

マウス腹腔内に挿入された diffusion chamber 内でのヒトリンパ芽球様株細胞の培養

第 1 編

ヒトリンパ芽球様株細胞の形態学的変化

岡山大学医学部第2内科（主任：平木潔教授）

吉 本 修 子

【昭和49年5月22日受稿】

緒 言

細胞や組織を生体内で培養しようという試みはかなり古くから行われてきているが、生体内培養法が急速な進歩を遂げたのは、毛細孔を多数有する良質のセルローズ質の膜が自由に作られるようになってからである。このセルローズ質の膜で作られた diffusion chamber (DC) は、液体は自由に通過するが細胞は通過しないという特性を有し、Algire 等¹⁾²⁾³⁾⁴⁾ この特性を利用した生体内培養に関して多くの業績を発表して、生体内培養法の進歩に大きく貢献した。Algire 等の報告以来、DCを用いる生体内培養については多くの研究者によって改良、工夫が加えられ現在迄に幾多の知見が加えられてきている⁵⁾⁶⁾

私は DC をマウス腹腔内に挿入して、ヒトリンパ芽球様株細胞の生体内培養を行い、細胞の増殖能と経時的な形態学的変化を追求した。また生体内培養を行った細胞を *in vitro* の培養に戻し、その再培養能についても検討したのでそれらの成績について報告する。

実験材料および実験方法

実験に使用した DC は日本ミリポア・リミテッド製のもので、プラスチックリングと円形極薄フィルター（ミリポア膜）よりなる。リングは非毒性 Plexiglass U-100 で作られ、その大きさは外径 14mm、内径 10mm、厚さ 2mm で、側面に細胞懸濁液を注入する 0.59mm の注入孔がある。ミリポア膜は HA タイプで、孔径 $0.45 \pm 0.02 \mu$ の毛細孔を持ち、直径 14mm、厚さ 150 μ である。又リングの注入孔を塞ぐ為にナイロン糸があり、これをフィルター基質を傷つけない非透過性接着剤で、毒性は無視出来る MF セメント

にて接着する。同様に MF セメントにて、リングとミリポア膜を DC 組立具にて適当に圧迫し付着させる。このようにして出来た DC は内容積 0.157 ml で、ethyleneoxide gas にて滅菌した。

用いた細胞は Hodgkin 病患者リンパ節由来のリンパ芽球様株細胞のクローン株 OUMS-6 C1⁷⁾ である（写真 1）。即ちこの患者は 80 才の男性で剖検による病理診断は Hodgkin 肉芽腫で、1970 年 2 月 18 日にリンパ節の培養を開始し、樹立されたリンパ芽球様株細胞を軟寒天培養法によりクローニングしたものである。

培養は次のような方法で行った。まず培養液交換後 2 日目の細胞浮遊液を 1,000 回転 5 分間遠沈し、上清を捨て必要量の RPMI1640 液を加えて生細胞数がトリパンブルー法により 3×10^5 /ml になるようにした。この細胞懸濁液を無菌的に DC の注入孔より 23 gauge 注射針にて注入し、ナイロン糸に MF セメントをつけて、注入孔を塞いだ。これらの DC はマウスの腹腔内に挿入するまで RPMI1640 液を入れた Petri 皿内に保存された。準備したマウスは 16 匹で、各々エーテル麻酔下に、下腹部を酒性マージニンで消毒し、1.5cm 切開し、DC を腹腔内へ挿入後、2 針縫合を行った。

観察方法に関しては、DC を 3 日目、5 日目、1 週目以後は 1 週間間隔で 8 週目まで経時的に取り出し、ミリポア膜内面のスタンプ標本と内容液の塗沫標本の May-Grünwald-Giemsa 染色を行い、形態学的変化を光顕的に観察した。1,000 個の細胞を数え、リンパ芽球、成熟リンパ球、macrophage 様細胞、mitosis を示す細胞とに分類した。1 週目、2 週目、3 週目には電顕学的観察も行い、同じく 1、2、3 週目には DC をとり出す前に、マウス腹腔内に体

重1gにつき1 μ ci の³H-thymidineを注入し、1時間後にとり出したDC内の細胞の標識指数〔(標識細胞/全細胞)×100〕を求めた。

形態学的に成熟リンパ球は、①細胞の平均直径が7-15 μ で、②核細胞質比が大きく、③染色質は凝集傾向を認め、④核小体を認めないものとし、リンパ芽球と区別した。そして、一般に豊富な細胞質を持ち、軽度好塩基性で、時に網状構造を示し核は偏在性で卵円形又は、腎形で、リンパ球の核より薄く染色され、核小体が時に認められるような細胞をmacrophage様細胞とした。

更に、2週目、3週目、4週目には細胞をin vivoからin vitroに戻し培養する事を試みた。即ち、あらかじめシャーレにRPMI1640液と胎児牛血清を4:1にした培養液3ccを入れておき、その中に無菌的にマウス腹腔内より取り出し一度RPMI1640液で洗ったDCを入れ、ミリポア膜をハサミで切り細胞が外に遊出しやすい状態にして培養を開始した。培養液の交換は週2回行い、やがて活潑に増殖するようになった細胞について、染色体分析を行い、これがヒトの細胞である事を確認した。更に、3日目2週目、4週目、5週目には、DCのミリポア膜をBouin液にて固定し、そのパラフィン切片をhematoxylin-eosin染色し、ミリポア膜の内面と外面の状態を観察した。

上記の実験は2回くりかえして行ない、この2回の実験成績を平均して結果を求めた。

結 果

① 経時的増殖能と形態学的変化

DC注入前のOUMS-6 C1細胞の大部分は、リンパ芽球であり、中に約16%の成熟リンパ球を含み、mitosisを示す細胞は1.3%であった(写真1)。

3日目に取り出した細胞は成熟リンパ球を20.8%含み(写真2a)、他の大部分の細胞がリンパ芽球で、mitosisを示すものは0.4%であった(写真2b)。5日目の細胞も3日目と大差なく、成熟リンパ球は16.2%、mitosisは0.3%の細胞に見られた。2週目になると細胞の空胞化、染色性の変化などの変性傾向が目立ち、mitosisを示す細胞は0.1%であった。この頃には、macrophage様細胞と思われるものが7~8%見られるようになった(写真2c)。3週目の細胞にはやはり変性した細胞がかなりあり、細胞数も減少傾向を示したが、macrophage様細胞の増加が見られ、その割合は42%であった。4週目には

macrophage様細胞と思われるものが著明に増加し、特に膜内面のスタンプ標本において顕著であった。これらの細胞の占める割合は約80%で(写真3)、残りの細胞のほとんどは成熟リンパ球であった。5週目にはmacrophage様細胞がさらに増加し約90%を占めた。6週目には変性細胞がさらに多くなったが、やはりmacrophage様細胞が多く60~70%を占め、残りの細胞は同様にほとんど成熟リンパ球であった。7週目から8週目にかけて細胞数は著明に減少し、残存する細胞にも変性が強くなった。この間のmacrophage様細胞と成熟リンパ球の推移を図1にmitotic indexを図2に示した。

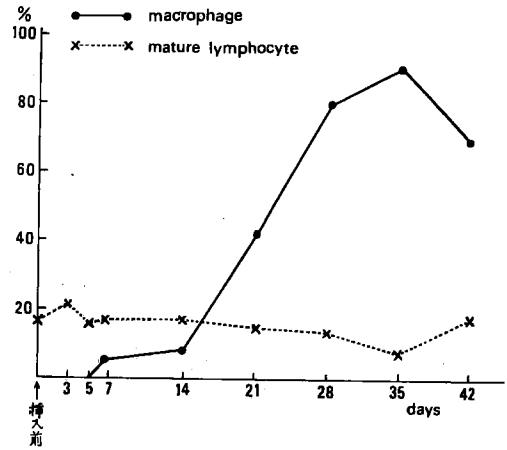


図1 マウス腹腔内に挿入される前の細胞と挿入後のdiffusion chamberにおけるヒトリンパ芽球様株細胞の経時的形態学的変化

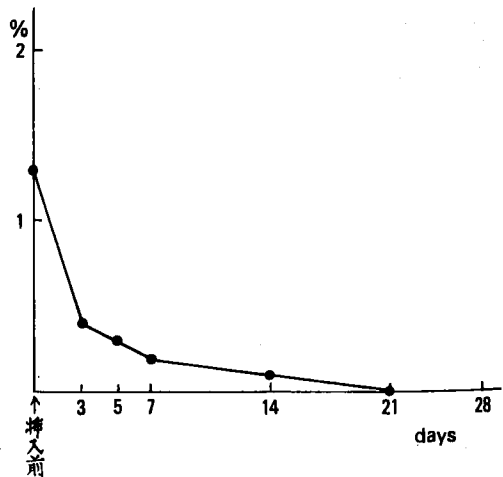


図2 マウス腹腔内に挿入される前の細胞と挿入後のdiffusion chamberにおけるヒトリンパ芽球様株細胞の経時的mitotic index

さらに1週目, 2週目, 3週目に電子顕微鏡による形態学的観察を行ったが, 胞体の空胞化が著明で, 細胞外にフィブリンの沈着を認めた(写真4)。

② ^3H -thymidine による細胞標識

マウス腹腔内に ^3H -thymidine を注入し, 1時間後にとり出したDC内の細胞の autoradiography 標本を作成し, 10個以上の銀粒子を持つ細胞を陽性細胞とした。その結果標識指数は1週目0.3%, 2週目0.2%, 3週目0%で少なくとも2週目までは明らかにDNA合成が行われている事が明らかとなった(図3)。

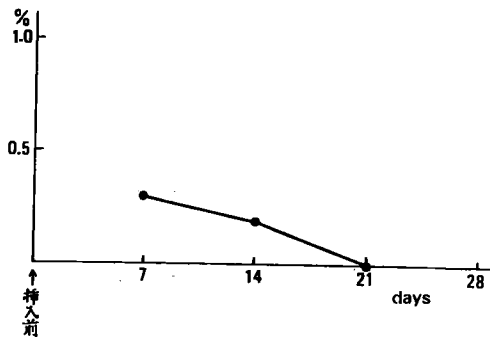


図3 マウス腹腔内に挿入された diffusion chamber 内でのヒトリンパ芽球様細胞の ^3H -thymidine による経時的標識指数

③ macrophage 様細胞の貧食能

3週目頃から増加し始めた macrophage 様細胞の機能を見る為次のような実験を行った。前述した手技にて, ヒトリンパ芽球様細胞を DC 内に注入後マウス腹腔内に挿入し4週目にとり出した。この DC 内に 23 gauge 針にて, *Staphylococcus epidermidis* の懸濁液を注入し, その後 RPMI1640 液の入ったシャーレ内に DC を入れて, 37°C で 24 時間放置した。そして膜内面のプリント標本と, 内容液の塗沫標本を作って, これに May-Grünwald-Giemsa 染色を施した。この標本を観察し, 細胞周囲に細菌の集団塊がなくて, しかも胞体内に明らかに細菌をとり込んでいる細胞を貧食能のある細胞とした(写真5)。このような細胞の占める割合は21%であったが, 形態的に macrophage 様細胞と思われるものでも細菌を貧食していない細胞がかなり見られた。コントロール群として用いたリンパ芽球様細胞(OUMS-6C1)の中で貧食能のある細胞は2%であった。

④ 再培養開始より樹立までの経過

DC内の細胞の再培養は2週目, 3週目, 4週目に

行なった。2週目にマウスよりとり出した DC 内の細胞の再培養は, macrophage 様細胞と円形の浮遊細胞より構成されていた。再培養開始後1週目に, 浮遊液のみを他のシャーレに移し, 各々培養を続けた。どちらも細胞の増殖は順調で, 円形細胞の増殖が著明になった2週目に, 染色体分析と細胞の塗沫標本の May-Grünwald-Giemsa 染色を行った。染色体数は46本でヒトのものである事が判明し, 形態学的にも最初 DC に挿入したヒトリンパ芽球様細胞に一致するものであった。3週目にマウスよりとり出した細胞の再培養開始時においても, やはり macrophage 様細胞と円形浮遊細胞の両者が見られたが, 2週目に比べて円形浮遊細胞の方が少いように思われた。再培養開始後, 数回にわたって他のシャーレに浮遊液のみを移したが, 培養は成功せず結局 DC を入れた最初のシャーレのみの培養を続けた。このシャーレの細胞の大部分は macrophage 様細胞で, その増殖は最初の2週間著明でなかったが, その後徐々に増殖を始め, 6週目から7週目にかけて円形浮遊細胞の増殖が著明になって来た。

その後 macrophage 様細胞は円形細胞により完全に置きかえられ, 後者の細胞の増殖は10週目までに極めて盛んになった。この時点でやはり染色体分析を行ない, その結果染色体数は46本で, ヒトのリンパ芽球様細胞である事が証明された。4週目にマウスよりとり出した細胞の再培養の経過は, 3週目の場合と類似しており, やはり再培養開始後10週目に染色体分析を行なったところ, やはりヒトに由来した細胞であった。これらの結果, 少なくとも4週目までの細胞は in vitro に戻しても, 十分増殖を続ける能力があり, 形態学的にも, もとの細胞に戻りうるということが示された。

⑤ ミリポア膜の観察

ミリポア膜のパラフィン切片を hematoxylin-eosin 染色により観察すると, いずれの膜も外面に多数のマウスの細胞が厚い層をなして附着しているのが観察された(写真6)。これは炎症性反応の現れと思われるが, マウス体液の DC 内への流入を妨げる結果になり, DC 内の細胞の栄養状態を悪くしたものと考えられる。

考 察

私の実験は長期培養されているヒトリンパ芽球様細胞のクローン株がマウス腹腔内に挿入された DC 内においてどのような形態学的変化をとげるかを観

察する目的で行われた。従来 DC を用いた *in vivo* の実験においては、動物^{9, 10} 及びヒト^{11, 12} の白血球の DC 内での変化が追求されている。即ち Petrakis らは¹² DC 内にヒト末梢白血球を注入し、これを末期の癌患者の腋窩に挿入し、6 週目まで DC 内の細胞の形態学的変化を観察した。好中球や好酸球は 2 ~ 3 週目までに消失し、残った単核細胞が 2 週目位で macrophage や histiocyte の形態をとるようになり 3 週をこえると fibroblast と思われる細胞に変ることをみている。同様にヒトの骨髄細胞を DC に入れて、マウスの腹腔内に挿入した場合にも、macrophage 様細胞が徐々に増加し、いくつかの DC においては、60~70% を占めるようになったと報告されている¹¹。一方 Ross ら¹³ は、種々の方法で採取されたモルモットの白血球を DC 内に注入し、これをモルモットの背部皮下に挿入して DC 内の細胞の変化を光顕的及び電顕的に観察した。その結果、やはり単核球細胞がある時期に macrophage 様の形態をとる可能性を示した。又 Johnson ら⁹ は PHA で処理されたラットの末梢白血球を注入した DC を、ラットの腹腔内に挿入し、24 時間間隔で 72 時間まで、DC 内のリンパ球の PHA に対する反応を観察しているが、この際にも macrophage 様細胞が出現してきたと述べている。

私の実験においても、DC 内へ注入前の細胞の大部分を占めたリンパ芽球は、DC 内においてその割合を減じ、徐々に macrophage 様細胞の増加が見られた。この macrophage 様細胞がいかなる細胞に由来するか興味ある点である。DC 内にはクローン株であるリンパ系細胞のみが注入されているので、今回の実験でみられた macrophage 様細胞はこれらの細胞に由来したものであると断定出来よう。観察期間を通じて、成熟リンパ球の割合はあまりかわらず、リンパ芽球の減少に平行して macrophage 様細胞の増加が見られたので、恐らくリンパ芽球が macrophage 様細胞に形態学的変化をとげたものであろうと推測している。ただし、成熟リンパ球が macrophage 様細胞へ変換したという可能性も全面的に否定出来ない。

今回の *in vivo* における実験において *in vitro* と異なる状態はマウス体液によってのみ細胞が養われているということと、小さい内腔をもつ DC 内に細胞の増殖が限定されているという事である。DC 内の細胞の培養液は炎症性の浸出液が主体をなす腹水から成り立ち、これは腹圧や浸透圧等によって DC 内にはいる。この腹水はリンパ系細胞に最適な酸素飽和

度より低い酸素飽和度を持つし、グルコース濃度も低く、理想的な培養液ではないと言われている¹⁴。これに加えて DC のフィルターの外にはマウスの細胞が多数付着しているのが観察されており、これはマウス体液の DC 内への流入を妨げる結果となり、更に培養条件を悪化させたものと思われる。これらの事から mitosis や DNA 合成が 3 週目以後見られなくなり、細胞数も著明に減少していったという事は当然理解出来ることである。このようにリンパ芽球様細胞の macrophage 様細胞への形態学的変化はあまりよくない培養条件のもとで行われたのであるが、出現した macrophage 様細胞は macrophage としての機能的な面をも備えているのであろうか？この疑問に答える為に、macrophage 様細胞の貧食能の有無を調べてみたが、貧食能があると判定された細胞の割合は 21% で、コントロールとして用いたリンパ芽球様細胞の中で貧食能があると判定されたものは僅かに 2% であった。このようにして私の実験で見られた macrophage 様細胞は形態学的ばかりでなく機能的にも macrophage としての特徴を備えているということが言える。

さて、DC 内の細胞の *in vitro* での再培養の試みは 2 週目、3 週目、4 週目で行われ、全ての場合もとのリンパ芽球様細胞に復した。この際 DC 内に見られた macrophage 様とリンパ系細胞のいずれがもとのリンパ芽球様細胞に戻り得たか明らかでない。2 週目にマウスよりとり出した DC 内の細胞が再培養の樹立に要した期間と 4 週目にマウスよりとり出した細胞がそれに要した期間には相当の違いがある。即ち、4 週目の細胞は 2 週目の細胞の再培養の樹立に要した期間の 10 倍の期間を必要とした。これは 2 週目にはだリンパ芽球も多く存在し、さらに DNA 合成や mitosis もみられているので、*in vivo* から *in vitro* へ移された時、リンパ芽球が比較的容易にわずか 2 週間でもとの状態に戻り得たものと思われる。反対に 4 週目の DC 内の細胞は macrophage 様細胞が大部分で、リンパ芽球は、ほとんどみられていない。従って恐らくリンパ系細胞に由来したと思われる macrophage 様細胞が *in vitro* で再びリンパ系細胞に逆戻りする過程に 10 週間という比較的長い期間を必要としたのであろう。なお、再培養開始時に DC のミリア膜に付着しているマウスの細胞の存在を考慮しなければならない。しかし、これはシャーレに付着する故、継代をくりかえすうちに、selection をうけて消失し、遂にはヒトの細

胞のみになったものと考えられる。このことはリンパ芽球様細胞の増殖が活発になった段階で行った染色体分析の結果をみても明らかである。

結 語

Hodgkin 病患者のリンパ節由来のリンパ芽球様細胞のクローン株を DC に入れ、マウスの腹腔内で培養し、経時的に DC 内の細胞につき種々検討を加えた。

DC 注入前の細胞はそのほとんどが、リンパ芽球で占められていたが、注入後 3 週目頃から macrophage 様細胞の増加が見られ、その割合は 4 週目、5 週目と増加し、80~90% を占めるようになった。この macrophage 様細胞の機能を見る為、4 週目の細胞を細菌と共に培養し、貧食能を見たが、貧食能があると判定された細胞の割合は 21% であった。これに対しコントロールとして用いたリンパ芽球様細胞

中貧食能の見られたものは 2% であった。又 ^3H -thymidine をマウス腹腔内に注入後 DC 内の細胞の標識指数を求めた結果、2 週目まで細胞の DNA 合成が行われている事が明らかになり、mitosis も 2 週目まで観察された。さらに、2 週目、3 週目、4 週目に DC 内の細胞を in vivo から in vitro へ戻して再培養を行い、いずれの場合にも DC に入れる前のリンパ芽球様細胞の状態に復した。

以上の結果よりヒトのリンパ系細胞が特殊な環境条件下で、macrophage に形態転換する可能性が示された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた恩師平木潔教授、および三好勇夫講師に深謝いたします。

文 献

- 1) Algire, G. H., Weaver, J. M. and Prehn, R. T.: J. Nat. Cancer Inst., **15**: 493-507, 1957.
- 2) Algire, G. H., Weaver, J. M. and Prehn, R. T.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **64**: 1009-1013, 1957.
- 3) Algire, G. H.: Fed. Proc., **16**: 601-602, 1957.
- 4) Algire, G. H.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **69**: 663-667, 1957.
- 5) Shelton, E. and Rice, M. E.: X Nat. Cancer Inst., **21**: 137-149, 1958.
- 6) Gabourel, J. D. and Fox, K. E.: Cancer Res., **19**: 1210-1216, 1959.
- 7) Tsubota, T.: Acta Haemat. Jap., **35**: 705-712, 1972.
- 8) Ebert, R. H., Sanders, A. G. and Florey, H. W.: Brit. J. Exp. Pathol., **21**: 212-220, 1940.
- 9) Johnson, L. I., Sullivan, P. A., Siegel, C. D., Chan, P.-C. and Gordon, A. S.: Brit. J. Haemat., **13**: 168-174, 1967.
- 10) Ross, R. and Lillywhite, J. W.: Lab. Invest., **14**: 1568-1585, 1965.
- 11) Boyum, A., Boeker, W., Carsten, A. L. and Cronkite, E. P.: Blood, **40**: 163-173, 1972.
- 12) Petrakis, N. L., Davis, M. and Lucia, S. P.: Blood, **17**: 109-118, 1961.
- 13) Holub, M.: Folia Microbiol., **5**: 347-363, 1960.

Cultivation of Human Lymphoblastoid Cells in Diffusion Chambers Implanted in the Abdominal Cavity of Mice

I. Morphologic Alteration of Human Lymphoblastoid Cells

By

Shuko Yoshimoto

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

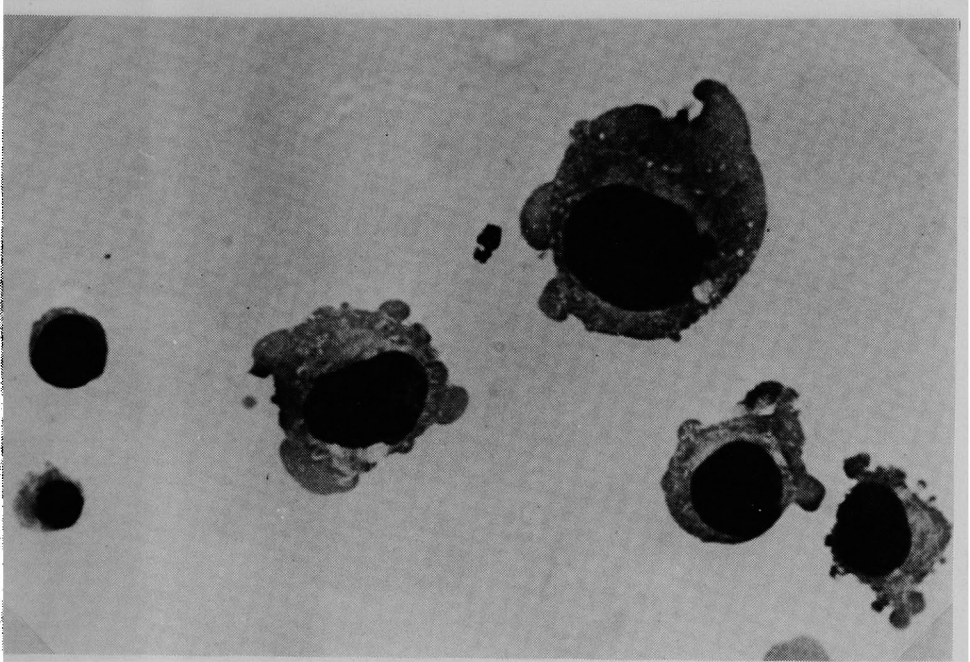
(Director : Prof. Kiyoshi Hiraki)

A clonal lymphoblastoid cell line derived from lymph node of a patient with Hodgkin's disease was cultivated in diffusion chambers implanted in the abdominal cavity of mice and cellular morphologic changes were sequentially studied for up to 8 weeks.

The majority of cells before intraperitoneal implantation were lymphoblasts with approximately 16% mature lymphocytes. However, after 3 weeks of *in vivo* cultivation in diffusion chambers, macrophage-like cells began to increase and occupied 80-90% of cells after 4 and 5 weeks. These macrophage-like cells, when tested for phagocytic activity after 4 weeks, exhibited bacterial phagocytosis. Labeling studies with ³H-thymidine indicated that active DNA synthesis continued for up to 2 weeks of *in vivo* diffusion chamber cultivation, during which mitotic figures were also observed morphologically. Further, it was attempted to recultivate *in vitro* cells that were taken out of diffusion chambers after 2, 3, and 4 weeks of *in vivo* implantation. These 3 separate attempts led to the development of lymphoblastoid cells that were morphologically and cytogenetically similar to those prior to diffusion chamber implantation.

From these findings, it is suggested that human lymphoid cells undergo morphologic alteration to macrophages under certain circumstances.

写真1. diffusion chamber 注入前のヒトリンパ芽球様株細胞



吉本修子論文附図

写真2. diffusion chamber 内の細胞 a. 小リンパ球 (3日目)
b. mitosis を示す細胞 (3日目) c. macrophage 様細胞 (2週間目)

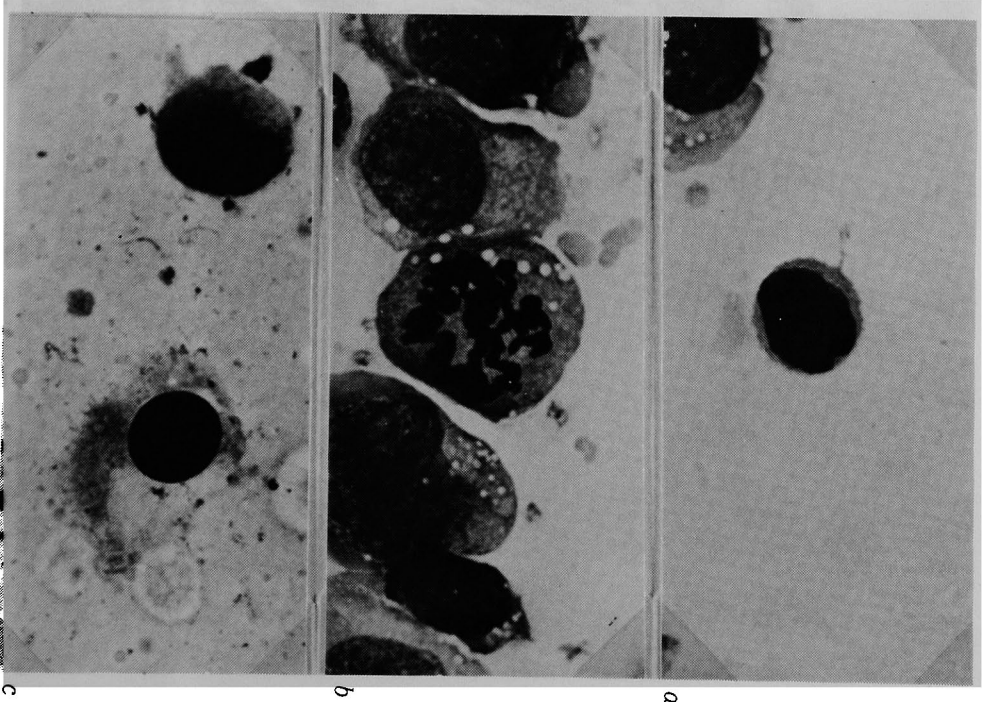
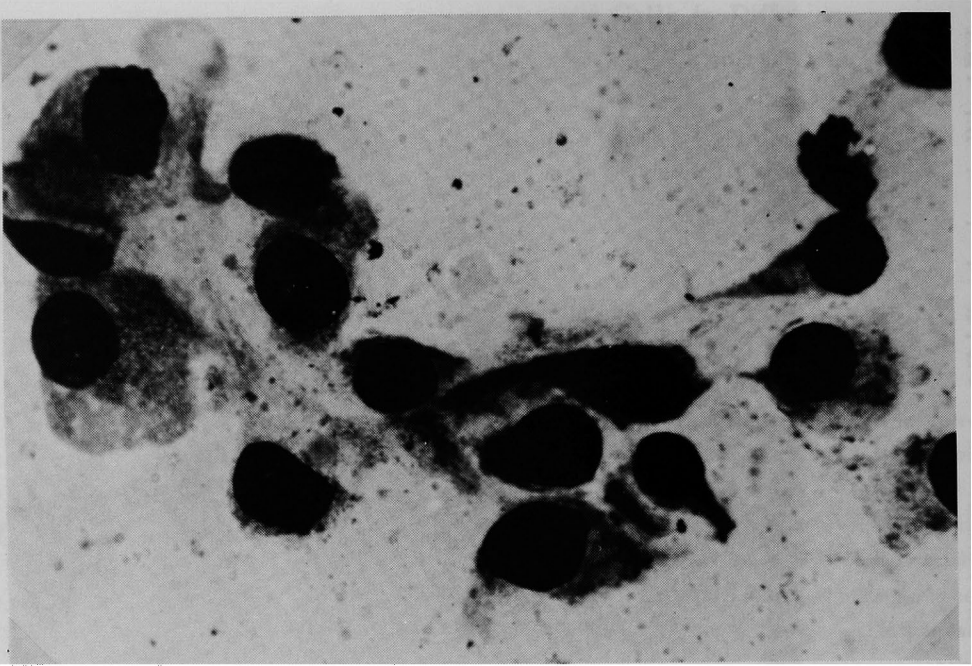


写真3. 4週目の diffusion chamber 内面のスタンチ標本



吉本修子論文附图

写真4. 1週目の diffusion chamber 内の細胞の電顕像

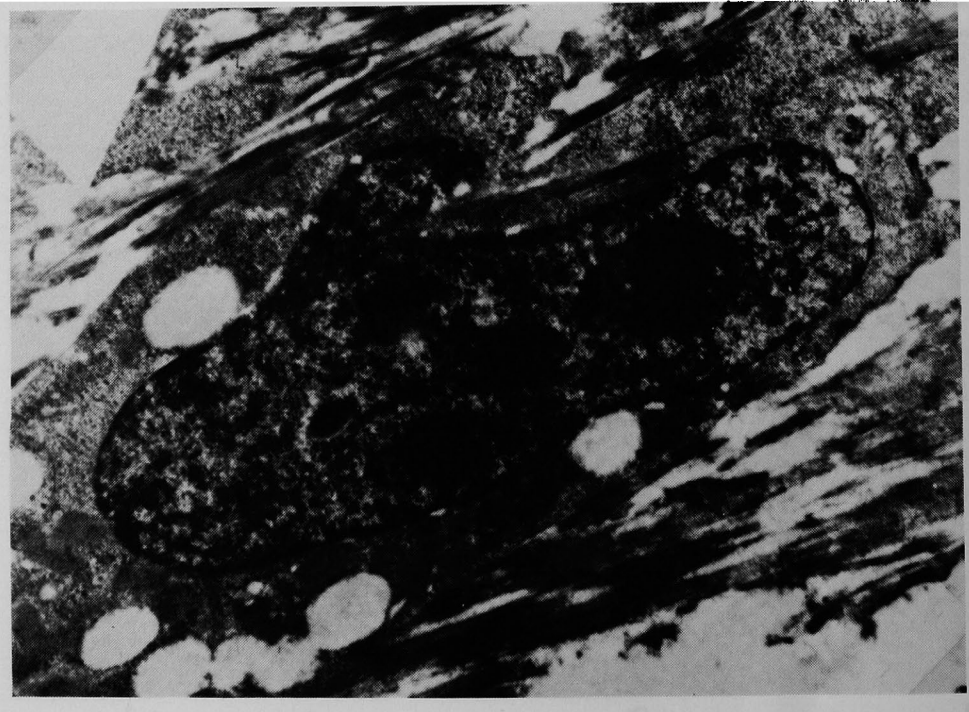


写真5. 4週目の細菌を貪食した細胞

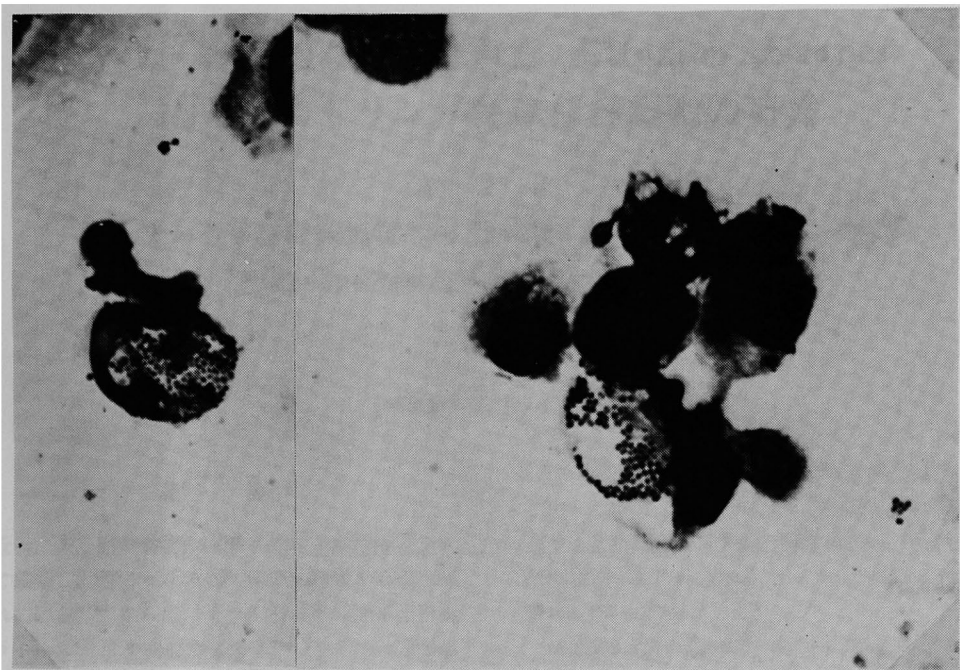


写真6. 2週目の diffusion chamber のシリコネ膜の切片標本

