1 l に C & M 液 (メタケイ酸ナトリウム 10g、ヘキサメタリン酸ナトリウム 90gr を蒸溜水 1 l に溶解した洗滌液) 10 ml の割に混じた液中に入れ、これを15分ないし20分間煮沸後、静かに約15分間流水洗する。水洗後稀塩酸水 (10 l の水に 1 規定塩酸 3 ml を加えてよく混和したもの) を注ぎ15分間放置後、再蒸溜水で充分洗滌し、水を切り乾燥器で乾燥後、これらガラス器具をステンレス製滅菌罐に入れ、乾熱滅菌器で 180°C, 30分間滅菌した。

### II. 培養条件

#### 1. 培養液組成

培養液の組成は、血清などの natural media と塩類溶液が基本組成であるが、著者は次の如きものを混合して培養液とした。

##### 1) 合成培地

市販の TCMedium 199 の 10 倍濃縮液を滅菌再蒸溜水で希釈，更に注射用メイロン溶液で pH 7.2~7.6 に調整し，これに結晶ペニシリンを 200U/ml の割に加えた。

## 2) 血清

屠殺場から得た仔牛血液から血清を分離し，これをゼイツ濾過滅菌装置で濾過滅菌後，60°C，30 分間にて不活化した。

以上 TCMedium 199 液 80% に仔牛血清 20% の割に混じたものを培養液として用いた。なお培養液の交換は 3 日ないし 4 日毎に行なつた。

## 2. 初代培養方法

外科的切断肢より採取せる腫瘍組織を滅菌生理的食塩水で数回洗滌し，附着している血液並びに壊死組織を充分洗い落した後，ハサミにて約 1mm 立方以下になるように出来るだけ細かく細切する。これに 0.25% Trypsin 溶液を約 10 倍量加え，37°C で 15 分間よく Pipetting を行なう。更に Trypsin と同量の Ca イオン，Mg イオンを含む磷酸緩衝食塩水 (Phosphate buffered saline, 以下 PBS と略す) を加え Trypsin の作用を阻止してから，ガーゼで濾過，未消化の粗大組織片を除き細胞浮遊液を作る。次いで細胞浮遊液を 1000r.p.m. 5 分間遠沈後，沈渣即ち細胞を  $5 \times 10^5$  ないし  $10 \times 10^5$ /ml になるように培養液に再浮遊させ，角型大培養瓶，角型小培養瓶にそれぞれこの細胞浮遊液を 10ml, 2ml ずつ分注し，37°C で静置培養した。

## 3. 継代培養方法

2 代目以降の継代培養には角型大培養瓶の培養液を排除後，0.25% Trypsin 溶液を 4 ないし 5ml 加え，37°C で 5 分間放置後，ガラス壁より細胞の剥れるのを待つて Pipetting を行ない，更に PBS を加えて Trypsin の作用を阻止してから，この細胞浮遊液を 1000r.p.m. 以下で 5 分間遠沈，上清を捨て沈渣の細胞濃度を  $10 \times 10^4$  ないし  $20 \times 10^4$ /ml として培養液中に再浮遊せしめ，継代培養用は角型大培養瓶に 10ml，実験用は短冊を挿入した角型小培養瓶に 2ml 充分分注し，37°C にて静置培養した。なお角型小培養瓶中の短冊は培養経過中適宜取り出して，染色標本作製に供した。

## III. 細胞観察法

### 1. 培養状態の観察

培養細胞については 12 時間ないし 24 時間毎に，細胞のガラス壁への定着状態，細胞の増殖状態，pH の変動状態及び細胞の変性状態などについて観察した。なお細胞増殖の程度を知るために，白血球メランジュールで 1 の目盛まで細胞浮遊液を吸引し，次いでクリス

タル紫を 10 の目盛まで吸い，以下血球計算盤を用いて白血球数計算法に準じ 1 ml 当りの細胞数を計算した。

### 2. 培養細胞の形態学的観察

#### 1) 無染色標本の観察

培養細胞の無染色標本を生のまま倒立顕微鏡及び倒立位相差顕微鏡で観察したが，この方法では細胞の微細構造をみることは甚だ困難であるので細胞の大まかな観察をした。

#### 2) 染色標本の観察

小培養瓶の短冊上に定着した細胞を PBS で数秒間洗い，次いで Carnoy 氏液で 5 分間固定後水洗，Haematoxylin-Eosin 2 重染色を施し，細胞の形態を観察した。

### 3. 染色体構成の観察

継代培養後 24 時間~72 時間の最も細胞分裂の旺盛な時期を選んで染色観察した。

#### 1) 水処理おしつぶし法

小培養瓶の短冊を PBS で洗い，次いで 1.12% Na-citratum 溶液で室温 20 分間水処理し，50% acetocarmine で 20 分間固定染色後，40% acetic acid 液にて充分洗滌，直ちにスライドガラス上に短冊をのせ強く押し潰す。短冊の周囲をグリセリン・バルサム封入し鏡検した。

#### 2) 空気乾燥法

小培養瓶にコルヒチン (0.5 r/ml) を 1 滴落し 1 時間半，37°C に放置後排水し，0.25% Trypsin を 1.5 ml 加え 5 分後細胞を管壁より剥がして遠沈し，沈渣に 0.5% citratum 液を加えて Pipetting，約 30 分間室温で放置後，Carnoy 氏液を添加，1000r.p.m. 以下で遠沈する。この操作を約 1 時間，2~3 回繰り返して後ピペットで静かに攪拌し，この 1 滴をスライドガラス上に落して速やかに細胞を拡げ，充分乾燥後 10 倍希釈の Giemsa 液にて 20 分間染色，水洗後バルサム封入し鏡検した。

以上の如くにして得た標本よりの染色体の観察に際しては，細胞原形質のくずれた核板や，染色体同志が重なり合つてその数の算定を誤り易いような核板は除外した。

## 研究成績

著者の行なつた組織培養法による各種骨肉腫の培養成績は表 I に示す通りであるが，以下本論文では骨肉腫のうち，長期継代培養に成功した 1 例について述べる。

### I. 細胞の定着及び増殖状態の観察

表 1 分離培養した腫瘍の総数 37例  
骨肉腫の総数 9例

腫瘍名	培養した数	初代培養にて細胞の定着した数	継代培養し得たもの		
			総数	継代々数	数 (所要日数)
Chondroblastoma	1	1	1	9代	1 (150日)
Enchondroma	4	3	1	2代	1 (89日)
Myeloma	3	2	1	4代	1 (82日)
Fibrous dysplasia	2	1	1	9代	1 (164日)
Eosinophilic granuloma	2	1	1	5代	1 (90日)
Reticulosarcoma	1	0	—	—	—
Ewing's sarcoma	1	1	1	6代	1 (185日)
Chondrosarcoma	1	1	1	3代	1 (21日)
Metastatic carcinoma	3	2	1	2代	1 (95日)
Carcinoma of upper jaw	1	0	—	—	—
Giant cell tumor	7	6	4	3代 6代 19代	1 (19日) 2 (140日) 1 (130日) 1 (388日)
Osteogenic sarcoma	9	7	5	3代 5代 11代 12代 30代	1 (31日) 1 (190日) 1 (195日) 1 (132日) 1 (402日)
その他	2	1	0		
総数	37	26	17		

初代培養では Trypsin 消化前に充分生理的食塩水で洗滌したにも拘らず、なお細胞以外に血球の混在をみたが、これは培養中における数回の培養液交換により、殆んど消失し2代目の継代培養時には血球の混在をみなかつた。分離培養後数時間目頃より培養液の pH は徐々に下降し始め、この頃には大方の細胞はガラス面に一様に定着し始めるが、培養液中にはかなりの細胞並びに血球が浮遊していた。培養後12時間を過ぎると細胞の定着は更に良好となり、pH も一段と下降した。細胞定着が極めて良好であつたので培養後24時間を過ぎて培養液の全量を改液し、液中に浮遊する血球の除去に努めたが、なおいくらかの血球浮遊は免れなかつた。培養48時間後再び改液し、残りの浮遊血球を除去した。爾後の改液は3日ないし4日毎に行なつた。

培養後24時間から48時間までの細胞増殖は緩徐であつたが、48時間を過ぎる頃より細胞増殖は一段と強くなり、ガラス面に単層の綺麗な白色の細胞シートを作り、pH 下降も著明となつた。かくて次第に細胞増殖著明となり、培養後10日目までは旺盛な増殖を示した

が、12日目頃より一部の細胞に原形質の膨化、空胞形成が認められるようになり、更に14日目ではガラス面より星状の細胞剝離がみられ、一部変性したと思われる細胞の浮遊をみたので、この時期に2代目の継代培養を行なつた。

2代目以降の継代培養では、一時的に細胞増殖の遅れた時期もあるが、大体培養日数の増加に従い順調な細胞増殖を示し、且つ増殖につれて pH も著明に下降した。以上の操作を継続するうち14代目に至り急激な細胞増殖を示し、この増殖の態度は爾後の継代培養においても何らの変化も示さず今日に及んでいる。なお継代培養経過は表2に示す通りである。

培養液中に仔牛血清を含まないで合成培地のみで培養すると、細胞の定着は殆んどみられなかつたが、仔牛血清混合の割合を種々変えた結果では、20%に仔牛血清を含む培養液で最も細胞定着がよく、且つ表3に示す如く細胞増殖も良好であつた。

また継代培養時に細胞分離に用いる Trypsin の処理時間がながびいたり、処理後 Ca イオン、Mg イオンを含む PBS で Trypsin の作用を阻止することな

表2 ヒト骨肉腫由来細胞の継代培養経過

植継ぎ代数	継代までの 所要日数	通算所要日数	継代日	備考
初代			'63. 10. 28	
2代	14日	14日	11. 11	
3代	28日	42日	12. 9	
4代	22日	64日	12. 31	
5代	16日	80日	'64. 1. 16	
6代	17日	97日	2. 2	
7代	16日	113日	2. 18	
8代	18日	131日	3. 7	
9代	9日	140日	3. 16	
10代	22日	162日	4. 7	
11代	25日	187日	5. 2	
12代	10日	197日	5. 12	
13代	12日	209日	5. 24	
14代	10日	219日	6. 3	←急激な細胞増殖を示す(219日目)
15代	9日	228日	6. 12	
16代	10日	238日	6. 22	
17代	7日	245日	6. 29	
18代	17日	262日	7. 16	
19代	24日	286日	8. 9	
20代	19日	305日	8. 28	
21代	9日	314日	9. 6	
22代	8日	322日	9. 14	
23代	9日	331日	9. 23	
24代	10日	341日	10. 3	
25代	10日	351日	10. 13	
26代	8日	359日	10. 21	
27代	7日	366日	10. 28	
28代	8日	374日	11. 5	
29代	14日	388日	11. 19	
30代	14日	402日	12. 3	

表3 培養液組成による細胞の定着及び増殖の比較

継代時の細胞数 20×10<sup>4</sup>/ml

培養液組成	細胞の 定着	細胞数 × 10 <sup>4</sup> /ml											
		2代		5代		8代		11代		14代		24代	
		3日	6日	3日	6日	3日	6日	3日	6日	3日	6日	3日	6日
TCMedjumのみ	殆んどなし	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCM <sub>80</sub> +Serum <sub>10</sub>	比較的良好	21	22	22	23	23	25	23	24	27	33	26	33
TCM <sub>80</sub> +Serum <sub>20</sub>	極めて良好	22	24	24	26	25	28	25	30	38	49	32	49
TCM <sub>80</sub> +Serum <sub>30</sub>	やや良好	21	21	21	22	22	23	22	23	26	31	26	31

く培養すると、細胞定着がかなり遅れるか、或いは定着出来ない細胞が多くなり培養液中に浮遊する。更に

表4に示す如く、細胞がガラス面に定着し得た後の細胞増殖はあまり良くないことがわかった。

表 4 Trypsin での処理時間による細胞増殖の比較  
 培養液組成: TCM<sub>80</sub>+Serum<sub>20</sub> 継代時の細胞数 $20 \times 10^4$ /ml  
 培養後 6 日目

Trypsin での処理時間	Ca <sup>++</sup> , Mg <sup>++</sup> を含む PBS での処理	細胞数 $\times 10^4$ /ml					
		2 代	5 代	8 代	11 代	14 代	24 代
15 分 間 以上	-	20	20	20	21	22	23
"	+	21	21	21	23	28	28
5 分 間	-	22	23	25	27	40	39
"	+	24	26	28	30	49	49

## II. 培養細胞の形態学的観察

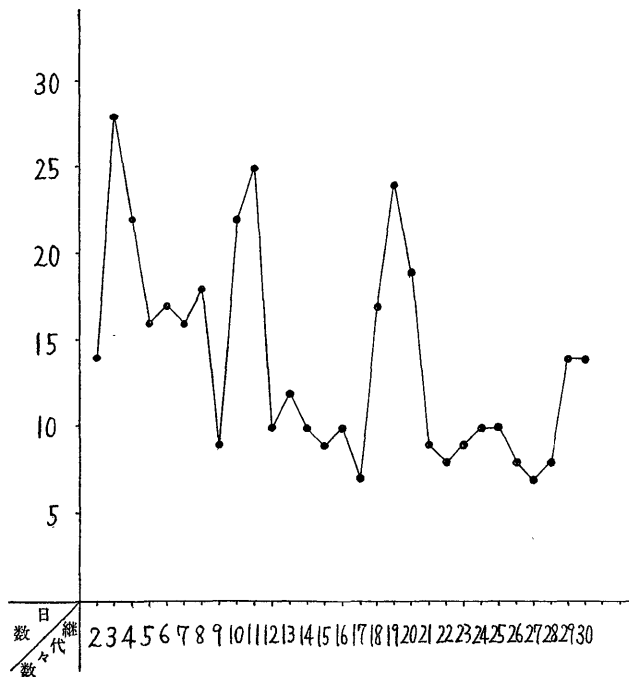
### 1. 無染色標本での観察

初代培養後数時間して細胞がガラス面に定着し始める頃は、未だ細胞としての形態を全く整えず、ほぼ球状の血球よりやや大きな形として認められる。培養後12時間を過ぎて、ガラス面への定着が良好となる時期には、細胞は球状のものより次第に紡錘形様形態を整えてくるが、なお形は小さく数も少ない。培養後24時間を経ると紡錘形様細胞の数もやや増加し、少しずつ形態も明瞭となるが、細胞全体の形としては未だなお小さい(図3)。培養後48時間を過ぎて細胞増殖が強くなる頃には、殆んど細胞が紡錘形様形態を示し、培養後24時間でみられた細胞よりは遙かに大き

い。この紡錘形様細胞は培養日数が進むにつれて一段と鮮明な形態を示し、細胞原形質の両極に細い突起様のものを認める(図4)。更に培養が進み、培養後12日ないし14日目に至ると一部の細胞に原形質膨化、空胞形成がみられるようになり、また変性したと思われる細胞の浮遊も認められるようになった(図5)。

継代培養代数が若く、且つ培養後間もない時期では、紡錘形様細胞が個々に判別出来るが(図6)、培養日数が進むと次第に個々の細胞を判別することが困難となる(図7)。更に継代培養を重ね、培養が進むと個々の細胞が僅かに判別出来るのみで、且つ Aggregation を形成するようになる(図8)。この Aggregation 形成の傾向は培養日数の増加と共に強くなる。

表 5



継代培養10代目及び11代目で一時的に細胞増殖がやや弱まり、表5に示す如く継代までの培養期間がいくらか延長したが、継代培養14代目に至り急激な細胞増殖を示した。この旺盛な細胞増殖のため細胞形態及び輪廓は全く区別出来なくなる(図9)。14代目以降の継代培養では、一時的に細胞増殖に軽度の増減はあるが、殆んど変ることなく旺盛な増殖能力を示しつつ、現在まで30代(402日)の継代培養に達し、なお目下培養続行中である。ここに著者は、このヒト骨肉腫由来の培養細胞が株化に達したものと認め、この株化細胞に Osteogenic Sarcoma Takase strain (OST Strain: 以下 OST 細胞と略す) なる名称を与えた。

この OST 細胞の Aggregation 形成を倒立位相差顕微鏡で観察すると、細胞の輪廓が或程度わかる部位では紡錘形様に、輪廓の殆んど区別出来ない部位では上皮細胞様にみえ、核及び核小体も明瞭

ではないが認められる(図10). また一部には細胞の分裂寸前の状態を思わせるものもみられる(図11, 矢印).

2. 固定染色標本での観察

OST 細胞は初代培養で綺麗な紡錘形を呈するが, 継代々数の若い時期では, 紡錘形の網状構造を形成しつつ増殖し, 細胞原形質の長いものや短いものなど種々の像を呈する.

継代々数並びに培養日数が進むにつれて, 細胞間の網状形成構造が少なくなり, Aggregation 形成が強くなる(図12の a, b). この Aggregation 形成の初期では, なお細胞は紡錘形様形態を保持しているが, 更に継代を重ね, 培養が進むと Aggregation 形成の増加と共に, 細胞は概して均等なる形態を示し, 一見上皮様細胞と思われる像を示し, 細胞の輪廓は殆んど区別出来ない(図13). この時期の細胞は大小不同の核を1個ないし2個有し, 核は細胞のほぼ中央に位置する. 核小体はあまり鮮明ではない.

継代培養14代目に至り, 急激な細胞増殖を示した時期では, Aggregation 形成は一段と強くなり細胞数の増加もまた著しい(図14). かかる像は継代培養15代目以降においても等しく観察された(図15). またこの時期以降では細胞の輪廓は明瞭ではないが, 核の大小不同性は比較的少なくなり, ほぼ円形ないし楕円形を呈し, 更に割合に鮮明な核小体がみられ, 且つ細胞分裂像もよく散見される(図16). 培養経過中, 14代目の継代培養を過ぎても1個ないし2個の核は細胞のほぼ中央に位置し, 増殖が如何に旺盛になっても,

数個以上の核を有する多核巨細胞の出現を認めなかった.

また各継代の培養日数がかなり進んだ時期に一部の細胞に, 原形質の膨化 或いは空胞形成以外に micro-nuclei を認めた(図17及び18). 著者はかかる細胞の原形質膨化, 空胞形成, 更に micronuclei の出現を認めた時期を, 一応細胞変性の初期と考えて継代を行なった.

III. 培養細胞の染色体構成

著者は継代培養17代目の OST 細胞についてその染色体構成を観察した. 調査細胞数は100個で, 染色体数の頻度分布は表6に示す通りである.

即ち OST 細胞は20%に61個をモードとする細胞群を中心に, 染色体数16個~76個と広範囲な染色体数変異を示した. 正常2倍数を示す染色体数46個を有するもの1%, 低2倍域にあるもの8%, 高2倍域から低3倍域にあるもの87%, 3倍数を示すもの3%並びに高3倍域にあるもの1%であつた.

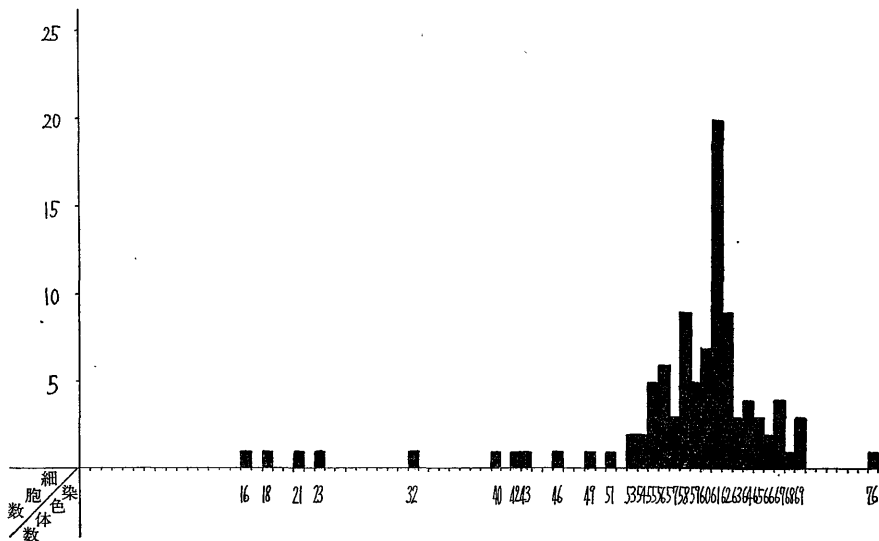
また染色体構成についてみると, 多くの細胞において正常染色体型中には存在しない marker chromosome と思われるものが観察された(図19, 矢印).

総括並びに考察

1885年 Roux が生体組織を体外で培養して以来, 組織培養の研究は急激な進歩を遂げたが, これに伴い種々の培養法も考案されて来た. 1934年 Lewis によつて改良された廻転組織培養法により, 培養の簡易化並びに優秀性という点から, 骨などの Organ culture

表

6



にまで応用されるようになり、著者らも既にこの廻転組織培養法を用いて鶏胚脚原基の軟骨成長に及ぼすX線照射の影響について報告した。また Trypsin 処理法の普及により、原組織からの細胞分離は単層培養を容易ならしめ、且つ分離細胞の継代培養にも極めて適した方法となった。かくて多くの人々により、動物またはヒトの正常或いは腫瘍由来の細胞培養が行なわれるに至った。就中腫瘍細胞の培養については文献的考察で述べた如く、殆んどが動物またはヒトの軟部組織由来のもので、骨腫瘍の組織培養に関する研究は極めて少ない。

その理由の第1は、骨組織由来の腫瘍細胞の培養という点で、おのずから軟部組織由来のものとは異なり、Trypsin 消化法を用いたとしても、原組織からの細胞分離が甚だ困難であるということ、またこの Trypsin 消化法により、たとえ細胞を分離し得たとしても、初代の単層培養を行なうに足るだけ充分な細胞を分離出来ないということ、第2は、かりに初代の単層培養に成功したとしても、長期間分裂、増殖、継代を続けることが困難であり、更に第3は、増殖及び継代が可能であったとしても、その細胞が真に腫瘍細胞であるか、または間質細胞であるかを判別することは極めて困難なためであろうと考える。

著者は表1に示した如く9例の骨肉腫患者の腫瘍組織より、Trypsin 消化による単層培養を行なった結果、培養細胞のガラス面への定着をみたもの7例で、このうち細胞増殖があり僅かの期間でも継代出来たもの4例、残りのうち1例に充分な細胞の定着及び増殖を認め、今日まで30代(402日)に亘り長期継代培養に成功し、現在なお培養続行中である。この培養細胞は、経過中14代目に至り急激な増殖を示し、爾後の継代培養では、一時的に細胞増殖に軽度の増減はあつたが、殆んど変ることなく旺盛な増殖を示した。ここに著者は、このヒト骨肉腫由来の培養細胞が株化に達したものと認め、この株化細胞を Osteogenic Sarcoma Takase strain (OST strain) と名付けた。

組織培養の基本となるものは培養液であるが、著者の用いた培養液の主成分をなす合成培地は、生化学的見地より、組成の明らかな化学物質のみを組合せて培養液を作る目的で研究されたもので、1950年 Morgan, Morton & Parker によつて発表された TCMedium 199 である。これにはアミノ酸、糖類、ビタミン及び各種塩類が一定比率に含まれている。更に1955年 Parker らは TCMedium 199 の成分に、nucleotide や coenzyme を含めた65種の組成よりなる合成培地 TCMedium 858 を報告した。その他 NCTC 109 な

どの合成培地がある。1960年 Kageyama はL株細胞の培養に際し、種々の培養液を比較した結果、TCMedium 199 が細胞に与える影響が最も少なかったと報告している。また1962年、太田は骨巨細胞腫由来の細胞培養に際し、EL溶液にそれぞれTCMedium 199, TCMedium 858, NCTC 109 を加えた場合、TCMedium 199 及び NCTC 109 の添加培地で細胞増殖が良好であつたと述べている。従つて著者は細胞増殖を良好ならしめ、且つ細胞に与える悪影響の最も少ないものとして、一応 TCMedium 199 を選んだ。しかし著者の研究成績より、TCMedium 199 のみでは OST 細胞がガラス面に定着せず、仔牛血清を用いてはじめて細胞の定着並びに増殖を認めた事実から如何に優れた合成培地でも、これのみでは細胞の培養には不適といえよう。やはり血清などの化学的成分の未だ解明されていない物質が、細胞の定着並びに増殖にかなりの影響を及ぼしているものと考えられる。

培養細胞には如何なる種類の血清を用いるかについては、培養細胞の種類或いは培養法の選択などにより、未だ一定した説はなく多くの報告がある。1954年 Chang は正常ヒトの結膜、腎臓、肝臓などの epithelial like cell の培養で成人血清を用い、ヒト血清には個人差があり、1人の成人血清は、或種の細胞には細胞増殖を促進するが、他の種の細胞には寧ろ毒性として働き、細胞増殖を抑制ないしは阻止するため、培養時に如何なる血清を選択するかが重要なことであると述べている。1960年 Kageyama はL株細胞の培養で、TCMedium 199 及び仔牛血清を用いると巨細胞の出現が最も少なく、L株細胞の培養に適していたと報告している。1961年 Cobb らはヒト正常細胞及び悪性腫瘍細胞の培養で自家血清、同種血清及び異種血清をそれぞれ用い、自家血清で最も良い成績を得たと述べている。1962年阿部は骨巨細胞腫を血漿包埋法で培養し、ヒト血清または馬血清をそれぞれ40%、鶏胚抽出液を10%の割合に混合した培養液を用いている。同じく1962年太田は骨巨細胞腫の単層培養で自家血清、同種血清、仔牛血清を用い、自家血清と同種血清との間には、細胞の定着及び増殖に影響を与えるような差異は認められなかつたが、仔牛血清は成人血清より好結果を示したと述べ、これは恐らく成人血清に種々な程度に細胞毒性物質が含まれていたためと考えた。著者は骨腫瘍の一つである骨巨細胞腫の培養に好結果を示した仔牛血清を用いて OST 細胞の培養を行ない、極めて優れた細胞増殖を得ることが出来た。しかも著者の研究成績では、仔牛血清を20%の割合に混合した培養液で細胞増殖に好成績を与えた。しかし著者



は仔牛血清と、その他の血清を比較して培養したわけではないので、今直ちにヒト骨腫瘍細胞の培養には、仔牛血清が優れた結果をもたらすとは断定出来ないが、長期継代培養を考えると、殊に悪性骨腫瘍細胞の培養では、長期に亘る自家血清の供給は殆んど不可能に近く、また同種血清では同一人のものであれば問題はないが、培養経過中、同一人の血清供給が困難となり、他人の血清を用いるような場合には免疫学的に各種の問題があるであろう。かかる見地より、容易に大量入手が可能で、一応骨腫瘍細胞の培養に好結果を与えたと考えられる仔牛血清を用いるのが適切かと考える。

表5に示す如く継代培養経過中、一部に次代への継代までに培養期間の延長したものがみられるのは、継代するに十分な細胞増殖が早期にみられなかつたため、この時期に使用した仔牛血清のなかに、或いは成熟動物のものと同様な、細胞に毒性を示す物質が含まれていたため、細胞増殖が遅れたものか、細胞自身の分裂増殖機能に何らかの要因があつたのか、この点に関しては定かでない。

継代培養中の改液は3日ないし4日毎に行ない、且つ著者は一度に全量を改液した。太田は骨巨細胞腫の培養で、Puckらのfeeding factorを考慮に入れて、液量の半分ずつしか改液していないが、継代培養後ガラス面に定着出来ず死滅浮遊し、またはたとえ定着しても早期に変性死滅する細胞が、極めて僅かではあるが存在することを考えれば、これら細胞の浮遊した培養液の全量を改液して、新しい培養液を供給することは、培養細胞の増殖維持及び経過中の細胞観察における不純物除去という点で望ましいものとする。著者の改液方法でOST細胞に何らかの変化或いは増殖などに障害を与えたとはいえない。

継代培養時のTrypsin処理については種々の意見があるが、著者の研究成績では、処理時間が延長したり、処理後Caイオン、Mgイオンを含むPBSでTrypsinの作用を阻止せずに培養すると、細胞のガラス面への定着が遅れるか、或いは定着出来ない細胞が多くなり、且つ表4に示す如く、細胞が定着したあとでも増殖があまり良くないという事実は、Trypsinの細胞に対する影響がかなり大きく、Trypsin処理によつて或程度培養細胞の増殖が左右されるものと考えられる。従つてTrypsin処理に際しての留意は、OST細胞の継代に関する限り、極めて重要なことである。

形態学的観察でみられる、継代々数の若い時期の紡錘形の網状構造形成は、恐らく細胞原形質両極より出

た突起様物質の運動が起り、お互いに細胞が連絡を保たうとするためではなからうかと考える。

継代培養を重ね、培養日数が進むにつれて、網状構造形成が少なくなり、Aggregation形成の傾向を帯びてくる事実は、1961年Ambrose, Dudgeonらが正常hamsterの腎上皮及び上皮由来の移植腎腫瘍を単層培養し、それぞれの細胞膜の粘着性を検索した結果、腫瘍細胞膜は正常な上皮細胞膜と比較して、遙かに粘着性を減じていたという報告とは異なるが、1962年OkadeはEhrlich's ascites tumor cellにHVJ-virusを混合して、suspension cultureを行なうと、tumor cellはAggregationを形成するが、これはvirusにより細胞膜の粘着性が増すためであると述べていることから、著者はこの細胞膜粘着性が増すfactorは何であるかは別として、Aggregation形成を細胞膜粘着性の増加と考えたい。しかして継代培養14代目に至り、急激な細胞増殖を示したあと、変ることなく、Aggregation形成を示すことは、このOST細胞は細胞膜粘着性という性質を有しているものと思われる、またAggregation形成の増加と共に、細胞は概して均等なる形態を有し、一見上皮様細胞を思わせる像を示したことは、細胞自体の形態変化か、或いはAggregation形成によつて仮性の上皮様細胞形態を示したものが明らかではない。

micronucleiに関しては、1961年FitzgeraldはHeLa株細胞の培養で、主として細胞変性を起す際のmitotic abnormalityであると報告し、また1963年Varani, Balducci及びChiozzotoは正常猿の腎細胞の培養で、細胞にX線照射するとmicronucleiの出現をみると述べているが、その成因については、Fitzgeraldと同様、atypical mitosisであろうとしているだけで、このmicronucleiの出現は細胞変性を意味するのか、或いは全く逆に細胞増殖の傾向を意味するのかについては全然ふれていない。著者の観察したOST細胞の一部に出現したmicronucleiは、各代共に培養の後期、即ち細胞原形質の膨化、空胞形成を示す細胞の出現時期に一致してみられたため、著者はOST細胞に関する限り、このmicronucleiの出現を細胞変性の一つの徴候と考えた。

染色体を研究するには、細胞分裂が頻繁に行なわれている細胞や組織を得ることと、これらの細胞を観察し易いように染色体をひろげることが必要である。かかる見地に立つとき、組織培養により得られた細胞を材料とすることは、染色体研究には最も好都合であるといわねばならない。

腫瘍細胞の染色体に関する研究は、マウス並びに

ラットの腹水性腫瘍を中心に広く行なわれ、1957年 Makino は細胞の遺伝学的立場から腫瘍増殖の機構、所謂種族細胞の説を提唱した。また腫瘍の増殖には一般に正常細胞の染色体とは異なつた特有な染色体型、即ち marker chromosome を示し、しかも高頻度に出現する種族細胞が一次的役割を果すことが明らかにされた。

一方ヒト腫瘍細胞の染色体研究は適当な研究材料を得ることが困難で、しかも標本作製の問題、更には正常ヒトの染色体型が明確にされなかつたなどの理由により、ヒト腫瘍細胞の染色体に関する研究の大部分は、1956年 Tjio 及び Levan によつて、ヒトの正常染色体型が決定されて後なされたものである。ヒト腫瘍細胞の染色体研究からもまたマウスやラットの腫瘍と同様な増殖機構の存在が認められ、既に1961年 Hauschka, 外村、また1963年牧野などにより報告されている。

ヒト腫瘍細胞の染色体研究は正常ヒト細胞の染色体との比較が最も基本的なものである。ヒトの染色体数は46個で、22対の正常染色体と、男性ではXY、女性ではXXの性染色体から構成されている。従つてヒトの正常組織はこれらの染色体系をもつた細胞からなり、染色体数変異は殆んどないとされている。

1963年 Ishihara & Sandberg は癌性胸腹水の観察で、異数性モードを示す例では、正常細胞にみられる染色体数分布と異なつて、非常に広範囲な染色体数変異を示し、且つモードは20~30%と低く、また高2倍性細胞も殆んど例にみられ、染色体構成においても正常染色体型中には存在しない種々の marker chromosome が存在していたと報告している。また1964年石原は54例の種々な悪性腫瘍の胸腹水の観察から、染色体数には共通する特徴はないが、各例は一般にモードとなる特有な染色体型をもつ細胞群を中心に、広範囲な染色体数変異を示し、且つ染色体構成では、やはり多くの腫瘍が色々の marker chromosome を有していたと述べている。

著者の行なつた OST 細胞の継代培養17代目の染色体構成の観察では、20%に61個をモードとする細胞群を中心に、染色体数16個~76個と広範囲な染色体数変異を示し、また高2倍域から低3倍域にあるもの87%、3倍数及び高3倍域にあるもの合わせて4%であつた。更に染色体構成では、多くの細胞に正常染色体型中には存在しない marker chromosome と思われるものが観察された事実は、前記の Ishihara & Sandberg 並びに石原が悪性腫瘍の胸腹水の観察から得た結果にほぼ一致する。

培養細胞が長期に亘り培養されていると、形態学的に変化を来し、殊に正常細胞が長期の培養中に悪性化することが Fischer らにより報告されており、また最近太田も骨巨細胞腫の細胞培養中に染色体数及び核型に変化を来したと述べているが、この骨巨細胞腫は Jaffe-Lichtenstein の第Ⅱ度であつたと報告していることから、原組織が悪性であつたとは考えにくい。しかるに著者の例は既に原組織が悪性であつたことから、染色体構成という見地のみからするならば、OST 細胞は間質細胞由来ではなく、腫瘍細胞由来のものと考えてもよいのではなからうか。しかし OST 細胞を腫瘍細胞と断定するには、今後種々の研究にまたねばならないであろう。

## 結 論

昭和37年4月より昭和39年10月までの間に金沢大学医学部整形外科を訪ずれた骨肉腫患者9例の材料を用いて、組織培養を行ない次の如き結論を得た。

1) 組織培養を行なつた9例中、培養細胞のガラス面への定着をみたもの7例で、そのうち細胞増殖があり、僅かの期間でも継代出来たもの4例、1例に長期継代培養が成功した。継代々数は現在30代(402日)である。

2) 長期継代培養に成功した細胞は、培養経過中14代目に至り、急激な細胞増殖を示し、爾後の継代培養では、一時的に細胞増殖に軽度の増減はあつたが、殆んど変ることなく旺盛な細胞増殖を示した。ここにこの細胞が株化に達したものと認め、この株化細胞を Osteogenic Sarcoma Takase Strain (OST Strain) と名付けた。

3) OST 細胞は合成培地 TCMedium 199 単独では定着出来なかつたが、仔牛血清の混合培養液にて細胞の定着並びに増殖を認めた。20%仔牛血清混合培養液中で、最も細胞の定着がよく且つ増殖も良好であつた。

4) 継代培養時の Trypsin 処理は、細胞の定着及び増殖に及ぼす影響が大きく、細心の注意を要した。

5) 継代々数を重ね、培養日数が進むにつれて Aggregation 形成を示した。この Aggregation 形成を一応細胞膜粘着性の増加と考えるならば、OST 細胞は細胞膜粘着性を有している。

6) Aggregation 形成の増加と共に、OST 細胞は概して均等な形態を示し、一見上皮様細胞の像を呈する。

7) 各継代培養の後期に、一部の細胞に micronuclei の出現をみたが、この micronuclei の出現を細

胞変性の一つの徴候と考えた。

8) OST 細胞の継代培養17代目の染色体構成の観察では、20%に61個をモードとする細胞群を中心に、染色体数16個~76個と広範囲な染色体数の変異を示し且つ正常染色体型中には存在しない marker chromosome と思われるものが多くの細胞にみられた。

稿を終えるに臨み終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った恩師高瀬武平教授に衷心より深甚の謝意を表すると共に、染色体観察について種々御教示戴いた第3解剖学教室松田健史助教授並びに御助言、御鞭撻戴いた当教室野村助教授に深く感謝致します。更に惜しめない御協力を頂いた当教室組織培養班の安元、布谷、宮沢、高田、山田の諸学兄に感謝の意を表します。

### 参 考 文 献

- 1) **Ambrose, E. J., Dudgeon, J. A., Easty, D. M. & Easty, G. C.** : Exptl. Cell Research, **24**, 220 (1961).
- 2) **栗野彦佐武・津田福視** : 日本臨床, **19**, 2315 (1961).
- 3) **Baron, S. & Rabson, A. S.** : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **96**, 515 (1957).
- 4) **Carrel, A. & Burrows, M. T.** : J. Am. Med. Assoc., **55**, 1554 (1910).
- 5) **Carrel, A. & Burrows, M. T.** : J. Am. Med. Assoc., **55**, 1732 (1910).
- 6) **Chang, R. S.** : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **87**, 440 (1954).
- 7) **Cobb, J. P.** : J. Nat. Cancer Inst., **27**, 1 (1961).
- 8) **Eagle, H.** : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **89**, 362 (1955).
- 9) **Fischer, A.** : Münch. Med. Wochenschr., **73**, 1079 (1926).
- 10) **Fitzgerald, P. H.** : Exptl. Cell Research, **24**, 584 (1961).
- 11) **Gey, G. O., Coffman, W. D. & Kubick, J.** : Cancer Res., **12**, 264 (1952).
- 12) **Gey, G. O. & Gey, M. K.** : Amer. J. Cancer, **27**, 45 (1936).
- 13) **Harrison, R. G.** : Ant. Rec., **1**, 116 (1906).
- 14) **Hauschka, T. S.** : Cancer Res., **21**, 957 (1961).
- 15) **Henrichsen, E.** : Exptl. Cell Research, **11**, 115 (1956).
- 16) **堀田 進・大山昭夫** : 日本臨床, **18**, 169 (1960).
- 17) **Ishihara, T. & Sandberg, A. A.** : Cancer, **16**, 885 (1963).
- 18) **石原隆昭** : 総合医学, **21**, 115 (1964).
- 19) **Kageyama, R.** : Zschr. Zellforsch., **51**, 725 (1960).
- 20) **勝田 甫** : 組織培養法, 納谷書店, 東京 (1955).
- 21) **Krystyna Dabrowska-Piaskowska** : Exptl. Cell Research, **16**, 315 (1959).
- 22) **Kuyper, CH. M. A., Smets, L. A. & Anna C. M. Pieck** : Exptl. Cell Research, **26**, 217 (1962).
- 23) **Kuchler, R. J., Martha L. Marlowe & Merchant, D. J.** : Exptl. Cell Research, **20**, 428 (1960).
- 24) **Makino, S.** : Inter. Rev. Cytol., **6**, 25 (1957).
- 25) **牧野佐二郎** : 総合医学, **21**, 73 (1963).
- 26) **牧野佐二郎** : 日臨外会誌, **27**, 69 (1963).
- 27) **Moore, A. E. Sabachewsky, L. & Toolan, H. W.** : Cancer Res., **15**, 598 (1955).
- 28) **Norris, G. & Hood, S. L.** : Exptl. Cell Research, **27**, 48 (1962).
- 29) **Morgan, Morton & Parker** : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **73**, 1 (1950).
- 30) **太田丞一** : 日整会誌, **36**, 521 (1962).
- 31) **Okada, Y.** : Exptl. Cell Research, **26**, 98 (1962).
- 32) **Okada, Y. & Tadokoro, J.** : Exptl. Cell Research, **26**, 108 (1962).
- 33) **Okada, Y.** : Exptl. Cell Research, **26**, 119 (1962).
- 34) **Parker, R. C., Healy, G. M. & Fischer, D. C.** : Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **89**, 71 (1955).
- 35) **Puck, T. T., Marcus, P. I. & Cieciura, S. J.** : J. Exper. Med., **103**, 273 (1956).
- 36) **Rose, G. G.** : J. Biophysiol. & Biochem. Cytol., **3**, 697 (1957).
- 37) **Roux, W.** : Zschr. Biol. **21**, 411 (1885).
- 38) **Sanford, K. K., Earle, W. R. & Likely, G. D.** : J. Nat. Cancer Inst., **9**, 229 (1948).
- 39) **清水 晃** : 日整会誌, **34**, 21 (1960).
- 40) **外村 昌** : 日本臨床, **19**, 2285 (1961).
- 41) **高瀬武平・大成清一郎・山崎安朗・安元三郎・布谷猛** : 日整会誌, **37**, 681 (1963).
- 42) **高瀬武平・山崎安朗・安元三郎・布谷 猛・森田 聖一** : 中部整災誌, **7**, 121 (1964).
- 43) **高瀬武平・山崎安朗・安元三郎・布谷 猛・宮沢 洋一** : 日整会誌, **38**, 539 (1964).
- 44) **Tjio, J. H. & Levan, A.** : Hereditas, **42**, 1 (1956).
- 45) **Varani, P., Balducci, D. & Chiozzotto, M.** : Exptl. Cell Research, **32**, 333 (1963).
- 46) **Valpino, G.** : Pathologica, **2**, 495 (1910).

## Abstract

Tissue culture was performed on human osteogenic sarcoma for a long time.

Methods : The human osteogenic sarcoma tissues were chopped up into small pieces and treated with 0.25% trypsin solution for 15 minutes.

The cell suspension was inoculated into a culture bottle at 37°C incubator.

The culture medium consisted of 80% synthetic medium (TCMedium 199) and 20% calf serum.

The results obtained.

1. The cells which were derived from human osteogenic sarcoma tissues could be maintained under continuous cultivation for a long period of time and vigorous propagation of the cells was observed suddenly in the 14th culture generation.

2. The increased rate of multiplication has been maintained until to-day, up to 402th day (30th culture generation), thus the cell strain has been established from human osteogenic sarcoma, this strain was named Osteogenic Sarcoma Takase strain (OST strain).

3. OST strain has been most adapted to composite medium containing TCMedium 199 (80%) and calf serum (20%).

4. The cell proliferation was considerably affected by treatment of trypsin solution in the subculture, therefore careful attention must be paid to culture procedures.

5. According to increase of culture generation and culturing time, the cells aggregated together and these aggregating cells showed an epithelium-like form, so it was thought that OST strain had the character of adherence to the cell membrane.

6. At the later stage of respective culture generation, micronuclei in some cells were noticed. This appearance of the micronuclei was regarded as a type of the cell degeneration.

7. Chromosome counts, made on this cell strain in the 17th culture generation, confirmed that the histogram of the chromosome number and its constitution were far from normal. Chromosome aberration which seemed to be marker chromosome, was recognized in almost all the cells.

## 附 図 説 明

図1 左大腿骨下 1/3, 内側前方に輪廓やや不鮮明な, 手拳頭大の骨形成性を思わせる腫瘍陰影を認める。

図2のa 異型性に富んだ紡錘形の腫瘍細胞に囲まれて, 所々に不規則な形態をした類骨組織の形成がみられる。H+E.×100.

図2のb 同上, H+E,×200.

図3 初代培養後24時間目, 紡錘形様細胞の数がやや増加, 少しずつ形態を整えてくるが, 細胞全体の形としてなお小さい。無染色生標本, ×60.

図4 初代培養後10日目, 鮮明な形態を示し, 細胞原形質両端に細い突起様のものを認める。無染色生標本, ×60.

図5 初代培養後14日目の継代培養直前, 細胞の膨化或いは空胞形成が一部にみられる。無染色生標本, ×100.

図6 継代培養3代, 培養後3日目, 紡錘形様細胞がなお個々に判別出来る。無染色生標本, ×60.

図7 継代培養5代, 培養後5日目, 個々の細胞の判別が困難となる。無染色生標本, ×60.

図8 継代培養7代, 培養後5日目, 個々の細胞が僅かに判使出来, Aggregation 形成を示す。無染色生標本, ×60.

図9 継代培養14代, 培養後4日目, 急激な細胞増殖のため, 細胞形態及び細胞の輪廓は全く分らない。無染色生標本, ×60.

図10 継代培養29代, 培養後3日目, 細胞輪廓の区別出来ない部位では, 上皮様細胞を思わせる。無染色生標本の位相差顕微鏡所見, ×100.

図11 継代培養29代, 培養後3日目, 一部に核分裂が終り, 将に細胞分裂寸前を示す(矢印)。無染色生標本の位相差顕微鏡所見, ×200.

図12のa 継代培養6代, 培養後8日目, 細胞間の網状構造形成が少なくなり, Aggregation 形成が強

くなる。H+E,×40.

図12のb 同上, H+E,×100.

図13 継代培養8代, 培養後7日目, Aggregation 形成の増加と共に, 一見上皮様細胞を思わせる像を示す。H+E,×40.

図14 継代培養14代, 培養後5日目, 細胞増殖と共に, Aggregation 形成も一段と強くなる。H+E,×40.

図15 継代培養19代, 培養後15日目, 14代の継代培養を過ぎても, 細胞増殖, Aggregation 形成は変わらない。H+E,×40.

図16 継代培養20代, 培養後7日目, 継代培養14代

目を過ぎる頃より, 細胞の輪廓は明瞭でないが, 核の大小不同性が少なくなり, 核はほぼ円形ないし楕円形を呈し, 割合鮮明な核小体がみられ, 細胞分裂像も散見される。H+E,×200.

図17 継代培養9代, 培養後22日目で次代への継代直前, 細胞原形質の膨化, 空胞形成の他に micronuclei を有する細胞の出現をみる。H+E,×200.

図18 継代培養25代, 培養後8日目, 所見は同上, H+E,×200.

図19 継代培養17代, 培養後3日目, 61個の染色体数を示し, marker chromosome と思われる核型の出現をみる(矢印)。Acetocarmin 染色, ×1000.

图 1



图 2, a



图 2, b

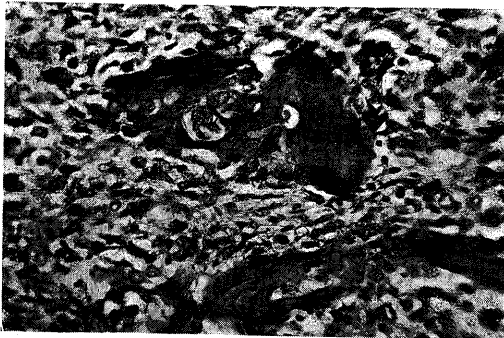


图 3



图 4

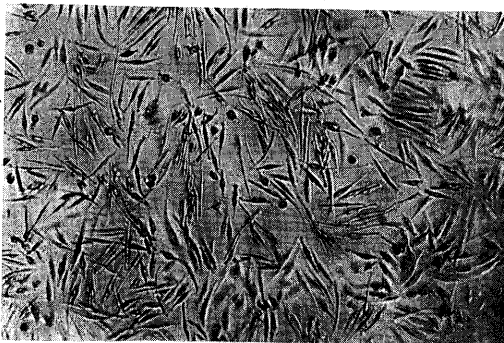


图 5

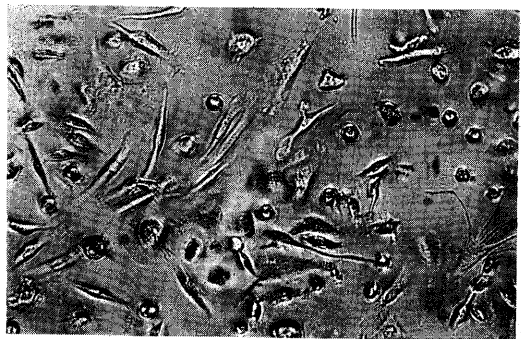


図 6



図 7

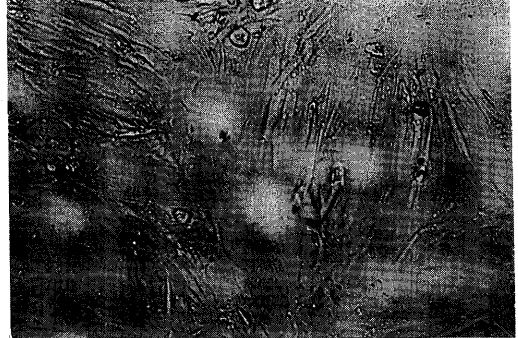


図 8

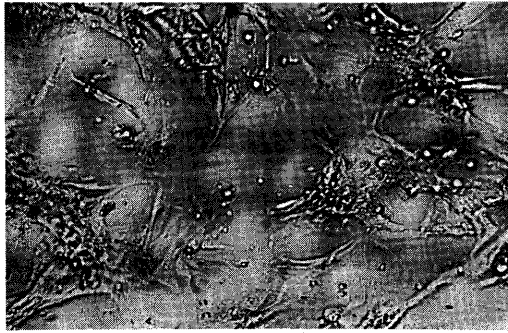


図 9

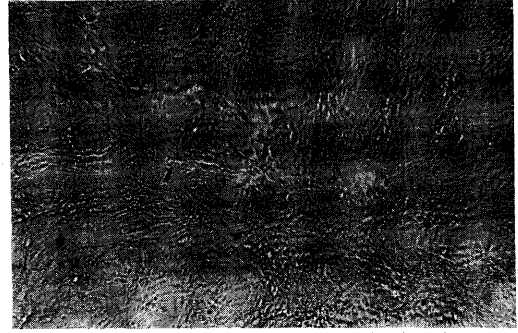


図 10

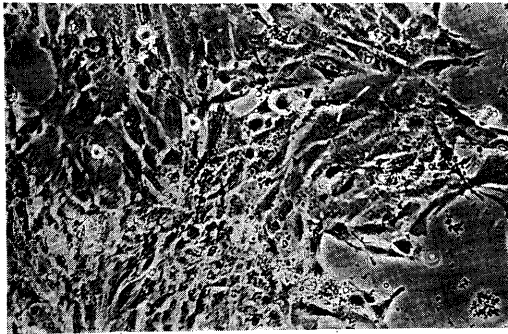


図 11

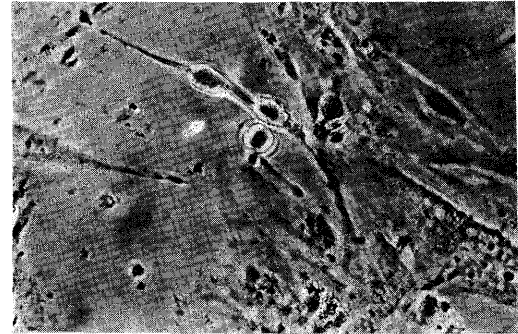


図 12, a



図 12, b

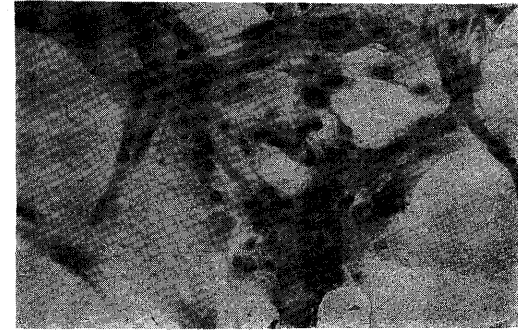




図 13

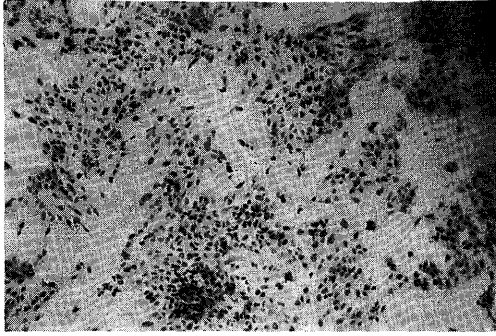


図 14

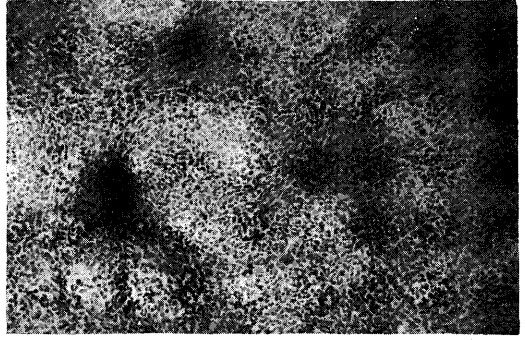


図 15

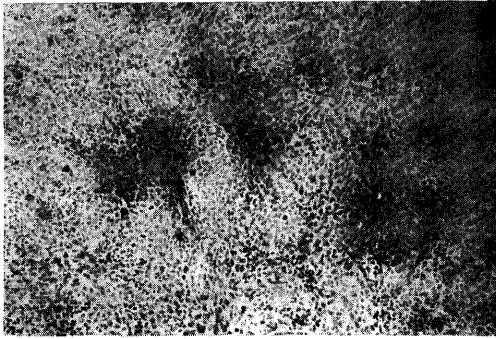


図 16

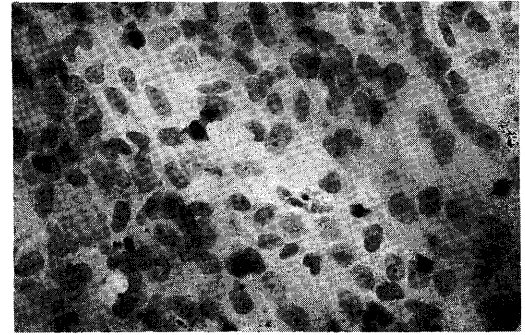


図 17

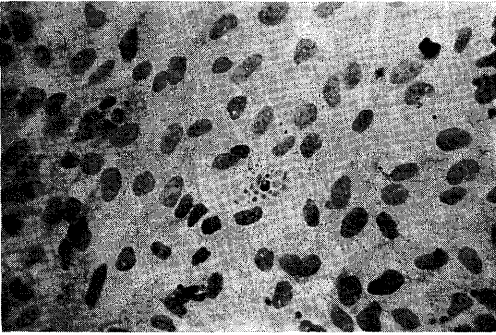


図 18

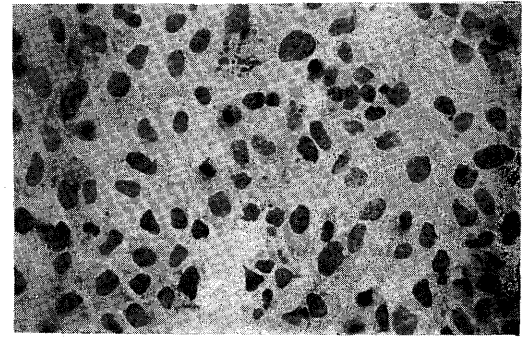


図 19

