

長期培養（総日数1212日）されたエールリッヒ腹水癌細胞（JTC-11株）の性状について

第二報

標準株（K系）の適性培地及び動物復元継代 K 株の培養順応性（株性）の保持について

（本論文の要旨は第53回日本病理学会総会において発表）

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（指導主任：佐藤二郎助教授）

大学院 生 浜 崎 充 彦

〔昭和39年3月28日受稿〕

緒 論

組織培養された細胞の適性培地の決定は、その細胞の生物学的性状、培養上の継代の問題、あるいは他種細胞の性状との比較検討の上からも、組織培養学上極めて必要な事項である。我国においても、近年設立せられた種々の細胞株について、適性培地が報告¹⁻⁵⁾ されている。私は第一報⁶⁾ において報告したと同じエールリッヒ腹水癌細胞株（JTC-11）を用いて、その適性培地を決定した。又同株細胞の復元株再培養も、そのあらましを第一報⁶⁾ に報告したが、さらにその詳細にわたつて、動物（継代）株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞との相異性を比較検討したのでここに報告する。

材料及び方法

この第二報に用いられた細胞は、いずれも第一報⁶⁾ において報告した継代経過をとつた細胞の継続である。即ち、その適性培地決定に用いられた細胞は、第1図に示すごとく、Exp. 1（牛血清適性濃度決定実験）は1964年1月12日（第221代）、Exp. 2（Lactalbumin Hydrolysate 適性濃度決定実験）は1964年1月20日（第222代）、Exp. 3（Yeast

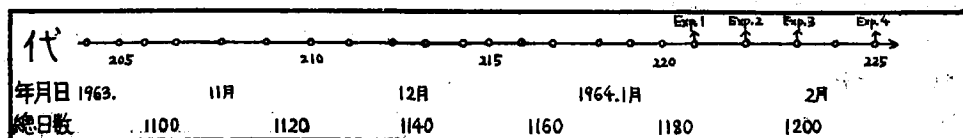
Extract 適性濃度決定実験）は1964年1月28日（第223代）、Exp. 4（Glucose 適性濃度決定実験）は1964年2月9日（第225代）のものである。

培養方法は、第1図に示されている期間の継代には、すべて普通の試験管が用いられ、第一報⁶⁾ に報告したような継代法で、1/50～1/200の希釈で次代に継代された。実験の前にはかなり多量の細胞数を必要とするため、TD40 が用いられた。継代培地は、80% YLE+20% 牛血清（最終濃度 Yeast Extract 0.08%, Lactalbumin Hydrolysate 0.4%, Glucose 0.36%, 抗生物質及び pH 指示薬は含まない）が用いられ、培地交新（M.C.）は行なう必要がなかつた。継代の際の細胞剝離には、駒込ピペットによる pipetting で充分その用を満すことが出来た。

実験の際は短い試験管（実験用短試）を使用し、計数法、37°C の孵卵器中における 5° 傾斜の静置培養法等は、第一報⁶⁾ に報告したものとまったく同様である。

復元株の再培養実験に用いられた細胞は、第一報⁶⁾ に報告したように、生後2ヶ月前後の Cb 系健康雌マウスの腹腔を通して継続継代をしている K 株細胞を使用した。その復元継代図は第2図に示され

第1図 JTC-11（K株）細胞継代系図



第2図 JTC-11 (K株) 細胞の Cb 系雌マウス
復元継代図

総日数	代	マウス数	細胞数 ($\times 10^4$)	生存日数	腹水量 (ml)
159	10	* 1/1	200	27	8
		1/1	50	42	1
		1/1	10	42	0.5
176	11	* 1/1	200	18	2
		1/1	100	22	3
190	12	* 1/1	200	21	4
		1/1	100	21	4
205	13	* 1/1	200	18	5
		1/1	50	18	3
217	14	* 1/1	250	19	4
		1/1	100	19	3
232	15	* 1/1	700	15	4
		1/1	100	18	3
242	16	* 1/1	1300	14	6
		1/1	650	14	4
250	17	* 1/1	700	17	6
		1/1	350	17	6
260	18	* 1/1	400	17	5
		1/1	200	19	10
270	19	* 1/1	600	17	6
		1/1	300	18	3
281	20	* 1/1	500	18	3
		1/1	300	18	3
292	21	/1	500		
		/1	300		

* 次代継代使用マウス

ている。そのマウス及び継代法は、第一報⁶⁾のものとまったく同様である。又継代毎の腹水を塗抹標本にし、ギムザ染色をして、動物通過によるK株細胞の性状変化を観察した。さらにこれらの細胞の対照として、動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞を、継代中の腹水より、同じ処理法で得て使用した。なお、第2図中の空欄は、現在生存中のものである。

1. 適性培地の検討

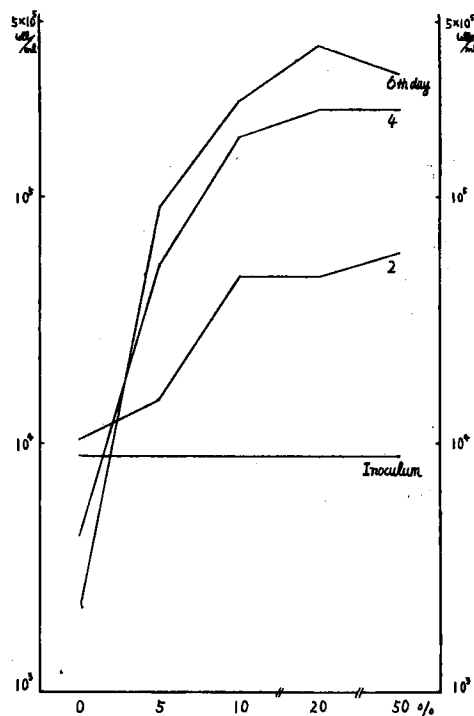
JTC-11 (K株) 細胞を用いて、牛血清, Lactalbumin Hydrolysate, Yeast Extract 及び Glucose

について、その適性濃度を検討した。ここに用いられた inoculum size は、第一報において報告された増殖曲線図に基き、半対数グラフではほぼ直線的な増殖を示す、 $5 \sim 10 \times 10^3$ 個の細胞数を用いるのが適当と考えられたので、 $7 \sim 9 \times 10^3$ 個を各々の inoculum size とした。

a) Exp. 1 牛血清濃度の影響 (第3図)

第3図に示すごとく、牛血清最終濃度を0~50%の5系列とし、細胞計数は第2, 4, 6日目に行なつた。培地の最終濃度は、Yeast Extract 0.08%, Lactalbumin Hydrolysate 0.4%, Glucose 0.36%とした。その結果は、20%のものが最適であつた。

第3図 JTC-11 (K株) 細胞の増殖に
及ぼす牛血清濃度の影響



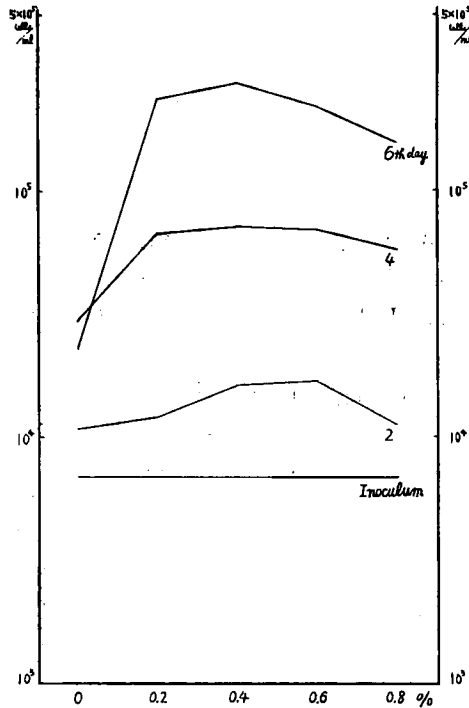
b) Exp. 2 Lactalbumin Hydrolysate 濃度の影響 (第4図)

第4図に示すごとく、Lactalbumin Hydrolysate 最終濃度を0~0.8%の5系列とし、細胞計数は第2, 4, 6日目に行なつた。培地の最終濃度は、牛血清20%, Yeast Extract 0.08%, Glucose 0.36%とした。その結果は、0.4%のものが最適であつた。

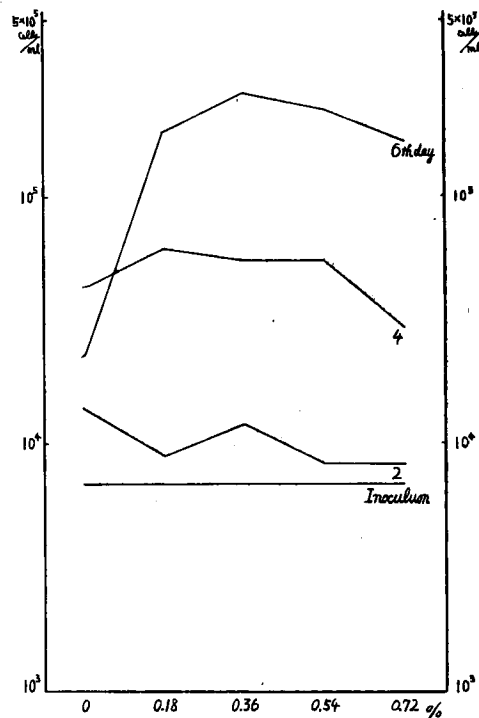
c) Exp. 3 Yeast Extract 濃度の影響 (第5図)

第5図に示すごとく、Yeast Extract 最終濃度を0~0.12%の5系列とし、細胞計数は第2, 4, 6日目

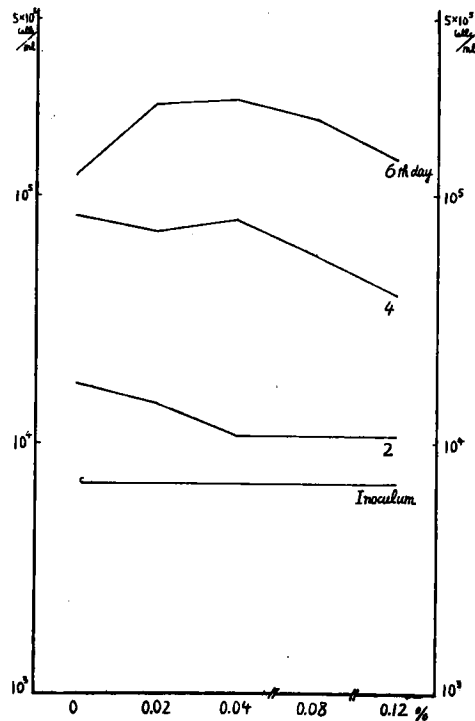
第4図 JTC-11（K株）細胞の増殖に及ぼす Lactalbumin Hydrolysate 濃度の影響



第6図 JTC-11（K株）細胞の増殖に及ぼす Glucose 濃度の影響



第5図 JTC-11（K株）細胞の増殖に及ぼす Yeast Extract 濃度の影響



に行なった。培地の最終濃度は、牛血清20%、Lactalbumin Hydrolysate 0.4%、Glucose 0.36%とした。その結果は、0.04%のものが0.08%のものよりも最適であつた。

d) Exp. 4 Glucose 濃度の影響（第6図）

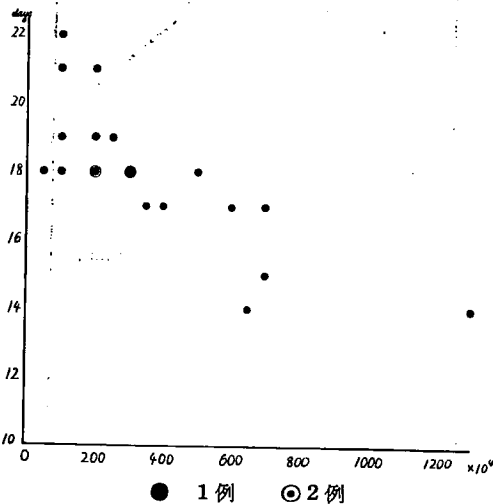
第6図に示すごとく、Glucose 最終濃度を0~0.72%の5系列とし、細胞計数は第2, 4, 6日目に行なつた。培地の最終濃度は、牛血清20%、Lactalbumin Hydrolysate 0.4%、Yeast Extract 0.04%とした。その結果は、0.36%のものが最適であつた。

2. 復元継代株の変化

第一報⁶⁾に報告した復元株を、更に連続的にCb系雌マウスに移植し、第2図に示すごとく継代を行なつた。総日数200日頃までは腹水0.1ml中200万个前後の細胞数であつたが、総日数200日を越える頃から0.1ml当りの細胞数の増加が著明となり、特に第16代では最高1300万/mlを記録した。又腹水中に混入する赤血球数も非常に減少してきた。又腸間膜等に散在した粟粒大腫瘍も、その数は減少したが、その大きさが粟粒大よりやや大きめになつた（2~3個の粟粒大腫瘍が癒着した）かの感がある。さらに腹腔内のほぼ全体にわたつて、時に見られた

類壊死塊から成る腫瘤も、生ずる頻度が大となり、その着色も、以前に見られた赤黄褐色より赤紅色に変化してきた。又第7図は、マウス腹腔内注入細胞数とマウス生存日数との関係を、第11代から第20代の10代について示している。これによると、注入細胞数と生存日数とは、ほぼ反比例している。

第7図 マウス腹腔内注入細胞数とマウス生存日数の関係



次に、その各代における腹水塗抹ギムザ染色標本の検鏡所見を見ると、(第1代より第13~14代までの所見は、第一報⁶⁾に報告してある)第15代では腫瘍細胞の腹腔内増殖(所謂腹水型増殖)が著しく、所々ではやや集つて認められる。核は楕円形ないし類円形で、アズールに濃染して見られる。細胞の大きさは比較的均一である。しかし裸核、あるいは細胞質の好塩基性の弱いものが、かなり認められる。第16代では、稀に腫瘍細胞の島状の増殖が見られるが、腹腔内増殖(所謂腹水型増殖)は明らかである。腫瘍細胞に対する赤血球数は、減少している。第17代も、第16代と略同様の所見である。但し動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌塗抹細胞に比して、遊離状の増殖度がやや弱く、集団して島状増殖する傾向がなお見られる。かつ動物株ほどの多形性がなく、細胞が比較的均一に見られる。培養による腫瘍細胞の選択(selection)の結果、細胞が均一となつたのかも知れない。第19代(後述する復元細胞の培養順応性の保持に関する実験に使用)では、類円形ないし楕円形の核を有して、それと相似形の細胞質を有する腫瘍細胞が、遊離状に増殖して見られる。核側に近く、ややエオジンに淡染する部

分が見られる。第18代の所見にも記載したが、この場合にも、細胞が元来の動物株に比して比較的そろつているのは興味深い。少数のものは、楕円形の先端がのびて、紡錘形に近い性状を示している。この所見は、培養時、腫瘍細胞が紡錘形態を示すことと関連があるように思える。第20代の所見は、第19代のものに類似するが、やや多形性が現われ始めている。

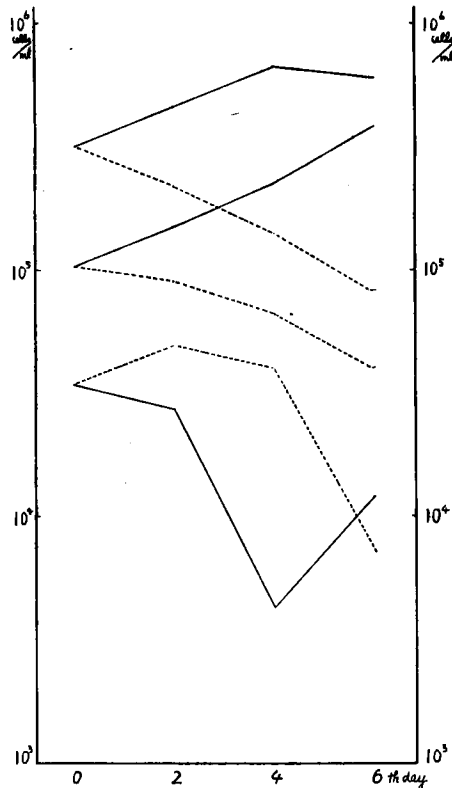
3. 復元株細胞の培養順応性(株性)の保持

Cb系健康雌マウス(生後2ヶ月前後)腹腔内へ復元したJTC-11(K株)細胞を、再び組織培養にもどした場合と、動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞を初めて組織培養に移した場合とを比較すると、培養可否の上で明らかな相異があることは、既に第一報⁶⁾において報告した通りである。ここではさらに、増殖率及び形態について観察した。材料は、第2図に示された復元マウス第19代の内、腹腔内注入細胞数 600×10^4 のマウスの腹水腫瘍を、第11日目(初代よりの通算総日数281日目)に使用した。腹水は無菌的に注射器で抜きとり、約10倍量の20%牛血清+80% YLEを混入して、1000 r. p. m. 10分間遠心沈澱した。その上清を捨て、沈澱している癌細胞及び少量赤血球を、必要細胞数となるように20%牛血清+80% YLE + penicillin 2000単位で稀釈した。

実験は、第8図に示すごとく、1 ml 当りの inoculum size を 30×10^4 , 10×10^4 , $10/3 \times 10^4$ の3系列とし、各々の10本の実験用短試をとり、37°C, 5°で静置培養し、第2, 4, 6日目に3本づつを計数し、その平均値を値とした。M.C.は第3日目に行なつた。さらに1 ml 当り 30×10^4 のもの10 ml をつくり、TD40を用いて培養して継代用とした。又第一報⁶⁾に報告した様式による短冊標本をつくり、第2, 4, 6日目に取り出してギムザ染色を行なつた。これらもM.C.を3日目毎に行なつた。以上の実験の対照として、動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞を、まったく同様の処理方法によつて培養し、比較検討した。TD40に培養された細胞の内、復元株再培養細胞は継代可能であつたが、動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞の方は、7日の後に変性し、消失してしまつた。

上述の短冊標本の検鏡所見は、次のごとくである。(B:復元再培養株 0:動物株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞の培養初代)

第8図 JTC-11（K株）復元再培養細胞及び動物株エールリッヒ細胞の増殖比較図（3日目 M.C.）



— JTC-11（K株）復元再培養細胞

.....動物株エールリッヒ細胞

第2日目

B：弱拡大で見ると，円形細胞と紡錘形細胞が，半々程度に存在する。紡錘形細胞は，JTC-11（K株）細胞の形態によく似ている。ごく少数のものは，極めて細長い細胞質を有していた。強拡大で見ると，類円形の細胞は，楕円形，円形のアズールに濃染する細胞核を有し，メチレンブラウに濃染する少ない細胞質を有していた。紡錘形のもの，2～数个の核仁を有する楕円形の核を有し，細胞質は二極性にびて突起を形成していた。突起の先端は，稀に細くつがったものも認められるが，第一報⁶⁾に記載したごとく，先端がふくらんでいるものが多い。細胞質には小空泡が散見された。細胞中には，マウスの腹腔から由来したと考えられる，空泡の多い単球ないし組織球性の細胞が稀に見られた。

O：円形に近い細胞が，大部分を占めている。こ

れらの細胞は，復元の場合（B例）と異なつて，細胞がやや歪で，核濃縮が強く，変性に傾いていた。小数のものは，円形のまま広がつて，ガラス壁に附着していた。稀には，腫瘍性の細胞がやや紡錘形になつて認められたが，一般には，ガラス壁に附着して増殖する傾向は極めて少ない。上述の細胞の間に，数个の突起を有する星形ないし舟の帆状の細胞が見られる。これらの細胞質は，好塩基性にとほしく，核も小さく，且喰食性を持つものも見られる。従つてこれらの細胞は，腹腔中の単球ないし組織球が附着したと考えるのが妥当と思われる。

第4日目

B：細胞は著しく増加している。JTC-11（K株）細胞の所見と比較して，既に単位面積当りの細胞の附着増殖の極限に達したと考えられる。紡錘形の細胞は，細胞質がやや広くなつて，所謂成熟に近い形を示している。一般には，単位面積当りの細胞数の増加のための円形化が著明である。

O：円形の細胞は，変性して顆粒状に崩壊しつつあるものが，かなり認められる。細胞量は，第2日目に比して減少している。しかし少数の腫瘍細胞は，紡錘形或いは菱形となつて，ガラス壁に附着している。これらの細胞は，注意深い M.C. によつては，増殖を起す可能性があると思われる。

第6日目

B：細胞は，円形化したものの一部が浮游脱落して，附着腫瘍細胞数はやや少なくなつてはいるが，ガラス壁に附着する細胞は，細胞質が広くなり，2～数个の突起を示す成熟形となる。一部の細胞には，波動膜の形成が見られる。

O：円形の細胞は，さらに減少している。附着していた単球ないし組織球性の細胞は，細胞質に空泡を生じて，変性を起している。これらの細胞の一部は，明らかに変性腫瘍細胞を貪食している。腫瘍細胞の一部は，第4日目に記載したごとく，ガラス壁に附着して濃染する細胞質と核を有している。しかしこれら腫瘍細胞は，復元再培養された K株細胞に比して，ガラス壁への附着性が弱い。

以上の所見から，JTC-11（K株）細胞は，約280日の動物継代においても，その株性を保存していることは明らかである。

次に，復元再培養細胞の TD40 による継代が，20%牛血清+80% YLE の培地で行なわれた。その第2代においては，1ml 当り 15×10^4 の inoculum size で，1週間で増殖極限に達したが，次第にその

増殖率を増し, inoculum size を少数にする必要を生じてきた。即ち, その第3代においては, 第2代と同じ inoculum size では, 第4~5日目に増殖極限に達した。現在第4代進行中であるが, これは1ml 当り 5×10^4 程度の少数にしたため, 徐々の増殖を示しつつある。その形態も, 小さくて円形の細胞が多いという特徴を有している。

総括及び考按

既に第1報⁶⁾において, JTC-11 (K株) 細胞の性状のあらましを報告したが, ここに第2報として, その適性培地決定と培養順応性の詳細について, 実験検討した。

適性培地については, 既に近年種々の株細胞について, 同じ方法によつて試みられている。それらの報告によると, Katsuta 他⁷⁾ は, Rat Ascites Hepatoma Cells において20%牛血清が, 又 Hori 他⁸⁾ は, 同株細胞において0.08% Glucose が最適であると述べている。又 Katsuta 他⁹⁾ は, Monkey Kidney Cells においては, 5%牛血清及び0.4% Lactalbumin Hydrolysate が最適であると述べている。さらに Takai⁴⁾ は, Actinomycin Sarcoma Cells において, 10%牛血清, 0.4% Lactalbumin Hydrolysate 及び0.08% Yeast Extract が最適であると述べている。又 Mori 他⁵⁾ は, MN-Lymphosarcoma Cells では, 40%牛血清, 0.4% Lactalbumin Hydrolysate 及び0.08% Yeast Extract を最適培地としている。これらの報告と比較するに, JTC-11 (K株) 細胞は20%牛血清, 0.4% Lactalbumin Hydrolysate, 0.04% Yeast Extract 及び0.36% Glucose を最適とする。当然のことであるが, 株細胞の種類が異なれば, 適性培地も大きく相異している。但し Lactalbumin Hydrolysate の最終濃度は0.4%で, 略々一定している。それらの相異に関して, 培地中に牛血清が添加されているかぎり, その血清の個体差も当然考慮されるべきであろう。即ち各々の牛血清中には, Lactalbumin Hydrolysate 類似物質, Yeast Extract 類似物質及び Glucose 類が種々の割合で含有されており, これらがお互いに複雑な関係で, 細胞自身に作用していると考えられるからである。従つて, もし他の牛血清を使用すれば, 異なつた結果が出ることも当然想像されよう。又細胞株の株化代数にも影響されよう。即ち, 一定培地で長期間培養された株細胞を使用した場合は, 既にそれまでにその培地中の物質に順応してしまい, 或いは淘汰が行

なわれ, その結果, 上述したごとく血清さえ一定にしてあれば, その維持培地中の物質の含有量が適性培地の実験で最適となる可能性が強い。ここに報告された JTC-11 (K株) 細胞では, 一応このことを考慮すべきと思われるが, Yeast Extract 最適濃度が, 0.08%でなく0.04%に落ちているのは, この際用いられた牛血清中に, Yeast Extract 類似物質の含有量が比較的多いためとも思われる。さらに, 適性培地決定の順序も考慮されねばならない。即ち, 培地中の各物質は, お互いに複雑微妙な関係にあり, それらの総合が細胞に影響するためである。故に, ここに報告したような方法で適性培地の正確を期すためには, 各物質の濃度のあらゆる組み合わせの実験を行なう必要がある。さらに生体細胞について, 生体時における栄養要求を論ずるためには, 佐藤の考えるように, 少なくとも以下の三条件, 即ち,

- ① 生体より取り出されて直後, 即ち, 培養上では primary culture 時に検索されねばならない。
- ② 合成培地のみを利用し, 未知の物質を含まない条件において行なわれなければならない。
- ③ 一種類の細胞 (clone 化した細胞) のみについて検索されねばならない。

を満たさなければならない。私はこれらの条件に近づくために, JTC-11 (K株) 細胞の無血清培地亜株の樹立に参画した。(続報)

次に復元細胞の培養順応性 (株性) の保持の問題であるが, 第8図に示されているように, YLE+牛血清培地内での増殖性に関して, その対照細胞との間に明らかな相異が認められる。即ち, 復元株細胞においては, その inoculum size さえ適当に定めれば, その初代から充分な組織培養上の増殖を示し, 又継代を重ねるにつれて, 次第にその増殖率を増し, ゆくゆくは従来の JTC-11 (K株) 細胞に類似した性格を持つようになると思われる。これに対して, 培養を経験していない, 動物 (継代) 株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞 (対照細胞) の組織培養では, 第8図に示されているように, 次第に浮游消失してゆく。さらにその短冊標本においても, 復元株細胞は次第に JTC-11 (K株) 細胞に, 形態的に類似してゆくのに対し, 動物 (継代) 株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞では, 次第に変性消失してゆく。これらの結果から, Cb 系雌マウス (生後2ヶ月前後) 腹腔内に継代され続けた JTC-11 (K株) 復元細胞は, その280日 (第19代) の後においても, まだその培養順応性を十分に所有していると

ということが、数的及び形態的に証明された。最近 Takai⁴⁾も Actinomycin Sarcoma Cells について、同様の報告を行なっている。こうした培養株の性状は、株の維持、抗癌物質の力価判定、ビールス性腫瘍の発癌細胞の同定等色々な意味に利用される可能性が濃い。

なお JTC-11 (K株) 細胞のマウス復元継代株は、第1報⁶⁾にも報告したごとく、その第13~14代までは、その腹水中の癌細胞数も 200×10^4 前後で、しかも赤血球を多数混じり、腸間膜に多数の粟粒大腫瘤を生ずる等の所見から、動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌の場合とやや異なる様相を呈していた。これが、第15代以後より次第に類似の傾向をたどり、現在ではその塗抹標本の検鏡的所見においても、さしたる相異が認められなくなってきた。特に 600×10^4 以上の大量細胞数をマウス腹腔内に注入した場合には、その結果がより類似するようになる。このような、動物への順応の傾向と、前記した株性の保持の条件とをうまく組み合わせれば、動物にも継代出来、培養も容易であるという第三次の細胞株が出来る。又第7図から明らかなごとく、マウス腹腔内注入細胞数が $100 \sim 1300 \times 10^4$ の範囲内では、そのマウスの生存日数とその細胞数とは、一般的に見て反比例する傾向にある。

結 語

第1報⁶⁾に報告した事項に引続いて、JTC-11 (K株) 細胞の性状の内、その適性培地、復元株細胞の培養順応性及び復元動物継代株のその後の様相について実験検討した結果、次の結論を得た。

1) JTC-11 (K株) 細胞の第221~225代の適性培地は、牛血清20%、Lactalbumin Hydrolysate 0.4%、Yeast Extract 0.04%及びGlucose 0.36%である。

2) JTC-11 (K株) 細胞の復元株細胞は、その初代より280日(第19代)を経過しても、動物(継代)株である元来のエールリッヒ腹水癌細胞に比して、増殖率でも検鏡的所見でも、明らかに培養順応性を有している。

3) 復元動物継代株は、初代より280日経過した頃には、元来のエールリッヒ腹水癌細胞の動物(継代)株と、肉眼的検鏡的に類似の様相を呈している。

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜わった佐藤二郎主任に深甚の謝意を表すると共に、本実験について御援助を戴いた癌源研究所矢部所員に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Katsuta, H., Takaoka, T., Hori, M., Saito, S., Someya, Y. & Ito, E., On the Growth-Promoting Substances for Rat Ascites Hepatoma Cells in Tissue Culture. Japar. J. Exp. Med. 28, 99~212, 1958.
- 2) Hori, M., Takaoka, T., & Katsuta, H., On the Carbohydrate Metabolism of Rat Ascites Hepatoma Cells in Tissue Culture. Japan. J. Exp. med. 29, 259~288, 1958.
- 3) Katsuta, H., Takaoka, T., Tagaya, I., & Kikuchi, K., Cultivation of monkey kidney Cells in the Simplified Replicate Tissue Culture. Japan. J. Exp. med. 30, 483~493, 1960.
- 4) Takai, S., A Newly Established Tissue Culture Strain, Strain JTC-14, from Actinomycin Sarcoma (Kawamata), and Its Biological Properties. 大阪大学医学雑誌 15, 133~139, 昭和38年.
- 5) Mori, S., Harada, Y., & Yamaoka, I., In Vitro Cultivation of MN-Lymphosarcoma Cells. Gann 27, 239~250, 1963.
- 6) 浜崎充彦：岡山医学会雑誌，投稿済み。

On the Properties of a Cell Strain, JTC-11, Established
in Culture from Ehrlich Ascites Carcinoma Cells.

II: The optimal medium for the cultivation of the standard line, K,
and the culture-adaptability of cells after passage through mice.

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; Assoc. Prof. J. Sato)

The optimal medium for the cell proliferation of the standard line, K, was investigated and found to consist of 20% bovine serum, 0.4% lactalbumin hydrolysate, 0.4% yeast extract, 0.36% glucose and saline.

The cultured cells were retransplanted and passaged intraperitoneally through mice. After 19 transfers through mice, e. g., in 280 days, the cells were re-inoculated into culture and compared in the cellular morphology and in the culture-adaptability with the primary culture of purely mice-passaged Ehrlich carcinoma cells. The former cells adhered readily to the glass surface showing spindle-like form and demonstrated the capacity for the proliferation in culture from the earliest stage of cultivation, while the latter cells adhered hardly to the glass maintaining their round form and revealed little proliferation or underwent degeneration rapidly with days.
