

人腹水腫瘍細胞の組織培養による形態学的研究

第 2 編

人腹水腫瘍細胞の細胞浮游液培養

岡山大学平木内科（主任：平木 潔教授）

浅 香 隆 一

〔昭和 34 年 6 月 6 日受稿〕

目 次

第 1 章 緒 言

第 2 章 研究材料及び研究方法

第 3 章 研究成績

1) 培養方法

2) 腫瘍細胞の形態的变化

(1) 胃癌性腹水の癌細胞（腺癌）

(2) 体腔上皮腫細胞

第 4 章 総括並びに考按

第 5 章 結 語

第 1 章 緒 言

Roux が生体組織を体外で培養する事を試みて以来、組織培養法の研究は60年を経過している。その間この特殊な技術は Harrison²¹⁾ (1907), Fischer¹¹⁾ (1948), Carrel⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾ (1912, 1913, 1923, 1929)等先達とするたゆみない努力によつて幾多の輝かしい業績をもたらしている。特にここ10年前後の間、細胞生理の研究、Virus の培養或いは癌研究等の分野からの要請によつて、急速に盛んになつて来た事は周知の通りである。癌研究に於いても、組織培養法は種々の面に利用されているが、その培養法は基本的には癌細胞乃至癌組織の培養のための特別の方法ではなく、一般の組織培養に用いられる手技に従うもので、ただそれぞれの目的に応じて細部の条件を整えて用いられているのが現状である。今日利用されている方法のうち主なものとしては、Coverslip 法 (Harrison²¹⁾) 又は懸滴法 (Maximow³⁸⁾), Carrel⁶⁾ 瓶法, Maitland-Maitland³⁵⁾ 法, Roller-tube 法 (Gey)¹⁴⁾¹⁵⁾, 時計皿法 (Fell¹⁰⁾) 等種々あるが、これらは何れも各々原法であつて、この他多くの研究者により長短を取捨選択して種々の方法が用いられている。即ち一定期間廻転培養した後静置したり、或いは細胞浮游液をそのまま廻転したりしている。又細胞の附着面或いは支持体についても種々な考案がなされ、培養液の組成についても本邦で木村³¹⁾,

勝田²⁸⁾等が詳細に検討を加えている。以上の培養法により多くの研究者は実験動物及び人体の腫瘍について腫瘍組織そのもの或いは腹水腫瘍細胞として培養し、免疫学、細胞形態学、化学療法、診断、治療、移植、発癌、細胞化学等あらゆる部門にわたつて究明しつつある現状である。然し乍ら、特に腫瘍細胞の培養に基く形態学的観察には未だ確実なるものはみられていない。それは元来腫瘍細胞の形態学的観察を行うには、腫瘍組織そのものを検鏡するより腫瘍組織を個々の細胞として、即ち単離の細胞として位相差顕微鏡下に観察の方が理想想的の筈であるが、実際には腫瘍細胞単離浮游培養は従来より非常に困難とされており、未だその充分なる方法論的解明は行われていず、従つて従来の形態学的研究は総て組織そのものの培養に基いているからである。仮この単離腫瘍細胞として最も材料的に好都合であるのは、云う迄もなく腹水腫瘍細胞であろう。即ち本腫瘍細胞を培養材料として研究するならば、腫瘍形態学に貢献する処大なるものがあると思惟せられる。然るに前述の如く方法論的な問題が障碍となつてこの方面の研究には満足すべきものが見当らない。例えば吉田肉腫についてこれをみるに、金³²⁾, 森脇³⁹⁾⁴⁰⁾はその腫瘍組織を Carrel 瓶法, Coverslip 法等により培養しているが、細胞の単離培養は行つておらず勿論位相差顕微鏡は使用していない。一方桜井⁴⁴⁾は一応単離細胞の静置培養を行つているが、

矢張りその観察に位相差顕微鏡は使用していない。又今木²⁶⁾、武田⁴⁹⁾は細胞を位相差顕微鏡で観察しているが、培養したわけではない。更に人体腫瘍については Weitzmann⁵²⁾、Coman⁹⁾は腹水癌細胞を Plasma-clat で細胞塊となし培養しているが、細胞の単離浮游培養を行い、その細胞学的検索を試みたものは之迄全く見当たらないやうである。

そこで私は腫瘍細胞の培養に基く形態学的観察を行うべく、人腹水腫瘍細胞の細胞浮游液培養法を種々検討し、位相差顕微鏡による形態学的検索を行った結果、聊か知見を得たのでここに報告する次第である。

第2章 研究材料及び研究方法

1. 研究材料

患者腹水採取 胃癌患者3例及び体腔上皮腫患者3例の腹水を穿刺し研究に供した。

2. 研究方法

1) 培養方法： 後述の研究成績の項で詳述する。

2) 観察方法： 0.9~1.0 mm 厚さの良質の載物硝子に、培養各時期に適当に取出した腹水沈渣を1滴載せ、被覆硝子で覆い、周囲をパラフィンで封入した。これを位相差顕微鏡にてレンズは DM, BM, DLL を用い1000×で観察した。尚腹水沈渣は1分間1000回転にて5分間遠心沈澱器にかけたものである。

第3章 研究成績

1) 培養方法

(1) 短冊培養法：

後述の細胞浮游液培養法と比較検討するために、一応本培養法をも試みた。

人腹水腫瘍細胞を短冊型載物硝子上に附着せしめて廻転培養すべく種々試みたが、何れも流失して不成功に終った。即ち先づ短冊型載物硝子上に健康人へパリン加血漿、腹水沈渣、鶏胎圧搾液の順にツベルクリン針1滴づつ載せて附着せしめ、暫時放置後円形廻転管に挿入し液体培地を加えて 37°C 廻転培養器で培養したが、12時間で固形物は殆んど流失した。又健康人へパリン加血漿の代りに健康鶏へパリン加血漿を使用したと同様に消失した。更に流失を防ぐために、腹水沈渣を健康鶏へパリン加血漿で包む如くに腹水沈渣の上下に血漿を置き、37°C 孵卵器に30分間収め血漿の凝固をはかり、円形廻転管に挿入し、廻転培養器に収めたが矢張り12時間で流失

した。以上の如く短冊培養法は液体培地の組成を検討するまでもなく成功しなかつた。結局本培養法に於いては、腹水腫瘍細胞は腫瘍組織片と異なり単離細胞であるため附着力が弱く流失するものと思われる。

(2) 細胞浮游液培養法：

諸種の栄養液を含有した液体培地に、腹水沈渣を滴下し、これを円形廻転管に収め 37°C 廻転培養器で培養したものである。以下先づ種々試みた方法の結果を比較検討し、最後に最良の結果を得た方法に就いて手技を述べる。

((1)) 液体培地のみで鶏胎圧搾組織培養を行わぬもの。

液体培地としてハンクス氏液70%、健康人血清30%、リボ核酸 2 mg/cc、ビタミン B₁₂ 2 γ/cc の比率に含有したものを各々廻転管に 1 cc づつ加えた。本培養に於いては、胃癌性腹水の癌細胞は12日間生存した。

((2)) 液体培地に鶏胎圧搾組織培養を行ったもの。

液体培地は上述((1))と同様であるが、更に鶏胎圧搾組織を同時に培養したものである。即ち短冊型載物硝子の一端に孵化第9日目の鶏胎圧搾組織を健康鶏へパリン加血漿にて固めたものを廻転管に挿入した。癌細胞は21日間、体腔上皮腫細胞は12日間生存した。即ち鶏胎圧搾組織培養により生育する線維芽細胞が腫瘍細胞の培養に良効果を齎した。

((3)) 上述((2))と全く同様であるが健康人血清の代りに馬血清を使用したもの。

液体培地はハンクス氏液70%、馬血清30%、リボ核酸 2 mg/cc、ビタミン B₁₂ 2 γ/cc の比率で鶏胎圧搾組織を同時に培養した。癌細胞は8日間しか生存し得なかつた。以上健康人血清より馬血清の場合の方が変性が早い事を確認した。

((4)) 上述((2))にグロンサンを添加したもの。

後述の如くグロンサンは腫瘍細胞の分裂、増殖を促進すると云われているので、本細胞浮游液培養法の液体培地に添加した。

即ち液体培地はハンクス氏液70%、健康人血清30%、リボ核酸 2 mg/cc、ビタミン B₁₂ 2 γ/cc、グロンサン 2 mg/cc の比率である。体腔上皮腫細胞は8日間で全く変性死滅した。かくの如くグロンサンは本腫瘍細胞に好影響を与えなかつた。

((5)) 液体培地並びに鶏胎圧搾組織培養に多少改良を加えたもの。

液体培地としてハンクス氏液70%、健康人血清15

%, 鶏胎圧搾液15%, リボ核酸 2 mg/cc, ビタミン B₁₂ 2 γ/cc の比率にて各々廻転管に 1.5 cc ずつ加えた。又鶏胎圧搾組織は短冊型載物硝子の一端に2ヶ所に培養した。即ち本液体培地では健康人血清30%の代りに、健康人血清15%として鶏胎圧搾液15%を新しく加えたものである。

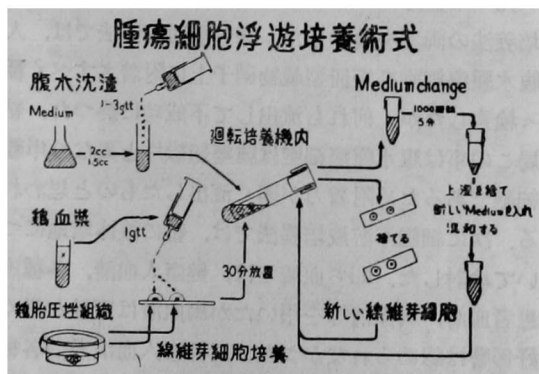
体腔上皮腫細胞は18日間生存し((2))より良い結果を得た。

((6)) 上述((5))と全く同様であるが健康人血清の代りに各種癌患者血清を使用したもの。

即ち液体培地としてハンクス氏液70%, 各種癌患者血清15%, 鶏胎圧搾液15%, リボ核酸 2 mg/cc, ビタミン B₁₂ 2 γ/cc の比率で培養した。体腔上皮腫細胞は17日間生存した。従来より健康人血清は抗腫瘍性格を有していると云われているので、この点を考慮して健康人血清の代りに各種癌患者血清を使用したのであるが、格別の腫瘍細胞の延命効果は認められなかった。然し液体培地交換の際に、癌患者であるため毎回同一患者から採血出来ず、従つて液体培地の条件が毎回多少共異つていたので、この結果を以て決定的な事は云えない。以上要するに私の試みた範囲内では、人腹水腫瘍単離細胞の浮游培養法としては、上述の((2)), ((5)) (或いは((6))) 就中((5)) (或いは((6))) が最も良い様に思われる。

かくの如く私は液体培地を中心として種々の培養方法を検討したが、次にこの最も良い成績を示した細胞浮游液培養法の培養手技を少々詳しく述べる(図1)。

図 1



先づ液体培地は上述の如くハンクス氏液70%, 健康人血清或いは各種癌患者血清15%, 鶏胎圧搾液15%, リボ核酸 2 mg/cc, ビタミン B₁₂ 2 γ/cc の比率に含んだものを円形廻転管(外径 15 mm, 長さ 150 mm)に各々 1.5 cc ずつ分注する。鶏胎圧搾液は孵化9日目の鶏胎児を Fischer の圧搾器で圧出

し、得たる粥状物を1分間3000回転で30分間遠沈しその上清を使用した。リボ核酸はハンクス氏液で溶解し、ザイツの濾過器にて濾過したものを使用した。尚リボ核酸は乾燥酵母抽出リボ核酸(ミノファージン製薬)を使用した。次に癌患者の腹水を採取後、可及的速やかに1分間1000回転で5分間遠沈処理して得た腹水沈渣を、円形廻転管にツベルクリン針にて各々1~3滴を滴下する。尚細胞数は1000~3000/mm³になる如く調整した。更に円形廻転管内に鶏胎圧搾組織を同時に培養する。即ち短冊型載物硝子の一端に、支持体として健康鶏のヘパリン加血漿をツベルクリン針にて1滴ずつ2ヶ所に滴下する。その上に孵化9日目の鶏胎圧搾粥状物を1塊ずつ入れる。かやうに鶏胎圧搾組織を培養した短冊型載物硝子を37°C 孵卵器に30分間静置し血漿の凝固をはかり、円形廻転管に組織の附着した部分を下にして挿入する。最後に円形廻転管にダブル栓をして1時間10回転の37°C 廻転培養器に収め培養を行う。液体培地交換は3日目毎に行つた。即ち腫瘍細胞を含んだ液体培地を1分間1000回転で5分間遠沈し、上清を捨て新しい液体培地を加えて混和する。又鶏胎圧搾組織交換は6日目毎に行い、新しい組織と交換した。以上の手技はすべて培養室で無菌的に操作した。

2) 腫瘍細胞の形態的变化

(1) 胃癌性腹水の癌細胞(腺癌)

培養直後では、本細胞は大型の略々円形の細胞で胞体全体として重厚感がある。核は円形、楕円形で概して胞体内に偏在し核優勢を示し、核、核膜共に屈光性が強い。核小体は大型1個或いは大小不同、不整の2個を有し屈光性強度である。胞体縁は極めて明瞭で屈光性強く、辺縁より懸滴状乃至クラッカー状の偽足を認めこれを出没させる(写真1)。胞体内には細小糸状の糸粒体が多数散在し、その他胞体全域に微細顆粒状のものも多数見られる。培養4~5日目には、一部の細胞の胞体に多数の空胞がゴルジ野から出現するが、核は比較的良く保たれ、更に胞体が崩壊し核の融解が起つても、核小体は比較的良く原の形を失わない(写真2, 3)。尚一部の少々変性の進んだ細胞は全周から、正常より反つて多数のクラッカー状偽足を出す、一般に小さく均質感が強く運動も殆んどない(写真5)。この様に細胞の変性崩壊が見られる一方、この頃即ち3~4日目頃より核分裂が増加し、新生細胞が多数出現してくる。新生細胞は培養前に比し、更に胞体は清明で、糸粒体もよく観察されるが偽足は殆んど見られ

ない。核分裂では prophase→telophase の全期にわたる像が観察される。又諸所に対細胞が認められ更に対細胞の娘細胞が更に分裂を開始しているものも認められる(写真4)。核分裂と糸粒体の関係を見ると、prophase から metaphase にかけて糸粒体が糸状に染色体の周囲に集合しているのが認められ、anaphase になるとその糸粒体が両極の染色体の中間に入り(写真2)、更に分裂の方向に配列された像がみられ(写真3)、更に注目すべきはこの時期には糸状の糸粒体が二重に認められ、縦の方向に分裂している事が唆される事である(写真3)。又この核分裂の時には常に前述の突起状偽足がみられ、それは非常に大きく活潑に伸縮しており後の phase 程多く対細胞にも常に多数みられる事は特異である(写真2, 3, 4)。以後培養日数の経過と共に、概ね4~5日を周期として変性崩壊と新生小型細胞の出現がみられ、次第に変性崩壊が増加して、21日目には殆んど全細胞が変性を見た。

(2) 体腔上皮腫細胞：

培養直後の所見は、第1編に於いて圧挫による所見として述べた通りである。即ち細胞の大小不同が極めて甚だしく、且つ多種多様な形をとり、多核性、対細胞、大空胞性等がみられる。偽足も多様で花卉状、クラッカー状、鬚状、刷毛状などがある。然し一般腫瘍細胞に比し細胞全体として重厚感が少ない。核は類円形で屈光性強く、核小体は大小不同、不整である。胞体縁は明瞭で偽足は上述の如く多彩であるが、伸縮運動は少なくともクラッカー状のものではかなり活潑に見られる。胞体内には、核を中心に同心円状に DLL にて微細鈍黒に見える糸粒体を認め微細桿状或いは顆粒状のものが多数存在する。更に本細胞に特異な点として、胞体内に大小不同の空胞が見られ、更に又核を一方に圧排した大空胞を有するものもみられる。培養の経過と共に既に少々変性を開始していた細胞は次第に変性崩壊に陥り、一方3日目頃から核分裂が起り、新生細胞が出現してくる。即ち5日目の新生細胞を見ると、一般腫瘍細胞に比し大型細胞が多く且つ扁平な感じである。核は略々胞体の中央にあり円形で核優勢は軽度、核膜は一般腫瘍細胞に比べると厚くない。核小体は2個が多く、時に3個あり余り大型でなく、又大小不同も著しくなく腫瘍性格が低い。胞体は培養直後の時に比し非常に清明で空胞は全然無く、辺縁の偽足形成も殆んど無い(写真6)。只細胞の結合部の跡に特有の一束の針状突起が見られるが、これはクラッカ

一状、懸滴状偽足の如き伸縮運動は行わず、恐らく細胞間の結合糸と考えられる(写真8)。何れにしてもかかる突起は本腫瘍の特色であつて漿膜細胞にも全然認められない。尚胞体が他の腫瘍細胞に比して薄い事は培養直後のものと同じである。DLL にて鈍黒の糸粒体が核の周囲から胞体全体にわたり同心円状に配列され、極めて細小糸状である(写真7)。一見漿膜細胞の糸粒体と極めて類似しているが、核を離れるにつれ必ずしも同心円状にならず、微細な網状を形成する事及び遙かに数の多い事が漿膜細胞とは異っている。以上の様に本培養時期には新生細胞及び或いは変性初期の細胞の活性化により、腹水中には中々認め難い本腫瘍細胞の新しい形態が観察されたのであるが、第1編で述べた如く、結局本腫瘍細胞は漿膜細胞を基盤とした腫瘍細胞である事が明らかで、漿膜細胞との移行型も数多く見られる。又この時期には対細胞も認められ、この対細胞のみにはクラッカー状、懸滴状の偽足が見られた(写真9)。その後培養日数が経つと、次第に胞体に空胞化が生ずるが、9日目をみると空胞が糸粒体から生ずる像が明らかである。即ち糸粒体は断裂し、顆粒状化し、その配列も乱れ次第に空胞化に陥るのが認められる。次いで空胞は大空胞化し、核を一方に圧排し、腹水中にみられた印環細胞と略々同様の複雑怪奇な形態をとるに至る。かくして変性崩壊と新生細胞の出現がみられ、次第に変性崩壊が増加して18日目に全細胞が変性した。

第4章 総括並びに考按

先づ培養方法については短冊培養法と細胞浮游液培養法の両者を検討した。即ち短冊培養法では、人腹水腫瘍細胞を短冊型載物硝子上に附着さすべく種々検索したが、何れも流出して不成功に終つた。結局この事は腹水腫瘍細胞は腫瘍組織片と異なり単離細胞であるため附着力が弱く流出したものと思われる。次に細胞浮游液培養法では、特に液体培地について検討した。即ち血清では、健康人血清、各種癌患者血清、馬血清等を用いたが馬血清は変性が早く好影響は認められなかつた。又健康人血清及び各種癌患者血清では両者に差異は認められなかつた。更に腫瘍細胞の分裂、増殖を促進すると云われているグロンサンを添加したが、これも変性が早く腫瘍細胞は早期に死滅した。

結局培養方法としては、液体培地はハンクス氏液70%、鶏胎圧搾液15%、健康人血清或いは各種癌患

者血清15%, リボ核酸2 mg/cc, ビタミンB₁₂27/ccが最も優れていた。又培養に当つて鶏胎圧挫組織を同時に培養したが、これにより生育する線維芽細胞が腫瘍細胞の培養に良効果をもたらした。尚液体培地交換は3日目毎に、鶏胎圧挫組織交換は6日目毎に行つた。上述の培養法による腫瘍細胞の形態的变化では、胃癌性腹水の癌細胞(腺癌)に於いては、培養直後は胞体縁より偽足を出没させ、糸粒体は胞体内に細小糸状のものが多数散在する。3~4日目頃から分裂が増加し、新生小型細胞も多数出現する。特に分裂各期に於ける糸粒体の態度は興味あるものがある。この頃一部の細胞の胞体内に多数の空胞が出現し核の融解が起るが、核小体は原形を失わない。以後培養日数の経過と共に4~5日を期として変性崩壊と分裂小型新生細胞の出現が繰返され、21日目に殆んど全細胞が変性した。次に体腔上皮腫細胞に於いては、既に少々変性していた細胞は次第に変性崩壊に陥り、一方3日目頃から分裂が起り新生細胞が出現してくる。5日目の新生細胞は胞体清明、空胞無く、核周より極めて細小糸状に同心円状に配列された糸粒体を認め、漿膜細胞を基盤とした腫瘍細胞である事を確認した。更にその頃本細胞特有の結合糸と考えられる一束の針状突起を認める。9日目頃には糸粒体は断裂し顆粒状化し配列も乱れ空胞化する。空胞は次第に大空胞化し変性崩壊に陥り、一方新生細胞も見られるが18日目に全細胞が変性した。

似生体組織を体外で培養する所謂組織培養法の研究は最近特に著しい業績をみせているが、特に癌研究の進歩と共にその方面に於ける展開が行われ、今後の進展が大いに期待されている。その中で液体培地の組成についても、多くの研究者により既に一応提示されている。即ち勝田²⁹⁾は人或いは馬血清2、鶏或いは哺乳類胎児圧挫液2、塩類溶液6の比率を癌細胞を含むあらゆる培養法の液体培地の原法としている。又高野⁴⁸⁾等はマウス乳腺癌及びHela株細胞のRoller tubeによる組織培養の液体培地として鶏胎圧挫液3、人臍帯血清3、塩類溶液4の比率を示している。勝田²⁹⁾等は更に液体培地につき種々検討を加え、細胞浮游液培養による正常細胞の培養に必須である鶏胎圧挫液及びイースト浸出液はラッテ腹水肝癌細胞の増殖を抑制したと述べている。然し私の実験では、鶏胎圧挫液を加えた方が変性も少く細胞の生存日数も延長しており、イースト浸出液も培養に好影響をもたらした。又馬血清については

勝田²⁹⁾等是否定的であるが、私の場合も同様に細胞の変性を促進した。一方桜井⁴⁴⁾等は吉田肉腫腹水細胞の単離静置培養に於いて、鶏胎圧挫液2、馬血清4、塩類溶液4の比率の液体培地に、鶏胎心組織を併置培養して良効果を得ているが、私の場合も鶏胎圧挫組織培養により好影響をもたらした。又小川⁴⁹⁾等は吉田肉腫ラッテ腹腔内にグロンサン注入により、吉田肉腫細胞の分裂増殖が促進されたと述べているが、私の場合は細胞の変性が甚だしく良効果を得なかつた。

以上の如く腫瘍細胞の組織培養法、特にその液体培地の組成については諸説があり一長一短で、今後の研究に待つ所大なるものがある。

然し何れにしても人腹水癌細胞の単離浮游培養は従来全然試みられていない所であるので、私の検討した分野を更に先人の成績と比すべくもないが、一応私の吟味した範囲内では上述の方法が最良であり、少なくとも形態学的な研究には先づ充分な成績であると信ぜられる。更に長期培養を企図するならば、新たな組成の吟味を要するであろう事は申す迄もない。

其次にこの培養法を基盤とする腫瘍細胞の形態学的観察面はその方法論的不備に伴つて極めて遅れている事は緒言で述べた通りである。即ち数少ない文献の中金³²⁾、森脇³⁹⁾40)は吉田肉腫の腫瘍組織そのものをCarrel瓶法、Coverslip法により、桜井⁴⁴⁾は吉田肉腫腹水細胞を単離静置培養法により、各々培養しているが位相差顕微鏡下で詳細に形態学的観察を行っていない。又武田⁴⁹⁾は腫瘍組織及び腹水腫瘍細胞を、今木²⁶⁾は腹水肝癌等の糸粒体を、田中⁵⁰⁾は腹水肝癌の細胞分裂を、各々位相差顕微鏡で観察しているが勿論培養は行っていない。更に人体腫瘍については、単離浮游培養を行いその細胞学的検索を試みたものはこれ迄全く見当たらないやうである。私はかかる観点より、以上の如く人腹水腫瘍細胞に対して細胞浮游液培養を行い位相差顕微鏡観察を行つて、経時的形態変化を追求し従来には全く顧みられなかつた多くの興味ある所見を見出した。

先づバブリング bubbling 現象について見るに、河合³⁰⁾は鶏胎被覆培養時の線維芽細胞の分裂時に観察しており、バブリングは細胞表面に拳骨を突出す如く活潑に出現、退縮し、この事は娘細胞の分離と細胞型の復元に役立つものであらうと述べている。更に河合は細胞培養条件が悪化すると休止期の細胞にもバブリングを起すと云っている。Lettré³⁴⁾はヴィクトリアブルーなどの糸粒体染色色素や呼吸毒

の添加により休止期の線維芽細胞にもバブリング現象が起ると云っている。一方牧野³⁶⁾は M. T. K. 肉腫細胞の懸滴培養に於いて、温度条件の変化により肉腫細胞はアメーバ状偽足運動を示すと記載している。私の腫瘍細胞培養時には、分裂時のバブリングは非常に大きく活潑に伸縮し、細胞のエネルギーを象徴している如くである。新生細胞のものは、分裂時のものより小さく数も少く運動も割に少い。次に変性時の細胞ではバブリングは数多く現われるが、一般に小さく均質感が強く、バブルの根幹部の幅は前二者より小で運動も殆んど無く、恐らくこれは細胞変性により細胞質粘稠度が低下した為胞体縁に現われた一種の胞体膨化現象であろうと思われ、形態からみても自ら前二者とは異なるものである。上述の河合³⁰⁾の分裂細胞に於ける所見は私の分裂時の所見と一致しており、Lettré³⁴⁾、牧野³⁶⁾の記載した所見は変性した病的細胞の所見であろうと思われるが、何れにしても氏等は細胞単離培養を行っていないので新生腫瘍細胞に就いては知る所でない。この点、私の単離培養に於いて確認された新生腫瘍細胞にはバブリングは少い事が明らかとなつたのであり、この事は先に述べた如く、一般偽足運動も新生細胞には少く変性過程に入つた細胞に多い事と同一機転の現象と解され、注目すべき事と考えられる。

次に分裂と糸粒体の関係については、牧野³⁷⁾はフキバツタ精母細胞の懸滴培養に於ける分裂を観察し、紡錘体周囲の糸粒体は娘染色体間に入り糸粒体束を形成し、分割溝により糸粒体束が中央で2分されると述べている。一方河合³⁰⁾は、鶏胎被覆培養時の線維芽細胞では糸粒体は細胞質の分離が進むに従つてどちらかの娘細胞に配分され、分割溝で2分される事は稀であるとしている。私の腺癌細胞に於いては、後期になると糸粒体が両極の染色体の中間に入り、次に分裂の方向に配列され、更にこの時期に糸粒体が二重に認められ縦の方向に分裂している事が示唆され、誠に注目すべき所見であると云える。

次に胞体内の糸粒体については、武田⁴⁹⁾の圧搾標本の位相差顕微鏡観察によれば白鼠肝細胞では糸状、桿状、球状の糸粒体が胞体内に充満しているが、腹水肝癌細胞の糸粒体は繊細となり、その数も減少すると述べている。然し私の場合腺癌細胞では、細小糸状乃至微細顆粒状の糸粒体が多数散在し、体腔上皮腫細胞に於いても、微細桿状乃至顆粒状の糸粒体が核を中心に同心円状に多数存在しており、漿膜細胞に比べると少々大きく数も遙かに多い。かよう

に武田が腫瘍細胞の糸粒体が繊細化し、而もその数が減少すると云っているのとは異なり、私の観察では必ずしも繊細化するとは限らず、又数はむしろ増加しているのが認められたが、もとより武田の観察は培養細胞ではなく、又癌の種類も異なるので同日には論じられない。

次に私の培養した腫瘍細胞の形態を培養前の形態と比較してみると、腺癌細胞に於いては、培養前のものも胞体は比較的清明であり辺縁より多数の偽足を認めるが、培養後の活性度を得た細胞乃至新生細胞では胞体は更に清明となり糸粒体もよく観察され、又偽足は非常に少なくなっている。又体腔上皮腫細胞では、培養前のものは胞体は割に清明であるが、大小様々の空胞を有し、又辺縁より複雑怪奇な多種多様の偽足を多数認め一見直ちに診断がつく程度の特有の形態を示しているのに対し、培養後の新生細胞は胞体は極めて清明で、空胞は全然無く、辺縁の偽足形成も殆んど無く、糸粒体も極めて細小糸状でよく観察され全く別種の細胞をみる感がする位様相を異にしている。然るに培養経過が経ち9日目頃になると次第に細胞は空胞化し、前記奇怪多彩な偽足形成を行うに至る。兎角この様に腺癌細胞にしる、体腔上皮腫細胞にしる、培養を行う事によつて活性度を得た細胞乃至は新生された細胞の形態が培養前のものとはかなり異なる事は、これら培養後の形態こそ真実の該腫瘍細胞の形態を示す貴重な所見である事を示すと共に、一面平素腹水材料からそのまま観察している腫瘍細胞の形態は、かなり変性過程に入つたものの形態である事を示すものと云わねばならない。又同時に以上の観察から、培養を行わずして観察され得る腫瘍細胞の偽足形成もその多くは変性機転に基くものである事が明白となつた。

以上の如く私は腹水腫瘍細胞の単離浮游培養を行う事によつて、各々の微細構造の逐時的経過、更に腫瘍細胞の分裂時、新生細胞時、変性時における偽足の相異、分裂と糸粒体の関係等について種々興味ある所見を認める事が出来た。

第5章 結 語

3例の胃癌患者腹水中の癌細胞（腺癌）と3例の体腔上皮腫患者腹水中の腫瘍細胞の Rollor-tube による細胞浮游液培養法を種々検討し、更にこの培養法による腫瘍細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡下に詳細に検討した。

1) 培養方法としては、液体培地はハンクス氏液

70%, 鶏胎圧搾液15%, 健康人血清或いは各種癌患者血清15%, リボ核酸 2 mg/cc, ビタミン B₁₂ 2 γ/cc が最適であつた。同時に鶏胎圧搾組織を培養した。尚液体培地交換は 3 日目毎に, 鶏胎圧搾組織交換は 6 日目毎に行つた。

2) 以上の培養法により胃癌性腹水の癌細胞は21日間, 体腔上皮腫細胞は18日間生存せしめ得た。

3) 形態学的観察では,

(i) 胃癌性腹水の癌細胞に於いては 3 ~ 4 日目頃から分裂が増加し, 胞体清明な新生小型細胞が多数出現する。一方この頃に一部の細胞は変性崩壊し, 培養日数の経過と共に 4 ~ 5 日を期として変性崩壊と新生小型細胞の出現が繰返された。

(ii) 体腔上皮腫細胞に於いても, 3 日目頃から分裂が起り, 胞体清明な新生小型細胞が出現し, 漿。

膜細胞との明らかな移行像を認めた。9 日目頃になると細胞は次第に変性崩壊し, その後培養の経過と共に変性細胞が増加して来た。

以上の如く, 人腹水腫瘍細胞を細胞浮游液培養法により培養し, 腫瘍細胞の形態学的変化を逐時的に観察し興味ある所見を認める事が出来た。

稿を終るに臨み終始御懇切なる御指導と御校閲を賜りたる恩師平木潔教授並びに大藤真助教授に深謝の意を授ける。

本論文の要旨は第17回日本癌学会総会並びに第2回岡山地方癌交見会に於いて発表した。

文献は第3編巻末に一括掲載の予定。

Morphological Studies on Human Ascites Tumor Cells by Tissue Culture

Part 2. Cell-suspension culture of human ascites tumor cells

By

Takakazu Asaka

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Using cancer cells (adenoma) from ascites in three gastric cancer patients and tumor cells from ascites in three cases with coelothelioma the author conducted tissue culture of these cells in suspension by roller-tubes and further studied morphological changes of these tumor cells during the culture under a phase-contrast-microscope, and obtained the following results.

1) As for the method of tissue culture, it is most suitable to use the medium composed of 70 per cent Hank's fluid, 15 per cent chick embryo extract, 15 per cent normal human serum or serum of various cancer patients, with the addition of 2 mg/cc ribonucleic acid and vitamin B₁₂ 2 γ/cc. At the same time ground chick embryo tissue is cultured with this cell-suspension culture. Moreover, the medium is exchanged with fresh one every three days and the ground chick embryo tissue every six days.

2) By this culture method it has been possible to keep the cancer cells of ascites in gastric cancer alive for 21 days while tumor cells of coelothelioma for 18 days.

3) In the morphological observations:

(1) In the case of cancer cells of gastric cancer ascites, cell division increases around third to fourth day of culture and numerous new small cells with clear cell body appear. On the other hand, about this time a portion of the cells become degenerated and are destroyed and within 4 or 5 days as a cyclic period the processes of cell degeneration and destruction and appearance of regenerated

small cells are repeated.

- (2) Likewise in the tissue culture of coelothelioma cells, cell division occurs on around the third day of culture, and new small cells with clear cell-body make their appearance, revealing distinctly the transformation from serous cells. By the ninth day the cells gradually become disintegrated and are destroyed, and with lapse in culture time degenerated cells increase in number.

As can be seen from above, it has been possible to obtain quite interesting findings in the day-to-day observations on morphological changes occurring in tumor cells under culture by the above method.

浅 香 論 文 附 図

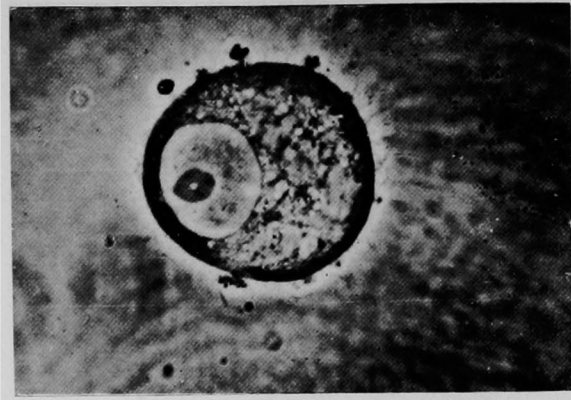


写真1 胃癌性腹水の癌細胞（腺癌）培養直後
(PCM-DLL)

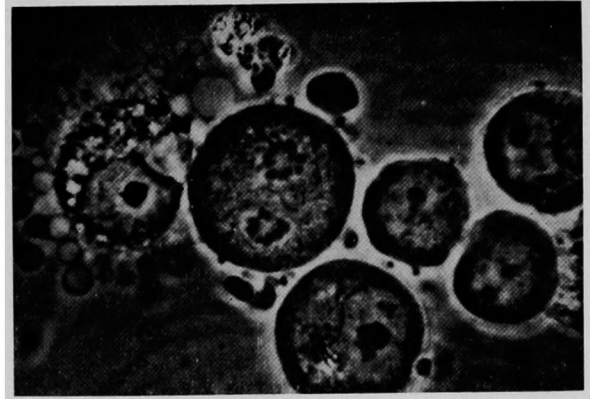


写真2 胃癌性腹水の癌細胞（腺癌）培養4日目
分裂像（染色体の中間に入つた糸粒体）
(PCM-DLL)

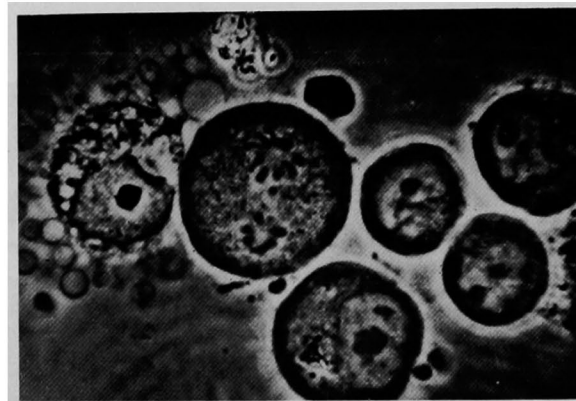


写真3 胃癌性腹水の癌細胞（腺癌）培養4日目
分裂像（染色体間の糸粒体が分裂の方向に配列）
(PCM-DLL)

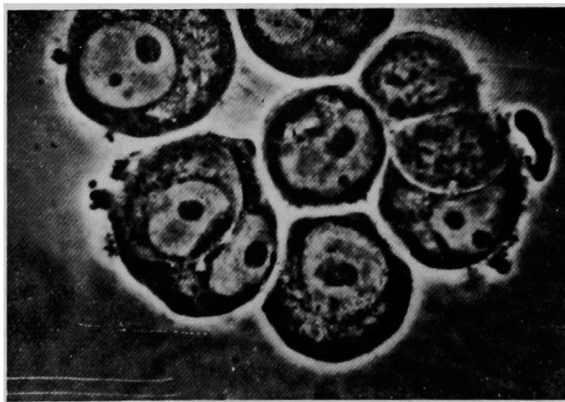


写真4 胃癌性腹水の癌細胞（腺癌）培養4日目
対細胞及びその分裂像と新生細胞の増加
(PCM-DLL)

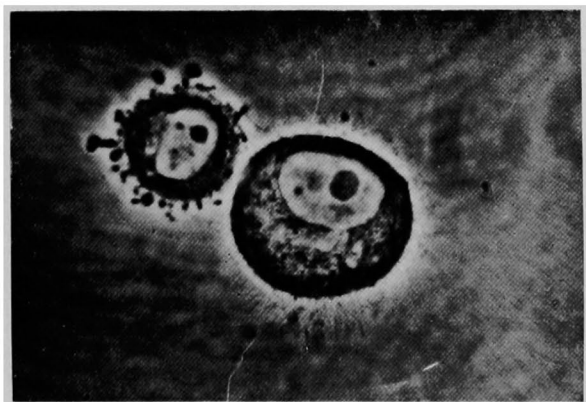


写真5 胃癌性腹水の癌細胞（腺癌）培養5日目
稍，変性を開始した細胞
（多数のクラッカー及び鬚状偽足）
(PCM-DLL)

浅 香 論 文 附 図

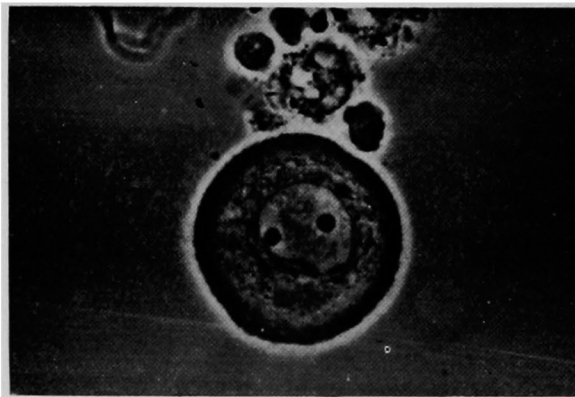


写真6 体腔上皮腫細胞 培養5日目
崩壊及び新生細胞
(PCM-DLL)

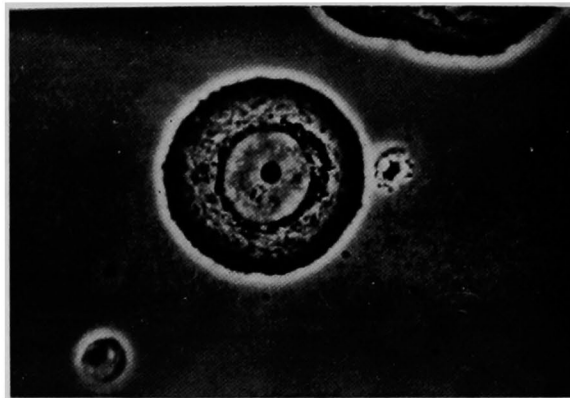


写真7 体腔上皮腫細胞 培養5日目
同心円状に配列した糸粒体
(PCM-DLL)

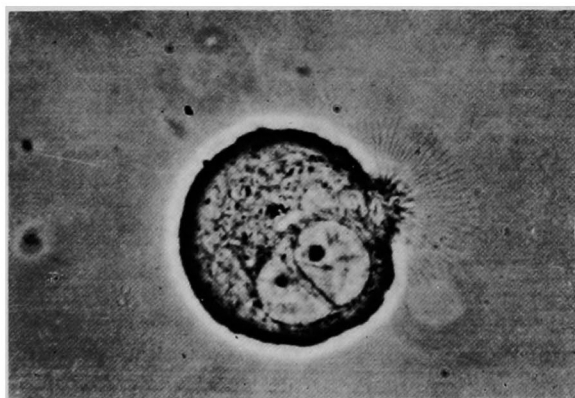


写真8 体腔上皮腫細胞 培養5日目
細胞間結合糸
(PCM-DLL)



写真9 体腔上皮腫細胞 培養5日目
クラッカー状偽足を有する対細胞
(PCM-DLL)