

乳癌嫌発系 AKR マウスに自然 発生した乳癌に関する研究

第 2 編

乳癌の組織培養細胞の形態学的研究

岡山大学第二内科（主任：平木潔教授）

原 田 英 雄

[昭和48年8月1日受稿]

Synopsis

本研究は、乳癌嫌発系の AKR マウスに自然発生した乳癌およびその動物継代移植腫瘍の長期組織培養に関するものである。

第4代継代移植腫瘍（腺癌）からはA-419系、A-319系の長期培養細胞株を、第26代継代移植腫瘍（肉腫像を呈す）からはA-600系の長期培養細胞株を、A-419系初代培養細胞をAKRマウスに戻し移植して生じた腫瘍（組織学的に腺癌像を呈した）からはA-162系の長期培養細胞株を得た。これら4系の培養細胞は、材料として用いた腫瘍の組織像が、あるいは腺癌、あるいは肉腫と異った像を示したにもかかわらず同様の細胞形態、細胞組成および増殖速度を示した。即ち上皮細胞様細胞と線維芽細胞様細胞の両者が混在して認められた。

A-419系およびA-319系の初期培養細胞をAKRマウスおよびC₃Hfマウスに戻し移植すると腺癌が生じ、A-419系、A-319系の長期培養細胞およびA-600系培養細胞を上記系統のマウスに戻し移植すると肉腫が生じた。これらの結果をもとに、乳癌の組織培養中に起る肉腫様変化の機構について考察を加えた。

緒 言

第1編の論文においては乳癌嫌発系AKRマウスの自然発生乳癌およびその動物継代移植腫瘍の電子顕微鏡による観察結果を報告し、AKRマウスも乳癌好発系マウスと同様、Bittner agentのCarrierであり、ホルモンおよびその他の環境条件さえ揃えば増殖して乳癌発生に導き得ることを推論した。

私は更にBittner agentの持続感染を伴う長期培養細胞株の樹立を目的としてAKRマウス乳癌の培養を試み、4系統の細胞株を得ることに成功した。

本論文は、これら培養細胞の形態的研究に関するものである。

材料および方法

第1編において記載したAKRマウスの自然発生乳癌を同系マウスに継代移植して生じた腫瘍の内、

第4代移植腫瘍（組織学的には腺管腺癌）、第26代移植腫瘍（組織学的には既に肉腫様になったもの）、および第4代移植腫瘍を培養に移したのち、その初代培養細胞をAKRマウスに戻し移植して生じた腫瘍組織を材料として用い長期培養細胞の系の樹立を試みた。

細胞の培養にあたっては、まず腫瘍組織を無菌的により出し、鉄で小片に細切したのち0.05%トリプシン液に浸し、5分間静置した後、上清液を1500r.p.mで5分間遠心し得られた細胞を培養瓶に移した。培養液は加熱により非動化した仔牛血清50%を含むMedium 199液を用い、それに100U/mlのペニシリソ、と100μg/mlのストレプトマイシンを加えた。A-419系細胞、A-319系細胞、A-162系細胞の場合は、in vitro 6ヶ月経過した後に培養液を上記と同量の仔牛血清および抗生物質を含むYLE(0.1%のYeastolate、0.5% Lactalbumin hydrolysate in

Earle's saline) 液に変更した。

A-600系細胞の場合は最初から YLE 培養液を用い、同様に仔牛血清および抗生物質を加えた。培養温度は37°Cで試験管および角びんに静置培養を行い、培養液は週2回交換した。増殖した細胞が Monolayer を形成するに到ると、0.05%トリプシン液を5~10分間作用させて細胞を剝離し、1500r.p.m.で5分間遠心して得た細胞に新しい同組成の培養液を加えて新しい培養瓶に分注し、細胞の継代培養を行った。

培養細胞の形態的観察には培養瓶に増殖する状態をそのまま位相差顕微鏡で観察するか、または Leighton tube 中でカバーガラス上に増殖させたものをメタノールで固定し、May-Grünwald-Giemsa 染色を施して観察した。

細胞の増殖速度は Puck¹⁾ の方法を用いて測定した。

培養細胞の動物への戻し移植の実験には、培養細胞 $10^5 \sim 5 \times 10^5$ 個を培養液 0.1 ml に浮遊してそれを AKR および C₃Hf 系新生児マウスの背部皮下組織に注入し、週2回の割で腫瘍の増生を観察した。

結果

第4代動物継代移植腫瘍からは A-419 及び A-319 の2系統の細胞株が樹立され、現在 A-419 は培養42代(750日)、A-319 は培養52代(750日)に至っている。

既に肉腫様組織像を示すに至った第26代動物継代移植腫瘍からは A-600 細胞株が樹立され、現在培養13代(126日)である。

第4代移植腫瘍の初代培養細胞 A-419 系細胞(培養14日)を AKR マウスに戻し移植して生じた腫瘍組織からは A-162 細胞株が樹立され、現在 40代、706日に至っている。

培養細胞を顕微鏡的に観察した結果では A-319 系、A-419 細胞及び A-162 細胞が腺癌組織像を示した腫瘍組織から得られ、A-600 細胞が肉腫像を示した腫瘍組織から得られたと云う相異にも拘らず同様の細胞形態、細胞組成及び増殖速度を示した。図1, 2, 3, 4 の位相差顕微鏡像、図5, 6 の May-Grünwald-Giemsa 染色像に示す如く上皮細胞様細胞と線維芽細胞様細胞の両者が混在して認められた。

上皮細胞様細胞は扁平な多角形細胞が一

層に石疊状に増殖した像を呈し、線維芽細胞様細胞は細長い紡錘形の細胞が増殖する像を呈した。細胞が密に増殖した場合には多層化した増殖像を示した。

これら細胞は、細胞及び核共に様々な大きさを示し、多数の核及び核小体を持つ細胞も認められた。細胞質内には多数の顆粒及び空胞を認めた。

図7は A-419、A-319 細胞の増殖曲線である。縦軸は対数目盛で示している。

図8は A-419 細胞初代培養細胞(培養14日)を新生児 AKR マウスに戻し移植して1ヶ月後に生じた腫瘍の組織像で Dunn²⁾ の分類によるB型の腺癌像を示し、原発乳癌組織像に酷似している。

Fig. 7.

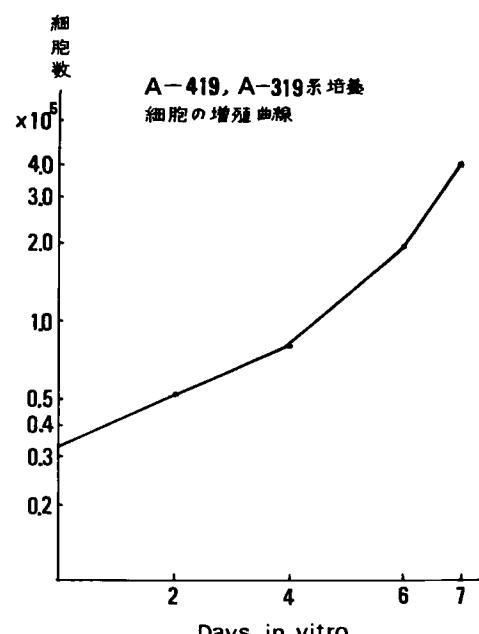


表1 A-319系培養細胞の AKR 新生児マウスの戻し移植による腫瘍形成

移植動物 の Litt- er 番号	移植細 胞の継 代数	移植細 胞の継 代日数	細胞を移植 したマウス の匹数	腫瘍形成を 認めたマウ スの匹数	発生に 要した 日数(月)
1	初代	14	2	2 (A)※	1
2	10	260	4	0	
3	22	478	4	0	
4	22	503	8	0	
5	25	513	9	0	
6	28	531	6	1 (S)※	2
7	29	543	8	0	

※ A : Adenocarcinoma. S : Sarcoma

図9はA-600系初代培養細胞(培養19日)を新生児AKRマウスに戻し移植して、1週間後に生じた小腫瘍の組織像で肉腫像を呈し、第26代動物継代移植腫瘍の組織像に酷似する。

表1, 2はA-319系細胞を新生児AKR及びC₃Hfマウスに戻し移植した場合の成績及び組織像をまとめたものである。

考 按

A-419系細胞、A-319系細胞、A-600系細胞、A-162系細胞がいずれも上皮細胞様細胞のコロニーと線維芽細胞様細胞の混在を示した現象は、Sanford^{3,4)}の報告に見

られるC₃Hfマウス自然発生乳癌の培養細胞株内の幾つかの株に見られた所見及びLasfargues⁵⁾の報告に見られるC57BL/Haagマウス乳腺の培養細胞にBittner agentを含む材料を加えて得た株細胞に見られた所見に類似している。Sanford^{3,4)}の場合この他に純粹に上皮細胞様増殖を示す株も得ているが、私の場合はこのような株を得ることは出来なかった。

A-419系、A-319系の培養早期の細胞を新生児AKR或いはC₃Hfマウスに戻し移植した場合に組織学的にType Bの腺癌像を呈する腫瘍を得、長期培養細胞を戻し移植した場合には組織学的に肉腫像を呈する腫瘍を得たという所見はSanford^{3,4)}の報告に類似する。彼の場合には培養期間5ヶ月を境にしてそれ以前に戻し移植するとB型腺癌が生じ、それ以後に戻し移植すると内腫が生じたと云う。

私の場合、初代培養細胞以後28代細胞まで戻し移植で腫瘍を得られなかつたので、いつからこのような所謂“肉腫様変化”が起つたかを論ずるのは困難である。

乳腺の長期培養細胞を戻し移植した場合、その培養細胞がたとえ上皮細胞様細胞及び線維芽細胞様細胞の両者を含んでいても、生じた腫瘍が肉腫像を呈することはLasfargues⁵⁾の報告にも見られ、Sanford^{3,4)}の報告中に見られる特殊な例(培養第35代/1/2年後の細胞でも戻し移植で腺癌を生じた。)を除けば極普通に認められる現像のようである。

この現象は、前の論文で報告した原発乳癌を動物に継代移植を繰り返しているうちに認められる肉腫様変化と並んで興味ある問題を提起している。

この現象が起る機構としては、動物に継代移植

表2 A-319系培養細胞のC₃Hfマウスへの戻し移植による腫瘍形成

移植動物のLitter番号	移植細胞の継代数	移植細胞の継代日数	細胞を移植したマウスの匹数	腫瘍形成を認めたマウスの匹数	発生に要した日数(月)
1	10	260	4	0	
2	25	504	7	0	
3	25	511	3	0	
4	27	516	5	0	
5	28	522	6	0	
6	31	553	4	3(S)※	2
7	35	564	4	4(S)※	2

※ S : Sarcoma

する間に或いは継代培養をする間に、上皮性の癌細胞が脱分化して形態的に肉腫様に変化したか、あるいは間質組織に存在する線維芽細胞が悪性変化して肉腫細胞となり増殖するに至ったかのいずれかが考えられるが、Sanford^{3,4)}は培養細胞にcloningの方法を用いてこの問題を検討し、場合場合により、その両者のいずれもが原因になりえたと報告している。

私の培養細胞の場合、いずれの機構が原因となつて肉腫様変化が起つたかに関して直接的証拠はないが、初期培養細胞の戻し移植実験で腺癌がえられた後は、同数の培養細胞を移植したにもかかわらず培養28代まで細胞移植が成立せず、そこで一旦移植が成立するとそれ以後移植成功率が増加し、生じた腫瘍が肉腫像を呈したということは、上皮性細胞の移植増殖する能力が減退した後、長期間経過するうちに線維芽細胞が悪性変化して肉腫細胞となり、移植増殖する能力をえて肉腫を形成するに至ったことを示唆して興味ある所見と思われる。勿論継代培養する内に上皮性細胞が脱分化して肉腫細胞にtransformしたという可能性も完全には否定しえず考慮に入れておかねばならないと考えられる。

次にA-319系細胞を戻し移植した場合、AKRマウスのみならずC₃Hfマウスにも腫瘍を形成したという所見は、AKRマウスとC₃Hfマウス間の交叉移植の可能性を示唆するものとして興味ある所見と考える。

そこでAKRマウスに継代移植して生じた腫瘍の組織片を同じ方法でC₃Hfマウスに移植し、生じた腫瘍を更にAKRマウスに戻し移植した所、移植成功率は夫々80% (4/5), 67% (4/6) であった。

次にA-319系細胞を C₃Hf マウスに戻し移植した所成功率は80% (4/5) であった。

この結果はマウス間の組織適合性遺伝子の存在に関する最近の知見^{7,8,9)}に照して興味がある。

マウスには組織適合性因子H-2に11個の allele があり、 AKR マウスと C₃Hf マウスは共通の H-2^K, H-2^{K'} の allele をもっていることが示されている。その他組織適合性因子には H-1 と H-3 があるがそれらは H-2 に比較してはるかに作用が弱いことが判つており、それが故に AKR マウスと C₃Hf マウス間の交叉移植が可能であったと考えられる。

結 語

乳癌発生系の AKR マウスに自然発生した乳癌およびその動物継代移植腫瘍から Bittner agent の持続感染を伴う長期培養細胞株を得る目的で本研究を行った。

第4代継代移植腫瘍（組織学的に Dunn の分類で B 型の腺癌像を示した。）からは A-419 系、A-319 系の長期培養細胞株を、第26代継代移植腫瘍（組織学的に肉腫像を示した。）からは A-600 系の長期培養

細胞株を、A-419 系初代培養細胞を AKR マウスに戻し移植して生じた腫瘍（組織学的に B 型の腺癌像を示した。）からは A-162 系の長期培養細胞株を得た。

これら 4 系の培養細胞は、材料として用いた腫瘍の組織像があるいは腺癌、あるいは肉腫と異った像を示したにもかかわらず同様の細胞形態、細胞組成および増殖速度を示した。即ち上皮細胞様細胞と線維芽細胞様細胞の両者が混在して認められた。

A-419 系および A-319 系の初期培養細胞を AKR マウスおよび C₃Hf マウスに戻し移植すると腺癌が生じ、A-419 系、A-319 系の長期培養細胞および A-600 系培養細胞を上記系統のマウスに戻し移植すると肉腫が生じた。従来、乳癌の組織培養中に起る肉腫様変化の原因として二つの機構が考えられており、1) 癌細胞が肉腫細胞に transform するか、2) 間質細胞が悪性変化するためとされているが、私の培養細胞の場合は後者の機構が考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導を賜りました恩師平木潔教授および三好勇夫講師に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Puck, T.T., Marcus, P.I., and Cieciura, S.: Clonal growth of mammalian cells in vitro. Growth characteristics of colonies from single He La cells with and without a "feeder" layer. *J. Eptl. Med.* **103**: 273-284, 1956.
- 2) Dunn, T.B.: Morphology of mammary tumors in mice. In the physiopathology of Cancer (Homburger, F., ed.) New York, Paul B. Hoeber, Inc., 1953.
- 3) Sanford, K.K., Dunn, T.B., Westfall, B.B., Covalesky, A.B., Dupree, L.T., and Earle, W.R.: Sarcomatous change and maintainance of differentiation in long-term cultures of mouse mammary carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**: 1139-1153, 1961.
- 4) Sanford, K.K., Andervont, H.B., Hobbs, G.L., and Earle, W.R.: Maintenance of the mammary-tumor agent in long-term cultures of mouse mammary carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **26**: 1185-1191, 1961.
- 5) Lasfargues, E.Y., Pillsbury, N., Lasfargues, J.C., and Moore, D.H.: Release of leukemia C particles from murine cell lines infected with bittner virus-containing inocula. *Cancer Res.*, **30**: 167-178, 1970.
- 6) Gorer, P.A., Lyman, S., and Snell, G.D.: Studies on the genetic and antigenic basis of tumor transplantation: Linkage between a histocompatibility gene and "fused" in mice. *Proc. Roy. Soc.*, **135**: 499-505, 1948.
- 7) Allen, S.L.: Linkage relations of the genes histocompatibility-2 and fused tail, brachyury and kinky tail in the mouse, as determined by tumor transplantation. *Genetics*, **40**: 627-650, 1955.

- 8) Allen, S.L.: H-2^k, a tenth allele at the histocompatibility-2 locus in the mouse as determined by tumor transplantation. *Cancer Res.*, **15**: 315-319, 1955.
 - 9) Snell, G.D., Smith, P., and Gablielson, F.: Analysis of the histocompatibility-2 locus in the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.*, **14**: 457-480, 1953.
 - 10) Counce, S., Smith, P., Borth., R., and Snell, G.D.: Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann. Surg.*, **4**: 198-204, 1956.
-

写 真 説 明

Fig. 1 A -419系培養細胞の位相差顕微鏡像。培養 7代, 164日。上皮細胞様細胞。×85。

Fig. 2 A -419系培養細胞の位相差顕微鏡像。培養 7代, 164日。線維芽細胞様細胞。×85。

Fig. 3 A -162系培養細胞の位相差顕微鏡像。培養 18代, 297日。上皮細胞様細胞。×85。

Fig. 4 A -600系培養細胞の位相差顕微鏡像。培養 3代, 20日。上皮細胞様細胞と線維芽細胞様細胞が混在する。×110。

Fig. 5 A -419系培養細胞の May-Grünwald-Giemsa 染色像。培養15代, 317日。上皮細胞様細

胞と線維芽細胞様細胞が混在する。×580。

Fig. 6 A -600系培養細胞の May-Grünwald-Giemsa 染色像。培養3代, 20日。上皮細胞様細胞と線維芽細胞様細胞が混在する。×230。

Fig. 8 A -419系培養細胞、初代14日の細胞を AKR マウスに移植して生じた腫瘍の組織像。Dunn の分類によるB型腺癌の組織像を示す。H-E 染色。×325。

Fig. 9 A -600系培養細胞、初代7日の細胞を AKR マウスに移植して生じた腫瘍の組織像。肉腫様組織像を示す。H-E 染色。×230。

**Studies on Spontaneous Mammary Carcinoma
of Low Cancer Strain AKR Mice**

**II Morphological Studies on Tissue Culture Cells
By**

Hideo Harada

The Second Department of Internal Medicine Okayama University
Medical School (Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Summary

This report is concerned with morphological studies on tissue culture cells derived from a spontaneous mammary carcinoma and its serially transplanted tumors of AKR mice.

Four lines of tissue culture cells were obtained. A-419 and A-319 lines of cells were obtained from the fourth transplant generation of the tumor (adenocarcinoma), A-600 line of cells were obtained from the 26th transplant generation of the tumor (sarcomatous), and A-162 line of cells were from the adenocarcinoma produced by back-transplantation of primary culture cells of A-419 line cells to AKR mice.

These four lines of tissue culture cells showed similar morphology and distribution; mixed growth of both epithelial cells and fibroblastic cells.

Back-transplantation of primary culture cells of A-419 and A-319 lines to AKR mice produced adenocarcinomas, but A-319 line cells of later passages (28th, 29th, 31st, and 35th passage) and A-600 line cells produced sarcomas when transplanted back to AKR and C₅Hf mice.

Two mechanisms have been proposed to explain the sarcomatous transformation; 1) transformation of carcinoma cells to sarcoma cells and 2) malignant change of interstitial connective tissue cells during serial passages of the culture cells. The second mechanism was considered to be most probable in the present case.

原田英雄論文附図

Fig. 1.

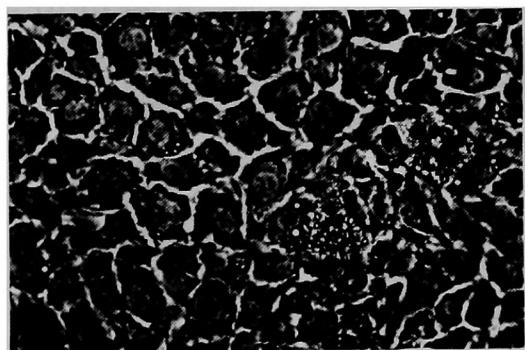


Fig. 2.

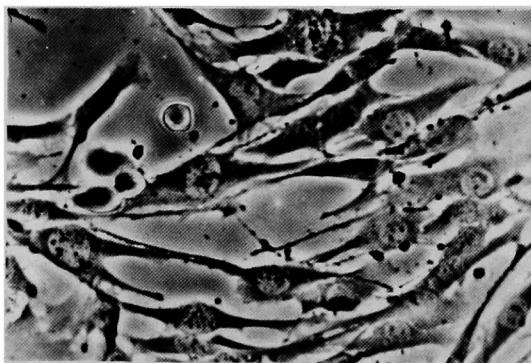


Fig. 3.

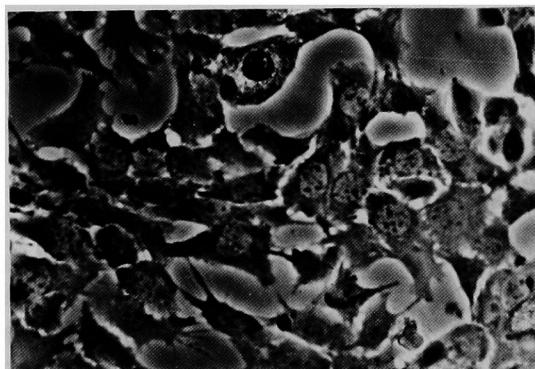
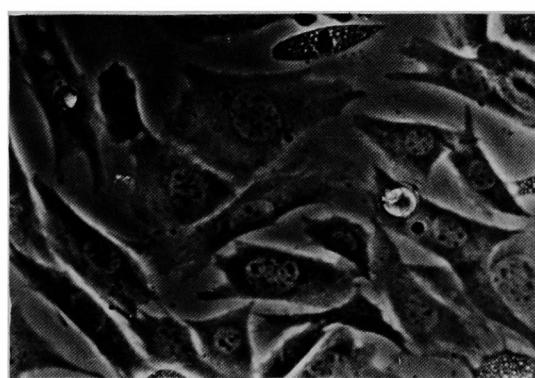


Fig. 4.



原田英雄論文附図

Fig. 5.

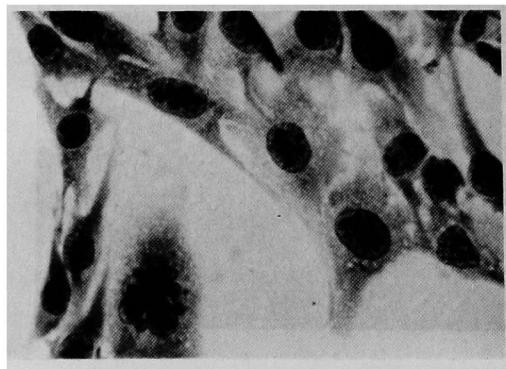


Fig. 6.

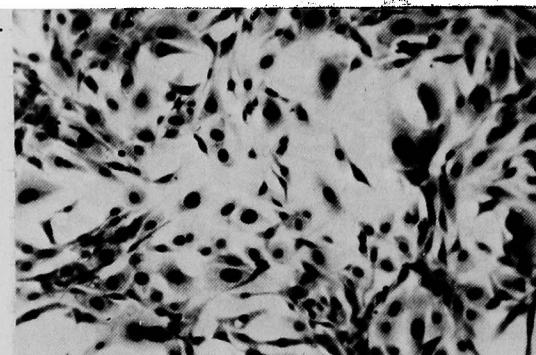


Fig. 8.

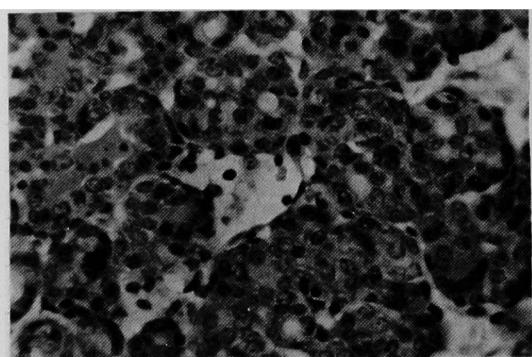


Fig. 9.

