

岡山医学会雑誌

第76巻1, 2, 3 合併号(第830, 831, 832号)

昭和39年3月30日発行

616.381—003.217—006.3 : 578.085.23

長期培養されたエールリッヒ腹水癌細胞 (JTC-11) の性状について

第一報

標準株(K株)の性状について

岡山大学医学部微生物学教室(主任:村上栄教授)
癌源研究所病理部(主任:佐藤二郎助教授指導)

大学院学生 浜崎充彦

[昭和39年1月30日受稿]

緒論

癌細胞の病理を研究する方法として実験腫瘍学が発達し今日に到つたが、1950年後半から、動物を使用する腫瘍細胞の継代方法から、生体外にとり出されガラス容器内で腫瘍細胞を継代する方法、即ち癌の組織培養が盛んとなつてきた。佐藤は1960年7月、従来実験腫瘍学の立場から継代されている代表的実験腫瘍細胞から、エールリッヒ腹水癌、吉田肉腫、あるいはC₃H自然発生乳癌等を選んで組織培養株を樹立することを企画し、今日に及んだ。その間、エールリッヒ腹水癌の培養については佐藤等の研究と時を同じくして、Hull¹⁾、Siegel²⁾、Moore³⁾、Graff⁴⁾、Eaton⁵⁾、Deschner⁶⁾、Ely⁷⁾、Foley⁸⁾、Guerin⁹⁾、Sato¹⁰⁾、Cailleau¹¹⁾、Dipaolo¹²⁾等の報告がなされたが、実験腫瘍学における動物腫瘍細胞に比較される実用性については、充分の記載がない。私は、癌研病理部において樹立されたエールリッヒ腹水癌細胞株(JTC-11)の内、三年以上継代に成功しているK株について、その形態、継代法、増殖率、復元性(腫瘍性)及び培養順応性等について知見を

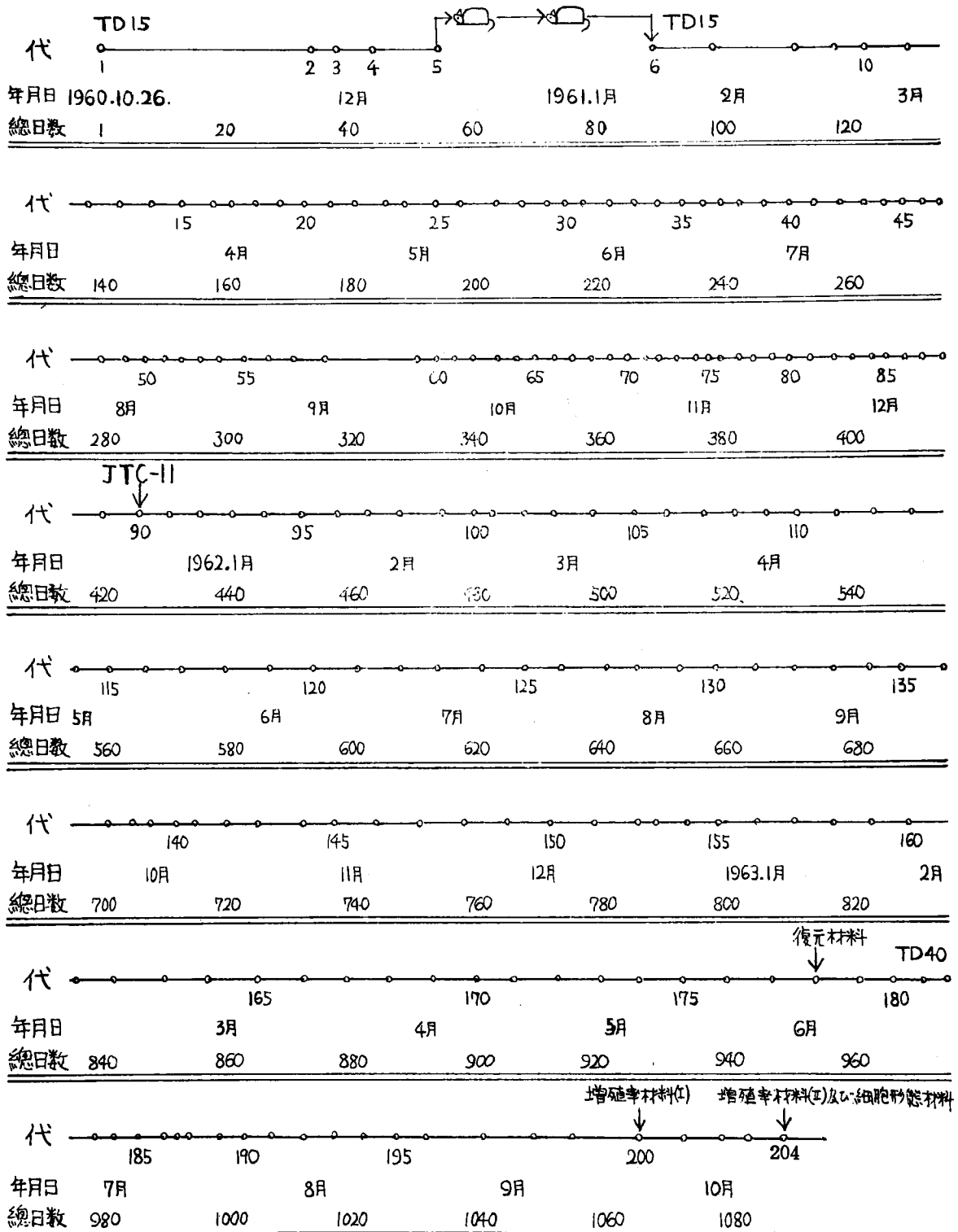
得たので、ここに報告する。

材料及び方法

動物(継代)株であるエールリッヒ腹水癌細胞は、岡山大学医学部附属癌源研究所病理部において、Cb系雌マウスの腹腔を用いて継代されているものを使用した。佐藤により、1960年6月から50以上に及ぶ予備実験¹⁰⁾から考案された方法によつて、1960年10月26日、組織培養に移された。その継代系図は第一図に示すごとく、初代より数えて33日目に第2代に移され、以下第4代まで継代されたが、その後約1ヶ月間Cb系マウス腹腔内に移植され、1961年1月18日、再度組織培養に移されてES 3620と仮称された培養細胞を起源とする。

初代より数えて90日目、即ち約11ヶ月目の1961年11月25日、ES 3620は勝田¹³⁾によつて定義せられた株化の条件を満足するものとして日本組織培養学会に認められ、JTC-11として登録された。

この第一報に用いられた細胞は、第一図に示すごとく、その復元成績は、1963年6月4日(第178代)、その増殖実験は1963年9月21日(第200代)及び



第一図 (JTC-11) K 株の系図

1963年10月12日 (第204代), 染色による細胞形態観察は1963年10月12日 (第204代) のものである。

培養方法は、佐藤の報告中の・Exp. 22¹⁰⁾ に述べられているごとく、その初期には、50% YLE に加

えるに50%牛血清であつた。そしてこの培地は第5代まで用いられ、第6代より以後はすべて80% YLE に加えるに20%牛血清が用いられた。(最終濃度はYeast Extract 0.08%, Lactalbumin hydrolysate

0.4%で抗生物質及び pH 指示薬は含まない) 培養ビンとしては, TD 15 が用いられたが, 181 代より TD 40 が用いられ, 37°C の孵卵器内で静置培養された。培地交新 (以後 M. C. と略記する) は初期には 2 日毎になされたが, 株化が進むにつれて M. C. を必要としなくなった。継代際の細胞剥離には, ラパークリーナーが用いられた。しかし後になると, 駒込ピペットのみで充分となつた。

細胞の増殖率については, 短い試験管 (実験用短試) を使用した。この中に, 1.5 ml の培地と共に細胞を植えて, 静置培養で 5° の角度をもたせて 37°C の孵卵器の中へ入れた。培地の成分は, 継代培養に使用したものと同じである。M. C. は行われなかつた。計数は, 2 日目, 4 日目, 6 日目あるいは 8 日目に, Sanford の原理に基づく勝田改良法¹⁴⁾ に従つて, 「クエン酸処理法」を用い, 染色された核数を Bürker Türk の計算板によつて計つた。そして 3~4 本の平均をその値とした。

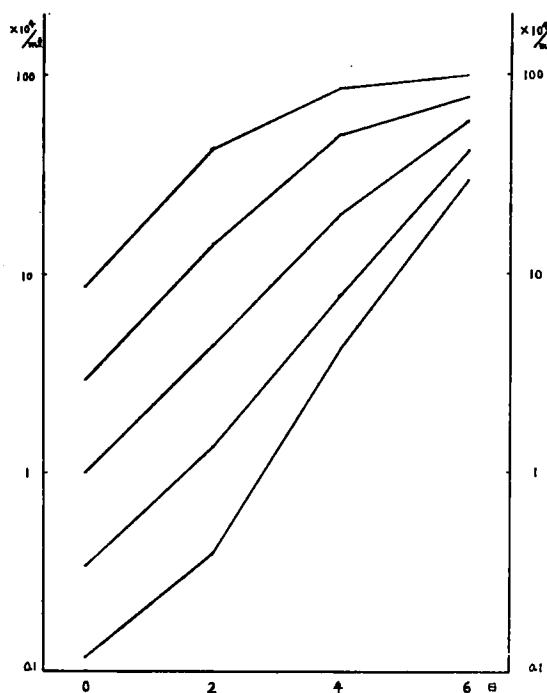
細胞の形態観察には, 普通のカバーガラスを 2~3 等分して短冊形のものを作り, これを細胞及び培地と共に試験管に入れて, 37°C の孵卵器中で 5° の角度で静置培養しておく, 短冊様ガラス表面に細胞が附着増殖してくる。これを毎日 1~2 枚ずつ取り出して, Eosinmethylenblau-Lösung für May-Grünwald färbung 及び May-Giemsa 氏液で染色し, 標本とした。

細胞の復元実験には, 生後 2 ヶ月前後の健康な Cb 系雌マウスが用いられた。その初代実験の詳細は後述する。その継代における細胞数測定は, 腹水を等濃溶液で 100 倍に希釈しておいて, Bürker Türk 計算板にて希釈液中の細胞数を測定し, これにより元の腹水中の 1 ml 当りの癌細胞数を計算した。そして, しかるべき細胞数を含む腹水を, 滅菌したマントー反応テスト用の注射器で無菌的に抜き取り, ヨードチンキ及びアルコールで腹壁を消毒された正常マウスの腹腔内に注入した。またその継代ごとに, 腹水の塗抹標本を作り, メタノール固定してギムザ染色した。

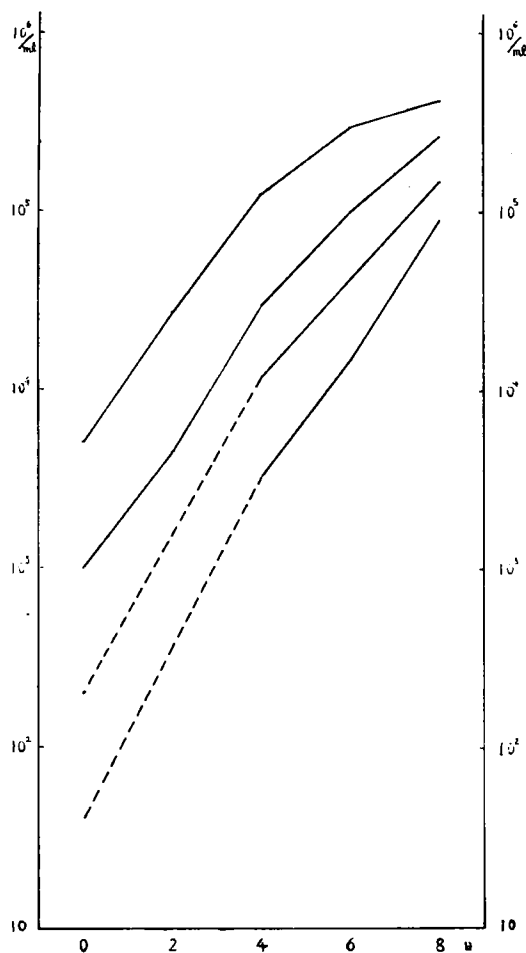
実験成績

1) 増殖率

長期培養されたエールリッヒ腹水癌細胞 (JTC-11) の増殖状態は, 第二図及び第三図に示されている。第二図においては, 初期細胞数を 1 ml 当り 9×10^4 より $1/9 \times 10^4$ に到る 3 倍希釈の 5 系列とし, その



第二図 (JTC-11) K 株細胞の増殖図



第三図 (JTC-11) K 株細胞の増殖図

細胞計数は第2日目、第4日目、第6日目と2日毎に行われた。第二図から見ると、初期1ml当りの細胞数の多いものでは凸曲線を示し、細胞密度の少ないものでは凹曲線を示していることが明らかである。なお各々の6日間の増殖率は次の通りである。9×10⁴:10.2, 3×10⁴:30, 1×10⁴:64, 1/3×10⁴:132, 1/9×10⁴:270。第三図は、少数細胞数による増殖状態を調べたものであり、実験方法は第二図のものと同様である。初期細胞数を、1ml当り5000より40に到る5倍希釈の4系列とし、その細胞計数は、上位2系列は第2日目、第4日目、第6日目、第8日目の2日毎に行ない、下位2系列は、ある程度の細胞数になるまで増殖しないと計数不可能のため、第4日目、第6日目、第8日目に行ない、計数をしなかつた部分は点線で結んだ。その6日間の増殖率は次の通りである。5000:50, 1000:80, 200, 40:320であり、極めて少数の細胞でも増殖することが明らかである。

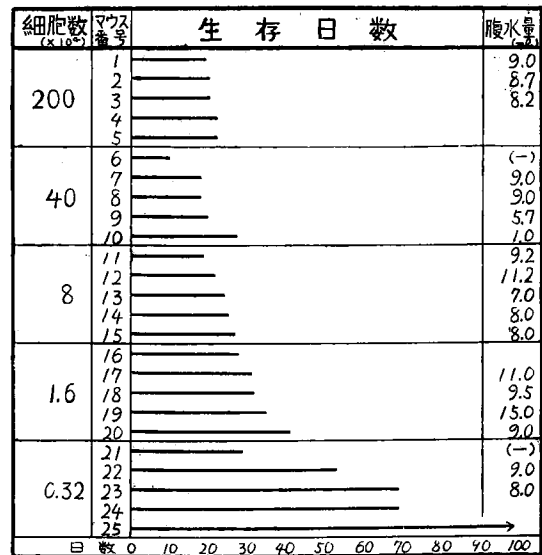
2) 株の維持

現在(JTC-11) K株の保持には、維持培地として、80% YLE+20%牛血清を用い、次の様な順序によつて行われている。

37°Cで5°傾斜静置培養され、底部に白く(JTC-11) K株細胞の附着した試験管から、古い培地を棄てて、新しい維持培地を入れ、駒込ピペットで充分に攪拌する。その一滴をとり、新しい試験管に倍数希釈で1/50, 1/100及び1/200になるように希釈して継代し、7日後これらの内から再び同様の処置を行なつて継代している。室温に放置された場合には、3週間から4週間維持することが出来る。この際注意すべきことは、被継代細胞が、形態の項で述べるような変性をうけていないこと、及び攪拌が充分に行われることである。攪拌が不十分な場合には、継代された試験管内に塊が出来て、塊の中心部が早期に壊死におちいり、株細胞中に壊死破壊物質が混入し、腫瘍細胞が汚くなる。不幸にしてこの状態が起つた場合には、初期注入量を多くし、M.C.を行い、継代間隔を短くするか、あるいは、継代に際して、壊死した塊を静置によつて除き、上清の細胞のみをもつて継代する方法がとられねばならない。

3) 復元成績

(JTC-11) K株細胞の、Cb系マウスに対する復元実験は、その178代の細胞を用いて行われた。その第1代においては、第四図に示すように、5系列各々5匹の、生後2ヶ月前後のCb系雌健康マウスが



第四図 マウス復元第1代成績

用意された。細胞数は200×10⁴より0.32×10⁴に到る5倍希釈の5系列とし、これらを各々0.5mlのCondition's mediaに浮游させて、マウス腹腔内に無菌的に注入した。Condition's mediaには、K株細胞を継代し5~7日経過したときの培地を、遠心沈澱または濾過して使用した。Condition's mediaを使用した理由は、培養株細胞が動物に注入されるまでに障害を受けることを、出来る限り少くするためである。その各々の生存日数及び腹水量は、第四図に示してある。即ち、マウス番号6のものは、例外的に早期死亡した。そして解剖所見で、胸腔内リンパ腺への癌転移及び胸水が認められた点から、他のものより区別される。またマウス番号21のものは、比較的早期死亡し、その解剖所見で、胸腔内血性浸出液を認め、また胸骨剣状突起下に癌性腫瘍を認めた点から、前者と同様胸腔内腫瘍転移による早期死亡と考えられる。さらにマウス番号25のものは、細胞接種後98日目に、肉眼的に異常を認められなかつたので屠殺し検索したが、解剖所見においても、癌性腫瘍及び腹水は認め得なかつた。その他の22例については、その解剖所見はいずれもほぼ同様で、大網及び腸間膜に粟粒大の腫瘍を数多く認めた。なお腹水はいずれも出血性で、その検鏡では、腹水は多くの赤血球及び少数のリンパ球、単球、好中球からなる血性成分が主体をなし、腫瘍細胞はわずかに混じて見られる程度である。腫瘍細胞は10~20μ程度までの類円形の核を有し、アズールに紫色に顆粒状にそまつて見られる。核仁はあまり明瞭でない。細胞質はメチレンブラウに青く染つて見られる。

元来の動物エールリッヒ癌細胞の場合には、多数の腫瘍細胞 (1ml 当り 10^8 程度) が鏡見されるのが通常であり、所謂腫瘍性腹水を形成するが、(JTC-11) K株の復元の場合には、腫瘍性腹水というよりも血性腹水の中に腫瘍細胞が混在している状態となっている。腫瘍細胞自体のみについて見ると、通常の動物株のエールリッヒとほとんど変わらない。従つて、培養後1年前後の状態で復元された成績の報告 (当研究室：野田等)¹⁵⁾、即ち復元腫瘍は動物株と同様腫瘍性腹水をつくり、腹水中の細胞は元来の動物株に比して大きくなり、かつ空泡形成が著明であつたという報告と異つて、3年経過の場合には、血性腹水中に存する腫瘍細胞は空泡形成がなく、通常の動物株に初代から極めて類似しているという点、及び腫瘍細胞が腸間膜及び大網に粟粒大の腫瘍を多数つくり、腫瘍性腹水を形成しないで血性成分の多い腹水中に腫瘍細胞が散在するという点において、経時的变化を受けていることを示している。しかしこれらの血性腹水は、他の Cb 系雌健康マウスに接種することによつて、第五図に示すように 100% 継代可能であるという以下の研究成績によつて、腫瘍細胞を含有していることは明らかである。なお腹水量記入中の空欄は記録もれである。

4) 復元マウスの動物継代

第2代以後のマウス継代成績は、第五図に示してある。第1代の時と同様に、その各々の解剖所見は、大網部及び腸間膜に粟粒大の腫瘤を認め、腹水は出血性であつた。また時によると、腹腔のほぼ全体にわたつて、癌細胞の類壊死塊からなる腫瘤が認められ、この際の腹水量は、他に比してかなり減少していた。なお腹水中の癌細胞数は、第3代継代の際には非常に増加 (1ml 当り 17760 万程度) し、動物継代のものとはほぼ同数となり、その腸間膜等における腫瘍も、ややその数を減少したかの感があつたが、第4代、第5代と経過するにつれて再びその数を減少し、1ml 当り 40~50 万程度となり一定してきた。1963年11月20日現在、第11代継代まで進行中で、第五図に記載されている第10代、第11代の4例は、今だ生存中のものである。各々の腹水塗抹ギムザ染色標本の検鏡所見では、第3代の場合 (1ml 当りの腫瘍細胞数が多いが、動物株のように腫瘍細胞がばらばらでなくて、やや集落をなして見られる) を除いて、第5代までは初代の所見に似ており、やや好中球の存在が多いのが特徴である。第6代以後腫瘍細胞がやや大きくなり、好中球はほとんど見られ

第五図 (JTC-11) K株細胞の cb 系マウス復元継代図 ※次代継代使用のマウス

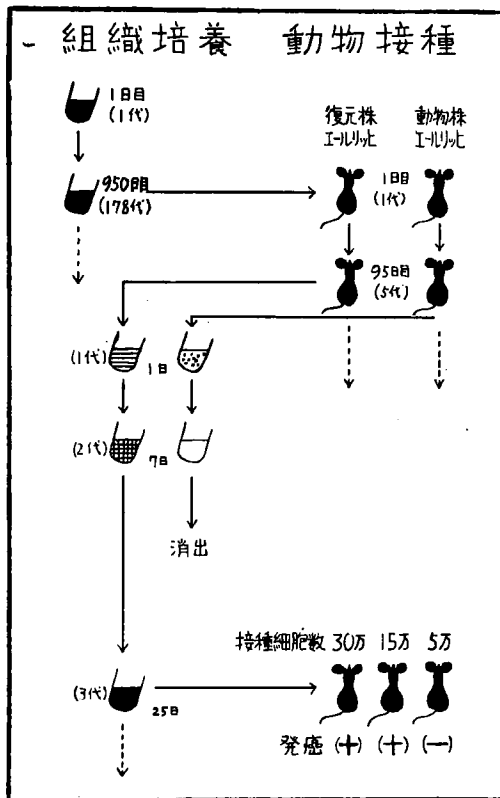
総日数	代	マウス数	細胞数 ($\times 10^4$)	生存日数	腹水量 (ml)
1	1	5/5 5/5 5/5 * 5/5 4/5	200 40 8 1.6 0.32	第四図	第四図
32	2	1/1 * 1/1 1/1	(2ml) (1ml) (0.5ml)	12 20 15	6 6
45	3	1/1 * 1/1 1/1	17760 8880 1776	11 10 10	7 7 8
63	4	1/1 * 1/1 1/1	150 100 50	29	17
78	5	* 1/1 1/1 1/1	80 40 20	21 23 26	12
100	6	* 1/1 1/1 1/1	200 100 50	18 19 28	9 9 7
115	7	* 1/1 1/1 1/1	200 50 10	23 28 40	9 5 9
129	8	* 1/1 1/1 1/1	200 50 20	20 22 27	9 9 2
145	9	* 1/1 1/1 1/1	200 40 10	22 26 32	6 7 7
159	10	* 1/1 1/1 1/1	200 50 10	27	8
176	11	/1 /1	200 100		

なくなる。しかし第10代まで腹水そのものの性状は依然として強く血性であつて、多数の赤血球が見られ、腹腔中に粟粒大の腫瘍結節を形成する。従つてこの時期まで、本腫瘍は元来の動物のエールリッヒ腹水癌から区別される。第11代以後 1ml 当りの細胞数が増加しているの、次第に動物株のエールリッヒの性状に近づいているものようである。

5) 培養順応性の動物通過による維持

第五図における復元マウス第5代のうち、細胞数 40×10^4 を腹腔内に接種したマウスの17日目、初代復元よりの通算日数95日目の腹水を消毒された注射

器で無菌的に取り出して、得られた癌細胞を再度組織培養にもどして見た。第六図に示すように、第5代マウスより無菌的に得られた腹水に、80% YLE+20%牛血清を数倍量加え、1ml 当り2万単位のペニシリン液2滴を混じて、1000r. p. m. 10分間遠心沈澱を行い、上清を捨てて、癌細胞及び混入した赤血球を得た。その対照として、動物株としてCb系雌マウスに継代されている、培養に移されたことのない元来のエールリッヒ腹水癌細胞を、その腹水中より同様の方法で得た。こうして得られた二種の癌細胞を、各々 $10 \times 10^4/\text{ml}$ 及び $50 \times 10^4/\text{ml}$ の同数細胞数で、80% YLE + 20% 牛血清の培地で試験



第六図 動物継代中の復元培養細胞及び非培養細胞の培養における比較

管内に移し、 37°C の孵卵器中に傾斜 5° で静置培養を始めた。その第4日目における両者の検鏡的相違は、前者の内 10×10^4 のものでは、細胞附着数も少く、時に空泡細胞すら見られるが、少数の附着細胞の状態はよく、徐々に増殖してゆくと思われる。 50×10^4 の方は細胞の附着増殖共によく、既に継代可能な程の状態であつた。細胞形態は、円形細胞と線維状細胞とがほぼ同数見られた。これに反して後者即ち動物エールリッヒ株よりの細胞は、いずれも

附着細胞数は充分であるが円形細胞がほとんどで、稀に線維状細胞が見られる程度で、所謂ガラス壁附着性が弱い。また細胞質内に小顆粒が多く、変性気味となり、継代困難を思わせた。その後 M. C. を3日毎に行なつたが、前者は増々増殖してゆくに反し、後者は約10日後に変性し、次第に浮游消失した。また前者は、その25日目のものをラパークリーナーで丁寧に洗はがし、1000r. p. m. 5分間の遠心沈澱により得られた癌細胞を、Condition's media (上清液) で稀釈し、0.5ml 当り30万、15万及び5万の細胞数になるようにし、無菌的に、生後2ヶ月前後のCb系雌健康マウス3例の腹腔内に注入した。その結果は、30万接種マウスは36日目に、15万接種マウスは39日目に、いずれも腹水癌を生じて死亡した。その解剖所見は、いずれも数mlの出血性腹水が認められ、復元マウスのそれとの相違は認められなかつた。また大網及び腸間膜に粟粒大の腫瘍が、初代復元マウスと同様に認められた。なお5万接種マウスは、約60日間経過した現在、腹水も腫瘍も認められず生存中である。

6) 形態

(JTC-11) K株細胞の形態的観察は、短冊法により得られた標本を、ギムザ染色して検鏡した。細胞は継代後、第1日目から第10日目まで、無処置の静置培養細胞の標本を作製した。その所見は次のごとくである。

第1日目：(写真1)

細胞は一般に小型で、小突起のある円形を呈するものが多い。核は円形ないし類円形で、中等度の厚さをもつ核膜と、2~3ヶの核仁が見られる。細胞質突起は2~4ヶ見られるが、極めて短いものが多い。一部のものではかなり長い突起が見られるが、突起の突端は広がって「いもりの吸盤」状になっている。一部の細胞核は濃縮し、一部のものは多核を示す。稀には細胞質に、大小の空泡が形成されているものもある。

第2日目：

核及び細胞質が次第に大きくなる。核の中には、かなり2核性のものや多型核が含まれている。細胞質は微細顆粒状に見られるが、大小の空泡を有するものが多い。細胞質が広くなつて、突起の数が多くなっている。この場合にも、突起の突端は吸盤状にふくらんでいる。

第3日目：(写真2)

細胞数の増加がかなり目立つてくる。2日目に見

られる細胞群の他に、やや小型で核が濃染し、細胞質突起が金餅糖状に小さく数多く見られる、所謂幼若型の細胞が見られることが特徴である。従つてこの時期には細胞の lag phase 現象である、細胞の変性異型化と共に、細胞の増殖が起つている。

第4日目：

第3日目の所見に似るが、空泡を有する細胞及び大型細胞の減少が起つている。第3日目幼若型の細胞が次第に大きくなってゆくのが見られ、且つ二極性の突起を有する細胞が少数ながら認められる。一般に成熟型の細胞は、核、細胞質共に大きく且つ核内構造が明るく識別されるが、幼若型のもは核が濃染して核内構造は認め難い。稀に大型多型核が認められる。

第5日目：

細胞増殖が著明で、多数の幼若型細胞が見られる。それらと略同数に楕円形の緊張した核膜と、2ないし数ヶの突起を有する細胞質を中等量にもつ成熟型の細胞が認められる。また非常に数多くの突起を有するものも認められるが、いずれの場合にも、突起の突端が吸盤状に小球状にふくらんでいるのが特徴である。少数に散見される大型細胞の多くは、多型核ないし多核で、細胞質は扇状で周辺部が波状に見られ、明瞭な突起は認められないのが通常である。

第6日目：

第5日目の所見と変らないが、2～3ヶの突起を有しやや伸長された細長い細胞が多く見られる。

第7日目：(写真3)

細胞数が著明に増加している。4～6日間に見られた伸展された突起をもつ成熟型細胞も多く認められるが、円ないし楕円形の緊張した核膜をもち、数多くの核仁を含む比較的大きな核を有し、短く太い突起を細胞質の周囲に2～5ヶ程度有する成熟ないし老化型の細胞が認められる。弱拡大ではこれらの突起がお互いに離れて、所謂接触障碍と考えられる分離を示しているように見られるが、精査すると、これらの突起がお互いに入り交つて重なつてのを認めることが出来る。この場合、遊離した突起の突端は大きくなつている。少数には極めて大きな単核、多型核あるいは多核の巨細胞が認められる。

第8日目：

第7日目の状態とあまり変らない。

第9日目：

単位面積中の細胞数が多い部分では細胞が丸くなり、平面的増殖から立体的増殖の様式にうつり、細

胞塊となる。更にその状況が続くと液中に浮遊する。細胞数が比較的少ない部分では、細胞質はガラス壁に接着して広がり、メチレンブラウによつて顆粒状一部空泡状に青染し、前記した特有な細胞質突起を現わしている。核は円形に近く、比較的多くの核仁を有し、アズールに紫色に呈色している巨大核が散見しているが、これらの細胞の一部には、核側にエオジンに呈色する塊状顆粒を有し周囲と膜状に境された空泡を有するものが見られる。これらの空泡は、他の培養株細胞に散見される所見と類似している。この時期には増殖率が下りつつある。

第10日目：(写真4)

第9日目の所見と類似する。細胞の密度が多くなつた場合、存在する細胞突起は縮少し太く短くなるのが通常であるが、時には縮少に際して、ガラス壁に附着したまま取りのこされて顆粒状に汚く紫青色に染つているのが見られる。細胞密度の少ない部分では、細胞質の突起数は4～5日に比して増加している。

総括及び考按

近年、動物腹水癌細胞培養による株化の成功とその継代がなされ、特にその長期培養に成功した報告として、Ehrlich Ascites carcinoma⁸⁾⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾, AH-130 rat ascites hepatoma¹⁶⁾, 6C3HED mouse Lymphosarcoma¹⁷⁾, TA3 mammary carcinoma⁹⁾, MN-Lymphosarcoma¹⁸⁾ 等がある。

ここに報告したエーリッヒ腹水癌細胞 (JTC-11 細胞) と、従来報告されているものとを比較検討して見ると、種々の面において、かなりの相異が認められる。

その培養期間について見ると、Deschner⁸⁾ によればわずかに80日であり、Ely⁷⁾ によれば8ヶ月であり、Cailleau¹¹⁾, Dipaolo¹²⁾, Guerin⁹⁾ 等においては1年余であり、Foley⁸⁾ によるものが2年半の比較的長期にわたつているのみで、3年以上の報告については今だその報告を見ない。さらにその継代法にいたつても、M.C. を1～2日毎に行わねばならぬものが多く、それでも次代継代は1～2週間かかっている (Guerin⁹⁾, Cailleau¹¹⁾)。また継代の際の細胞剝離に際しても、Dipaolo¹²⁾, Guerin⁹⁾, Foley⁸⁾ 等はラバークリーナー、トリプシンあるいはヴェルゼン液を使用しているが、(JTC-11) K株細胞では駒込ピペットによる pipetting 法で充分に要を足すことが出来る。

さらに(JTC-11) K株細胞の特異的なことは、その増殖率であつて、Ely⁷⁾によれば6日間で32倍増殖率が記載されており(細胞数 80×10^4)、Foley⁸⁾はあまり増殖率はよくないと記載しているのみで、他の報告にもその点の記載は充分でない。これらと比較してみても、(JTC-11) K株細胞の増殖率は実に驚威的なもので、おそらく世界最高の増殖率を有するものと思われる。また初期注入量が少いと多くの株細胞では増殖不能であるが、実験成績にも記したように、本K株は極めて少数の単位注入量によつても容易に増殖する点においても勝れている。そのGeneration timeはほぼ十数時間であることが、増殖曲線及び連続映画撮影によつて確認せられている。従つてこれらの性状から、生体外即ち組織培養の日常の継代においての制限即ち初期注入密度、ガラス壁に対する容易な剝離性、またこれと反するような性状であるが、一面ガラスへの静置による密着性、強い増殖率等から、所謂株性という条件をまつたく充すものである。

次に長期培養癌細胞の復元成績については、その細胞が癌であるという同定の問題と共に、その所謂毒性変化が従来より云々される所であるが、Deschner⁶⁾においては 4×10^3 の細胞数で失敗に終つている。さらにDipaolo¹²⁾によれば 7×10^6 で100%の成功をみているが、 1×10^5 でほとんど成功していない。またCaillaud¹¹⁾によると $10^5 \sim 10^7$ で100%の成功をみているが、それ以下では100%に達しない。Guerin¹⁰⁾では $2 \sim 3 \times 10^6$ で90%~100%の成功率である。なおEly⁷⁾も成功はしているが、細胞数に関する充分の記載に欠けている。これらに比して(JTC-11) K株細胞では、 1.6×10^4 以上においていずれも100%の発癌が見られ、しかもその動物継代も十分に可能である。さらに 0.32×10^4 では80%の発癌が見られたことより、このあたりに致死限界線があることが想像される。よつて(JTC-11) K株細胞は、従来の報告には見られない程の腫瘍性を所有し、組織培養によつて起るかも知れない腫瘍性の低下は現在の所考えられない。ただし復元エールリッヒ株が元来のエールリッヒ腹水癌と趣きを異にする点は、形成された腹水中における単位体積中細胞数の減少(約 $1/10$)とそれとともなう赤血球の游出、さらに腸間膜などに粟粒大腫瘤を生ずる点である。これらの事実は、実験成績の項で述べた好中球の出現と共に、元来の動物株エールリッヒ腫瘍細胞が培養によつて癌性そのものは失われ

ないかも知れないが、従来の腹水腫瘍形成性を失い、あるいはマウスへの同種性のある程度失い、異種化することを物語っているのかも知れない。しかし動物継代が続けられると、従来の腹水腫瘍に次第にかえつてゆく様である。また復元中の細胞を再度組織培養にもどす実験は、Sanford¹⁹⁾及びBarski²⁰⁾等により報告されているが、これらはいずれも腹水型の腫瘍ではなく、またこの報告のごとく元来の動物継代細胞との間の比較はなされていない。この比較は第六図及びその説明に見られるように、組織培養を経験していない動物継代細胞はわずかの日数で変性浮游してしまうが、動物→組織培養→動物を経過した細胞は非常に簡単に組織培養に移ることが判明した。これらの細胞の再度復元の成績は、30万、15万のものではいずれも発癌するが、5万のものでは発癌しない点から見て、第四図の実験細胞よりも毒性がやや弱まつたような感じであり、Sanford¹⁹⁾等の報告にあるような腫瘍性の低下と類似の結果が出ているが、日数及び例数の相違もあり、その断定は下し難いと思われる。私が本実験を行つた主目的は、動物癌細胞が組織培養株化を起した時、組織培養で容易に継代され得るという培養順応性あるいは株性(佐藤)が復元動物継代によつても失われまいということの確認と、実用性として動物癌の培養株の動物による保持の可能性の確認であるが、これらの点もいずれも陽性であることが判明した。同様の実験が高井²¹⁾によつてもなされており、組織培養癌株と実験腫瘍動物との間の橋渡しになる可能性が強い。

次に培養における細胞の形態については、一般論として既に佐藤、笛吹²²⁾等によつて報告されたように、一定の条件、即ち同一細胞でもその細胞が①生存する培地②培養及び継代の方法、例えば静置培養、浮游培養あるいはトリプシン継代、pipetting法等③培養液に生存する日数(この場合は特に初期細胞注入量が影響する)等の変化によつて大きく変動することが明らかである。(JTC-11) K株細胞によれば、継代された始めは細胞は丸く小型で小さな突起を所有しており、ガラス壁への附着は弱い。この時期の突起は映画撮影(佐藤、浜崎等)して見ると、細胞質の諸所から出現し、ガラス壁の上をそれによつて動き廻つていくことがわかつた。培養日数が経過するにつれてこの突起は成長伸展し、2~3の比較的長い細胞突起となる。この場合細胞突起の突端は吸盤状に小球化しているのが特徴であり、

突端の細長い所謂線維芽細胞 (L細胞) の場合と異っている。またこの吸盤状突起は、株化の初期即ち (JTC-11) K株細胞の歴史の始めの頃から認められる性状の一つである。更に時期が経過すると、突起の数が増加する。しかし細胞数がそれと共に増加してくると、突起の先端は互いに入り交じるようになる。即ち一部の培養株細胞に見られるような所謂接触障壁は起らない。更に細胞数が増すと、突起は縮少し細胞は丸くなつて塊状となり、病理組織学的にいう類壊死の状況を経て液中に浮遊し壊死する状況となる。培養の初期及び後期においては巨細胞あるいは多核細胞が現れる率が多いが、これは現在の組織培養で用いられる方法即ち閉鎖された培地中での pH 並びに代謝終末産物の影響と考えるのが妥当であろう。従来報告によると、Dipaolo¹²⁾ はリンパ球様細胞が線維芽様細胞より優勢であると述べており、Foley⁸⁾ は細胞質は長細くなり一端または両端に細長い突起を有するものが多く見られると述べているが、形態の相違は色々の条件によつて起るものであり、両者の形も我々の亜株の中に見ることが出来る。また Cailleau¹¹⁾ は人の腹水を培地中に用いたものでは大きくアメーバ様になるが、これを用いないものでは小さく細長い形態をとると述べており、本報告の主張の一部を肯定していると思える。

結 語

ここに報告記載したエールリッヒ腹水癌細胞

(JTC-11 細胞) は、80% YLE (最終濃度 Yeast Extract 0.08%, Lactalbumin hydrolysate 0.4%) + 20% 牛血清の培養液で、pipetting により3年間以上培養継代されたものである。その性状について組織培養学的に観察した結果、次の結論を得た。

1) 私の馴化した (JTC-11) K株は、株の維持において継代の方法 (pipetting)、細胞の強固性、一世代における培地無交新、継代細胞数及びガラス壁附着性等から考えて、現存する動物腫瘍培養株の中で最も取り扱い易いものの一つである。

2) その増殖率は最高8日間で2000倍にも達する極めて激しく増殖する細胞であり、また極めて少数の細胞からでも増殖が可能である。

3) 復元実験により生後2ヶ月の Cb 系雌マウスに対し、 1.6×10^6 細胞数以上で100%の発癌率を示し、継代も可能である。即ち腫瘍性は極めてよく維持されている。

4) 組織培養が可能となつた動物癌組織培養株 (K株) は、動物通過によつても株性 (佐藤) は残留している。

5) 形態的に突起の突端が吸盤状になつてガラス壁に附着し、はなはだ興味ある形態をとつていた。

稿を終るにのぞみ御指導、御校閲を賜つた佐藤二郎主任に深甚の謝意を表するとともに、本実験について御援助を賜つた癌源研究所矢部所員に感謝する。

文 献

- 1) Hull, R. N.: Science 117: 223 1953.
- 2) Siegel, B.: Nature 173: 584. 1954.
- 3) Moore, A. E. et al.: J. Immunol. 77: 81. 1956.
- 4) Graff, S. et al.: Exp. Cell Res. 13: 348. 1967.
- 5) Eaton, M. D. et al.: Cancer Res. 18: 164. 1658.
- 6) Deschner, E. E. et al.: Science. 131: 419. 1960.
- 7) Ely, T. O. et al.: Cancer Res. 20: 918. 1960.
- 8) Foley, G. E. et al.: Cancer Res. 20: 930. 1960.
- 9) Guerin, M. M. et al.: Cancer Res. 22: 378. 1961.
- 10) Sato, J. et al.: Bull. of Cancer Inst.
- Okayama. 1: 42. 1961.
- 11) Cailleau, R. et al.: J. Nat. Cancer Inst. 26: 271. 1961.
- 12) Dipaolo, J. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 109: 616. 1962.
- 13) Katsuta, H. et al.: Symposia of the Society for Cellular-chemistry 10: 91. 1960.
- 14) Katsuta, H.: Tissue Culture technic. Tokyo. 1955.
- 15) 野田昌子他: 未発表
- 16) Takaoka, T. et al.: Japan J. Exp. Med. 28: 1155. 1958.
- 17) Guerin, M. M. et al.: Cancer Res. 20: 344. 1960.
- 18) Mori, S. et al.: Japan J. Cancer Res. 54:

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>251. 1963.</p> <p>19) Sanford, K. K. et al.: J. Nat. Cancer Inst. 23: 1061. 1959.</p> <p>20) Barski, G. et al.: J. Nat. Cancer Inst. 26:</p> | <p>865. 1961.</p> <p>21) 高井新一郎: 大阪大学医学雑誌 15: 63. 1963</p> <p>22) 佐藤二郎, 笛吹圭二: 第九回防衛衛生学会にて報告, 論文未発表,</p> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|

On the Properties of an Established Cell Strain, JTC-11, from
Ehrlich Ascites Tumor in Tissue Culture

Part 1 The Characteristics of the Standard Strain (K-Strain)

By

Mitsuhiko Hamasaki

Department of Microbiology, Okayama University Medical School

(Prof. S. Murakami)

Pathological Division, Cancer Institute of Okayama University Medical School, Okayama, Japan

(Director: J. Sato)

Ehrlich Ascites Tumor Cells (JTC-11) reported here have been cultured in vitro for more than 3 years by pipetting, using 80% YLE+20% Bovine serum (final concentration: yeast extract 0.08%, lactalbumin hydrolysate 0.4%) as the medium. As the results of tissue culture experiments concerning the characteristics of this strain, I obtained the following conclusion.

1) This (JTC-11) K-Strain is the easiest group of actual animal malignant tissue culture strains in points of cell preservation, culture-method (pipetting), stability, medium-unchanging during one subculture term, inoculum size and adhesion on the glass surface.

2) The proliferation rate is the greatest (about 2000 times for 8 days) and even a small number of cells have the ability of proliferation.

3) After the intraperitoneal reinoculation into female mice with more than 1.6×10^4 this strain cells, all the mice died by the tumor. Accordingly tumor producing capacity has been strongly preserved after a lapse of 3 years.

4) The strain-character (Sato) of this K-strain cells has still remained after in vivo 100 days transplantation through Cb-mice (Experiments of retissue-culture).

5) This K-strain cells have a interesting form, namely the small sucker-form podia appear at the tip of the processes.

浜崎論文附図



写真1 第1日目



写真2 第3日目



写真3 第7日目

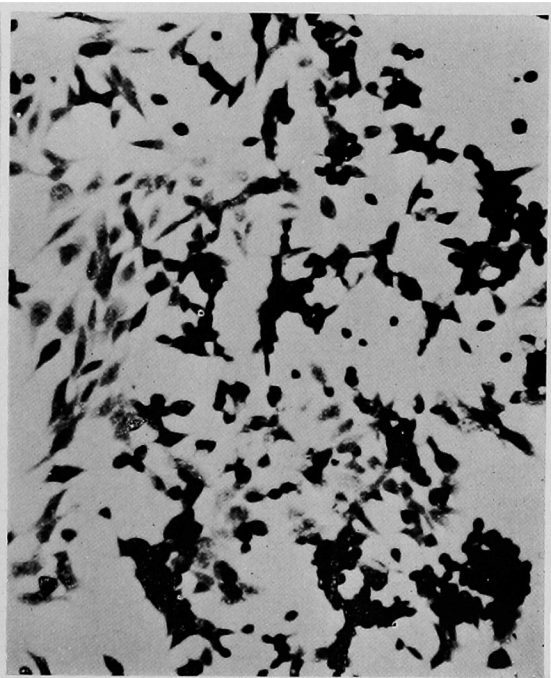


写真4 第10日目