

C₃H 乳 癌 細 胞 の 組 織 培 養 に つ い て

第 1 編

長期培養された C₃H 乳癌細胞株 (C₃H-Hei 株細胞仮称)の性状について

(本論文の要旨は第15回日本組織培養学会において発表)

岡山大学医学部附属癌源研究所病理部 (主任: 佐藤二郎助教授)

助 手 野 田 正 彦

〔昭和39年3月28日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言

第2章 実験材料及び実験方法

第1節 実験動物及び使用腫瘍

第2節 培養方法

第3節 培養液

第4節 染色法

第5節 核数計算法

第6節 染色体染色と計数方法

第7節 復元方法

第3章 実験結果

第1節 初期培養細胞の状況及び継代

第2節 増殖率

第3節 Yeast extract (Difco) の至適濃度

第4節 Lactalbumin Hydrolysate (NBC) の至適濃度

第5節 葡萄糖の至適濃度

第6節 細胞株の染色体数

第7節 復元成績

第4章 総括及び考案

第5章 結 論

第1章 緒 言

一般的に知られてる様に C₃H マウス乳癌の自然発生率は、8～9ヶ月で95%以上に達し癌研究の為には非常に重要、且興味ある実験材料である。我国においても C₃H 乳癌は種々の研究機関で検討されているが、未だ組織培養し株化された報告を見ない。我々の研究室では、既に Ehrlich 腹水癌細胞¹⁾²⁾、吉田肉腫細胞³⁾ ラット肝細胞⁴⁾ 等の長期組織培養に成功しているが、私は佐藤の指示に従って C₃H 乳癌細胞の株化を企図した。それによつて生物学的細胞学的ウイルス学的、或は生化学的追求を行ない、癌の本質を究めたいと思う。私はこの第1編においては、長期培養に最初に成功した C₃H 乳癌細胞の一株 (C₃H-Hei) について主として病理組織学的及び生物学的記載を行ない、併せて培養方法を論じたいと思う。

第2章 実験材料及び実験方法

第1節 実験動物及び使用腫瘍

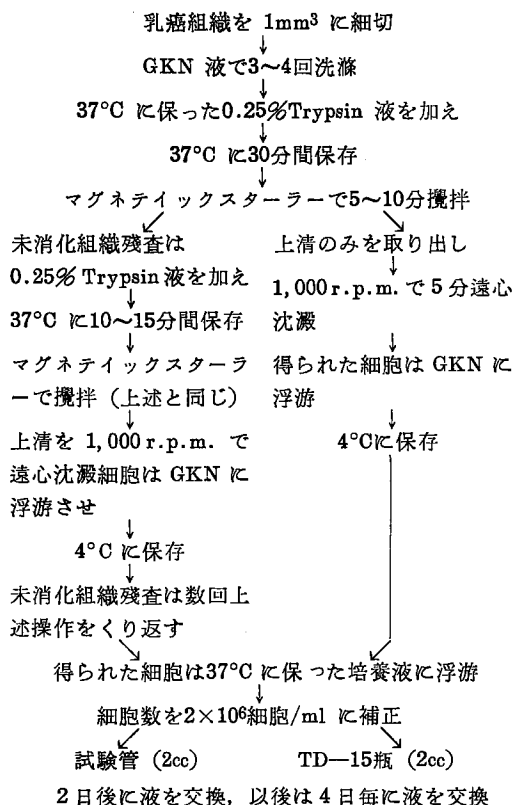
株化に使用した担癌 C₃H 系マウス及び復元実験

に使用した C₃H 系、Cb 系、Zb 系マウスは岡山大学医学部マウスコロニーで、オリエンタル工業 KK の固形実験用飼料と水を自由に与えて飼育されたマウスである。実験時、腫瘍は 2.5×2.9×1.5cm の大きさで、被膜の剝離は安易であり、剖面は灰白赤色で血液に富み、弾性は少なく、もろかつた。

第2節 培養方法

組織培養法は表1に示した様に腫瘍組織を無菌的に取出し、1mm³ に細切りし、GKN⁵⁾ で3～4回洗滌、三角コルベンへ入れ 37°C に保つた 0.25% Trypsin (Difco) GKN 溶液を加え、37°C に30分間静置、次に 37°C 加温のマグネティックスターで5～10分泡の出ない程度に攪拌し、未消化組織残渣は残し、遊離細胞を含む上清のみを取出し、1,000 r. p. m. で5分間遠沈、得た細胞は GKN 液に浮游し 4°C に保存する。未消化組織残渣のものは、再び 0.25% Trypsin GKN 溶液を加え上記の操作を数回繰返して、Trypsin 処理でバラバラとなつた細胞を遠沈して集め、培養液を加え、細胞数を 1ml 当り 2×10⁶ として試験管と TD-15 瓶え 2ml

表 1 細胞分離法



宛々分注し, 2日目に培養液を交換し, 以後は4日間隔で培養液の交換を行なった。

第3節 培養液

培養液は Earle の塩類溶液に Lactalbumin Hydrolysate (NBC), Yeast extract (Difco) を加えた。YLE 50% に牛血清 50% を最終濃度 Glucose 0.225%, Lactalbumin Hydrolysate 0.25%, Yeast extract 0.05% となる様にした。牛血清は 56°C 30分 で非働性にして使用した。動物から分離初期にはペニシリンを 1ml 当200単位となる様に培養液に加えた。pH は7.2~7.4となる様調整したが, フェノールレッド等の pH の指示薬は使用しなかつた。

第4節 染色法

細胞株はタンザク培養を行なつて, ギムザ染色をした。カバーガラスを試験管の内径の $\frac{2}{3}$ 位の中に細長く切り, これを試験管に入れ滅菌し, 細胞浮游液を入れ 5° の傾斜静置培養をするとカバーガラス上に細胞が附着し, 集落を作り増殖する。これを取り出してギムザ染色を行なつた。染色に使用する場合には液交換の1日後が最も良く液交換後日数を経たもの, 或は 1ml 当の細胞数の多い場合には変性を

受け染色状態は不良であつた。

第5節 核数計算法

核数の計算は増殖率, 葡萄糖の至適濃度, Yeast extract の至適濃度, Lactalbumin Hydrolysate の至適濃度の各実験共通であるが, 次の様に行なつた。母培養より実験に必要な細胞浮游液を作るには細胞の核数の計算が必要であるが, その方法はSanford⁶⁾の原理に従つた勝田の改良法⁷⁾ によつて行なつた。実験の表に記載された一つの点を Plot するためには, 3本の試験管の平均値を使用し, 1本の試験管の核数は4回 Bürker Türk 氏計算盤で計数した。クリスタルヴァイオレット液 (100ml の蒸溜水+2.1g クエン酸+50mg クリスタルヴァイオレット) を使用して細胞質を融解し, 細胞核のみにする場合, 細胞の種類によつて温度, 振盪等の時間が異なるが, C₃H 乳癌細胞 (C₃H-Hei) の場合には 37°C, 30 分静置後比較的簡単な振盪によつて細胞をバラバラとする事が出来た。この際, 細胞核の均等液を作る事及び管壁に残留する細胞を無くする事が実験結果に対して極めて重要である。クリスタルヴァイオレット液で, 健康であつた細胞の核はきれいに染まり, 核小体も見えるが, 変性に陥つていた細胞では核濃縮, 或は核質融解が起つている。又細胞分裂中のものも鉦紡体をもつて染色体が集まつているのを観察する事が出来る。

第6節 染色体染色と計数方法

染色体の検索には牧野の水処理押しつぶし法⁸⁾ を使用した。染色液は30%酢酸にダリア色素を0.75%の割合に溶かしたものである。コルヒチン濃度は0.0000025%最終濃度⁹⁾ となる様にして, 15時間培養した後, 細胞をラバークリナーで集め遠心器で1000r.p.m. 5分, 上清をすてて油気のないスライドグラスに細胞液を1滴おとし, これに蒸溜水を1滴加え, 少しくガラス棒で攪拌し, 約5~10分間放置して, 細胞がやや半透明となつたとき, ダリア染色液を1滴落とし, 1分程放置して, カバーガラス (24×32mm) を空気の混入しない様かぶせ, カバーガラスと共に, スライドを吸取紙にはさんで机の上に水平に置き, その上から親指で静かに強く押しつけて細胞をつぶす。その後, カバーガラスの周辺は染色液が乾かない様にパラフィンで封ずる。計数は油浸で行なつた。この方法では押しつぶし過ぎて, 染色体がバラバラとなり, 一部が他に移動して消失する事が考えられるので, この危険を除くため, 分

析には他の分裂細胞より離れた細胞を注意深く観察した。

第7節 復元方法

復元に使用したマウスは C₃H, Cb, Zb 系マウスの♀生後2ヶ月程度のものを岡山大学医学部マウスコロニーより取りよせて使用した。接種部位は背部皮下に行なつた。一部はレントゲン照射による前処置を行なつた。400r 全身照射で、照射条件は 180 KVP, 3mA. Cu 0.5+Al 0.5, H. W. S. Cu 1.1, F. H. O. 30cm, 25.5r/分で総量 400r である。接種用の細胞は全て TD-40 で培養され 0.2% Trypsin GKN 溶液処理を行なつて細胞を集め、1000r. p. m. 5分遠沈して、Condition-media (C₃H-Hei 株を培養し1~3日間を経た培養液)に浮游させ細胞核数を計算して、1匹当りの必要接種細胞数を 0.3ml の培養液に浮游せしめる様にして皮下接種した。復元マウスは実験に使用する以外のものは総て死に到るまで観察した。

第3章 実験結果

第1節 初期培養細胞の状況及び継代

マウスより分離し、trypsinize され培養を開始された細胞は翌日直ちに試験管又は TD-15 瓶の底面え、上皮様細胞の単層コロニーとして(写真1)広がって来た。各々の小さな単層コロニーはお互に広がって3日間で癒合し、ガラス面は全て細胞の単層 Sheet でおおわれた。腫瘍の間質からの間質細胞群は腫瘍結節から腫瘍細胞を分離する際、使用した 0.25% Trypsin では完全に消化されず、未消化のままケサ状に浮游している事が多く、培養第2日の最初の培養液交換で殆んど流出する事が出来た。少数に残留する線維芽様細胞群も3日後の継代(2代)に際して、ガラス壁に附着せず、次の培養液交換で流出した。従つて私の方法によつて取出された細胞は主として C₃H 乳癌の実質細胞であると考えられる。継代後細胞は再び Sheet 状に広がって来たが、この Sheet 状細胞も総て上皮様細胞の形態を示していた。培養開始後10日目、第2代までは少数ながら分裂像が見られたが、培養開始後18日、第3代の継代では分裂像を見出す事は極めて困難となつた。株化開始後30日目に第4代へ継代したが、この場合ガラス面えバラバラと小塊が島の様に散在して附着した。細胞塊の中心部で細胞が重なり合い、周辺部では単層の上皮様細胞が少量に認められた。併し培養初期の様に細胞が成長し、ガラス底面に広

がつて Sheet とならず、中心部の細胞は重なり合った状態を維持した。前記の細胞の島群は培養液の交換に際して多くの場合、小さな細胞の島は変性し流出したが、4つ程の塊が TD-15 瓶の底面え残つた。この細胞の島の一つが、所謂コロニーとなり増殖を開始した。(写真2)コロニーが大きくなるにつれて、細胞或は細胞の少数の塊が、元のコロニーより四方に飛び散り(写真3)増殖して来た。この増殖細胞は一見上皮様でなく円形又は紡錘形細胞に変化してやや厚みを増していた。他の部位の島状の細胞群は増殖を示して来たコロニーと異なり、4代の初めから終りまで同様の形態を持続し、5代の継代に際してガラス壁に附着せず、完全に消失した。4代から5代の間、即ち、1ケのコロニーが増殖して娘コロニーを形成しながらガラス底面え広がつて行つた間は約5ヶ月を要している。この間、4日間隔で極めて慎重に培養液の交換をつづけた。第4代までの継代は 0.25% Trypsin GKN 溶液で 37°C 20分静置し、細胞を浮游させ遠沈して、Trypsin を除去し、あらためて培養液に浮游させ継代したが、第5代からはピペettingで細胞を浮游させ継代した。第5代以後は所謂紡錘形細胞となつた。(写真4)併し良く観察すると突起の尖端は、所謂線維芽細胞に見られる突起と違つて吸盤状に広がっているものが見られるのは注目に値する。第3代の上皮様 Sheet を呈している間までは巨細胞、及び多核細胞の出現は無く、比較的そろつた細胞であつたが、紡錘形細胞として増殖が開始され、10代以後の細胞群では巨細胞(写真5)が出現して来た。細胞核は円形、乃至卵円形で細胞質は一部のものは円形乃至 Polygonal であるが、多くのものはやや紡錘形で2~3ケの突起を示していた。この突起は細長く延びているものも在るが、一部のものは先にも記した様に、尖端が広がって吸盤状となつていた。極めて少数の細胞は波状にやや巾広く延びた細胞質を有していた。細胞の透明度は上皮様形態を有していた3代までは非常に薄く、透明であつたが、増殖を開始し、紡錘形細胞となつた4代目の細胞から透明度がおちて部厚い感じの細胞となつた。細胞がガラス面全体に広がると隣り合つた細胞が押し合い細胞は少しく上皮様 Sheet の形を示したが、一部では細胞が重なり合う傾向を示した。(写真6)培養の継代日数は表2に示した。現在103代、総日数831日(1964, 3-16)で尚継代中である。

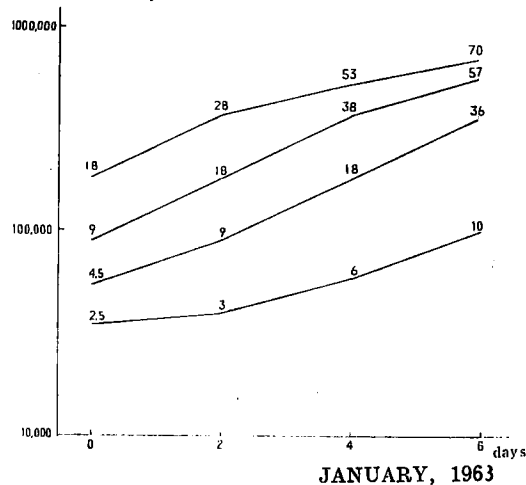
表 2

HEI STRAIN					
Generation	Date	Generation	Date	Generation	Date
1	1961, 12 6	29	1962, 11 19	57	1963, 5 9
2	9	30	24	58	17
3	23	31	12 2	59	23
4	1962, 1 5	32	14	60	30
5	6 10	33	21	61	6 6
6	15	34	25	62	13
7	22	35	1963, 1 2	63	21
8	27	36	14	64	28
9	7 3	37	21	65	7 6
10	7	38	26	66	12
11	12	39	2 2	67	16
12	18	40	5	68	24
13	25	41	9	69	31
14	31	42	18	70	8 6
15	8 12	43	23	71	14
16	20	44	26	72	20
17	29	45	3 2	73	27
18	9 7	46	12	74	9 2
19	14	47	19	75	6
20	19	48	22	76	14
21	24	49	26	77	21
22	29	50	29	78	27
23	10 4	51	4 8	79	10 5
24	10	52	12	80	12
25	19	53	16	81	19
26	25	54	20	82	23
27	11 5	55	27	83	29
28	11	56	5 2		

1963, 11 1

第2節 増殖率

増殖率の実験は株化後1年1ヶ月、培養継代36代の細胞のものを示した。実験に使用した培養液は株化に使用したもの、即ち、YLE 50%+牛血清50%（最終濃度 Lactalbumin Hydrolysate 0.25%, Yeast extract 0.05%, 葡萄糖 0.225%）を使用した。実験方法は母細胞瓶に GKN 液を入れ、ラパークリナーで落とし、細胞を Pipetting して出来るだけ均等にした後、細胞を集めて計数し、実験日0日注入量を1ml 当りの細胞数、 2.5×10^4 , 4.5×10^4 , 9×10^4 , 18×10^4 の倍数希釈をして、各4系列に分け、各系列に実験短試10本を作り、2日後、4日後、6日後、各3本を取出し、実験方法に記した如く計数した。実験は静置 5° 傾斜培養で、培養液の交換は

図1 EFFECT OF THE INOCULUM SIZE (50% BOVINE SERUM AND SALINE YLE.) C₃H-HEI STRAIN

JANUARY, 1963

2日後, 4日後と2日間隔で行なつた。計数に際して, この C₃H-Hei 株はガラス壁への附着が良く, 浮游細胞は殆んど見られない状態であるので, 浮游細胞は計数しなかつた。増殖率の曲線は実験注入量の少ない, 2.5×10^4 細胞/ml の場合は凹様, 1ml 当細胞数の多い所, 即ち 18×10^4 細胞の部分では凸曲線を示して, 一般の組織培養株細胞の増殖曲線と同一の傾向を示している。この傾向の主原因はガラス面の単位面積に存し得る。それぞれの細胞の限界数の問題と培地交新, 特に初期注入時における細胞の順応の点に関する原因が主として考えられる。6日間の増殖率は 2.5×10^4 /ml の場合4倍, 4.5×10^4 /ml の場合8倍, 9×10^4 /ml の場合6.3倍, 18×10^4 /ml の場合4倍であつた。図1の曲線からみると, 4.5×10^4 細胞/ml の場合, 0日から6日にかけて対数増殖を示しており, この状態が各日数において細胞の最も安定な量と考えられるので, 以後の実験は1ml 当, 略々 5×10^4 細胞数を目標として行なつた。

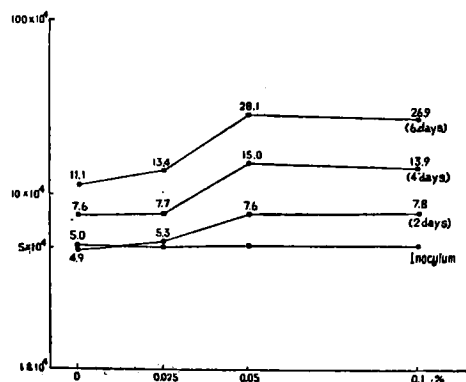
第3節 Yeast extract の至適濃度

従来, Yeast extract は培養の基本の栄養分として広く用いられている。Yeast extract は種々の酵素と多量のビタミンが含有されている。

勝田¹⁰⁾ はサルの腎臓細胞の株化での報告の中で Yeast extract は細胞の増殖に有害であるとのべている。佐藤は吉田肉腫の場合には Yeast extract はその増殖に有害であるが Ehrlich 乳癌の場合には濃度によつて有害であると報告している。私はこの点について C₃H 乳癌細胞株 C₃H-Hei 株で検討した。細胞は約1年1ヶ月, 36代継代された時期に, Yeast extract の至適濃度を測定した。実験方法は Earle's saline+0.25% Lactalbumin Hydrolysate+0.225% 葡萄糖+20%牛血清を基礎培養液とし, それに Yeast extract の最終濃度が, 次の各濃度即ち, 0%, 0.025%, 0.05%, 0.1%となる様に計算して培養液を作り, 細胞の増殖に対する至適濃度を調べた。計数方法は前実験と同様である。実験開始時の細胞数は1ml 当り 5×10^4 細胞数とし図2に結果を示した。実験2日後の計数で0%の系列は細胞数の増減は殆んど無かつたが, 他の系列は総て増殖を示した。4日後の計数では0%も増殖を示している。6日間の実験で0.05%のものが, 5.6倍となり, 細胞増殖に至適濃度であるとの結果を得た。この場合の0.05%の濃度は, 母細胞維持培養液の YLE 50%+牛血清50%の Yeast extract の濃度と同様であつた。

図2 EFFECT OF THE CONCENTRATION OF YEAST EXTRACT IN THE MEDIUM CONTAINING OF 20% BOVINE SERUM AND SALINE E. C₃H-HEI STRAIN

0.25% Lactalbumin Hydrolysate
0.225% Glucose



JANUARY, 1963

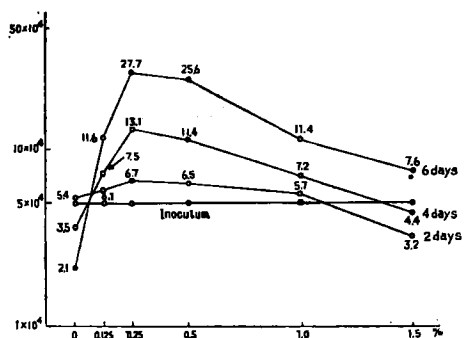
低濃度より高濃度の方が増殖には安全であるが, Yeast extract が除かれても増殖をおこしていた。

第4節 Lactalbumin Hydrolysate の至適濃度

Carrel¹¹⁾ が蛋白の Enzymatic Hydrolysate が培養に必要である事を発見して以来, 広く使用されている。Lactalbumin Hydrolysate は milk から得られ, β -lactoglobulin, α -lactalbumin 及び血清蛋白を主成分とする。これを加水分解したものであり, 必須アミノ酸, 又その他のアミノ酸, 及び Peptide を含有している。Eagle¹²⁾ はアミノ酸とビタミンを主とする合成培地で培養した。L 及び HeLa 細胞に Dipeptide を追加し, 増殖が良くなつた事を報告している。又勝田¹⁰⁾ は培養細胞における Lactalbumin Hydrolysate の至適濃度は多くの細胞で0.4%最終濃度と報告している。私は C₃H 乳癌細胞株で, この点を検討した。実験方法としては, 1年1ヶ月37代組織培養に継代した細胞を用い, 基礎培養液は Earle's saline+0.225%葡萄糖+0.05%Yeast extract +20%牛血清とした。Yeast extract の濃度は前実験で細胞の増殖の最も良い結果を得た最終濃度0.05%を使用した。Lactalbumin の濃度は0%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%最終濃度の6種類で至適濃度を調べた。結果は図3に示した。実験開始時の細胞数は Yeast extract の実験の場合と同様 1ml 当り, 5×10^4 細胞とした。培養液の液交換は2日間隔とし定めた時間に行なつた。2日後の計数で高

図3 EFFECT OF THE CONCENTRATION OF LACTALBUMIN IN THE MEDIUM CONTAINING OF 20% BOVINE SERUM AND SALINE E. C₃H-HEI STRAIN

0.05% Yeast extract
0.225% Glucose



JANUARY, 1963

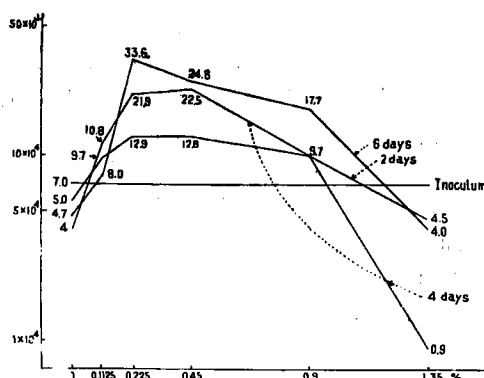
濃度の1.5%は増殖を見ず、かえって減少したが、4日目、6日目で漸次増殖を示し、初期量よりも最終的には増加した。0%の系列は2日後は少しの増殖を示したが、4日後、さらに6日後と細胞数の減少を来している。最終濃度0.25%の場合がもつとも増殖を示し、6日間で5.5倍を示した。この濃度は継代に使用した維持培地の Lactalbumin Hydrolysate の濃度と一致していた。この事は他の Yeast extract の場合と同様の現象であつた。Lactalbumin Hydrolysate の場合にも最終濃度より含有量の少ない側で減少が著しく、特に0%の場合には全く増殖の傾向が見られなかつた。

第5節 葡萄糖の至適濃度

葡萄糖は細胞により分解され乳酸となり、エネルギー源として使用される。細胞の葡萄糖利用は組織培養の細胞で従来生化学的に種々研究が行なわれているが、現在一般的に行なわれている組織培養法では、その実験を行なう場が閉鎖系であるために必然的に葡萄糖の終末産物による異常代謝も当然考えられなければならない。従つてそれぞれの細胞について増殖率を目標とした至適の葡萄糖濃度が決定されて後一定の条件において種々の実験が行なわれなければならない。私は葡萄糖の最終濃度を種々に変えて、C₃H 肝癌細胞株 (C₃H-Hei) 最適葡萄糖量の算定を行なつた。1年5ヶ月、培養継代数52代の細胞を用いて、基礎培養液を Earle's saline+0.25% Lactalbumin Hydrolysate+0.05% Yeast extract+20% 牛血清として、葡萄糖の濃度を0%, 0.1125%,

図4 EFFECT OF THE CONCENTRATION OF GLUCOSE IN THE MEDIUM CONTAINING OF 20% BOVINE SERUM AND SALINE E. C₃H-HEI STRAIN

0.25% Lactalbumin Hydrolysate
0.05% Yeast extract



APRIL, 1963

0.225%, 0.45%, 0.9%, 1.35%の最終濃度の6種類で増殖の至適濃度を調べた。結果は図4に示した。実験開始時の細胞数は 7×10^4 細胞/ml とした。培養液の液交換は2日間隔とし計数後に定めた時間に行なつた。実験2日後の計数で葡萄糖の0%と、高濃度の1.35%の系列で細胞数の減少が見られ、0%は4日後最も下がり、6日後やや上がっているが、実験日に比して常に減少していた。この傾向は1.35%のものでも同様で、4日目が最低で6日目はやや上がっていた。全体の傾向としては0.225%の葡萄糖最終濃度の場合が、細胞の増殖が最も良かつたとの結果を得た。この場合の葡萄糖の濃度は維持培地中における YLE 50%+牛血清50%中の葡萄糖の濃度と一致していた。葡萄糖量が0.225%より少なくなる場合には急速に増殖が悪くなり、増加の場合には影響が比較的広い範囲において少ない事が明らかとなつた。従つて葡萄糖の場合にも、むしろ多い部分において使用される方が安全であると云える。

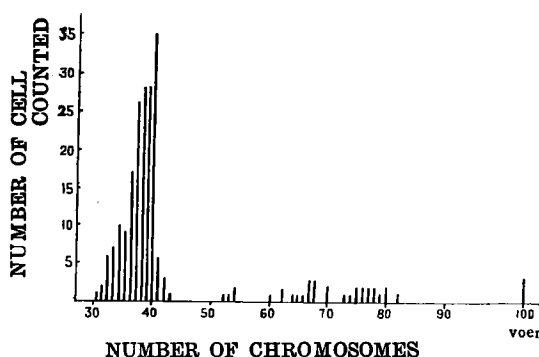
第6節 細胞株の染色体数

癌の細胞学的研究の始まつた19世紀後半より腫瘍の発生は正常体細胞に含まれている遺伝因子の変化と云う想定より Bauer (1911) の腫瘍発生突然変異説を生み、又、Boveri (1914) は染色体の型及び数の変化、即ち、染色体の分裂異常、多極分裂で細胞の平衡が破れる事が癌発生の原因として来た。最近は牧野, Hau, Levan 等の染色体の研究から牧野の種幹細胞説が多くの動物腫瘍及び人腫瘍材料で

検討された。

Stemcell theory は一部変更されざるを得なくなつたが腫瘍細胞における染色体そのものについて興味は彼等によつて極めて強く押し出された。私は C₃H の原発乳癌の染色体を 11 匹のマウス腫瘍で検討した。実験方法としては腫瘍を一次培養し 5～7 日後に染色体を調べた。結果は図 5 に示す様に、37～40 をモードとし Triploid 附近、又 Tetraploid 附近にも少しく分布している結果を得た。染色体数が組織培養中で移動変化する事、即ち、一般的な場合とし

図 5 C₃H ORIGINAL STRAIN
MARCH, 1964

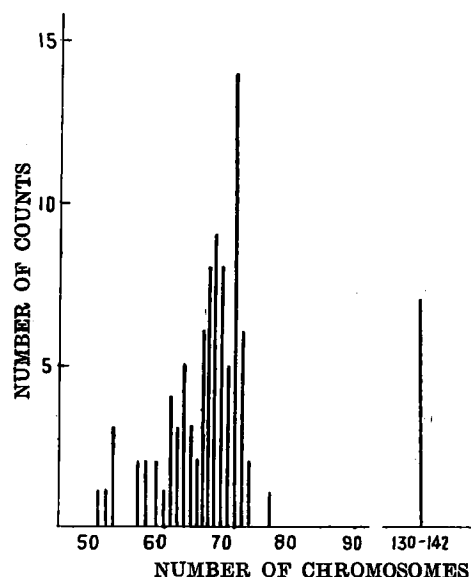


て、組織培養での初期の段階では Diploid 又は near-Diploid を所有しているが、組織培養を継続して行くと Tetraploid 附近へ移行し、染色体の増加を認め、次いで Triploid と Tetraploid との間の染色体数で染色体数が安定するとされている。Levan 等¹³⁾ の C₃H マウス腹膜細胞及び骨髓細胞からの組織培養株細胞又 J. Paul¹⁴⁾ の癌細胞についての報告等がある。私は C₃H 乳癌細胞株を 1 年間、培養したものの染色体数を検討したが、図 6 に示す結果を得た。即ち、染色体数 72 のものが 14.7% あり、62～73 のものが大多数であり、所謂 Triploid に近いものであつた。130 以上の染色体数を持つ細胞も認められたが、正常染色体数の Diploid 又 near-Diploid の染色体数を持つ細胞は検索した範囲では認める事は出来なかつた。染色体の形態等は後に報告する。

第 7 節 復元成績

復元成績は表 3 に総括して示した。復元使用マウスは生後約 2 ヶ月前後の♀である。組織培養し、6 日目に試験管 2 本の細胞を集め C₃H マウスへ復元したが、約 1 ヶ月の潜伏期を経て腫瘍の増殖を見た。この腫瘍は再び約 2 ヶ月後組織培養に移行させたが、

図 6 C₃H-HEI STRAIN IN TISSUE CULTURE
18G JANUARY, 1963



培養での細胞形態は総て上皮様であつた。株化に成功し 216 日の培養を経過した細胞を 10 匹の Zb 系マウスの皮下と腹腔に復元した。復元接種細胞数は皮下、腹腔共 2×10^6 細胞数が各 3 匹、 9.5×10^6 細胞数が各 2 匹、合計 10 匹に実験し、約 110 日観察したが腫瘍の発生を見なかつた。組織培養後 223 日に C₃H マウス 2 匹に、細胞数 2.4×10^7 は皮下え、細胞数 1.6×10^7 は腹腔え復元したが腫瘍の増殖は約 100 日観察したが見なかつた。以上は被接種マウスに対して無処置の状態で復元された。培養後 429 日、C₃H マウスに対して 400r 全身照射して後直ちに 9×10^6 細胞数を接種した場合に始めて腫瘍の発生を見る事が出来た。これ以後の実験は総てレントゲン全身照射処置して行なつた。組織培養後、453 日、Cb 系マウス 2 匹、細胞数 1×10^7 を接種したが腫瘍は形成されなかつた。組織培養後 499 日、Zb, C₃H, Cb 系マウスと同時に復元実験を行なつた。Zb マウスは 1 匹、接種細胞数 6×10^6 、C₃H マウスは接種細胞数 6×10^6 、4 匹、 1.2×10^7 は 3 匹、Cb マウスは接種細胞数 6×10^6 4 匹、 1.2×10^7 も 4 匹接種した。この場合には C₃H マウスでは全例腫瘍の発生を見た。Cb, Zb マウスでは腫瘍の発生はみられなかつた。株化後の細胞で復元に成功したのは、前処置としてレントゲン全身照射を行なつた場合で C₃H マウスに限られた。図 7 には腫瘍発生状況を示した。潜伏期は約 15～43 日間で腫瘍は徐々に増大

表3 TUMOR INCIDENCE IN MICE BACKTRANSPLANTED WITH HEI-STRAIN

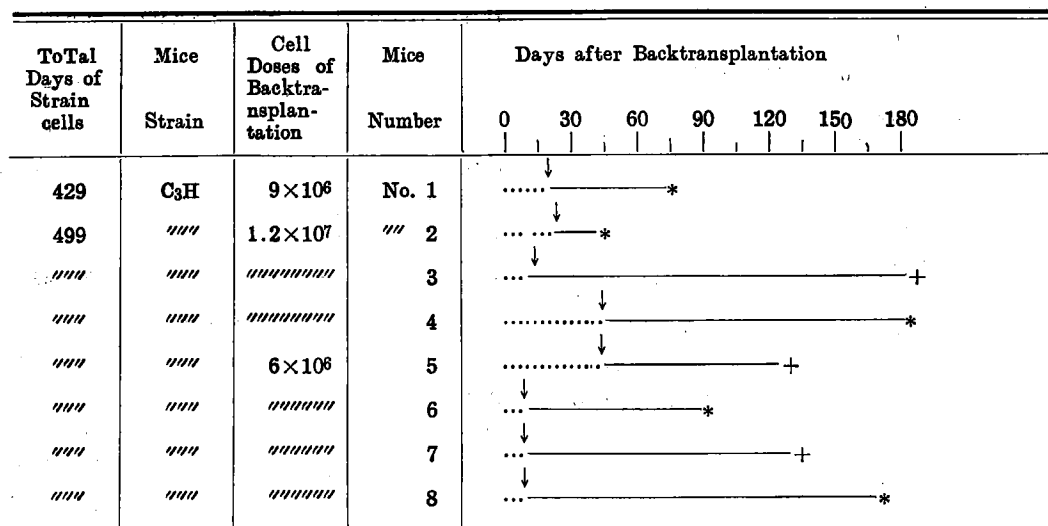
Date of Back-transplantation	Total Days of Cell strain at Time of Backtransplantation	Strain Cell Doses	Number With Tumor/Total Number Back-transplanted	Strain of Mice
61, 12-12	6	Two Tubes	1/1	C ₃ H
62, 7-10.	216	2×10 ⁶ =6 I.P.3 S.C.3 9.5×10 ⁶ =4 I.P.2 S.C.2	0/10	Zb
62, 7-17	223	2.4×10 ⁷ 1.6×10 ⁷	0/2	C ₃ H
63, 2- 8	429	9×10 ⁶	1/1	C ₃ H (r)
63, 3- 4	453	1×10 ⁷	0/2	Cb (r)
63, 4-19	499	6×10 ⁶	0/1	Zb (r)
" " " "	" "	6×10 ⁶ =4Mice 1.2×10 ⁷ =4Mice	0/8	Cb (r)
" " " "	" "	6×10 ⁶ =4Mice 1.2×10 ⁷ =3Mice	7/7	C ₃ H (r)

(r)=Backtransplantation after 400r Total Body Irradiation

I.P.=Intraperitoneal Injection

S.C.=Subcutaneous Injection

図 7 PROGRESS OF BACKTRANSPLANTATION EXPERIMENTS



+ = Natural Tod ... = Latent Period ↓ = Tumor Arising Time * = Experimental Tod

— = Tumor Bearing Time

して来た。復元腫瘍の細胞学的研究は後に報告するが、細胞学的研究に使用する為に殺したマウスもあり、腫瘍死までの観察は3例のみであるが、接種後

各々4ヶ月半、5ヶ月、5ヶ月半の間マウスは生存していた。

第6章 総括及び考案

Bittner の乳因子によつて自然発生する C₃H 乳癌は、今日、Virus 性腫瘍の代表的なものの一つとして有名である¹⁵⁾。併し一般の Virus 性腫瘍の場合と同様に今日、尚癌細胞と Virus との関係について明らかにされていない部分が多い。それは主として腫瘍の発生が、動物体内と云う色々の調節機構の中で、更に性質のそれぞれ異なつた組織或は臓器を含む場所の内で行なわれ、且長期間の潜伏期を有していると言う事の爲である。従つてこれらの問題を解明する手段として先づ第一に C₃H 自然発生乳癌の癌性の維持を目標とした株化が可能かどうかを試みる事は癌の病理発生学上、又癌と組織培養の観点からも重要な事柄と思われる。又本研究は当癌研究所の癌と組織培養という、一連の研究シリーズの一環をなすものである。

私の知り得た限りでは我国においては未だ C₃H 乳癌の長期培養に成功した報告は見られない。外国においても、わずかに1961年 Sanford¹⁶⁾等による報告が見られるのみである。彼等は培養法として C₃H 乳癌から腫瘍を取出し、細切りして Hen-Plasma clot に植込むか或は Evans¹⁷⁾等が Chick-embryo heart. etc.を行なつた方法、即ち D-3.5 Carrel flask の中で穴開きセロハンの Sheet の下に C₃H 乳癌腫瘍の細切り組織をおいて培養を行なっている。これらの方法では細胞増殖の計数等に正確を期し難く、且つ繁殖であるため私は表1の方法に従つて C₃H 乳癌細胞の浮游液をつくり、1ml 当りの細胞を計算してガラス壁に直接腫瘍細胞を附着する方法を使用した。

培養液に関しては Sanford 等は馬血清40%、鶏胎児エキストラクト(C. E. E.)及び Earle の塩類を使用する方法と馬血清10%+NCTC 109を使用する方法を採用し、CO₂ 5%の恒温器で株化を行なっているが、私は現在最も広く利用されている YLE 溶液と牛血清をそれぞれ50%に混じた簡単な培養液を使用し、CO₂ 恒温器を使用しないで、通常の 37°C 乾燥恒温器で株化に成功した。即ちこの株化法は現在のあらゆるの研究室で簡単に行なへる株化方法である。株化の確実性については、後に当研究室において新たに2株の樹立(後に報告)に成功した事からも成功率は高いと云つてよからう。

株化の初期には Sanford 等の記載では上皮様細胞の Sheet が細切腫瘍片から現われて来、更にこ

の上皮様 Sheet は時間の経過と共に(株化後6~12ヶ月)上皮様細胞のみのもの、線維芽様細胞のみのもの、或いは両者の混在せるもの等の状況を示す様になるという。併し Sanford 等の場合の様に腫瘍細片から出発した場合(且 C. E. E. を使用)には腫瘍組織片からの非上皮性成分由来の細胞の増殖を否定する事はむづかしい。従つて株化後の細胞の形態変化についても明確な事は云い難い。私の場合には初代培養のとき、Trypsin 消化を行なうが、このとき実験成績で記載した様に結締組織成分はケサ状に残留し、浮游細胞には含まれない公算が多く、且つ少数に培養瓶に移されたものも2代えの継代及び2代での培養液交換に際して流出した。又写真3で明かな様に初期培養時のコロニーに見える細胞は略々均一で上皮様形態を示している。上記の点から私の継代し得た細胞は C₃H 乳癌の癌実質細胞である可能性が極めて強い。この可能性については後に行なわれた復元実験によつて更に確定となつた。この Hei-strain は第4代で細胞がコロニーをつくつて TD-15 内で増殖を開始した時、上皮様多角形から線維芽様紡錘形になり、位相差で厚さを増して、不透明となり肥満した感じを与える様に変化した。併しこれら紡錘形の細胞の一部では突起の尖端に佐藤が Ehrlich 乳癌の紡錘形細胞で認めたと同様の吸盤が認められた。以上の様な理由から私は Hei-strain の場合には C₃H 乳癌細胞が培養液に順応して細胞増殖を始めた時、多角形細胞から紡錘形細胞に移行したと考えたい。組織培養上における形態変化は佐藤がたびたび主張している様に人工的にも変え得るものであり、培養上一般に云われる線維芽細胞と病理学上でいう線維芽細胞とは明らかに異なるもので、前者は混同をさけるために形態を主点として紡錘形細胞と呼ぶ方がより正確である。この意味から私の場合の Hei-strain の変化を記載すれば“上皮性の多角形細胞から上皮性の紡錘形細胞に移行して株化が成功”した事となる。

C₃H 乳癌の初期培養時の実質及び、間質の培養状況については目下詳細に検討されつつあるので後に報告する。

増殖率については YLE+牛血清の条件で6日で8倍程度の増殖率を示した。又各成分の適性条件は葡萄糖に関しては最終濃度、0, 0.1125, 0.225, 0.45, 0.9及び1.35それぞれ%で検索した結果0.225%で最も増殖が良かったという事がわかつた。Warburg が腫瘍細胞は一般に正常細胞より解糖作

用が大であると報告しており, Sanford¹⁸⁾ は *in vitro* の L 細胞を使用して腫瘍生産能力の大なる細胞は腫瘍生産能力の低いものより糖分解が大であると報告している. 併し C_3H Hei-strain の糖要求性は記載した如くそれほど高くない.

Yeast extract (Difco) に関しては 0, 0.025, 0.05, 0.1 それぞれ%について検索して, 0.05% で最も増殖率が良かった. 勝田¹⁰⁾ はサル腎細胞での報告で腎細胞のみならずラット腹水肝癌, 吉田肉腫及び HeLa 細胞で共に Yeast-extract は細胞の増殖を抑制すると報告している. 高井¹⁹⁾ はアクチノマイシン肉腫株 (JTC-14 株) で 0.04~0.08 の間に適性値があると報告し, 原田²⁰⁾ 等は MN-Lymphosarcoma 細胞で 0.08% が適性値であると報告している. 又 Yeast extract の適性値決定の場合には特に血清そのものの中に類似物が含まれることを考慮されなければならない (佐藤, 笛吹²¹⁾).

Lactalbumin Hydrolysate に就いては, 0, 0.125, 0.25, 0.5, 1 及び 1.5 それぞれで検索し 0.25% が適性である事が判明した. 勝田²²⁾ は無蛋白培養液で培養している L 細胞で検討しているが, 他の細胞, 吉田肉腫, 腹水肝癌でも同様に 0.4% が最適となり, 又前記のアクチノマイシン肉腫株, MN-Lymphosarcoma 株でも同様 0.4% が最適であるが, 我々の場合にはやや低い値 (0.25%) を示している.

尚株細胞の適性培地決定に際して一般的に考えられる事であるが, 初期培養に利用された事実は一般には看過され易いが株細胞になる間にその培地による撰択が行なわれ, その結果として各成分の適性値が初期培地と一致する傾向を示すと考えられる. 従つてその適性値より別に他の濃度で山が見られる様な株細胞では特に初期に於いて適性培地を決定しなければならない.

種々のマウスの自然発生乳癌の染色体の分析は多くの研究者で検討されているが, 一般に Diploid 又は near-Diploid の染色体を持つとされている. C_3H 乳癌で株化した細胞の染色体の細胞学的研究は Levan と Hsu²³⁾ が Sanford の株化した細胞で検討している. Levan が検討した株は Sanford が C_3H 細胞株に命名した, 2777 株と 2940 株の 2 株で, 2777 株の由来は C_3H ♀ の原発乳癌を 1952 年 Dunn と Barrett が動物移植乳癌としたもので C_3H に 33 代, 次いで ($C_3H \times C$) F_1 え 7 代, 次に ($C_3H \times C$) BC, 146 代え移植したものである. 2940 株は Sanford が

Barrett から原発の乳癌を得て ($C_3H \times C$) F_1 え 2 代通過させた後株化したものである. Sanford によつて, この株 2777 と 2940 は各々 1957 年 6 月 19 日と 1957 年 11 月 26 日に株化を開始したものである. この 2 株を Levan が 1959 年 7 月約 2 年後に検索した. この時の培養液は Mcloy's 5a を使用し, Trypsin 処理継代をしている. 両株とも Heteroploid を有している. 即ち 2777 株は染色体数 67~79 に分布し, 分析細胞 41 個中, 染色体数 70 と 73 に各 9 ケ細胞が有り, 特に多く現れている. 2940 株は染色体数 82~86 に分布し, 分析細胞 25 個中, 染色体数 84 に 10 個の細胞と 95 に 8 個の細胞が有る結果を得ている. 私の場合は原発腫瘍より, 1961 年 12 月に株化を開始し, 1963 年 1 月に染色体の検討を行なつたが, 染色体数は 50~78 に分布し, 分析細胞 95 個中, 72 の染色体数に 14 個と一番多く現われたが 63~72 の範囲に分布して居る染色体数を持つ細胞が多かつた. Levan が検討した 2777 株と類似した結果を得た. 2940 株の染色体数の分布 82~86 には私の場合無く, 130 個以上の染色体数を有する細胞が 7 ケ現れて来た. Tjio²⁴⁾ 原発性腫瘍即ち milk agent の有る C_3H マウスと dba マウスの染色体の研究を行ない, ほとんどが染色体数 40 の値を有していると報告している. 生体からとり出されて組織培養され株細胞となつた場合には, 染色体数が 3 倍体附近になつて安定する事は既に多くの場合に認められている¹³⁾¹⁴⁾. 併しその原因については Barski²⁵⁾²⁶⁾ の細胞合体説や Levan¹³⁾ 等の培養細胞から放出される異常の Purine や Pyrimidine による説等が有るが詳細にはわかつていない.

私の場合残念ながら初期の染色体数を調べていないが, 細胞株は Hypotetraploid で Stemcell number は 72 で 2777 株と似た様な結果を得た. 復元方法と結果は Sanford の実験では使用マウスは 6 週で生後 1~6 ケ月のものを使用し, マウス種は C_3H/An 系を主として使用し, その他 C_3H/He C_3H/Hen , 又この F_1 hybrid を使用している. 接種部位は腋窩左右皮下接種, 一部は 425 r をマウスえ全身照射して実験を行なつている. 株化後 10~80 週の間で種々接種を行なつているが, 20 週までは復元の成功率が悪く, 40 週後が成功率が良い様で, 又レントゲン照射処置のものが復元率が高い傾向を示している. 株化後 20 週まではレントゲン照射処置しての復元実験が無い様で復元の成功率が良くなかつたと考えられるが, 復元率約 50% である. 株化後 40 週以後のレントゲン照射処置では, ほとんど全例の復元成功を

見ている。私の場合は復元に使用したマウスはCb Zb C₃H であるが、レントゲン照射処置をしない場合は株化6日目の復元実験1例のみが成功し、他は不成功に終った。レントゲン照射処置しての復元実験は株化後70週に行なっているが、この時はC₃H マウスについては全例成功した。70週目頃にSanfordも2777株で復元実験を行なっているが、これも10例全部に成功している。私の場合Cb Zbにはレントゲン400rの処置、無処置にかかわらず全く成功しなかつた。私の実験では潜伏期は2~6週間であつたが、Sanfordの場合は約平均8週、レントゲン照射処置の有無に関係なく要している。この事から私の株化したC₃H細胞株がSanfordの株よりも少しく腫瘍性が高い様に思われる。

第7章 結 論

- 1) C₃H 自然発生乳癌細胞を trypsinize して支持体をいれないうで、ガラス壁に直接附着させて株化に成功した。現在103代831日(1964, 3~16)継代をつづけている。
- 2) 培養液、通常用いられる最も簡単な培地である YLE 50%+牛血清50%を使用した。
- 3) 培養細胞の形態は株化初期は上皮様多角形の

細胞 Sheet として現われて来たが、組織培養で増殖を示した4代からは紡錘形に近く所謂、線維芽様細胞へ変化した。佐藤の指摘する様に突起の先端に吸盤がみられるものがあつた。

4) 増殖率は2日間隔の培養液の交換を行ない6日間で8倍の増殖を示した。

5) 栄養要求の実験は Earle's saline+20%牛血清を基礎培地として行ない、葡萄糖, Yeast extract, Lactalbumin Hydrolysate の細胞増殖に対する至適最終濃度は、各々0.225%, 0.05%, 0.25%の結果を得た。この至適濃度は株化又は、維持に使用した培養液の濃度に一致していた。

6) 染色体数は Hypotetraploid を有し、Stemcell number は 72 Mode は64~72であつた。

7) 復元実験はC₃H系マウスでレントゲン処置400r全身照射し、接種したもので、7例中全例の成功を見た。しかしながらCb, Zb系マウスへの復元は今の所成功していない。

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わすと共に、本実験について御援助を頂いた佐藤文子所員に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Sato, J., Matsuda, S., Yabe, T., Usui, K., and Noda, M. Tissue Culture of Ehrlich Ascites Tumor Cells. Bulletin of the Cancer Institute Okayama University Medical School. 1: 42-68, 1961.
- 2) 浜崎充彦: 岡山医学会雑誌投稿済。
- 3) 佐藤二郎: 第20回日本癌学会総会, 昭和36年。
- 4) 佐藤二郎: 第22回日本癌学会総会, 昭和38年。
- 5) Merchant, Kahn and Murphy. "Handbook of Cell and Organ Culture" Burgess Publishing Company, Minneapolis. 1960.
- 6) Sanford, K. K., Earle, W. R., Evans, V. J., Waltz, H. K., & Shannon, J. E. The measurement of Proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. J. Nat. Cancer Inst. 11: 773-795, 1951.
- 7) 勝田 甫: 組織培養法, 納谷書店, 東京, 1955.
- 8) 佐々木: 日本臨床, 19: 2233-2242, 1961引用。
- 9) Paul, J. "Cell and Tissue Culture" Livingstone LTD. London. 1960.
- 10) Takaoka, T., and Katsuta, H. Establishment of a cell strain, JTC-12, from cynomolgus monkey kidney tissue. Japan. J. Exp. Med. 32: 351-368, 1962.
- 11) Carrel, A. and Baker, L. E. The chemical nature of substances required for cell multiplication. J. Exp. Med. 44: 503-521, 1926.
- 12) Eagle, H.; Utilization of dipeptides by mammalian cell in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 89. 71-77, 1955.
- 13) Hsu, T. C., Billen, D. and Levan, A. Mammalian chromosomes in vitro, XV. Patterns of transformation. J. Nat. Cancer Inst. 27: 515-541. 1961. 7

- 14) Paul, J. The cancer cell in vitro. *Cancer Res.* 22: 431-440, 1962.
- 15) Gross, L. "Oncogenic Viruses" Pergamon Press. New York. 1961.
- 16) Sanford, K. K., Dunn, T. B., Westfall, B. B., Covalessky, A. B., Dupree, L. T. and Earle, W. R. Sarcomatous change and maintenance of differentiation in long-term cultures of mouse mammary carcinoma. *J. Nat. Cancer Inst.* 26: 1139-1183, 1961.
- 17) Evans, V. J. and Earle, W. R. The use of perforated cellophane for the growth of cells in tissue culture. *J. Nat. Cancer Inst.* 8: 103-119, 1947.
- 18) Sanford, K. K., Wood, M. W., Burk, D. and Earle, W. R. Glycolytic properties of high and low sarcoma-producing lines and clones of mouse tissue culture cells. *J. Nat. Cancer Inst.* 23: 1079-1088, 1959.
- 19) Takai, S. A newly established tissue culture strain, strain JTC-14, from Actinomycin sarcoma (Kawamata), and its biological properties, *大阪大学医学会雑誌*, 15: 63-70, 1963.
- 20) Mori, S., Harada, Y. and Yamaoka, I. In vitro cultivation of MN-Lymphosarcoma cells. *GANN*, 54: 239-250, 1963.
- 21) 佐藤二郎, 笛吹圭二: 第8回防衛衛生学会, 昭和37年.
- 22) Kagawa, Y., Kaneko, K., Takaoka, T. and Katsuta, H. Amino acid consumption by strain L cell (mouse fibroblasts) in protein-free media. *Japan. J. Exp. Med.* 30: 95-113, 1960.
- 23) Levan, A. and Hsu, T. C. The chromosomes of two cell strain from mammary carcinomas of the mouse. *Hereditas.* 49: 231-240, 1960.
- 24) Tjio, J. H. and Östergren, G. The chromosomes of primary mammary carcinomas in milk virus strains of the mouse. *Hereditas.* 44: 451-465 1958.
- 25) Barski, G., Sorieul, S. and Cornefect, Fr. "Hybrid" type cells in combined-cultures of two different mammalian cell strain. *J. Nat. cancer Inst.* 26: 1269-1291, 1961.
- 26) Barski, G. and Cornefect, Fr. Characteristics of "Hybrid"-type clonal cell lines obtained from mixed cultures in vitro. *J. Nat. Cancer Inst.* 28: 801-821, 1962.

Tissue Culture of C₃H Mouse Mammary Carcinoma

Part 1. Properties of the long-term cultured C₃H mouse mammary carcinoma strain (Hei-Strain)

by

Masahiko Noda

Pathological Division, Cancer Institute
of Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director: Dr. J. Sato).

This paper presents some observations on the C₃H-Hei strain cells, established from spontaneous mammary tumor of the C₃H mouse.

1) The C₃H-Hei strain has been propagated over 800 days ever since December 1961.

2) The most optimal medium consist of 50 % bovine serum, 0,25 % lactalbumine hydrolysate, 0,05 % yeast extract and Earle's saline.

3) The primary culture and early subculture of this cell strain morphologically exhibited a number of cell sheets of epithelial-like cells, but suddenly at the 4th generation they have

transformed the morphological pattern from the epithelial-like cells to the fibroblast-like cells of a uniform size.

4) The growth rate in cell population was about 8 folds in 6 days.

5) Chromosome number of the Hei-strain showed a higher pattern ranging from 64 to 72.

6) The tumor-inducing capacity of this strain was examined by subcutaneous back-inoculation into C₃H, Zb and Cb mice. A certain portion of the mice had a total body irradiation (400r) before inoculation and it was found that 100 % C₃H mice challenged before injection had developed tumors, but Zb and Cb mice did not.

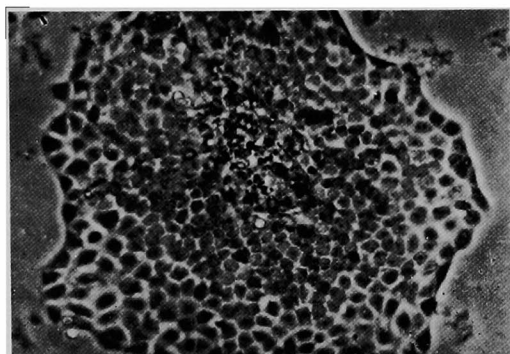


写真 1 上皮様細胞 Sheet 培養1代

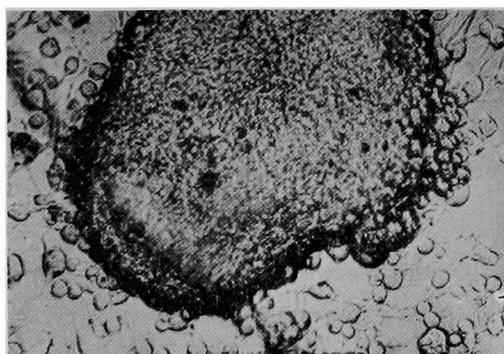


写真 2 細胞塊 (コロニー) の増殖像培養4代

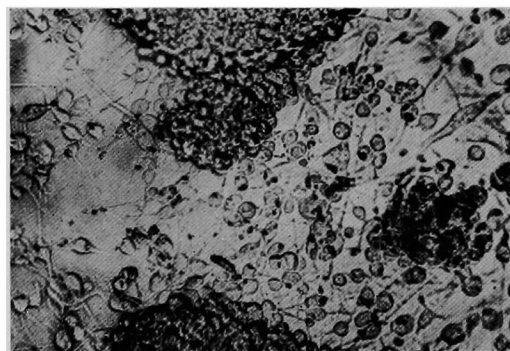


写真 3 細胞塊 (コロニー) 周辺部培養4代

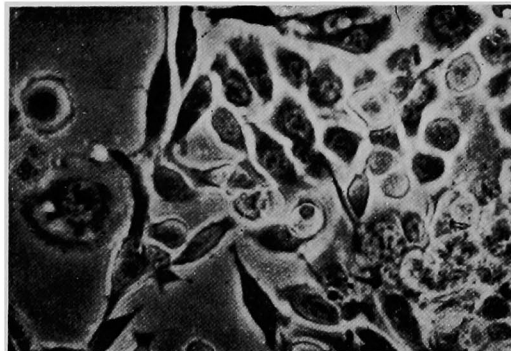


写真 4 紡錘形細胞, 吸盤状突起, 培養后5代

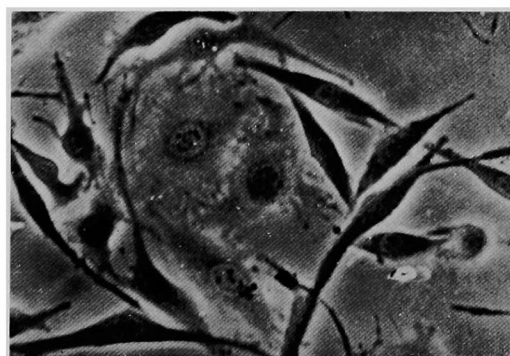


写真 5 巨細胞, 培養后10代

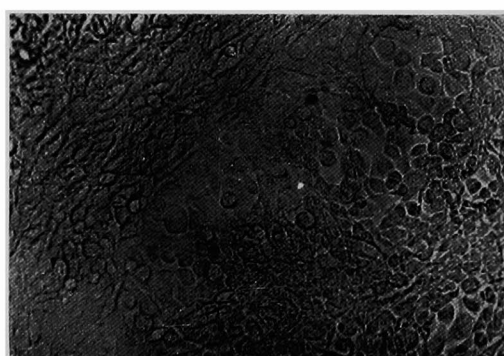


写真 6 培養細胞 Sheet 像