

アゾ色素短期飼育ラット肝から培養された 5細胞株の性状について

岡山大学医学部附属癌源研究施設病理部（主任：佐藤二郎教授）

岡山大学医学部第一外科教室（主任：折田薫三教授）

岡山大学医学部第一外科教室

星 加 照 毅

（昭和53年8月12日受稿）

諸 言

ラットの肝癌の研究はアゾ色素による研究に始まり、引続いて種々の発癌剤を用いて肝癌を作り出すことが出来るようになった。アゾ色素とラット肝癌の研究は故吉田教授¹⁾を中心に多数行われ、腹水肝癌という動物癌研究に極めて有効な実験材料を提供²⁾³⁾⁴⁾し世界をリードして来た。しかしながら、その発癌機構については明解な解答が得られていない。我々の研究室では *in vitro* におけるラット肝細胞とアゾ色素との組合せにおいて多数の研究が行われてきた。今回は 4 - Dimethylaminoazobenzene (DAB) 及び 3' - Methyl - 4 - dimethylaminoazobenzene (3' - Me - DAB) で短期飼育された Donryu 系のラット肝組織を培養し(1)アゾ色素がラット肝細胞の *in vitro* での増殖を誘導するかどうか、(2)増殖してきた肝細胞はどのような性状を示すか、(3)増殖系肝細胞を同系ラットに復元した時腫瘍を形成するかどうか等を検討する為に実験を行ったので以下に報告する。

材料及び方法

ラット：——自家繁殖している Donryu 系の生後 60~75日、体重112~180g、4同腹（5、6、7、10匹）計28匹のラットを使用した（表1参照）。

飼料：——0.06%の4 - Dimethylaminoazobenzene (DAB) 又は 3' - Methyl - 4 - dimethylaminoazobenzene (3' - Me - DAB) を含む固型飼料（実験動物中央研究所）を用いた。

培養液：——56℃、30分間で非働化した20%の Bovine serum (BS) 及び 0.4%の Lactalbumin hydrolysate を含む D 塩類 (LD 培地) 又は同様 20%の BS を含む Eagle's minimal essential

medium (MEM) (千葉県血清研究所) を使用した。各々の培養液には抗生物質 (Streptomycin 100 µg/ml, Penicillin-G 100 IU/ml) を用いた。

培養方法：——①静置培養法

対照群、DAB 飼育群及び 3' - Me - DAB 飼育群に分け、一定の期間飼料を投与した後、心穿刺によってラットを失血死させて無菌的に肝臓をとり出した。2本のメスで細かい組織片に細切し、Ca⁺⁺、Mg⁺⁺、free の Phosphate buffered saline (PBS) でよく洗い100 ml のナス型コルベンに入れ、0.2% trypsin を 20 ml 加え、20分間室温でマグネテックスターラー上でゆっくり回す。上清の細胞浮遊部分を採取して800回転/分で10分間遠沈し、沈渣に20%血清を含む培養液20 ml を加えて浮遊させ4℃に保存するこの操作を3回繰り返す。得られた細胞浮遊液を合わせて#150白金メッシュ(池本理化工業株式会社)で濾過した後濾液を遠沈(800回転/分)して上清を棄て、新しい培養液を加え血球計算板を使用して肝実質細胞の生死判別を Erythrosin B で行った。生細胞を最終的に50万/ml になるようにし2~5本の試験管に入れ、5℃の傾斜で静置培養した。静置培養で増殖して来たものは次第に大きな容器(TD-40びん等)で継代した。

②回転培養法

1~2mm²に細切した肝組織片を直接回転培養管のガラス壁に底から約1.5cmの高さに附着させ、軽く乾くのを待って1.5 ml の培養液を入れ回転培養器(8回転/時間)で培養した。

③巡回培養法

Moscona⁵⁾、黒田⁶⁾、智片⁷⁾の方法に従い0.2% trypsin によって各細胞系を単離分散させた後、#150白金メッシュで2回濾過する。800回転/分で遠沈した後20% BS を含む MEM の新しい培養液の中に

Table 1 The result of the cultured liver cell derived from rats fed with and without azo dyes

	Exp. No.	Lot No. *	Sex	Duration of feeding without Azo dyes (days)	Age of rats sacrificed (days)	Alteration of weight (grams)			
						Before	After		
Control	41	1	m	5	80	134	178		
	42	4	m	10	70	160	210		
	43	2	f	20	83	132	186		
	44	3	m	30	92	180	290		
	45	4	f	42	102	124	215		
	46	1	m	62	127	138	245		
	Exp. No.	Lot No. *	Sex	Duration of Azo dyes fed (days)	Age (days)	Total amount of Azo dyes (grams)	Alteration of weight (grams)		Designation of cell lines established
							Before	After	
DAB	1	1	m	5	80	0.07	156	210	dRLN- 4 dRLN- 9
	7	1	f	5	80	0.03	120	148	
	2	1	m	10	75	0.11	148	178	
	3	1	m	20	85	0.18	138	172	
	8	3	f	20	82	0.14	124	148	
	4	1	m	30	95	0.21	142	140	
	9	1	f	33	98	0.26	114	150	dRLN- 6
	5	1	m	42	107	0.36	126	195	
	10	3	f	56	118	0.41	124	160	
	6	1	m	62	127	0.56	148	185	
3'-Me-DAB	21	2	m	5	79	0.08	164	210	3'-mRLN- 30 3'-mRLN- 31
	27	2	f	5	79	0.04	128	148	
	22	4	m	10	71	0.08	152	170	
	28	4	f	10	71	0.05	112	120	
	23	4	m	20	81	0.17	150	180	
	26	2	m	20	84	0.12	152	160	
	29	2	f	20	84	0.14	124	142	
	24	3	m	32	95	0.26	178	200	
	32	3	m	35	98	0.21	166	120	
	25	4	m	41	102	0.33	140	180	
	30	4	f	55	116	0.43	120	160	
	31	2	f	61	125	0.45	126	155	

*

Lot 1 : The litter of 10 rats born in June 1

Lot 2 : The litter of 6 rats born in June 3

Lot 3 : The litter of 5 rats born in June 4

Lot 4 : The litter of 7 rats born in June 6

Table 2 Effects of cell proliferation in the roller tube culture of liver tissues from rats fed with and without azo dyes.

	Duration of feeding with and without azo dyes (days)	Duration of observation (days)	Induction of cell proliferation
Control	5	47	0/3
	10	12	0/4
	30	32	0/4
	42	38	0/4
	62	72	0/4
DAB	5	46	0/3
	10	60	0/2
	30	39	0/4
	33	66	0/4
	42	56	0/4
	56	43	0/4
3'-Me-DAB	62	72	0/5
	5	83	0/4
	10	51	0/4
	20	78	0/4
	32	66	0/4
	41	56	0/3
	55	78	0/4
61	72	0/4	

3×10⁶/3ml に浮遊させ25 ml Erlenmayer flask に入れ, gyratory shaker(New Brunswick Scientific Co.) で70回転/分, 37℃の条件で3日間培養を行った。細胞集塊は maximum slide にのせ顕微鏡下で測定した。

培養細胞の形態：——生鮮材料を小角びんを使用して位相差顕微鏡をもって観察した。固定標本は短冊培養により培養細胞を増殖させた後, ギムザ染色及び Periodic acid Schiff(PAS)染色を行った。

染色体の観察法：——Colchicine は培養液中で 1γ/ml の濃度となるようにして1~4時間処理した。処理後0.2% trypsin で分離し1000回転, 5分の遠沈を行って上清を棄て1% Sodium citrate を加え 37℃で20分間作用させた後, Rathfels⁹⁾ Moorhead⁸⁾ 牧野¹⁰⁾などの air-drying 法に従ってギムザ染色した。各染色体のスケッチを行い50個の写真撮影を行

った。

培養細胞のラットへの復元実験：——TD-40びん中に増殖した各培養細胞は0.2% trypsin で分離した後, 毎分1000回転の遠沈を行って集めた。腹腔内及び皮下接種には各々0.1 cc の等張溶液中に2~10×10⁶個の細胞数が含まれるよう調整した。復元動物は Donryu 系の生後24時間以内の新生児を使用した。接種した新生児は20℃-25℃で飼育し, 出来る限り長時間(最長721日間)観察した。復元動物に腫瘍が形成された時には, 多くの場合腫瘍死するまで放置し生存日数を記録した。又腫瘍は病理組織学的検索を行うと共に, 一部は再培養を行った。

α-fetoprotein(AFP)の測定：——細胞存在下の培養液中の AFP の測定は Radioimmunoassay (RIA) 法によった。測定は北海道大学第一生化学の渡部博之先生にお願いした。

結 果

1) 培養細胞の系図

表 2 に示したように回転培養では観察期間12~83日間では対照群, アゾ色素飼育群いずれからも, 増殖肝細胞は得られなかった. しかし0.2% trypsin で分散して開放系又は閉鎖系で培養した場合には対照群では肝上皮細胞の増殖は困難であったが, アゾ色素飼育群では増殖細胞を得ることが出来た. その内, 表 1 に示したように5系の細胞株が樹立された. 5系は DAB 飼育30日, 33日, 62日, 及び 3'-Me-DAB 飼育55日, 61日より得られた細胞株であり各々 dRLN-4, dRLN-9, dRLN-6, 3'-mRLN-30 及び 3'-mRLN-31 と名付けられた. 5系については図 1 に示す如く, 総培養日数188日から341日の間に種々の検索を行った.

2) 各培養細胞株の形態 (図 2 参照)

dRLN-4 :

①培養日数164日 (位相差) (写真1)

細胞はコロニーを形成して増殖し細胞数の増加と共にシートを形成する. 核は一般に円形で1個ないし2個の核仁が認められ細胞質は楕円形で密着すると多角形となり大きさは比較的揃っており, 多形性及び異型性は少ない.

②培養日数156日 (ギムザ染色) (写真2)

細胞はシートを形成, 核は楕円形でほとんど均一で異型性は認められない. 細胞質は一般には類円形であるが細胞の密着した部分では多角形を示す.

dRLN-9 :

③培養日数146日 (位相差) (写真3)

細胞は全く敷石状にシートを形成して密着し, 核は一般に円形を示す.

④培養日数148日 (ギムザ染色) (写真4)

細胞はコロニーを形成して増殖している. 核は一般に円形で異型性は余り強くない. 核仁が比較的明瞭と

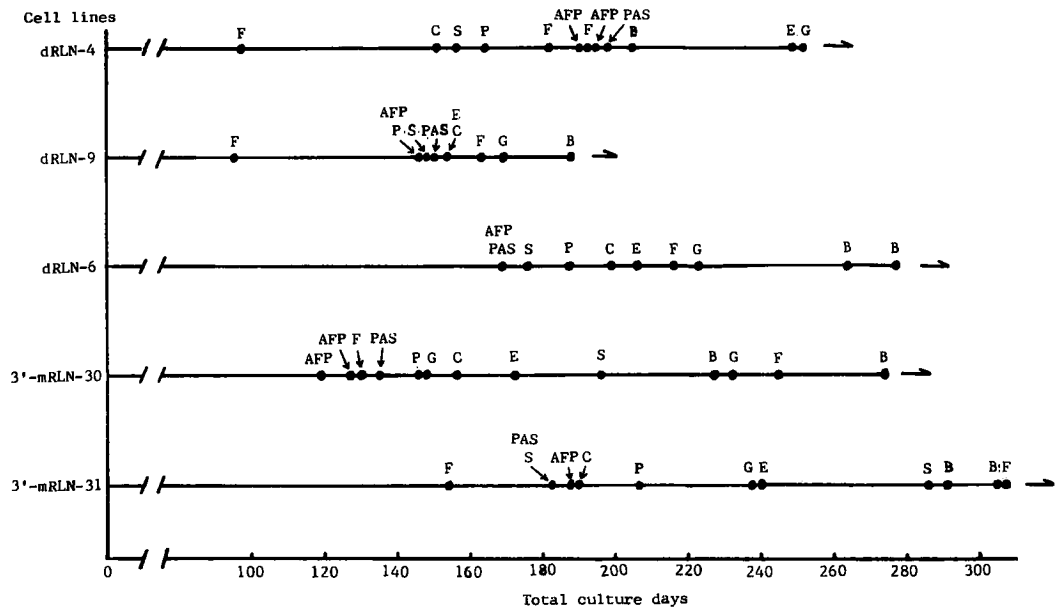


Fig. 1. Culture histories in diagram of cell lines derived from rat liver fed by azo dyes.

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| F: Frozen for storing | P: Phase contrast microscopy |
| G: Gyrotory culture | C: Chromosome analysis |
| S: Giemsa staining | AFP: α -Fetoprotein bioassay |
| PAS: Periodic-acid-Schiff staining | E: Enzyme bioassay |
| B: Back-transplantation | |

なっている。一般に dRLN-9の細胞は dRLN-4に類似するがやや大型である。

dRLN-6 :

⑤培養日数187日 (位相差) (写真5)

コロニーの辺縁はやや不規則であり、細胞の形態に

も軽度の異型性が見られる。しかし核は比較的揃っており円形、核仁はより明瞭化している。

⑥培養日数176日 (ギムザ染色) (写真6)

⑤とほぼ同じ形態を示す。

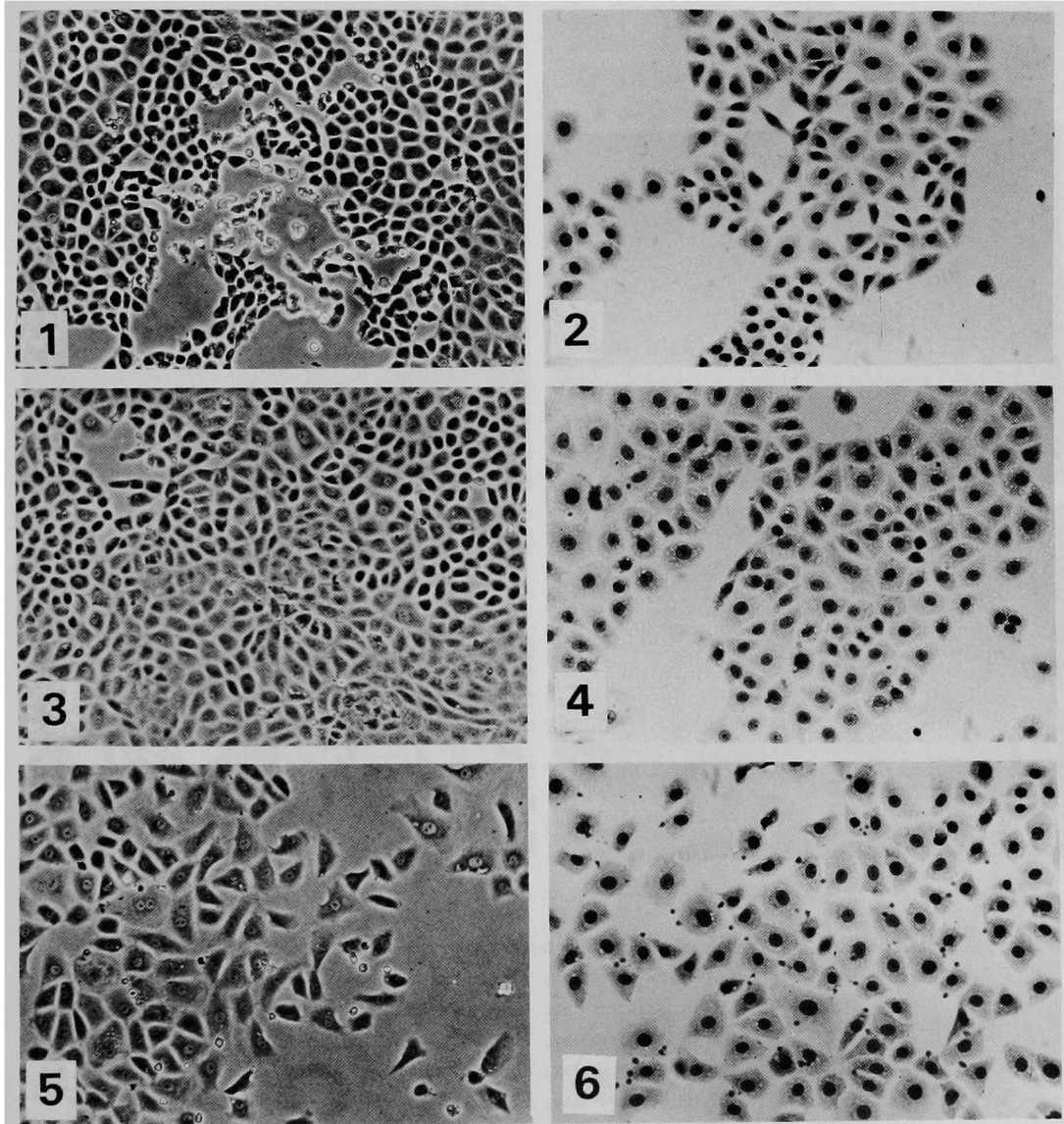


Fig. 2 a. The cultured liver cells derived from rats fed by DAB.

3'-mRLN-30:

⑦培養日数146日(位相差)(写真7)

細胞は船帆状ないし紡錘形で単層のシートを形成せず比較的単離して見られる。細胞質の両端は細長い突起に分れ先端はやや広がっている。核は楕円形で大小不同が見られる。

⑧培養日数196日(ギムザ染色)(写真8)

細胞質は筈星状となり全面に突起を有しシート形成は見られない。

3'-mRLN-31:

⑨培養日数206日(位相差)(写真9)

細胞は船帆状ないし紡錘形を呈し互に網眼を形成する。細胞質の突起も著明である。核は一般に円形ないし楕円形を示し大小不同である。細胞は異型性及び多形性が増加している。核仁は明瞭で数個存在する。

⑩培養日数286日(ギムザ染色)(写真10)

⑧とほぼ同じ形態を示す。

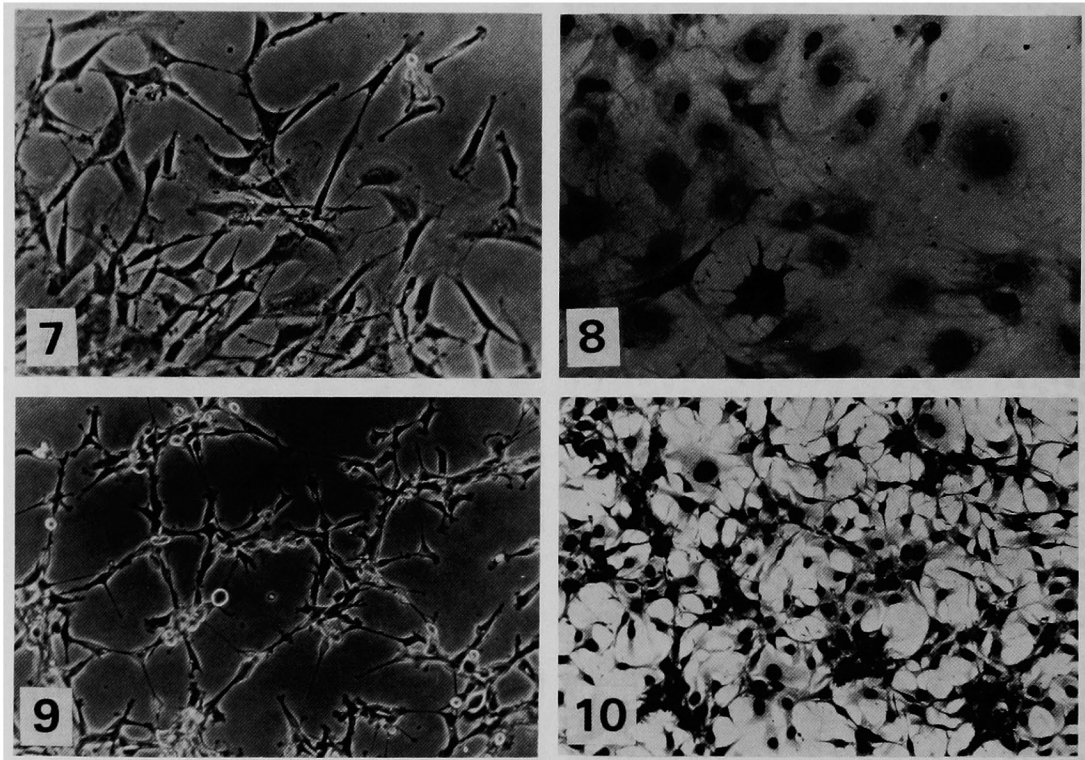


Fig.2b. The cultured liver cells derived from rats fed by 3'-Me-DAB.

1. dRLN-4, 164 th culture day, Phase contrast microscopy $\times 100$.
2. dRLN-4, 156 th culture day, Giemsa staining $\times 200$.
3. dRLN-9, 146 th culture day, Phase contrast microscopy $\times 100$.
4. dRLN-9, 148 th culture day, Giemsa staining $\times 200$
5. dRLN-6, 187 th culture day, Phase contrast microscopy $\times 100$.
6. dRLN-6, 176 th culture day, Giemsa staining $\times 200$.
7. 3'-mRLN-30, 146 th culture day, Phase contrast microscopy $\times 100$.
8. 3'-mRLN-30, 196 th culture day, Giemsa staining $\times 200$,
9. 3'-mRLN-31, 206 th culture day, Phase contrast microscopy $\times 100$,
10. 3'-mRLN-31, 286 th culture day, Giemsa staining $\times 200$.

PAS 染色では3'-Me-DAB 群の株細胞の方がDAB 群のそれよりかなり強く反応した。

3) 細胞集塊形成能の比較

① Moscona⁹⁾の方法に従って培養細胞を0.2% trypsin によって分離し、培養液と共に Erlenmayer flask に入れて旋回培養し細胞集塊を形成させた。旋回培養開始後の各細胞株の細胞集塊の大きさ及び分布は図3に示してある。集塊の平均直径は dRLN-4は0.041 mm, dRLN-9は0.042 mm, dRLN-6は0.061 mm, 3'-mRLN-30は0.238 mm, 3'-mRLN-31は2.5mmであった。3'-Me-DAB 群はDAB 群に比べて極めて大きな集塊を形成した。DAB 群では2カ月飼育の方が1カ月飼育より樹立された株細胞に比して大きな集塊を形成した。

②各細胞株の細胞集塊の形態(図4参照)

dRLN-4:培養日数252日, dRLN-9: 培養日数169日, dRLN-6: 培養日数223日目の細胞株を使用した。DAB 飼育に属するいずれの細胞株も10~20個前後の細胞からなる集塊を作り、集塊の辺縁には凸凹が見られる(写真1, 2, 3)。

3'-mRLN-30: 培養日数232日, 3'-mRLN-31: 培養日数237日目の細胞株を使用した。3'-Me-DAB 群に属する2系ではDAB 群に比して極めて大きな集塊を形成し、辺縁は比較的平滑であった。(写真4, 5)

4) 各培養細胞株のAFPの測定

表3に示したようにRIA法で測定したAFPは2日間の培養液で測定した結果、ml 当り dRLN-4では12.8倍濃縮で65 ng/ml, dRLN-9では10倍濃縮で258 ng/ml, dRLN-6では8.3倍濃縮で65 ng/ml, 3'-mRLN-30では10倍濃縮で303 ng/ml, 3'-mRLN-31では平均11倍濃縮で58 ng/mlであった。

5) 各培養細胞株の染色体数

5細胞株の染色体数は培養日数151日から199日の間に観察された。図5に示す如く、5カ月前後における染色体数はDAB 群の3つの細胞株は75%前後の2倍体の染色体数を細胞集団中に維持していたが、3'-Me-DAB 群では2倍体の染色体数を有するものは殆んど認められなかった。

6) 各培養細胞株の染色体数と分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼのアイソザイムの関係

分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼのアイソザイム¹⁰⁾は表4に示すようにDAB 群ではI型のみが、3'-Me-DAB 群ではIとIII型が見い出された。しかし5細胞株ともII型は認められなかった。染色体との関係では異数体細胞になったもの即ち3'-Me-DAB 群のみにIII型が見い出されている。

7) 各培養細胞株の動物復元実験

表5に示したように樹立された株細胞はDonryu系ラット新生児(生後24時間以内)の腹腔

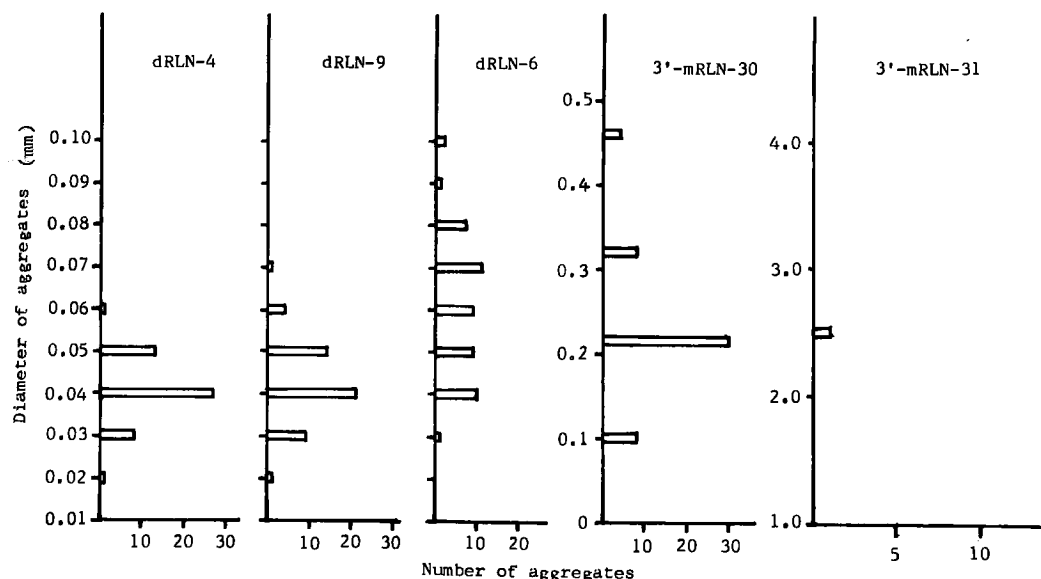


Fig. 3 Comparison of the aggregability of 5 cell lines from rats fed by azo dyes in rotation culture.

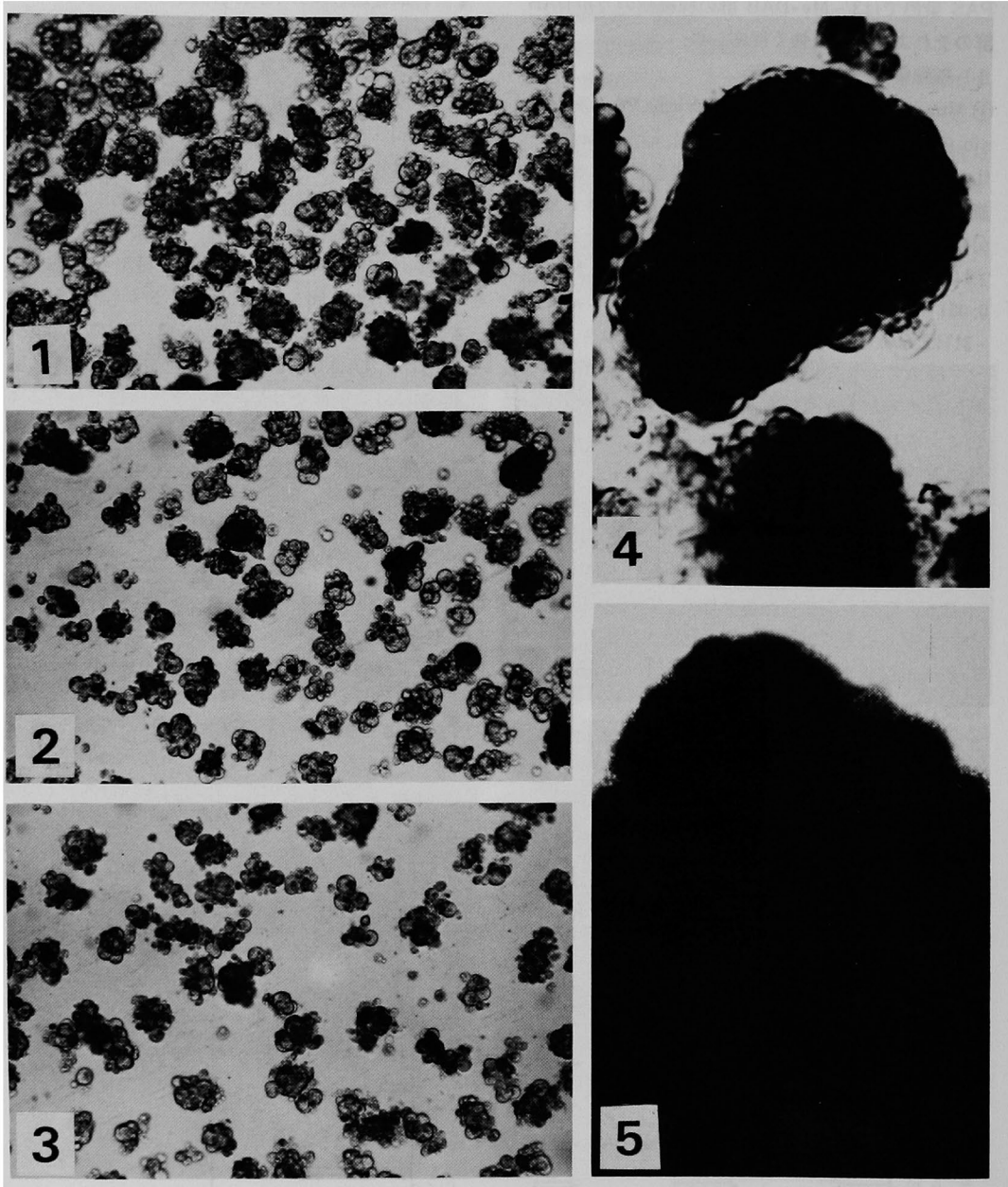


Fig. 4 Aggregates of each cell line obtained on the third day in rotation culture (phase microscopy).

1. dRLN - 4, 252 nd culture day $\times 100$.
2. dRLN - 9, 169 th culture day $\times 100$.
3. dRLN - 6, 223 rd culture day $\times 100$.
4. 3'-mRLN - 30, 147 th culture day $\times 100$.
5. 3'-mRLN - 31, 237 th culture day $\times 40$.

Table 3 Determination of α -fetoprotein in culture medium of liver cell lines from rats fed by azo dyes

Cell line	Total culture days	No. of sub-culture	Concentration rate of culture medium	α -Fetoprotein (ng/ml)
dRLN-4	191	10	× 5.6	(-)
	191	11	× 12.8	65
	194	11	× 8.0	(-)
dRLN-9	121	5	× 1.0	(-)
	123	5	× 1.0	(-)
	125	5	× 1.0	(-)
	146	7	× 1.0	(-)
			× 10.0	258
dRLN-6	167	4	× 8.3	65
	169	3	× 7.1	50
	171	3	× 4.8	(-)
3'-mRLN-30	119	6	× 1.0	50
	121	6	× 1.0	(-)
	124	7	× 1.0	(-)
	127	7	× 1.0	55
			× 10.0	303
3'-mRLN-31	183	7	× 7.8	(-)
	188	8	× 14.0	58
	190	8	× 8.0	58

(-) : Less than 20 ng/ml.

Table 4 Correlation between chromosome change and isozyme pattern of 5 cell lines derived from rat livers fed by azo dyes

Cell line	Period of azo dye feeding (days)	Chromosome			Enzyme *			
		Total culture days	Mode (%)	Diploid cells (%)	Total culture days	I	II	III
dRLN-4	DAB 30	151	42(70)	70	249	+	-	-
dRLN-9	DAB 33	153	42(78)	74	155	+	-	-
dRLN-6	DAB 62	199	42(86)	86	214	+	-	-
3'-mRLN-30	3'-Me-DAB 55	156	44(42)	0	172	+	-	+
3'-mRLN-31	3'-Me-DAB 61	189	43(46)	6	240	+	-	+

* Isozyme pattern of branched-chain amino acid transaminase

Table 5 The results of back-transplantation into newborn rats with 5 cell lines

Cell line	Total culture days	Rat No. tested	Inoculum size (10^6 cells)	Injected site	Survival days at the time of death or sacrifice	Tumor take
dRLN-4	205	2	5	○ ○	59 59	0/2
	205	1	2	○	60	0/1
dRLN-9	188	4	5	○ ○ ○ ○	12 19 19 623	0/4
dRLN-6	254	2	5	○ ○	330 721	0/2
	278	6	5	○ ○ ○ ○ ○ ○	469 474 480 511 539 613	0/6
3'-mRLN-30	227	2	5	● ●	376 521	2/2
	274	2	10	● ●	* 192 308	2/2
	274	3	3~4	● ● ●	* 268 481 544	3/3
3'-mRLN-31	291	2	10	● ●	28 33	2/2
	291	1	6	●	46	1/1
	305	2	10	■ ■	18 22	2/2
	305	4	10	● ● ● ●	18 18 22 22	4/4

○ Intraperitoneal cavity
□ Subcutaneous tissue

● Tumor take
■

* Re-tissue cultures of ascites have been done

内及び皮下に各々、 $2 \sim 10 \times 10^6$ 細胞/ラットで復元接種された。

①腫瘍発生率

dRLN-4, dRLN-9及びdRLN-6は培養日数188~278日の細胞で動物接種されたが、いずれも腫瘍を形成しなかった。dRLN-6では充分の観察日数があるので陰性が確認されるが、dRLN-4及びdRLN-9では後者の観察日数623日例を除いて観察日数が短いので今後更に検討が必要であろう。3'-mRLN-30では総培養日数227~274日の細胞(細胞数 $3 \sim 10 \times 10^6$)で7匹中7匹とも腫瘍を形成した。3'-mRLN-31でも総培養日数291~305日の細胞(細胞数 $6 \sim 10 \times 10^6$)で腹腔内及び脳内接種により9匹中9匹とも腫瘍を形成した。

②腫瘍死ラットの剖検所見

図6. に示す如く、3'-mRLN-30系培養細胞の腹腔内接種によって腫瘍死したラットは大網部、横隔膜、

腸管に粟粒大から大豆大の灰白色の腫瘍の形成を見た。又腹腔壁にも浸潤を認めた。腹腔内には50~100 mlの血性の腹水の貯留を見た(写真2)。横隔膜の病理組織学的検索では上皮性の肝癌細胞巢の形成がみられた(写真4)。総培養日数236日目の培養細胞の病理組織像は核は円形で核膜が比較的明瞭で細胞の大小不同がかなり認められた(写真1)。腹水の再培養14日目の組織像では培養日数236日のそれとよく似た像を呈した(写真3)。他の3'-Me-DAB系の剖検例もほぼ同様の所見を示した。

総括及び考案

1) 当教室の佐藤¹²⁾によってアゾ色素飼育成熟Donryu系のラットの肝の培養が行われ、組織片回転培養では50日ないし60日の飼育(アゾ色素総量約0.6g)を越えないと増殖肝細胞は出現しないことが報告され、又智片¹³⁾らによってアゾ色素長期飼育の肝から増殖

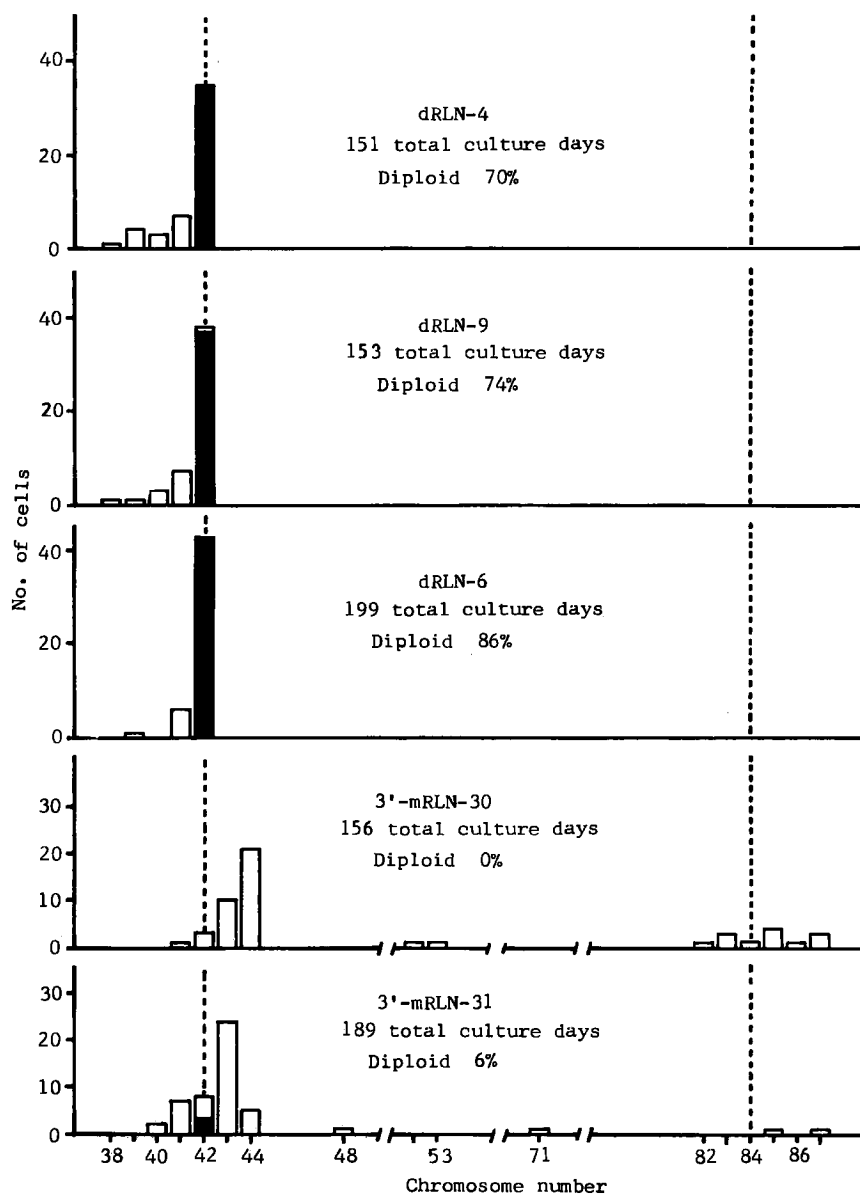


Fig. 5 Distribution of chromosome numbers in 5 cell lines.
Each figure consists of 50 chromosomes in metaphases.

した培養肝細胞系が投与日数に応じて細胞生物学的性状が段階的に異なることが報告されている。今回私はアゾ色素によって5~62日の短期飼育されたラット肝からの組織片回転培養を対照を含めて28例行った。佐藤の報告と同様にこの方法ではいずれの場合も増殖肝細胞系は得られなかった。しかしながら同様の肝組織を0.2% trypsin で分散した後、開放系並びに閉鎖系で培養したものでは増殖肝細胞系を

得ることに成功した。対照系では同様の実験条件下では増殖肝細胞系を得ることが困難であった。この事実はアゾ色素短期飼育によって培養増殖能を有する肝細胞が肝組織中に出現していることを示すもので、将来培養法を更に改良すれば種々の発癌過程にある増殖型肝細胞を定性的かつ定量的に取り出されることを意味しており、アゾ色素発癌機構解明に大きな進歩をもたらしたと言える。今回株化された5

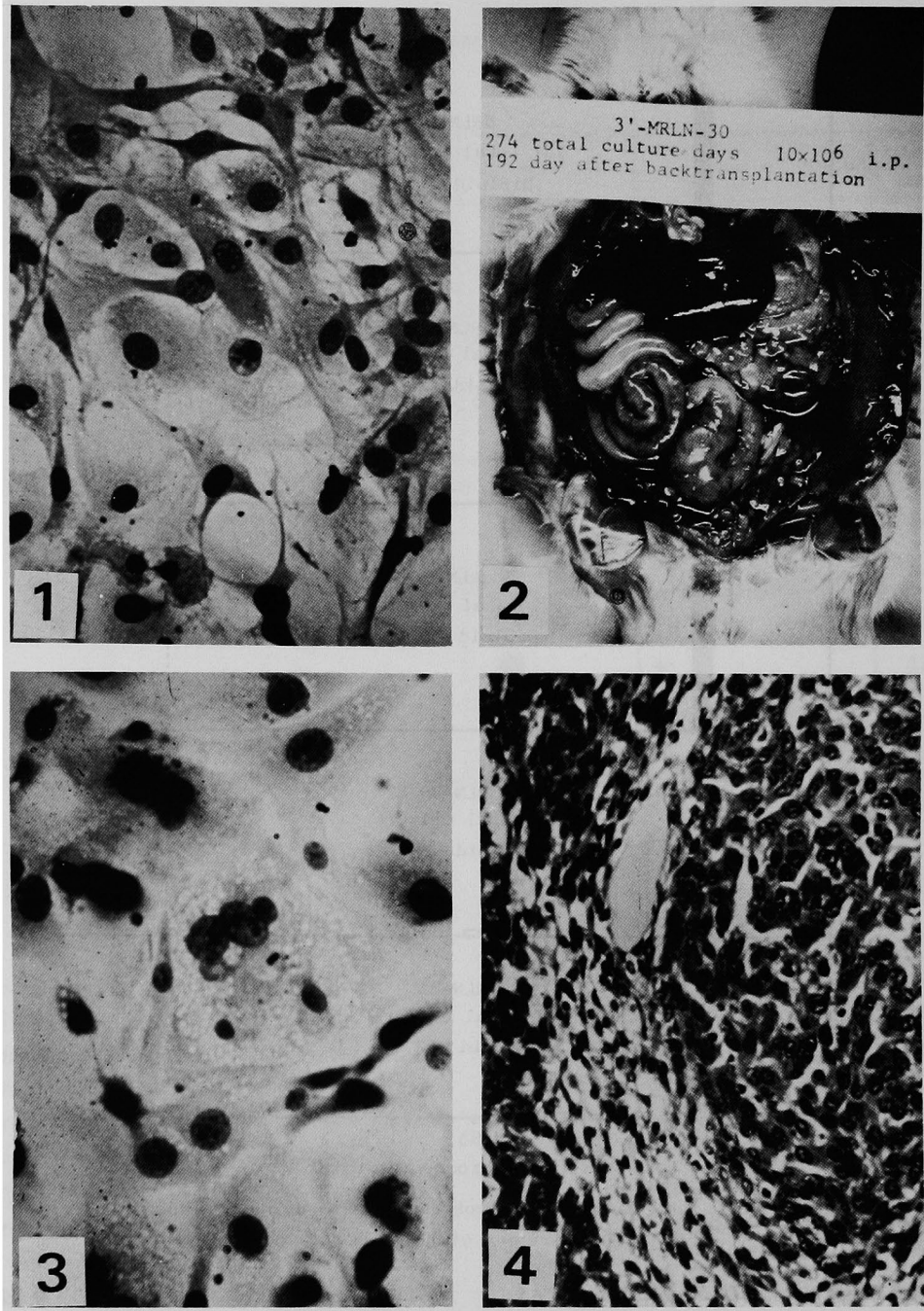


Fig. 6 Pathological findings of a back-transplanted animal.

1. 3'-mRLN-30, cells at the 236 th culture day.
Giemsa staining $\times 200$.
2. The tumor produced by the above cell line 3'-mRLN-30.
3. Recultured ascites cells. Reculture at the 14 th day.
Phase contrast microscopy $\times 200$.
4. Histology of a tumor in the diaphragm. The tumor cells show an epithelial-like character. H.E. staining $\times 200$.

系について大きな特徴は DAB 飼育群と3'-Me-DAB 飼育群との間に形態学的に著明な差があり、又染色体構成にも大きな差があることである。この差は DAB 発癌と3'-Me-DAB 発癌過程に大きな差があるのか、3'-Me-DAB に現われる変化が DAB でも長期に及べば現われるという発癌過程の両者の日数差によるものか、現時点で答えることは難しいが3'-Me-DAB 飼育実験の短期の培養を更に繰り返せば将来解決される問題である。

2) 平井¹⁴⁾らは DAB の発癌過程で DAB 投与7週目において一過性の AFP の血中増量即ち“一次反応”と名付けられる AFP の早期発現を認めたが、小野江¹⁵⁾らは組織学的及び組織化学的検索で上記“一次反応”の消長は oval cell あるいは oval cell が更に変化した小型肝細胞 (renewed hepatocytes) の数の変化に一致するとし AFP 産生担当細胞はこれらの細胞である可能性を主張している。今回得られた5細胞株とも AFP 産生陽性であり肝実質細胞由来であることを示しているが、産生量の間はかなり大きな差が見られる。これらの事実は in vivo における oval cell との関連において興味深い。

3) Moscona⁵⁾の方法に従って培養細胞を集塊形成させその形成能をみた。智片⁷⁾らは DAB 飼育の細胞株を用いてその集塊形成能力とその形態学的変化を明らかにした。その中で飼育期間の長いものから得られた細胞程大きな集塊を形成する傾向にあると述べている。

黒田¹⁶⁾は自然発癌したマウス乳腺細胞や in vivo で viral transformation したヒヨコ胎芽細胞と各々の対照群と比較して悪性細胞は正常細胞に比べて高い集塊形成能を有すると報告している。我々の実験でも DAB 飼育1カ月のものより2カ月のものの方が大きな集塊を形成した。又3'-Me-DAB 群の方が DAB 群より極めて大きな集塊を作成した。このことは動物復元実験において DAB 群は陰性、3'-Me-DAB 群が陽性であることと極めてよく一致する。

4) 分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ・アイソザイムは市原¹¹⁾らにより見いだされた酵素であるが、ネズミでは I 型は広く殆どどの臓器に分布し、II 型は肝のみに存在、III 型は脳に存在している。これらは DEAE-クロマト免疫的方法で区別出来る。市原らと共同で行われた我々の結果¹⁷⁾は表4に示したように Diploid cell が多い DAB 群では I 型のみ、Diploid が消失して Heteroploid になった 3'-Me-DAB 群では I + III 型が現われ、III 型の出現と造腫瘍性獲得との間には密接な関係が存在するよ

うに見える。尚肝細胞特異の II 型はモーリス7316A¹⁸⁾のような腫瘍細胞として保持された場合には in vitro に移されても発現されるが、正常成熟型肝細胞を in vitro に移した場合には II 型を検出できない。このことは in vitro 環境における肝細胞集団の変化による可能性が強いと考えられている。今回の5細胞系にいずれも II 型が出現を見ないことは培養による Phenotype の消失か、in vivo で起こった細胞形質転換なのか不明であるが将来に残された興味ある問題である。

5) 培養細胞の腫瘍形成能をみる為に培養細胞と同種同系の動物に培養細胞を復元接種した。免疫学的寛容を得る為に生後24時間以内のラットに接種し出来る限り長期の観察によって腫瘍形成能の判定が行われた。DAB 飼育群3細胞系の内2系は観察日数が短かいので陰性である確証が得られないが、1系 dRLN-6 は実験動物数、観察日数共に多く、且つ長いので造腫瘍性はないと考えてさし仕えないであろう。それに反して3'-Me-DAB 群では2系とも陽性であり確実に造腫瘍性をもっていると言える。後者については200~300日の培養日数の時点で復元されているので in vitro での自然悪性化機構¹⁹⁾がどの程度加わっているのか、現時点では判然としなないが、一般に in vitro の悪性化は早いものでも400日を越えること、又 DAB 例でな同様の培養日数で造腫瘍性がないことから、3'-Me-DAB 群では飼育短期の頃から悪性化ないし前癌の細胞が出現していると考えた方がよいように思われる。復元腫瘍の組織像では未分化な肝細胞癌の像を呈した。

結 論

1) アゾ色素短期飼育ラット肝組織から5系の培養細胞株が樹立された。

2) 形態学的に DAB 群と3'-Me-DAB 群とは異っており前者は多角形でシート状に増殖するが、後者は類円形ないし船帆状を呈し明瞭なシートを形成しない。

3) 培養150日前後での染色体検査で DAB 群では染色体数は Diploid のものが多いが、3'-Me-DAB 群では Diploid のものは極めて少なかった。

4) 5系の培養細胞株を Moscona の方法による集塊形成能で比較すると3'-Me-DAB 群の方は DAB 群より極めて大きな集塊を形成した。

5) 分岐鎖トランスアミナーゼは3'-Me-DAB 群の細胞に I + III 型が見い出され、DAB 群では I 型の

みであった。

6) 培養 Medium (2日間) のAFPの測定では計算値 ml 当り 5~50 ng の値を示した。

7) 腫瘍形成能の判定に同系ラットの腹腔内及び皮下に培養細胞を接種した。DAB 群の3系は腫瘍を形成しなかったが、3'-Me-DAB 群の2系は18例中全例腫瘍を形成した。腫瘍死した復元動物の腹水を

再培養しその細胞の組織像をみると接種時の形態と極めて類似していた。

稿を終るにのぞみ折田薫三教授並びに佐藤二郎教授の御指導並びに御校閲に感謝いたしますと共に御激励いただいた山本泰久博士並びに林健二博士に感謝いたします。材料提供並びに技術的援助を受けた宮野恵子技官に深謝いたします。

文 献

- 1) 吉田富三：O-Amidoazotoluol の飼与による肝細胞癌 (Hepatom) の人工的発生。東京医学会雑誌，46：2398-2400, 1932.
- 2) Sato, H. and Aruji, T. : Studies on the ascites hepatoma. *Gann*, 43 : 254-257, 1952.
- 3) 吉田富三, 井坂英彦, 中村久世, 小田島成和, 佐藤博：腹水肝癌の研究。日病会誌，44：407-426, 1955.
- 4) 吉田富三：腹水肝癌の研究。東京医学雑誌，68：717-747, 1960.
- 5) Moscona, A. : Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cells. A quantifiable approach to cell interactions in vitro, *Exp. Cell. Res.*, 22 : 455-475, 1961.
- 6) Kuroda, Y. : Aggregate-forming activity of rat hepatoma cells induced by DAB. *Ann. Rep. Nat. Inst. Genet. Jap.*, 19 : 18-19, 1968.
- 7) Chikata, E. : Aggregate-forming ability of liver cell lines derived from DAB-fed rats in rotation culture. *Acta Med. Okayama*, 25 : 57-64, 1971.
- 8) 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.
- 9) Moorhead, P.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. and Hungerford, D.A. : Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 20 : 613-616, 1960.
- 10) 牧野佐二郎：染色体による臨床と診断。Medical Culture, 6 : 1042-1058, 1964.
- 11) 小川紘一, 市原明：肝癌及び肝癌発生過程における分岐鎖アミノ酸トランスアミナーゼ・アイソザイムパターンの変化。日癌記事，29 : 23, 1970.
- 12) 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.
- 13) Chikata, E. : Morphology and growth patterns of colonies of liver cell lines derived from rats fed with 4-dimethylaminoazobenzene. *Acta Med. Okayama*, 24 : 559-571, 1970.
- 14) 平井秀松： α -フェトプロテインの基礎的研究。医学のあゆみ，86 : 1079-1091, 1973.
- 15) 小野江為則, 布旋祐輔：アゾ色素肝癌の発生。細胞，2 : 25-34, 1970.
- 16) Kuroda, Y. : Characteristic and selective aggregate-forming activity of neoplastic cells in culture. *Gann*, 59 : 281-288, 1968.
- 17) 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.
- 18) Tomita, Y., Ichihara, A., Masuji, H., and Sato, J. : Isozyme patterns of branched-chain amino acid transaminase in cultured Morris hepatoma 7316 A. *Gann*, 67 : 465-467, 1976.
- 19) 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.

**On the properties of five cell lines
established from the liver of rats fed on azo dyes**

Teruki HOSHIKA

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Kunzo Orita and Prof. Jiro Sato)

In our Department, various attempts have been made in order to elucidate the mechanism of carcinogenesis by azo dyes using tissue culture system. In the present experiments, a total of 28 Donryu rats were fed with 4-dimethyl-aminoazobenzene (DAB) or 3'-methyl-4-dimethyl-aminoazobenzene (3'-Me-DAB) for 5 — 62 days. Five cell lines have been established from the liver tissues of rats fed by either of the above substance. Subsequently, several experiments were made to investigate the histological characteristics of the established cell lines. The results are summarized as follows:

1) Morphological features differed in the cell lines derived from rats fed by DAB and those from rats fed by 3'-Me-DAB. The former exhibited polygonal shape and formed pavement-like sheets. On the other hand, the latter showed oval shape, but did not form pavement-like sheets.

2) In chromosome analysis, the cell lines derived from rats fed by DAB exhibited the diploid number in contrast to those from rats fed by 3'-Me-DAB.

3) In rotation culture, 5 cell lines formed aggregates. The aggregates of the cell lines derived from rats fed by 3'-Me-DAB were much larger in size than those from rats fed by DAB.

4) Concerning branched-chain amino acid transaminase, cultured cells derived from rats fed by 3'-Me-DAB contained the isozymes I and III, whereas cells from rats fed by DAB contained only the isozyme I.

5) With radioimmunoassay alpha-fetoprotein level in culture medium of 5 cell lines ranged between 5 to 50 ng/ml.

6) To examine tumor-producing capacity of 5 cell lines, the cells were inoculated into rats intraperitoneally or subcutaneously. All cell lines induced by 3'-Me-DAB gave rise to tumors, but 3 cell lines induced by DAB did not produce tumors. The recultured cells derived from ascites of rats that died of tumors were morphologically similar to the cells before inoculation.