

培養ラット肝細胞の自然発癌

第 2 報

11系の Donryu 系ラット肝細胞株に於ける腫瘍形成能の獲得と染色体変化

岡山大学医学部癌源研究施設病理部 (主任: 佐藤二郎教授)

西 崎 静 夫

(昭和53年 3月17日受稿)

緒 言

Gey¹⁾が1941年にラットの培養細胞の自然発癌を報告して以来、これ迄に培養内自然発癌の報告が次第に蓄積されつつある。しかし未だ自然発癌の機構については何等解明されておらず、又癌細胞の生物学的性状の特異性についても十分に研究されていない。今迄に培養内自然発癌の報告は動物の種類別ではマウス²⁻¹⁰⁾ ラット^{1, 11-21)} 及びハムスター^{9, 22, 23)} 由来の細胞株に於いて報告された。又細胞の発生由来した組織に基づいては、間葉系組織由来のもの^{1-5, 7-10, 12, 13, 22, 23)} と上皮性のもの^{6, 11, 14-21)} についてそれぞれ報告されているが、最近では後者の報告例、とりわけラット肝上皮細胞での例が圧倒的に多く報告されている。¹⁴⁻²¹⁾ これは癌の発生機構の解明及び癌細胞の特異性 (腫瘍の悪性度と分化形質との関連等) についての研究の為に、色々の分化形質を有する上皮性の細胞を用いての研究が望ましく、従って最近上皮性細胞の培養と研究が盛んになっており、その為の影響であると考えられる。

培養ラット肝の上皮性細胞の自然発癌の報告は1968年に佐藤等¹¹⁾が報告して以後これまでに7例の報告があった¹⁴⁻²⁰⁾しかしそれらはいづれも他の化学発癌乃至はウイルス性発癌実験の対照群として継代中に偶然に一部のものが癌化したもので、その試料も断片的であり、又一系統の動物で多数の細胞株についての自然発癌を報告したものは見当らない。

我々の研究室では1965年以来、発癌機構の解明の手段として、ラット肝細胞とアゾ色素を組合せてin vitro で研究するために、まずラット肝上皮性細胞の培養を試みて来た²⁴⁻²⁶⁾そして正常ラット肝から多数の上皮性細胞株の樹立に成功した^{11, 21, 24-30)}

この論文は呑竜系ラット 9 匹から肝上皮性株が11

系樹立され、それらが長期間培養継代中に全てが自然発癌したので、それらの造腫瘍性の獲得の経過と染色体変化について報告する。

材料と方法

1) 培養細胞株と培養法

1965年以来、約10年間に培養技術の進歩によりラット肝から上皮性細胞株の樹立の方法に3段階の進歩があり、それに従い細胞株をI, II, 及びIII群に分けた。即ちそれぞれに於いて、初代培養法、培地、cloning 歴の有無等が異っている (表1)。a) I群; 初代培養を回転培養法 (Roller tube culture)^{11, 36, 37)}により樹立したもので、cloning を行っていないので細胞は培地 (LD) 及び培養法によって選択された上皮性細胞の混合集団であった。この群に属する細胞株はRLN-8, -10, -35, -36, -38及び-39の6系である¹¹⁾用いた動物は呑竜系ラットの雄で生後9~25日目のものが用いられた。b) II群; この群では、初代培養を生後7日目の雄のラット肝を用いて、細切後、トリプシン分散法 (Trypsin-dispersed culture) にて細胞を分散し、分散細胞をシャーレに細胞数を倍数希釈して、次第に少数細胞にして植込み、5% CO₂のふ卵器内で培養する。培養14日頃に少数植込んだシャーレ内に上皮性コロニーが主に形成されるが、それをトリプシンろ紙法でコロニアル・クローン (Colonial clone) として分離し、その後 mass-culture で継代培養を行った。培地は Eagle's MEM に20% BS を添加したものをを用いた。この群に属するものはRLN-B2 とRLN-J13の2系がある²¹⁾c) III群に属するものはPC-2, -9 及び-10の3系で、これらはI群に属するRLN-E7 という細胞株の543日目のものを single cell cloning して、それぞれを分離したものである³⁰⁾

Table 1. CULTURE CONDITIONS OF EPITHELIAL CELL LINES FROM RAT LIVER CELLS

| Group | Cell line | Primary culture | Medium | Cloning | Cell type | Observation periods* |
|-------|-----------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------|----------------------|
| I | RLN-8 | Roller tube culture | LD+20% BS | Not done | Epithelial cells | More than 1 year |
| | RLN-39 | | | | | |
| II | RLN-B2 | Trypsin-dispersed culture | MEM+20% BS | Colonial clone | Homogeneous epithelial cells | More than 1 year |
| | RLN-J-13 | | | | | |
| III | PC-2 | Roller tube culture | LD+20% BS, MEM+20% BS | Single clone and colonial clone | Homogeneous epithelial cells | Within 6 months |
| | PC-10 | | | | | |

LD=0.4% lactalbumin hydrolysate and buffer saline (mixture D), BS=bovine serum, MEM=Eagle's minimum essential medium, *=the duration in which the inoculated animals were observed after backtransplantation until tumor formation.

I, II及びIII群の細胞は共に培養瓶 (Test-tube 乃至は TD-40) に confluent になった際, 0.1% トリプシンで細胞を剥がして, 継代培養し, 培養初期には 1:2 の split ratio で, 又培養後期で増殖が旺盛となったものでは 1:10 程度の split ratio で継代し, 培養期間中, 特別の処理を施さずに継代培養した。

2) 細胞の動物復元接種

a) I 群の細胞株; 培養 850 日以後の細胞を $10 \sim 500 \times 10^4$ 個を同系の生後 24 時間以内の新生児ラットの皮下, 腹腔, 及び脳内に移植した (表 2)。b) II 群の細胞株; RLN-B2 では培養 641 日目から 895 日の間に 7 回にわたり $500 \sim 1400 \times 10^4$ 個の細胞を腹腔のみに接種した。又 RLN-J 13 では培養 446 日から 662 日の間に 5 回にわたり $600 \sim 1400 \times 10^4$ 個の細胞を腹腔のみに接種した。c) III 群の細胞株; PC-2 では培養 591~1069 日の間, 6 回にわたり $360 \sim 1000 \times 10^4$ 個の細胞を腹腔及び皮下に接種, PC-9 では培養 684~753 日の間, 4 回にわたり, $440 \sim 1000 \times 10^4$ 個の細胞を腹腔のみに接種された。PC-10 では培養 684~821 日の間, 3 回にわたり, $600 \sim 1200 \times 10^4$ 個の細胞を復元接種された (表 3)。尚移植された動物は I 及び II 群では自然死するまで, 又 III 群では約半年間観察された。

3) 染色体分析

各細胞株の細胞はほぼ動物復元を行った時期のものを選んで染色体分析を行った。I 群の細胞株の染色体分析は 1967 年頃では押しつぶし法により標本を作製し, オルセインで染色したが, 今回は dry-ice

箱 (-79°C) に凍結保存していた当時の細胞を融解し, 再び培養した細胞を用いて, 最近の染色体技術により標本を作り, 染色体分析を行った。即ち各株共に培養日令が増加しているので, 増殖が非常に良く, colchicine 等の分裂静止の薬剤の前処理を行わないでも充分な分裂中期像が得られた。標本は空気乾燥法 (Air-drying 法)³⁸⁾ で作製しそれを 3% ギムザ緩衝液で 1 時間染色し, 水洗乾燥後, 各サンプル当り 50 枚づつ良好な分裂像を選んで写真撮影を行い, 出来上がったフィルムをガストロビューア装置 (保健資材販売 K.K. 製) を通して数の分析を行った。³⁹⁾

結 果

1. 培養細胞の動物復元接種の結果

1) I 群の細胞株

6 系の細胞株について, それぞれ動物復元時の細胞の培養条件, 腫瘍形成までの潜伏期間 (動物の生存日数), 移植成績, 及び腫瘍の組織像は表 2 及び 4, と図 1 に示した。表 2 は実際のデータを, 表 4 はそれらから各細胞株毎に総括したものである。I 群では培養細胞がいつ頃から造腫瘍性を獲得するのか予測が出来なかったために, 培養 1000 日頃から復元移植を始めたものが多く, RLN-39 のみ培養 850 日から復元を開始している。この群の腫瘍の組織像は癌腫の他に肉腫様の腫瘍も生じた。1968 年に佐藤等¹¹⁾ が初めて報告した時点では RLN-36 及び-38 の 2 系は未だ造腫瘍性は陰性であったが, 今回の報告ではそれらを含めて I 群の全ての細胞株が陽性となった。RLN-8 と RLN-39 では少い細胞数で, より短い

Table 2. RESULTS OF BACKTRANSPLANTATION OF I-GROUP OF CULTURED RAT LIVER CELL LINES INTO SYGENEIC NEWBORN RATS

| Cell line | Age of in vitro culture (days) | No. of total sub-culture | Inoculum size ($\times 10^4$) | Inoculum site | In vivo * latent periods (days) | Rats with tumor Rat inoculated |
|-----------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| RLN-8 | 1109 | 112 | 310 | i.p. | 130, 130 | 2/3 |
| " | 1182 | 121 | 100 | " | 151, 156, 158 | 3/3 |
| " | " | 121 | 500 | " | 106, 129 | 2/2 |
| RLN-10 | 1137 | 74 | 10 | i.c., i.p. | (-) | 0/6 |
| " | 1160 | 75 | 10 | i.c., i.p. | 425 | 1/7 |
| " | 1323 | 87 | 100 | i.p. | 262 | 1/2 |
| " | 1420 | 96 | 100 | * | (-) | 0/3 |
| " | " | " | 300 | * | (-) | 0/3 |
| " | 1543 | 102 | * | * | (-) | 0/2 |
| " | 1559 | 103 | 500 | i.p. | 191 | 1/4 |
| RLN-35 | 910 | 56 | 100 | i.p. | 313, 310 | 2/4 |
| " | 958 | 59 | * | * | (-) | 0/1 |
| " | 983 | 64 | 500 | i.p. | 216 | 1/1 |
| " | 1009 | 66 | 100 | " | 307, 350, 370 | 3/3 |
| RLN-36 | 909 | 50 | 100 | i.p. | 779 | 1/3 |
| " | 966 | 54 | 500 | " | 571 | 1/2 |
| " | 1026 | 57 | 100 | " | (-) | 0/3 |
| " | 1188 | 66 | 100 | i.c. | (-) | 0/2 |
| " | 1192 | 67 | 500 | i.p. | 243 | 1/2 |
| RLN-38 | 901 | 54 | 100 | i.p. | (-) | 0/3 |
| " | 981 | 64 | 100 | " | 465, 531 | 2/5 |
| " | 993 | 66 | 500 | " | 471 | 1/3 |
| " | 1188 | 82 | 500 | " | 205 | 1/3 |
| " | 1203 | 83 | 100 | " | 131, 136, 174 | 3/5 |
| " | 1212 | 84 | 500 | " | 227, 232, 236 | 3/3 |
| RLN-39 | 850 | 50 | 150 | s.c. | (-) | 0/3 |
| " | " | " | " | i.c. | 287 | 1/3 |
| " | " | " | " | i.p. | 310 | 1/3 |
| " | 887 | 55 | 500 | " | 183, 266 | 2/2 |
| " | 926 | 59 | 500 | " | 110 | 1/1 |
| " | " | " | 100 | " | 158, 172, 172 | 5/5 |
| | | | | | 223, 223 | |

*=escaped record

**=this means the periods from inoculation of cultured cells to tumor death (the animals were autopsied after sacrifice in a moribund state or when found dead with tumors)

Table 3. RESULTS OF BACKTRANSPLANTATION OF II-AND III-GROUP OF CULTURED RAT LIVER CELL LINES INTO SYNGENEIC NEWBORN RATS

| Cell line | Age of in vitro culture (days) | No. of total sub-culture | Inoculum size ($\times 10^4$) | Inoculum site | In vivo latent periods (days)* | Rats with tumor Rat inoculated |
|-----------|--------------------------------|--------------------------|---------------------------------|---------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| RLN-B2 | 641 | 80, 81 | 1400 | i.p. | 215, 599 | 2/4 |
| " | 663 | 85 | 1000 | " | 448 | 1/5 |
| " | 739 | 106 | 900 | " | 413 | 1/2 |
| " | 743 | 106, 107 | 1000 | " | (-) | 0/2 |
| " | 781 | 116 | 1000 | " | 486 | 1/5 |
| " | 796 | 119 | 1000 | " | 250, 291 | 13/28 |
| " | " | " | 500 | " | 300 | 3/3 |
| " | 895 | 143 | 600 | " | 347, 356, 416 428, 449 | 5/7 |
| RLN-J-13 | 446 | 58 | 1000 | i.p. | 399 | 1/4 |
| " | 452 | 59 | 1000 | " | 340 | 1/1 |
| " | 539 | 76 | 1000 | " | 192 | 1/3 |
| " | 597 | 87 | 1000 | " | 170 | 1/2 |
| " | 662 | 103 | 600 | " | 193, 239 | 6/12 |
| PC-2 | 591 | 52 | 400 | i.p. | (-) | 0/2 |
| " | 596 | 56 | 360 | " | (-) | 0/2 |
| " | 839 | 72 | 900 | " | 68, 116, 194 | 3/4 |
| " | 1059 | 92 | 400 | " | 67, 188 | 2/2 |
| " | 1059 | 92 | 400 | " | 144, 185 | 2/2 |
| " | 1069 | 93 | (-) | s.c. | 184, 184 | 2/3 |
| PC-9 | 684 | 56 | 440 | i.p. | 183 | 1/2 |
| " | 685 | 59 | 870 | " | 191 | 1/2 |
| " | 753 | 65 | 1000 | " | (-) | 0/2 |
| " | 837 | 75 | 600 | " | 194 | 1/3 |
| PC-10 | 684 | 57 | 1260 | i.p. | (-) | 0/2 |
| " | 730 | 63 | 1000 | " | (-) | 0/2 |
| " | 821 | 74 | 600 | " | 164, 183, 183 | 3/8 |

*=this means the periods from inoculation of cultured cells to tumor death (the animals were autopsied after sacrifice in a moribund state or when found with tumors)

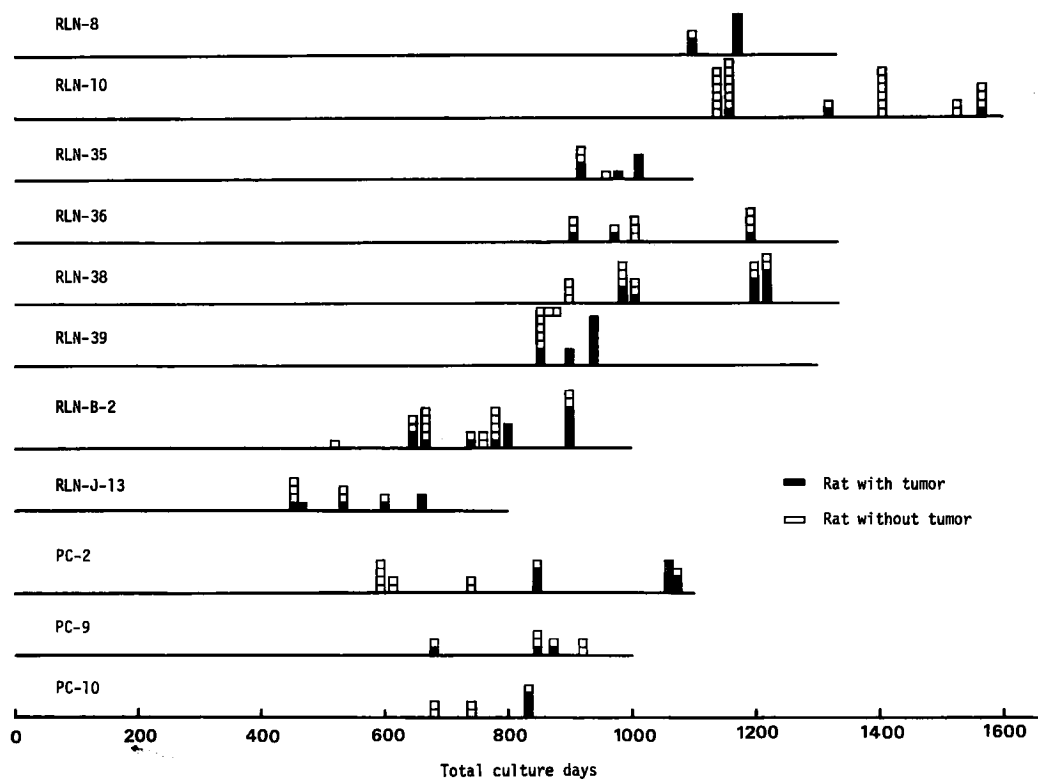
生存日数とより高い take 率を示しており、I 群の中では高い悪性度を示している(表4)。一方 RLN-10 と RLN-36 は take 率、生存日数から見て悪性度が弱いと考えられる。

2) II 群の細胞株

I 群に較らべて、動物復元の開始はずっと早く、

RLN-B2 では 641 日より、又 RLN-J13 では 446 日からである。又更に移植細胞数は I 群の平均で 200×10^4 ケに比し、 900×10^4 で多い。平均生存日数は RLN-B2 で 380 日、RLN-J13 では 250 日であった。腫瘍の組織像は両株とも肝細胞癌の組織像を示した。又 take 率は共に約 50% であった。

Fig. 1. RESULTS OF BACKTRANSPLANTATION OF THE LONG-TERM CULTURED CELLS INTO SYNGENEIC RATS



SUMMARIZED RESULTS OF BACKTRANSPLANTATION OF THE LONG-TERM CULTURED CELLS INTO SYNGENEIC RATS

Table 4.

| Cell line | Total culture days | No. of sub-cultures | Mean inoculum size ($\times 10^4$) | Mean* latent period (days) | Rats with tumor / Rats inoculated | % of take | Histology of tumor | |
|-----------|--------------------|---------------------|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------|--------------------|--------|
| RLN-8 | 1109-1182 | 112-121 | 279 | 137 | 7/8 | 41/95 | 43.0 | C |
| RLN-10 | 1137-1559 | 74-103 | 141 | 293 | 5/27 | | | C-S, S |
| RLN-35 | 910-1009 | 56-66 | 150 | 311 | 6/9 | | | C-S, S |
| RLN-36 | 909-1192 | 50-66 | 233 | 531 | 3/12 | | | C |
| RLN-38 | 901-1212 | 54-84 | 263 | 280 | 10/22 | | | C |
| RLN-39 | 850-926 | 50-59 | 197 | 210 | 10/17 | | | C, C-S |
| RLN-B-2 | 641-895 | 80-143 | 932 | 384 | 13/28 | 19/40 | 47.5 | C |
| RLN-J-13 | 446-662 | 58-103 | 933 | 250 | 6/12 | | | C |
| PC-2 | 591-1069 | 52-93 | 560 | 147 | 9/15 | 15/32 | 46.7 | C |
| PC-9 | 684-837 | 56-75 | 711 | 189 | 3/9 | | | C |
| PC-10 | 684-821 | 57-74 | 865 | 177 | 3/8 | | | C |

C=Carcinoma, C-S=Carcinosarcoma, S=Sarcoma

*=this means the periods from inoculation of cultured cells to tumor death (the animals were autopsied after sacrifice in a moribund state or when found dead with tumors)

3) III群の細胞株

復元移植は PC-2 で 591 日から, PC-9 及び PC-10 では共に 684 日から動物復元を開始している(表3). 腫瘍の組織像は II 群と同様にいずれも癌腫のみを形成している. この群の細胞はいずれも II 群の略同じ培養日令の細胞に比較して, 移植細胞数が少ないにもかかわらず, 生存日数は短く, 200 日以内であるが take 率は I 及び II 群の平均と略同じであった.

2. 染色体分析

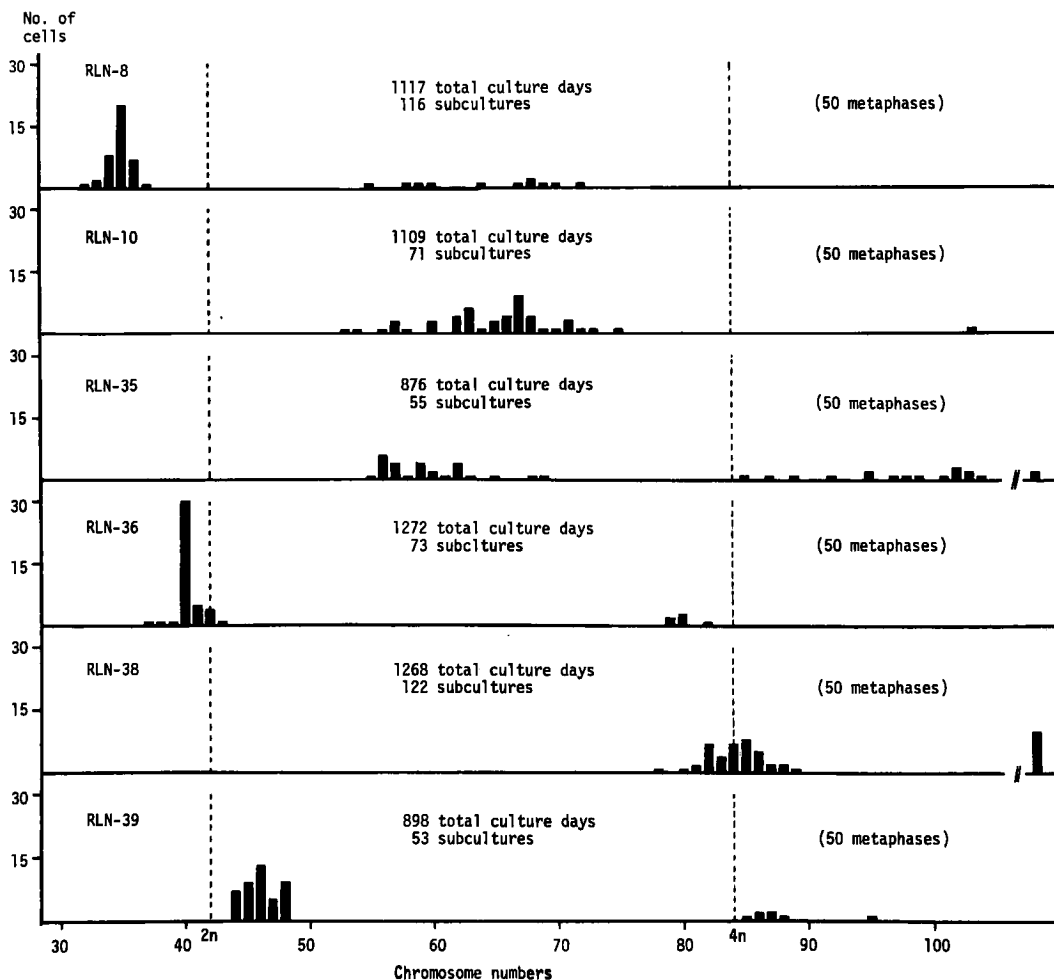
各群に於いて, 細胞が造腫瘍性を獲得したと思われる時期の染色体分布は図 2 及び 3 に示した. とりわけ I 群の細胞株については今回当時の細胞を凍結保存していたものを, 融解して再検査したところ, 前回の結果¹¹⁾をほぼ再確認しえた. 又各群の培養条

件の差は染色体の数の変化には無関係のようだった. 即ち全体を数の分布のモードが二倍体域のものと, 三倍体乃至四倍体域にあるものの 2 種類に大別すると, 前者には RLN-8, -36, -39, -J13, PC-9 及び PC-10 の 6 系が, 後者には残りの 5 系がそれぞれ属していた. 各系の詳細な核型分析の結果は一部ものは既に報告したが¹¹⁾全体については別報にゆづる.

考 察

この論文は我々の研究室に於ける過去 10 年間の呑竜系ラット肝由来の上皮性細胞の *in vitro* 自然発癌のデータをまとめ検討し実験を行ったものである. 1968 年に佐藤等¹¹⁾が培養ラット肝の上皮性細胞の自然発癌について報告して以後, 7 例の同様の報

Fig. 2. DISTRIBUTION OF CHROMOSOME NUMBER IN I-GROUP OF RAT LIVER CELL LINES



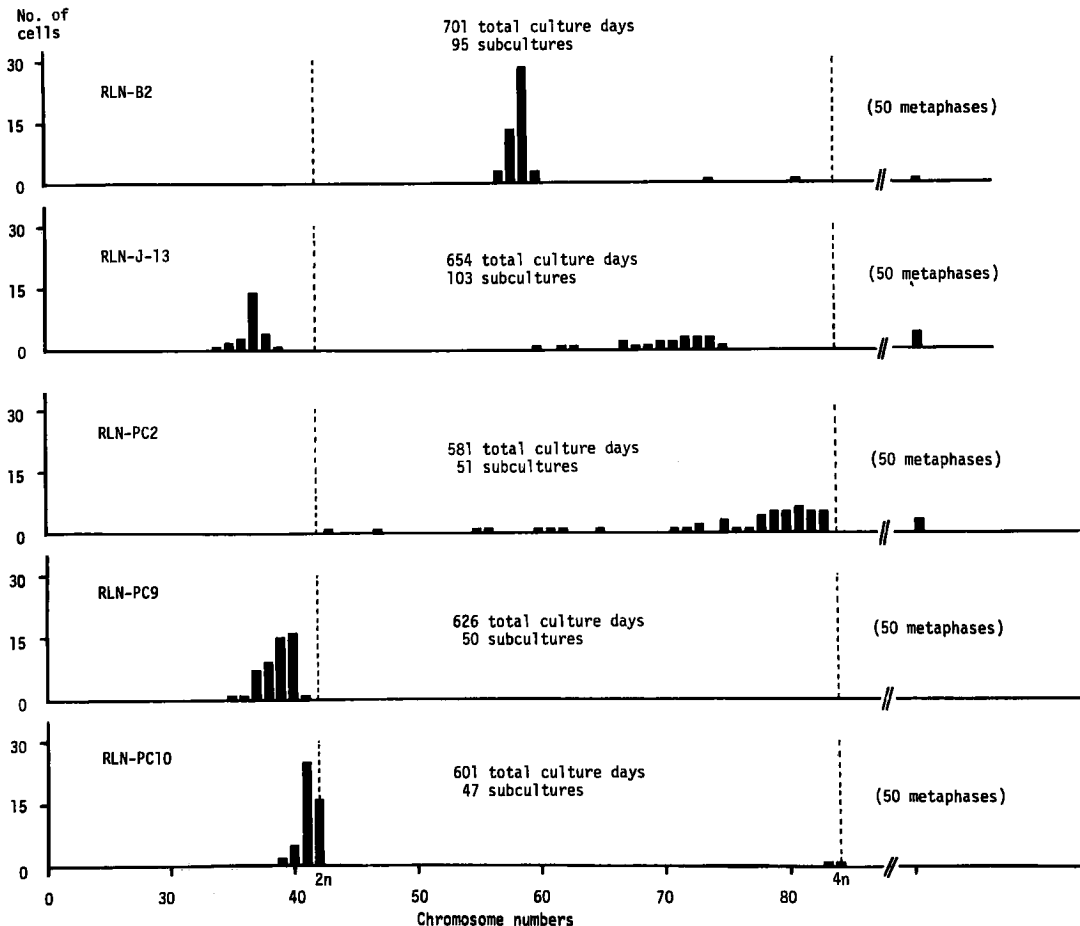
告があったが¹⁴⁻²⁰⁾それらはいづれも他の化学発癌乃至はウイルス性発癌実験の対照群として、継代中に偶発し、報告されたものが多く、自然発癌について最初から実験的に計画されたものでなく、報告された試料も断片的なものが多い。今回の報告の如く一系統(呑竜系)のラット由来の多数の培養肝細胞株(11系)のうち、全例に自然発癌した例は他に見当たらない。

繊維芽細胞に関しては Evans や Sanford らがマウス及びラットの胎児細胞を用いて、培養内自然発癌について計画し、数多くの研究成果を報告している。即ち培地に添加する血清の動物の種により自然発生率や潜伏期間に差のあること⁴⁰⁻⁴⁶⁾又 *in vitro* に於ける neoplastic transformation の criteria についても独自の提案をしている⁴⁶⁻⁴⁹⁾ 又更に最近では

自然発癌について mass-culture での解析から、single cell clone を用いての解析へと進み、mass-culture での結論をほぼ同様に clone level でも確認している⁵⁰⁾

今回この論文で11系の細胞株を初代培養法、培地、細胞の cloning 歴の有無により3群に分類したが、いづれの群の細胞株も増殖してくる上皮性の細胞は略形態的には同一のもので、小型で多角形をして、敷石状でシート様に増殖する。この細胞は機能的にも形態的にも成熟肝細胞と異ったもので、未熟で未分化な幹細胞 (stem cell) というべきもので、成熟型の分化機能は欠けている^{51,53,54,51,52)} 又これらの細胞は継代培養を続けている内に形態的にも又染色体上からも正常なものから次第に異常なものへ偏倚する。この変化は段階的であつ連続的であることは染

Fig. 3. DISTRIBUTION OF CHROMOSOME NUMBER IN II-AND III-GROUP OF RAT LIVER CELL LINES



色体の詳細な研究で確かめられており、^{18,21)}最終的には造腫瘍性をも獲得するようになる。今回の染色体の結果からも、染色体が正常から偏倚してから可成のちに造腫瘍性が認められており、いくら培養日令が600日を越えていても、染色体が正二倍体制乃至は偽二倍体性の細胞の如く正常からわずかに偏倚したものでは未だ造腫瘍性は認められていない。

移植細胞数及び細胞の培養日令と腫瘍が形成されるまでの潜伏期間の関係は表5と6に示した如く、移植細胞数が多くなればなる程又培養日令が長くなる程、潜伏期間は短縮した。これは培養日令が長く

なる程、変異細胞が多くなりかつその造腫瘍性のpotencialも高かまり、そしてより多く移植する程、それらは動物体内でより早く増殖し、腫瘍化するものと考えられる。

I群の細胞株により生じた腫瘍の組織像には癌腫の他に癌肉腫及び肉腫様腫瘍も生じた。これはこの群の細胞が最初から間葉組織由来の細胞も含まれており、それが悪性転換して肉腫を作成したのか、上皮性細胞が肉腫様構造を示しているのか定かでない点がある。この現象の解明のためには現在行われているsingle cell cloningされた正二倍体性の細

RELATION BETWEEN CULTURE AGE AND LATENT PERIOD TO TUMOR FORMATION

Table 5.

| Cell line | Total culture days | Inoculum* size ($\times 10^4$) | Latent* periods (days) |
|-----------|--------------------|----------------------------------|------------------------|
| J-13 | 446 | 1000 | 369 |
| " | 452 | 1000 | 340 |
| " | 539 | 1000 | 192 |
| " | 597 | 1000 | 170 |
| RLN-36 | 966 | 500 | 571 |
| " | 1192 | 500 | 243 |
| RLN-38 | 981 | 100 | 465, 531 |
| " | 1150 | 100 | 131, 136, 174 |
| RLN-38 | 993 | 500 | 471 |
| " | 1212 | 500 | 227, 232, 236 |

*=intraperitoneal implantation

*=this means the periods from inoculation of cultured cells to tumor death (the animals were autopsied after sacrifice in a moribund state or when found dead with tumors)

RELATION BETWEEN INOCULUM SIZE AND LATEN PERIOD TO TUMOR FORMATION

Tadle 6.

| Cell line | Total culture days | Inoculum* size ($\times 10^4$ cells) | Latent* periods (days) |
|-----------|--------------------|---------------------------------------|------------------------|
| RLN-8 | 1109-1182 | 100 | 151, 156, 158 |
| " | " | 310 | 130, 130 |
| " | " | 500 | 106, 129 |
| RLN-39 | 850-887 | 150 | 310 |
| " | " | 500 | 183, 266 |
| RLN-39 | 925 | 100 | 158, 172, 223 |
| " | " | 500 | 110 |

*=intraperitoneal implantation

*=this means the periods from inoculation of cultured cells to tumor death (the animals were autopsied after sacrifice in a moribund state or when found dead with tumors)

胞株の自然発癌によって明らかになるであろう。

11系のうちI群ではRLN-8とRLN-39が、II群ではRLN-J13が高い悪性度を示した。特にRLN-J13では他の株に比し染色体上では数のモードが早くから低二倍体域へ偏倚しており、増殖も旺盛となった。形態的にも、染色体変化と一致して早期から変化してheterogeneousな集団になった²¹⁾。従ってこの株では何等かの原因で悪性転換への過程が、早く始まったので、造腫瘍性も早く獲得されたと考えられる。又III群の3株共にI及びII群のものに比しtake率は変わらないが潜伏期間は短く、悪性度が高いと考えられる。何故単個培養したものが悪性度が高まるかについては、培養543日目に既にtransformedした集団から単個培養されたために、造腫瘍性のpotencialの高い細胞のみがsingle cell cloningによって選択されたと考えるのが妥当と思われる。しかし又別にsingle cellが増殖する過程で異常分裂が生じ易いことも関係しているかも知れない。

In vitroにおけるhepatocarcinogenesisについてこれまでに、ウイルス説^{53,54)}やnutritional stress¹⁶⁾乃至はenvironmentally stress¹⁵⁾等が報告されているが、今の処詳しいことは解っていない。今回の我々の細胞株に関してウイルス粒子の検索は一度も行っていないが、造腫瘍性を獲得するためには染色体の変異の如き細胞の変異が必要のように思われる。変異が生ずるまでには培養内での何回かの分裂が必要であろう。(どの染色体がどの様な変化を受けた後に造腫瘍性を獲得するかについては、将来の研究に待たねばなるまい。)又細胞自体の変異性がいくらか高度であっても、その細胞の抗原性も同時に高い場合は、動物に移植された際に、動物体内でrejectされ造腫瘍性が確められない場合も存在する⁵⁰⁾ので、造腫瘍性獲得には細胞自身と宿主との関係が複雑に関係している。

正常細胞から腫瘍細胞の発生までの一連の研究の結果、我々の研究室には同一の細胞株で培養日令の

若い、正二倍体性細胞から、染色体が高度に異数体化した培養日令の古い、前癌状態の細胞やそれらから由来した腫瘍の再培養の細胞までの一連の細胞を凍結保存しているの、今後それらを用いての発癌に到る過程をいろいろの指標でより詳細に分析することが可能である。

又更に上皮性細胞を用いてのin vitroでの自然及び化学発癌実験をより能率化させる為にはin vitro乃至はin vivoでの悪性転換の簡便で、早期に見出す方法を開発させ、悪性転換のcriteriaを確立することが急務である。⁵⁵⁾

結 語

- 1) 癌研、病理部において過去10ヶ年間に、Donryu系の幼若ラット肝から色々の培養法により肝由来の上皮性細胞株が11系樹立された。
- 2) 各系の細胞は培養法に関係なく、培養初期には略同一の形態を示した。
- 3) 細胞は培養を続けている内に染色体及び形態上の変化を生じて異常なものへ偏倚した。即ち染色体は異数体性へ、又形態はいろいろの形のもの混ったheterogeneousな集団となった。
- 4) 細胞はおおよそ培養600日以後に11系全例が培養内で自然に悪性転換し、同系の新生児ラットに復元接種して腫瘍を形成した。動物の平均生存日数は264日であった。
- 5) 造腫瘍性が獲得された時期の染色体の数の分布は6系は二倍体域に、残り5系は高三倍体乃至は低四倍体域に偏倚した。
- 6) 腫瘍の組織像は肝細胞癌の像を呈するものが多いが、一部では肉腫様の像を示した。

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師佐藤二郎教授並びに御指導をいただいた増地廣助教授に深甚の謝意を表します。

文 献

- 1) Gey, G. O.: Cytological and cultured observations on transplantable rat sarcomata produced by the inoculation of altered normal cells maintained in continuous culture. *Cancer Res.*, **1**, 737, 1941.
- 2) Earle, W. R.: Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **4**, 165-212, 1943.
- 3) Nettleship, A., Earle, W. R., Clapp, M. P. and Shelton, E.: Production of malignancy in vitro. VI. Pathology of tumors produced. *J. Natl. Cancer Inst.*, **4**, 229-248, 1943.
- 4) Sanford, K. K., Likely, G. D. and Earle, W. R.: The development of variations in transplantability and morphology within a clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma-producing cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **15**, 212-237, 1954.
- 5) Sanford, K. K., Merwin, R. M., Hobbs, G. L., Fioramonti, M. C. and Earle, W. R.: Studies on the difference in sarcoma-producing capacity of two lines of mouse cells derived in vitro from one cell. *J. Natl. Cancer Inst.*, **20**, 121-145, 1958.
- 6) Evans, V. J., Hawkins, N. M., Westfall, B. B. and Earle, W. R.: Studies on culture lines derived from mouse liver parenchymatous cells grown in long-term tissue culture. *Cancer Res.*, **18**, 261-266, 1958.
- 7) Barski, G., and Cassingena, R.: Malignant transformation in vitro of cells from C57BL mouse normal pulmonary tissue. *J. Natl. Cancer Inst.*, **30**, 865-883, 1963.
- 8) Evans, V. J., Parker, G. A. and Dunn, T. B.: Neoplastic transformation in C3H mouse embryo tissue in vitro determined by intraocular growth. I. Cells from chemically defined medium with and without serum supplement. *J. Natl. Cancer Inst.*, **32**, 89-121, 1964.
- 9) Sanford, K. K. and Hoemann, R. E.: Neoplastic transformation of mouse and hamster cells in vitro with and without polyoma virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, **39**, 691-703, 1967.
- 10) Franks, L. M., Chesterman, F. C. and Rowlatt, C.: The structure of tumors derived from mouse cells after "Spontaneous" transformation in vitro. *Brit. J. Cancer*, **26**, 843-848, 1970.
- 11) Sato, J., Namba, M., Usui, K. and Nagano, D.: Carcinogenesis in tissue culture. VIII. Spontaneous malignant transformation of rat liver cells in long-term culture. *Japan. J. Exp. Med.*, **38**, 105-118, 1968.
- 12) Sharon, N. and Pollard, M.: Spontaneous neoplastic transformation of germ-free rat embryo cell culture. *Cancer Res.* **29**, 1523-1526, 1969.
- 13) Jackson, J. L., Sanford, K. K. and Dunn, T. B.: Neoplastic conversion and chromosomal characteristics of rat embryo cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 11-23, 1970.
- 14) Oshiro, Y., Gerschenson, L. E. and Dipaolo, J. A.: Carcinomas of rat liver cells transformed spontaneously in culture. *Cancer Res.*, **32**, 877-897, 1972.
- 15) Katusta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture. XIV. Malignant transformation of rat liver parenchymal cells treated with 4-nitroquinoline-1-oxide in tissue culture. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 1563-1576, 1972.
- 16) Borek, C.: Neoplastic transformation in vitro of a clone of adult liver epithelial cells into differentiated hepatoma-like cells under conditions of nutritional stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 956-959, 1972.
- 17) Diamond, L., McFall, R., Tashiro, Y. and Sabatini, D.: The WIRL-3 rat liver cell lines and their transformed derivatives. *Cancer Res.* **33**, 2627-2636, 1973.

- 18) Schaeffer, W. I. and Polifka, M. D.: A diploid rat liver cell culture. III. Characterization of the heteroploid morphological variants which develop with time in culture. *Exp. Cell Res.*, **95**, 169-175, 1975.
- 19) Weinstein, I. B., Orenstein, J. M., Gebert, R., Kaighn, M. E. and Stadler, U. G.: Growth and structural properties of epithelial cell culture established from normal rat liver and chemically induced hepatomas. *Cancer Res.*, **35**, 253-263, 1975.
- 20) Borenfreund, E., Higgins, P. J., Steinglass, M. and Bendich, A.: Properties and malignant transformation of established rat liver parenchymal cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 375-384, 1975.
- 21) Masuji, H. and Sato, J.: Spontaneous malignant transformation of two epithelial cell lines of rat liver cells. *Acta Med. Okayama*, **30**, 359-370, 1976.
- 22) Yamane, I. and Tsuda, T.: Malignant transformation and chromosome change of two cell lines from syrian hamster embryonic tissue in vitro. *Tohoku J. Exp. Med.*, **88**, 171-180, 1966.
- 23) Okumura, H.: Spontaneous malignant transformation of hamster lung cells in tissue culture. *In Cancer Cells in Culture*, ed. H. Katsuta, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, p. p. 292-298, 1968.
- 24) Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture. IV. Proliferation-inducing effect of 4-dimethylaminoazobenzene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene culture. *Japan. J. Exp. Med.*, **35**, 433-444, 1965.
- 25) Sato, J. and Yabe, T.: Carcinogenesis in tissue culture. V. Effects of long-term abtition of 4-dimethylaminoazobenzene and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene on liver cells in culture. *Japan. J. Exp. Med.*, **35**, 445-462, 1965.
- 26) Sato, J. and Yabe, T.: Carcinogenesis in tissue culture. VI. Tissue culture of liver cells from DAB-feeding rats. *Japan. J. Exp. Med.*, **35**, 491-511, 1965.
- 27) Sato, J.: Malignant transformation in culture of rat liver cells treated with and without 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *In Cancer cells in culture*, ed. H. Katsuta, Univ. of Tokyo Press, Tokyo, p. p. 335-350, 1968.
- 28) Namba, M., Masuji, H. and Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture. IX. Malignant transformation of cultured rat cells treated with 4-nitroquinoline-1-oxide. *Japan. J. Exp. Med.*, **39**, 253-265, 1969.
- 29) Masuji, H., Nakabayashi, H. and Sato, J.: Long-term cultivation of two diploid epithelial cell lines derived from normal rat liver cells. *Acta Med. Okayama*, **28**, 281-293, 1974.
- 30) Miyahara, Y., Namba, M. and Sato, J.: Carcinogenesis in tissue culture. 22. Malignant transformation of cloned rat liver cells treated in culture with 4-dimethylaminoazobenzene and properties of the transformed cells. *Acta Med. Okayama*, **28**, 99-101, 1974.
- 31) Ogawa, K., Ichihara, A., Masuji, H. and Sato, J.: Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in cultured rat hepatocytes. *Cancer Res.*, **33**, 449-453, 1973.
- 32) Tomita, Y., Ichihara, A., Masuji, H. and Sato, J.: Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in cultured morris hepatoma 7316A. *Gann*, **67**, 465-467, 1976.
- 33) Tomita, Y., Ichihara, A. and Kuroki, T.: Further studies on the isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in cultured rat hepatocytes. *Gann*, **67**, 747-749, 1976.
- 34) Taketa, K., Watanabe, A., Shimamura, J., Takesue, A., Ueda, M., Masuji, H. and Sato, J.: Undifferentiated patterns of key glycolytic and gluconeogenic enzymes in epithelial cell lines derived from rat liver. *Acta Med. Okayama*, **29**, 151-159, 1975.
- 35) Miyazaki, M.: Primary culture of adult rat liver cells. II. Cytological and biochemical properties of primary cultured cells. *Acta Med. Okayama*, **32**, No. 1, 1978.

- 36) Katusta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture. I. Cultivation of normal rat liver cells. *Japan. J. Exp. Med.*, **33**, 265-275, 1963.
- 37) Katusta, H. and Takaoka, T.: Carcinogenesis in tissue culture. II. Proliferation-inducing effect of 4-dimethylaminoazobenzene on normal rat liver cells in culture. *Japan. J. Exp. Med.*, **35**, 209-230, 1965.
- 38) Rothfels, K. H. and Siminovitch, L.: An air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.*, **33**, 73-77, 1958.
- 39) Masuji, H., Nakabayashi, H. and Sato, J.: Long-term cultivation of two diploid epithelial cell lines derived from normal rat liver cells. *Acta Med. Okayama*, **28**, 281-293, 1974.
- 40) Evans, V. J. and Andresen, W. F.: Effect of serum on spontaneous neoplastic transformation in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **37**, 247-249, 1966.
- 41) Parshad, R. and Sanford, K. K.: Effect of horse serum, fetal calf serum, calf serum, bovine serum, and fetuin on neoplastic conversion and chromosomes of mouse embryo cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **41**, 767-779, 1968.
- 42) Andresen, W. F., Jackson, J. L., Mitchell, J. T. and Evans, V. J.: Effects of changing horse and fetal calf serum supplements on neoplastic conversion and chromosomal characteristics of mouse embryo cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **43**: 377-383, 1969.
- 43) Mitchell, J. T., Andresen, W. F. and Evans, V. J.: Comparative effects of horse, calf, and fetal serums on chromosomal characteristics and neoplastic conversion of mouse embryo cells in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 709-721, 1969.
- 44) Price, F. M., Gantt, R. R. and Evans, V. J.: Effect of fractions of horse and fetal bovine serum on neoplastic conversion of C3H mouse cells in tissue culture. *In vitro*, **6**, 437-440, 1971.
- 45) Evans, V. J., Price, F. M., Sanford, K. K., Kerr, H. A. and Handleman, S. L.: Comparative effects of mare, stallion, gelding horse and fetal bovine sera on neoplastic transformation in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 505-512, 1972.
- 46) Barker, B. E. and Sanford, K. K.: Cytologic manifestations of neoplastic transformation in vitro. *J. Natl. Cancer Inst.*, **44**, 39-63, 1970.
- 47) Sanford, K. K., Barker, B. E., Parshad, R., Westfall, B. B., Woods, M. W., Jackson, J. L., King, D. R. and Peppers, E. V.: Neoplastic conversion in vitro of mouse cells: Cytologic, chromosomal, enzymatic, glycolytic, and growth properties. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 1071-1096, 1970.
- 48) Sanford, K. K., Handleman, S. L., Fox, C. H., Burris, J. F., Hursey, M. L., Mitchell, J. T., Jackson, J. L. and Parshad, R.: Effects of chemical carcinogens on neoplastic transformation and morphology of cells in culture. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 1647-1659, 1974.
- 49) Fox, C. H., Dvorak, J. A. and Sanford, K. K.: Cytometric analysis of neoplastic transformation of vertebrate cell populations. *Cancer Res.* **36**, 1556-1561, 1976.
- 50) Sanford, K. K., Handleman, S. L. and Jones, G. M.: Morphology and serum dependence of cloned cell lines undergoing spontaneous malignant transformation in culture. *Cancer Res.*, **37**, 821-830, 1977.
- 51) 佐藤二郎, 増地廣: 肝細胞の培養, 医学のあゆみ, **86**, 1061-1067, 1973.
- 52) 佐藤二郎, 増地廣: ラット肝臓培養をモデルにした組織培養法の進歩, 臨床病理 **26**, 503-510, 1978
- 53) Weinstein, I. B., Orenstein, J. M., Gebert, R., Kaighn, M. E. and Stadler, U. C.: Growth and structural properties of epithelial cell cultures established from normal rat liver and chemically induced hepatomas. *Cancer Res.*, **35**, 253-263, 1975.
- 54) Narayan, K. S., Thompson, M. A. and Okigaki, T.: Detection of oncornavirus-like particles in normal and tumorigenic rat liver cell cultures. *Gann*, **67**, 755-762, 1976.

- 55) Sakakibara, K., Takaoka, T. and Katusta, H.: Carcinogenesis in tissue culture. 27: Hetero transplantation as an alternative in vivo assay for neoplastic state of cells in culture. Japan. J. Exp. Med., 46, 257-262, 1976.

**Spontaneous malignant transformation of rat liver cells
in long-term culture**

**Part 2. Acquirement of tumor-producing capacity
and chromosomal alteration on the eleven epithelial liver cell lines
of Donryu rats**

Shizuo NISHIZAKI

Division of Pathology, Cancer Institute, Okayama University Medical School,
Okayama, 700 Japan

(Director : Prof. Jiro Sato)

- 1) For past 10 years, 11 epithelial liver cell lines from baby rats of Donryu strain have been established in our laboratory.
- 2) All cultured cells in the 11 cell lines showed the same epithelial morphology in early culture passages irrespective of culture methods.
- 3) The cultured cells progressively deviated from normal to abnormal with time in chromosome as well as in morphology during long-term cultivation; normal diploid cells shifted to aneuploid and also homogeneous epithelial cells changed to heterogeneous in shape.
- 4) The cells in all of the 11 cell lines eventually underwent spontaneous malignant transformation *in vitro* after about 600 culture days and produced tumors in syngeneic newborn rats about 300 days after inoculation.
- 5) Histology of tumors showed mainly hepatocarcinomas and a few sarcomatous figures.
- 6) Chromosome numbers of the cultured cells in the 11 cell lines were in the near-diploid range in six of them and in the hypertriploid to hypotetraploid range in the remaining five, when chromosome analysis was done at the time of malignant transformation *in vitro*.