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　3　編

乳癌の組織培養細胞に観察されたウィルス粒子の電子顕微鏡的研究

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，乳癌嫌発系である AKR マウスに自然発生した乳癌の継代移植腫瘍からえられた培養細胞の電子顕微的観察に関するものである．

A-419系細胞，A-319系細胞，A-162系細胞には多数のC型ウィルス粒子を認め，組織培養の継代と共にその粒子の数は次第に減少した．この所見は，これら培養細胞をうるために材料として用いた腫瘍に多数のA型およびB型ウィルス粒子が認められ，C型粒子は殆んど認められなかった所見と対比して興味がある．

一方，A-600系細胞は，少数の未熟B型粒子が認められるのみである第26代継代移植腫瘍からえられたものであるが，少数の成熟B型粒子が観察された．これら培養細胞の Bioassay は白血病についても，乳癌についても陰性の結果であった．これらの所見から AKR マウスにおいては白血病ウィルスと乳癌ウィルスの間には干渉作用が存在することが推論された．

緒　　言

第1編では乳癌嫌発系である AKR マウスに自然発生した乳癌およびその継代移植腫瘍に認められたウィルス粒子の電子顕微鏡的研究について，第2編ではそれら腫瘍組織から得られた長期培養細胞の光学顕微鏡レベルでの形態学的観察および培養細胞の動物への戻し移植実験について報告した．

本論文では第2編において報告した株細胞に認められたウィルス粒子の電子顕微鏡的研究について報告する．

マウス乳癌の組織培養およびその培養細胞中のウィルス粒子の観察は Lasfargues ら[1)2)] Sanford ら[3)] Sykes ら[4)] Miroff ら[5)] その他の研究者によって試みられ，既にかなりの成果を収めている．

Lasfargues[1)2)] らはマウス胎児の皮膚の器管培養を行い，それにR Ⅲマウス乳汁中の乳癌ウィルスを加えてウィルスを増殖させることに成功した．さらにC 57black マウスの乳腺の組織培養に同様な処理を行い，培養細胞が上皮細胞のみの場合にはウィルスの増殖は認められず，間質組織があって始めてウィルスの増殖が認められるとし，脂肪組織の必要性を認めた．

Sanford ら[2)] は C_3H マウスの乳癌を長期組織培養に移し，これら培養細胞の系の中には半年から1年以上にわたって乳癌ウィルスの活性を認めたものがあると報告している．

Sykes ら[3)] は乳癌好発系および嫌発系マウスの乳癌組織を長期培養し，前者では培養細胞に特有な変化が認められ，細胞の形態も大きさも不規則であったが，後者の場合には石畳状に上皮細胞様の増殖を示し，細胞の形態も大きさも一定していたと云う．

さらに電顕的観察で，乳癌好発系マウスの乳癌組織由来の培養細胞では培養18ケ月，第69代継代後もなお乳癌ウィルス粒子を認めたと報告している

Miroff および Feldman[4] は C_3H マウスに自然発生した乳癌を aqent free の（$C_3H \times A$）$F_1 \times C_3H$ マウスに継代移植を行い，Bioassay による検討でも電子顕微鏡的観察でも乳癌ウィルスを証明出来なくなった後に組織培養に移し，その培養細胞に再びA型およびB型ウィルス粒子の出現を認めたと報告している

材料および方法

材料は第2編で詳述した株細胞A-419系，A-319系，A-600系，A-162系細胞である．

電子顕微鏡的観察を行うにあたっては，これら培養細胞の培養液交換後2日目に rubber policeman を用いて細胞を培養瓶からはがし，1500r.p.m.で5分間遠沈し，上清を捨てた後沈渣にベロナール緩衝液加1％オスミウム酸を注いで固定し，10分後にそれをとり出して細切して新しいオスミウム酸液に入れ50分間固定を行った．以後は第1編に述べたと同じ方法を用いて電顕的観察を行った．

Bioassay には，培養細胞A-419系，A-600系，A-162系の培養液を先ず1000r.p.m.15分間遠沈し，その上清を 105,000r.p.m.で3時間冷凍遠沈して得たペレットを C_3Hf および BALB/C 新生児マウスの背部皮下に注入し12ケ月にわたって観察した．

結　　果

A-419系，A-319系培養細胞の初代，14日目のものの電顕像は図1に示す如くで，予期に反して，もとの腫瘍組織（第4代動物継代移植腫瘍）に認められたようなA型およびB型ウィルス粒子は殆んど認めることが出来ず，多数のC型ウィルス粒子が観察された．

このC型粒子は形態的に白血病を発症した AKR マウスのリンパ節に認められる粒子に酷似し，細胞外に，あるいは細胞膜から budding している所が認められた．細胞外に存在する粒子は平均直径約90 mμ で，二重の外膜を有し，中心部に電子密度中等度，平均直径約50 mμ の核様体が観察された．このウィルス粒子にはかなりの大小不同があり，またその外膜にも凹凸が見られた．しかしB型粒子に認められたような外膜の Spike は観察されなかった．これらウィルス粒子は組織培養により継代するに従って次第に減少し（図2），第21代，383日目のA-419系細胞では図3に示す如く少数のC型粒子を認めるのみとなった

このA-419系細胞株の初代14日の細胞を第2編において述べた如く新生児 AKR マウスに戻し移植して1ケ月後に生じた腺癌には多数のA型およびB型ウィルス粒子を認め，C型粒子は観察されなかった．

ところが，この腺癌組織から得られたA-162系細胞では，A-419系の培養細胞の場合と同様に初代14日においては多数のC型ウィルス粒子を認め，B型粒子は殆んど観察されなかった．これらC型粒子の数は組織培養の継代を重ねるに従って減少した．（図4および図5）

一方，A-600系細胞ではA-419系細胞，A-319系細胞と異って初代および3代において，AKR 原発乳癌でみられたと同様の成熟型および未熟型のB型ウィルス粒子が少数細胞間隙に観察された．（図6）

次に培養液中のウィルスの Bioassay の結果は，表1，2にまとめた如く乳癌の発生も白血病の発生も認めず陰性であった．各系培養細胞中に認められたウィルス粒子の消長をまとめたのが図7である．

表1　A-419系細胞，A-600系細胞培養液の無細胞液の C_3Hf マウスにおける Bioassay

接種した材料	接種したマウスの匹数	乳癌発生数	白血病発生数
A-419系第4代細胞培養液から得た pellet	10	0	0
A-600系第3代細胞培養液から得た pellet	10	0	0

Fig. 6．組織培養細胞の由来および観察されたウィルス様粒子

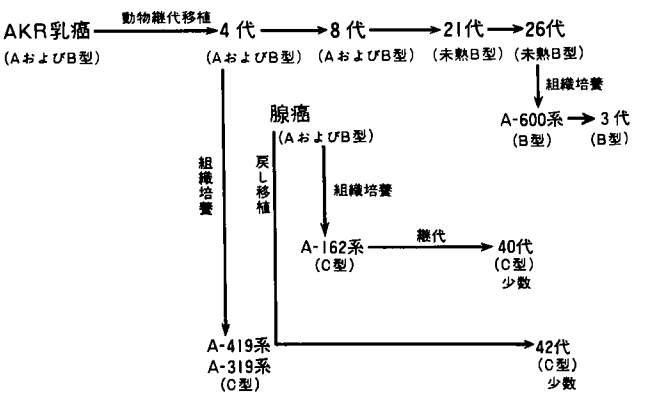


表2 A-162系細胞，A-600系細胞培養液の無細胞液の BALB/c マウスにおける Bioassay.

接種した材料	接種したマウスの匹数	乳癌発生数	白血病発生数
A-162系第4代細胞培養液から得た Pellet	12	0	0
A-600系第4代細胞培養液から得た Pellet	10	0	0

考　　按

乳癌ウィルスの盛んな増殖を伴う培養細胞株を樹立することは，このウィルスの動態および諸種の条件がその動態におよぼす影響を究明する上に極めて重要である．

従って，そのような細胞株の樹立を試みた研究は多く，諸家[1)2)3)4)5)]によりかなりの成果が得られていることは既に緒言の所で述べた．

私も乳癌嫌発系 AKR マウスに自然発生した乳癌に認められた乳癌ウィルスの動態を追求すべく，乳癌ウィルスの盛んな増殖を伴う培養細胞株の樹立を目的として本研究を始めたわけである．

しかしその結果は前述した如くで，A-419系細胞，A-319系細胞，A-162系細胞に認められたウィルスは予期に反して電子顕微鏡的には大多数がC型粒子であった．この場合に認められた粒子が白血病ウィルスであるか，あるいは Hairstone ら[5)]および Dmochowski[7)]らによって報告された変形乳癌ウィルス粒子であるかが問題となるが，教室の小塚ら[8)9)]の報告によると蛍光抗体法による検索では，これらの系の培養細胞は AKR 乳癌ウィルスに対する抗体とは殆んど反応せず，AKR 白血病ウィルスに対する抗体とよく反応したという．この結果からすると，私の培養細胞に認められたC型粒子は白血病ウィルスに相当するものと考えてよいと思われる．

B型ウィルス様粒子を多数認めた乳癌組織を培養した場合，認められる粒子の殆んどがC型粒子に変ったという報告は他に見ないが，類似した現象を記載したものに Mouriquand ら[10)]および Lastargues ら[11)]の報告がある．

Mouriquand ら[10)]は PS 系マウスの乳癌を培養した場合，3日目，5日目ではBおよびC型ウィルス粒子を認め，それ以後はC型粒子のみが認められ，Bioassay では乳癌の発生を見たと報告している．

Lasfargues[11)]らはC 57BL/ Haag マウスの正常乳腺組織の培養細胞に Bittner agent を含む材料をかけて長期培養を行った所，予期に反して電顕的に多数のC型粒子のみが認められ，Gross の白血病ウィルスに対する抗体と反応を示し，Bioassay で白血病の発生を高率に認めたと報告している．

私の培養細胞に多数のC型粒子が認められたという現象そのものは，AKR マウスが白血病好発系であり，白血病ウィルスが正常の乳腺組織中あるいは乳癌組織中で盛んに増殖し得るという Feldman[12)]ら，Hiraki[13)]ら，Matsui[14)]ら，Dmochowski[15)]の報告を考慮すると驚くにあたらない．只，私の AKR マウス乳癌の場合に認められたように，多数のB型粒子を有する乳癌組織を培養に移すと多数のC型粒子を認めるようになり，その初代培養細胞を動物に戻し移植して生じた腺癌には再び多数のB型粒子を認め，その腺癌を培養に移すと再び多数のC型粒子のみを認めるようになるという現象は他に報告がなく興味ある所見である．

この現象が示唆するものは，私の実験系においては，In vivo という条件下ではB型粒子が盛んに増殖し，In vitro という条件下ではC型粒子が盛んに増殖するのであろうこと，および他の報告[16)17)18)]にも散見される如くB型粒子の増殖とC型粒子の増殖の間には干渉作用が存在するのではないかということである．

これに比較して，動物継代移植腫瘍第26代の腫瘍組織から得られた細胞株A-600で認められた粒子がC型でなくB型粒子であったという所見もまた興味がある．Sanford ら[2)]は，細胞レベルで，乳癌を動物に長期継代移植して腺癌組織像が安定維持されている腫瘍を培養に移すと長期にわたって上皮性の増殖を示したと報告しているが，私のA-600系培養細胞の場合，長期にわたって動物継代移植をくり返し，その腫瘍組織でのB型粒子の増殖がくり返されているうちにそれが安定化して，培養に移してもなおB型粒子の増殖を示すに至ったと推論したい．

培養液の Bioassay の結果が乳癌発生についても白血病発生についてもいずれも陰性であったということについては，乳癌ウィルスと白血病ウィルスの間に干渉作用が存在していずれのウィルスの効果も出なかった可能性，および接種したウィルスの量が白血病あるいは乳癌発症に導くに充分でなかった可能性が考えられる．

結局私の実験系では乳癌ウィルスの盛んな増殖を示す培養細胞株の樹立という目的は果せなかったが

AKR マウスにおいては乳癌ウィルスと白血病ウィルスの間に干渉が存在することを示唆する所見を得たので報告する.

結 語

乳癌嫌発系である AKR マウスに自然発生した乳癌の継代移植腫瘍からえられた培養細胞の電子顕微鏡的観察を行った.

A-419系細胞, A-319系細胞, A-162系細胞には多数のC型ウィルス粒子が認められ, 組織培養の継代と共にその粒子の数は次第に減少した. この所見は, これら培養細胞をうるために材料として用いた腫瘍に多数のA型およびB型ウィルス粒子が認められ, C型粒子は殆んど認められなかった所見と対比して興味あるものと考えた.

一方A-600系細胞は, 少数の未熟B型粒子が認められるのみの第26代継代移植腫瘍から得られたものであるが, 少数の成熟B型粒子が観察された.

これら培養細胞液の Bioassay は白血病についても, 乳癌についても陰性の結果であった.

これらの所見から AKR マウスにおいては白血病ウィルスと乳癌ウィルスの間には干渉作用があることが推論された.

(謝 辞)

稿を終るにあたり, 御指導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) Lasfargues, E. Y., Moore, D.H., and Murray, M.R. : Maintainance of the milk factor in culture of mouse mammary epithelium. Cancer Res., **18** : 1281−1285, 1958.

2) Lasfargues, E.Y., Murray, M.R., and Moore, D.H. : Cultivation of the mouse mammary carcinoma virus. Natl. Canc. Inst. Monogr., **4** : 151−166, 1960.

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** : 1139-1183, 1961.

4) Sykes, J.A., Angerman, J., and Dmochowski, L. : Tissue culture studies of mouse mammary tumors. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **3** : 154, 1960.

5) Miroff, G., and Feldman, D.G. : Production and release of virus-like particles by cultures of agent-free ascites cells. J. Natl. Cancer Inst., **31** : 807-825, 1963.

6) Hairstone, M.A., Sheffield, J.B., and Moore, D.H. : Study of B particles in the mammary tumors of different mouse strains. J. Natl. Cancer Inst., **33** : 825-836, 1962.

7) Dmochowski, L., Grey, C.E., Langford, P.L., Williams, W.C., Sykes, J.A., Young, E.L., and Migliore, P.J. : Viral factors in mammary carcinogenesis In : Carcinogenesis, A Broad Critique. The University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, pp 211−256, Baltimore : The Williams & Wilkins Co., 1967.

8) 小塚堯：蛍光抗体法による腫瘍の免疫学的研究, 癌の臨床, **12** : 6, 1966.

9) 小塚堯, 加原雅教, 平木潔：蛍光抗体法による悪性腫瘍の免疫組織化学的研究. —ウィルス性腫瘍に於ける腫瘍抗原の分布並びに免疫家兎に於ける抗体産生細胞について—. 第3回組織化学会総会, 1962年9月.

10) Mouriquand, J., Mouriquand, C., et Viala, C. : Association de particules virales de type B et C dans des cultures de tumeurs mammaires murines. J. de Microscopie, **10** : 155-162, 1971.

11) 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.

12) Feldman, D.G., Gross, L., and Dreyfuss, Y. : Electron microscopic study of the passage A mouse leukemia virus in mammary gland of pregnant, virus-infected, C_3Hf mice. Cancer Res., **23** : 1604-1607, 1963.

13) Hiraki, K., Ota, Z., Suzuki, S., and Muguruma, M. : Electron microscopic study of mammary cancer in a high leukemic strain C 58 mouse. Gann., **56** : 81−83, 1965.
14) 松井敬介：マウス乳癌ウィルスの電子顕微鏡所見. 日本臨床, **21** : 1248, 1963.
15) Dmochowski, L. : Studies on the relationship of leukemogenesis and mammary tumorigenesis. Summary of proceedings : Conference on breast cancer in animals and man. Texas reports on biology and medicine. **29** : 3, 370, 1971.
16) Gross, L. : Mouse mammary carcinoma. In : Oncogenic viruses, Chap. 6, pp 126−152, New York : Pergamon Press, Inc., 1961.
17) Squartin, F. : Relationship between mammary tumor virus and other oncogenic viruses in mouse mammary tumorigenesis. In : Carcinogenesis, A broad Critique. The University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute, pp 257−286, Baltimore : The Williams & Wilkins Co., 1967.
18) Squartin, F., Olivi, M., Bolis, G.B, Ribacchi, R., and Giraldo, G. : Reciprocal interference between mouse mammary tumor virus and leukemia virus. Nature, **214** : 730-743, 1967.

写 真 説 明

Fig. 1 A-419系，初代培養細胞の電子顕微鏡像. 細胞外に多数のC型ウィルス粒子を認める. ×42.000.

Fig. 2 A-419系，第21代継代培養細胞の電子顕微鏡像. 細胞外に少数のC型ウィルス粒子を認める. ×31.500.

Fig. 3 A-162系，第12代継代培養細胞の電子顕微鏡像. 細胞外に少数のC型ウィルス粒子を認める. ×39.600.

Fig. 4 A-162系，第17代継代培養細胞の電子顕微鏡像. 細胞外に認められるC型ウィルス粒子の数は次第に減少する. ×36.000.

Fig. 5 A-600系，第3代継代培養細胞の電子顕微鏡像. 細胞外にB型ウィルス粒子を認める. ×39.600.

Studies on Spontaneous Mammary Carcinoma of Low Cancer Strain AKR Mice

III Electronmicroscopic Studies on Virus Particles in 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 electronmicroscopic studies on tissue culture cells obtained from a spontaneous mammary carcinoma and its serially transplanted tumors of AKR mice.

Numerous type C virus particles were observed in A-419 line, A-319 line, and A-162 line of tissue culture cells. These particles showed a gradual decrease during the serial passages in vitro. This finding is interesting in view of the fact that numerous type A and B particles but no type C particles were observed in the tumors from which those tissue culture cells were derived. In contrast, mature type B particles were observed in A-600 line tissue culture cells, whereas only a few immature type B particles were observed in the 26th transplant generation of the tumor from which A-600 line cells were derived.

The results obtained suggest a possible interference between type A and B particles and type C particles. Bioassays of tissue culture fluids from A-419, A-162, and A-600 lines induced neither leukemia nor mammary carcinoma in test mice.

原田英雄論文附図

Fig. 1.

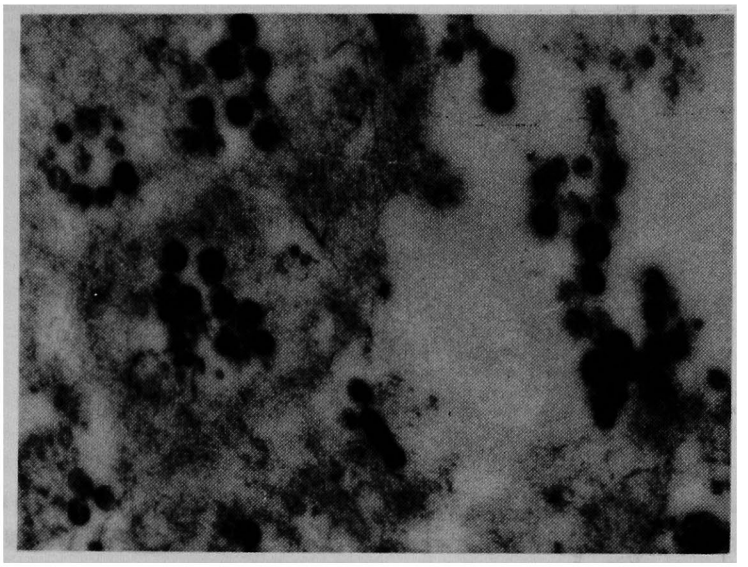


Fig. 2.

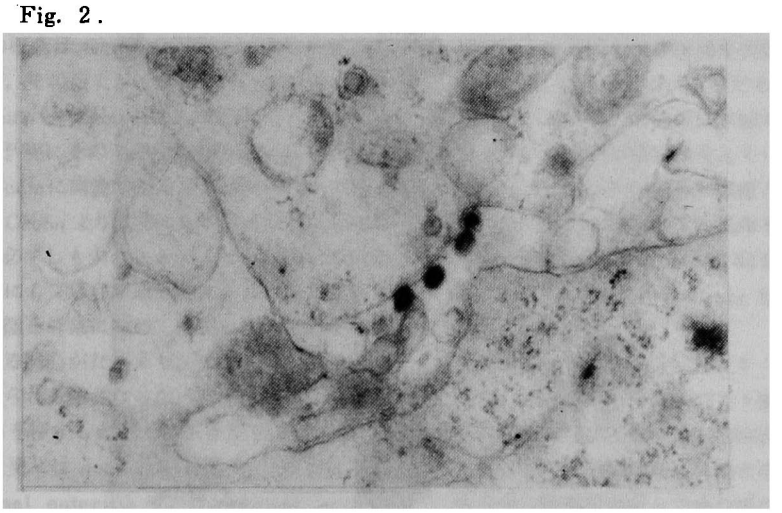
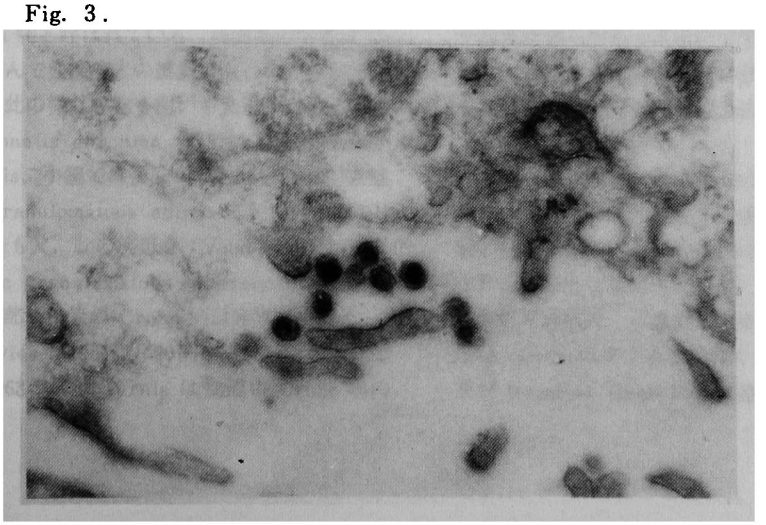


Fig. 3.



原田英雄論文附図

Fig. 4.

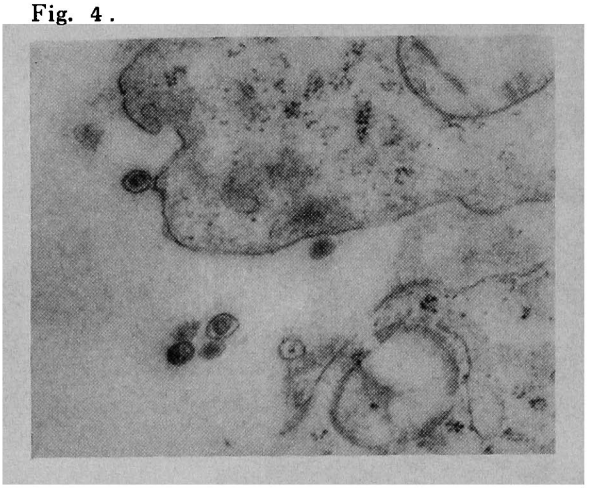
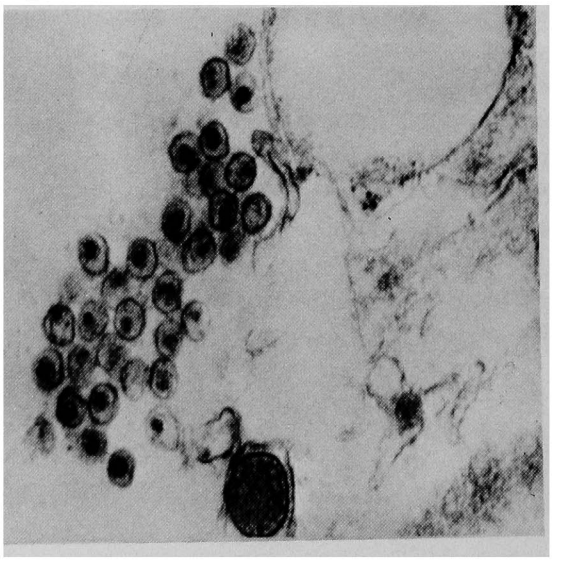



Fig. 5.