

組織培養による Bashford's Carcinoma の研究

第 3 編

Bashford's Carcinoma の廻転培養による長期
継代培養とその復元に就いて

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

水 津 昭

〔昭和 34 年 7 月 15 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	I) 培養方法
第 2 章 実験材料並びに実験方法	II) 培養癌細胞の動物への復元方法
第 1 節 実験材料	第 3 章 実験成績
I) 培養組織	第 1 節 長期継代培養の推移
II) 培養液	第 2 節 培養癌細胞の動物への復元
III) 実験動物	第 4 章 総括並びに考按
第 2 節 実験方法	第 5 章 結 論

第 1 章 緒 言

近年組織培養方法の改良と培養技術の発展により、各種動物癌及び人癌の長期継代培養株にその株化が盛んに行なわれるに至つた。周知の如く人の子宮頸部癌から分離された HeLa 株細胞をはじめ、マウスの正常皮下組織から分離され継代中悪性化した L 株細胞等、幾多の株化癌細胞に就いて多くの報告がある。而して之等の長期継代培養により株化された癌細胞は各種の研究に用いられている。即ち夫れ等癌細胞の培養条件、合成培地を用いての癌細胞の栄養要求の追求、各種抗癌剤のスクリーニングテスト、癌細胞変異過程の追求等多方面に渡り随時応用せられている。

さて Bashford 癌の培養に関する従来文献を見るに、いづれも被覆法による短期培養のみで、長期継代培養に就いては未だ報告に接していない。茲に於いて私は長期継代培養に有利な廻転培養法を用いて Bashford 癌の培養を行つて、癌細胞の増生度や培養液交換並びに植継ぎの技術等を検討し、これを基礎にして同癌細胞の長期継代培養を行つた。而してこの間に於ける培養癌細胞の増生様式並びに形態の変化に就いて追求し、更に培養癌細胞のマウス

への復元を試み、若干の新知見を得たのでここに報告する。

第 2 章 実験材料並びに実験方法

第 1 節 実験材料

I) 培養組織：培養組織片としては既に前編で述べた如く Bashford 癌を雑系マウスの背部皮下に累代移植したものを剔出して用いた。

II) 培養液：長期継代培養には最初多数の培養管を用いて培養し、組織片の脱落或は感染したものを除きつつ培養液を交換し、又植継ぎを行なわねばならない。これは長期継代培養から株化に至る迄は植継ぎの都度細胞の増生率が減少して来るからである。従つてこの場合の培養液は多量に且つ随時に必要とする故に、培養液としては第 1 編で述べた実験成績から非働化家鶏血清 30~40%、鶏胎血清 5%、ハンク氏液 55~65% なる組成のものを用いた。

III) 実験動物：復元に用いたマウスは Bashford 癌を累代移植するに用いたマウスと同じく体重 8 g 前後の健康な雑系マウスを選んだ。

第 2 節 実験方法

I) 培養方法：長期継代培養には 1.5×16 cm の丸型硬質培養管又は平型培養管を用い組織片を各

々5個宛管壁に直接植え、それに培養液を1.5 cc 宛注入し、ダブルゴム栓をほどこして廻転ドラム内に挿入した。培養液の pH, 培養温度、ドラムの廻転数等は前編と全く同様である。

培養液の交換は細胞増生が最も大で培養液の pH が強く酸性に傾いた培養7日目頃に行つた。交換方法は培養管の口を開いて白金耳を挿入し、癌細胞増生帯を残して原組織を抜き取り、次いで古くなつた培液1 cc を捨て、新しい培養液1 cc を加え再び廻転ドラム内に挿入して培養を続けた。以後は凡そ4日目毎に培養液の交換を行つた。

植継ぎは培養中15~20日目に1回の割合で行つた。植継ぎの方法としては Tripsin を用いる方法は細胞を障碍する率が多いので、機械的に癌細胞増生帯を剝離する方法を用いた。即ち培養管壁に膜様或は網眼状に増生している癌細胞をラバークリーナーにて機械的に剝離して培養液中に落とし、これを遠沈管に集めて1分間1000回転で3~5分間遠沈し、上澄を捨て残つた癌細胞沈渣を先曲り毛細管ピペットにて吸い上げ、これを新たに用意した培養管の壁に塗り付け、固着するを待つて培養液を1.5 cc 宛静かに注入し、ダブルゴム栓で密封して廻転ドラムに挿入した。この様にして一本の試験管から凡そ3本の新しい培養管に植継ぎを行い得た。

長期継代培養せる癌細胞の観察には、同細胞を短冊型カバーグラスに移し植えて用いた。即ち植継ぎの際に遠沈管に集めた癌細胞沈渣を新たに用意せる短冊型カバーグラス上に塗布し、固着するを待つて丸型培養管内に挿入密栓して更に4~5日間培養し、癌細胞が充分に短冊型カバーグラスに密着増生するを見た上でこれを取出し、固定染色を行い又位相差顕微鏡で観察した。染色の種類及び方法、位相差顕微鏡に依る観察方法はいずれも前編で述べたと全く同様である。

長期培養に於ける細胞増生の推移を見る為に、培養日数を追つて細胞核数の算定を行つた。算定法は既に第1編で述べた如く EDTA 溶液及び枸橼酸溶液を用いて増生癌細胞の原形質を融かし、核のみの浮游液とし、これを集めて Bürker-Türk の計算盤で数え、一培養管あたりの核数を算出した。

II) 培養癌細胞の動物への復元方法：長期継代培養の途中に於いて数回にわたつて培養癌細胞をマウス皮下に移殖しその復元に成功した。その方法としては培養管壁に密着増生せる癌細胞をラバークリーナーにて機械的に培養液中に剝離し、遠沈管に移

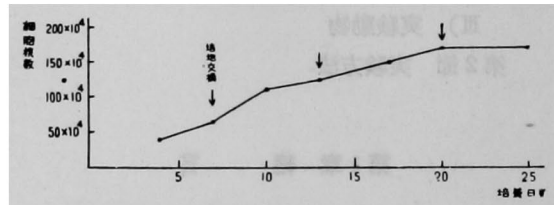
して1分間1000回転で3~5分間遠沈した後、癌細胞沈渣を少量の培養液と共に注射筒に吸引し、この癌細胞浮游液を体重8g 前後のマウスの背部皮下に0.5 cc 宛注入した。この様にして復元し得た腫瘍は摘出して夫々 Bouin 氏液、フォルマリン液、昇氷醋酸液、Kolster 氏液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色、Sudan III染色、Feulgen 核質反応、PAS 染色、鉄ヘマトキシリン染色を行い、母腫瘍組織のものと比較検討した。

第3章 実験成績

第1節 長期継代培養の推移

I) 細胞核数の推移 長期培養の途中で細胞核数の算定を行い、細胞数増加の推移を観察し、これにより培養液の交換並びに植継ぎの時期を検討した。即ち培養は4回行い、培養日数を追つて2本づつ培養管を取出して細胞核数を算出し、合計8本の培養管の平均値を求めた。第1図はこの平均値を示した

第1図 細胞核数の算定



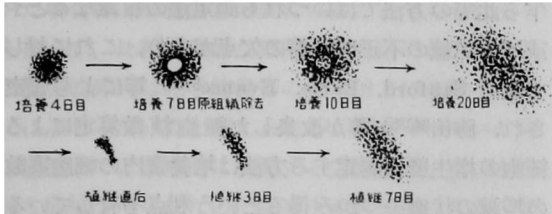
もので核数計算は3日目毎に行い、その間の培養液の交換は7日目毎に行つた。培養開始時に於ける細胞核数は一培養管当り約 30×10^4 であるが、培養4日目には癌細胞は狭い増生帯を組織片の周囲に形成し、この際の細胞核数は一管当り約 40×10^4 であつた。培養7日目に培養液の交換を行い、10日目に至ると細胞の増生は旺盛となり細胞核数は一管あたり約 110×10^4 となり、培養開始時の凡そ3倍に増加した。以後培養20日目迄は培養液の交換を行うことにより細胞核数は漸次増加し、培養20日目には最大値 266×10^4 、平均値 170×10^4 に及び、培養初期に比して5~6倍に達した。しかるに培養20日目以後は癌細胞の増生は極限に達し培養管壁に広く増生し、培養液の交換を行つても細胞核数の増加は殆んど見られず、培養25日目の細胞核数は 170×10^4 前後にとどまつた。

II) 増生様式の推移：上述の長期培養に於ける細胞核数の増加の推移より見て最初一管当り凡そ 30×10^4 の癌細胞を植え4日目毎の培養液の交換と15~20日目毎の植継ぎを行つた結果、5代継代3ヶ

月間の長期培養に成功した。この場合原組織の残存による初代癌細胞の介入を除き増生癌細胞のみを継代する為に、培養7日目に原組織を白金耳で取り除いた。又IV~V型以外の増在を示す組織片は総て白金耳で剥ぎ取り旧培養液と共に捨てた。

長期継代培養に於ける癌細胞の増生様式は第2図

第2図 継代培養に於ける癌細胞の増生様式



に示す如く培養7日目前後で原組織を除去することにより、ドーナツ型に培養管壁に残った癌細胞増生帯は培養10日目には最早やその空隙が増生して来た癌細胞でうづまる。更に癌細胞は周辺に向つて網眼状に増生して来る。培養15~20日目に至ると増生帯は培養管の半周以上に及び、時には管壁の全周が癌細胞の網眼状増生帯で覆われる場合も見られる。

次に植継ぎされた癌細胞は植継ぎ後2~3日目には網眼状の増生を示し始め漸次培養管壁を覆うに至る。しかし乍ら植継ぎの操作による癌細胞の機械的傷害は比較的大きく、植継ぎ後に癌細胞の増生を来さない場合がある。又植継ぎを重ねる度に細胞の増生度は初期に比して若干減少を示した。

Ⅲ) 培養癌細胞の形態の変化：長期継代培養せる癌細胞を固定染色並びに位相差顕微鏡によつて観察し、培養初期のものと比較検討した。先づ増生様式は培養20日目頃から網眼状の増生を示す様になり、各細胞膜の密着せるシート形成は殆んど見られなくなつた(写真1, 2)。次に5代継氏、3ヶ月間培養せる癌細胞は位相差顕微鏡による観察では培養初期のものと異なり胞体は全体として細長くなり棘状突起を生じ、夫れによつて各細胞が連繋する様になり核膜が肥厚するが核小体は培養初期のものと変わらない。原形質では糸粒体は全体として減少し、特に短桿状糸粒体の減少が目立ち糸状のものは寧ろ増加を示した。又 Golgi 野は一般に増大の傾向を認められた(写真3, 5)。

染色標本を比較するに、ヘマトキシリン・エオジン染色では両者の間に著明な変化は見られなかつた(写真4, 6)。

特殊染色の内、鉄ヘマトキシリン染色では位相差顕微鏡所見と同じく長期培養癌細胞の糸粒体は減少

を示したがPAS染色、Feulgen核質反応、Sudan III染色では両者の間に毎んど差異を認めなかつた。

第2節 培養癌細胞の動物への復元

長期継代培養の途中に於いて増生癌細胞を培養管より取出しマウス皮下に接種し腫瘍の復元を試みた。即ち培養15日、20日、30日、50日目に夫々培養管壁より増生癌細胞をラバークリーナーにて剥離し、これを注射器に吸引し、マウスの背部皮下に接種した。その結果は第1表に示す如くで、培養15日目に於け

第1表 腫瘍復元成績

接種材料	実験回数	接種マウス数	腫瘍形成数	陰性例
培養15日目増生細胞	2	4	2	2
培養20日目増生細胞	1	2	1	1
培養30日目増生細胞	2	6	2	4
培養50日目増生細胞	1	2	1	1
増生細胞を分離せる培養液	3	9	0	9
増生細胞の挫滅液	1	3	0	3
腫瘍組織の挫滅液	2	15	0	15

る接種は第1回3匹、第2回1匹に行い夫々1匹に接種後1週間で小豆大の腫瘍を生じ漸次増大し20日目には示指頭大となり発育状況、外觀、硬度等Bashford癌の累代移植したものと全く同様であつた。移植後22日目にこの腫瘍を剔出し、一部は組織切片標本に用い、他を7匹のマウスに移植した所、6匹に同様の腫瘍を形成した。更にこの腫瘍を移植後20日目に剔出し廻転培養を行つた所、組織片はいづれもIV型増生を示し、増生細胞の形態は前述した培養初期の癌細胞と全く同一であつた。即ち癌細胞を動物から培養管へ、次いで又動物へ、更に又養管へと移すことに成功した。培養20日目に於ける接種は1回行い2匹に接種、内1匹に11日目に漸く指頭に触れ得る程度の腫瘍を生じ17日目に小指頭大となつた。以後この腫瘍は増大せず23日目に摘出しを割入れるに中心部の壊死が強かつた。培養30日目に於ける接種は2回行い、第1回のものにはいづれも腫瘍の形成は見られなかつたが第2回目の接種では3匹の内1匹は接種後3日目に死亡したが残りりの2匹にはいづれも接種後1週間で小豆大の腫瘍を生じ、15日目には小指頭大となつた。培養50日目に於ける接種は1回行い、2匹の内1匹に腫瘍を形成し23日目は示指頭大となつた。

以上の復元実験と同時に培養癌細胞を遠沈して分離した癌細胞を含まない培養液上澄及び培養癌細胞を金剛砂にて挫滅としてリングル氏液と混和したものを夫々マウスに接種したが、両者共に腫瘍の形成は見られなかった。別にマウスより剔出した腫瘍組織を金剛砂にて挫滅してリングル氏液と混和したものをマウスに接種したが此の場合も腫瘍の形成は見られなかった。

次に復元腫瘍並びに母腫瘍組織の切片標本を作製し、各種染色を施して両者を比較した。ヘマトキシリン・エオジン染色所見は写真7、8並びに9、10の如く復元腫瘍は母腫瘍と全く同様の組織像を呈し、長期継代培養にて増生を示した細胞は Bashford 癌の実質細胞であることを確認し得た。母組織の特殊染色所見に就いては PAS 染色では結合織線維が淡赤色に染まっている他に癌細胞内に PAS 陽性顆粒は見られず、Feulgen 核質反応では核膜、核小体、核物質が撰択的に青紫色に染まっていた。又鉄ヘマトキシリン染色では核膜、核小体が濃青黒色に染まり糸粒体が淡青黒色に染色され、Sudan III 染色では被膜と癌細胞巣との間に鮮紅色～赤黄色に染つた粗大な脂肪顆粒群を見出し、一部癌巣間の結合織線維内にも少数の脂肪顆粒が見られた。又壊死巣近くには濃縮した癌細胞間或は癌細胞の胞体内に淡赤色～赤色の脂肪変性顆粒が見られた。而して復元腫瘍組織の特殊染色所見も以上のものと全く同様であつた。

第4章 総括並びに考按

腫瘍組織の長期継代培養に成功したと認められるには第一に少なくとも1ヶ月以上継代培養を続けること、第二にはその間に細胞数が確実に増加すること、第三に夫れをもつて腫瘍を完全に復元せしめ得ることの三条件を満足せしむべきことは今日の組織培養の常識である。

この様な意味での Bashford 癌の長期継代培養は従来の被覆法による培養では到底不可能で未だその報告は見られない。そこで私は Bashford 癌の長期継代培養に於いて、上述の条件を満たすべく培養日数を追つて細胞核数の算定を行い、細胞数の確実に増加することを認め、且つ3ヶ月間の継代培養の途中に於いて増生細胞をマウスに接種して腫瘍の完全なる復元を確かめ得た。更に継代培養時に於ける増生癌細胞の形態の変化に就いて、培養初期のものとは比較検討した。

組織培養に於いて細胞の増生度を測定する方

法は古くより諸家により種々試みられ、Carrel や Fischer 等は増生面積の測定を行い、これにより組織の増生度を判定したが、その後 Champy⁴⁾ が創案し Willer³²⁾ や Gacoby¹⁴⁾ が改良した Mitosis の数の算出、Meier²²⁾ によつて始められた培養組織の乾燥重量の測定、其の他ブドー糖消費量の測定、DNA の定量等の方法が相継いで用いられた。然し乍ら此等の方法ではいずれも測定法の複雑なことや、或は測定値の不正確さ等の欠点があり、これに対して最近 Sanford, Earle, Evance⁸⁾³⁰⁾ 等により創案され、勝田³⁴⁾³⁵⁾ 等が改良した細胞核数算定による細胞の増生度も測定する方法は培養管内の細胞実数の増減の状態をつかみ得るという利点を有している。前述せる如く Bashford 癌の長期培養に於ける細胞増生の推移は細胞核数の算定によつたのであるが、この場場合は固形組織片を相接培養管壁に植えて培養するのであるから誤差を少なくする為に培養管内に出来るだけ同じ大きさの組織片を植え、且つ多数の培養管を使用して同時に培養を行い、一培養管当りの細胞核数の平均値を算出した。その結果は既に実験成績の項で述べた如く、一培養管当り $25 \times 10^4 \sim 30 \times 10^4$ の細胞を入れて培養する場合には細胞核数の増加は培養液の交換後2～3日目が最も旺盛であつて、7日目ではその増加率は少しく減少して来るので培養液の交換は少くとも4日目毎に行う必要がある。又培養日数が15～20日以上経過して癌細胞が広く培養管壁に拡がって増生し一培養試験管当りの細胞数が 170×10^4 前後となると培養液の交換を行つても細胞数の増加が見られなくなる。これは培養癌細胞数の増加に伴う培養条件の悪化によるものと思われるが、その原因としては培養液の栄養の低下、癌細胞の栄養要求の増加、細胞支持体面積の減少、代謝産物の畜積による細胞発育の抑制等が考えられる。従つて長期継代培養を行う為には4日目毎の培養液の交換と15～20日目毎の植継ぎを行う必要があることを知り得た。

長期継代培養に於いて癌細胞は上述した如く直接培養管壁に密着して網眼状の増生を示すがこの為植継ぎの操作は甚だ困難となる。今日培養法の進歩と共に多くの細胞が直接培養管壁に密着して増生するので植継ぎの際には殆んど Trypsin 液又は EDTA 液を用いて増生細胞を培養管壁より落し、細胞浮游液として新たに培養管に植継いでいる。私は予備実験に於いて2% Trypsin 液を使用し植継ぎを試みたが、この場合細胞集団が一塊となつて試験管壁よ

り脱落し新たに植継いだ培養管からの細胞増生は殆んど見られなかつた。これは癌細胞が Trypsin 使用によつて傷害され、増生に必要な細胞支持体たる培養管壁への密着性を喪失した為と考えられる。又 EDTA 液によつては培養管壁からの剝離が仲々困難であつた。之に反してラパークリーナーによつて機械的に培養管壁より剝離した癌細胞を集めて植継いだ場合は、細胞傷害の度合は強いと考えられるにも拘らず、比較的良好的な細胞増生を認めた。要するに機械的障碍は化学的傷害の如く総ての細胞に平等には加わらない為と考えられる。以上 Bashford 癌の植継ぎでは機械的に剝離する方法を用いた方が良好な成績が得られたので便宜上これを用いたが、勿論 Trypsin 処理が総ての癌細胞に有害とは言えない。

長期継代培養に於ける細胞の増生率に就いては、勝田は株化に至る迄の最初の3ヶ月間は漸次低下し、後の3ヶ月間は最低の増生率を維持し、培養を始めて凡そ半年で株化するや、急激に増生率が大きくなり以後は培養管内で容易に増生を続けると述べているが、私の実験に於いても植継ぎ毎に細胞の増生率は漸次低下し最初数十本を植えたが培養3ヶ月後には十数本時に数本を保有するのみとなつた。しかしこれは多くは植継ぎ操作により細胞増生の全く停止するものを生じた為で植継ぎに成功した場合は比較的旺盛に培養管壁に拡がって可成りの増生を示した。

長期継代培養に於ける正常細胞並びに腫瘍細胞の形態や機能の変化に関しては古くは Fischer, Laser. Mayer⁹⁾¹⁰⁾ (1928) 等が Erlich マウス癌をマウス背部筋肉片並に胎児組織片と併置培養することにより長期間培養し、その間癌細胞の増生は多くは単層の膜状を示し、併置組織片に熔岩流の如く侵入し、この培養片を染色すれば濃染する癌細胞は明かに腺状に排列し核分裂も多数認められると述べ、更に培養組織片をマウスに移植すれば殆んど必発的に癌腫を発生すると言つている。又 Parker²⁴⁾ (1932) は線維芽細胞が培養中に細長い紡錘形から大型アメーバ様の大喰細胞に変形したと述べ、更に Earle⁶⁾, Sanford²⁹⁾ 等 (1951) は C₃H 系マウスの皮下組織より線維芽細胞を分離培養して継代を重ねて行く内に形態並びに増生様式が次第に変化して上皮細胞様にシートを形成して増生するものと、最初から変化せずに細長い紡錘形を呈して粗くまばらに増生するものとが観察されると述べている。而してこれら線維芽細胞の培養中にメチルコラントレンを添加して

も、全然用いず普通に継代しても長期間培養する内に上述の如き形態の変化を来し、悪性化することのあることを報告している。この様に長期継代培養の途中で細胞の形態に変化を来すことは従来より報告されているが、Bashford 癌の長期継代培養に於いても培養癌細胞の形態の変化が若干見られた。即ち培養初期のものに比して胞体は細長くなり、棘状突起を生じ、それによつて各細胞が連繋する様になり線維芽細胞に似て網眼状の増生を示すに至つた。更に位相差顕微鏡による細胞の微細構造の観察では培養初期のものに比して核膜の肥厚、糸粒体の減少、Golgi 野の増大が見られたが、癌細胞としての特徴は引続き良く保持されていた。

腫瘍復元成績は上述した如く生きた細胞を含んだ培養液をマウスに接種した場合には半数に於いて腫瘍の形成を見た。この場合の腫瘍発現は動物から動物への累代移植の場合に比して幾分遅れて而も腫瘍の大きさも幾分小さいのが普通であつた。これは復元の場合には動物から動物に移植する場合に比して接種細胞数が少ない為と思われる。しかし乍ら復元腫瘍の断面を見るにその被膜、実質、壊死巣等の色調、硬度は全く母組織と同一であつた。

次に可移植性動物癌で注意すべきは Virus による癌発生であるが Bashford 癌の復元に就いても生活細胞以外に Virus 其他の因子による腫瘍形成を除外する必要上2~3の実験を試みた。即ち増生細胞を遠沈分離して全く生活細胞を含まない上澄培養液をマウス皮下に接種したが総て腫瘍の形成を見なかつた。又 Virus は生活細胞内にのみあると言われているので、この結果のみでは Virus を否定出来ないで更に培養癌細胞の挫滅液及び抽出した腫瘍組織の挫滅液を夫々接種して見たが総て腫瘍の形成を見なかつた。以上の実験成績から Bashford 癌の腫瘍形成には生きた癌細胞が絶対に必要であると結論し得た。次いで復元した腫瘍がもとの腫瘍と同一であるか否かに就いて追求するに母腫瘍組織並びに復元腫瘍組織の固定切片標本の染色に於ける異同を検討した。先づヘマトキシリン・エオジン染色に就いては被膜、癌巣、癌巣を囲む結合組織線維、間質中の血管、壊死巣等の配列、形態等は既に木村³⁶⁾, 吉田⁴³⁾, 和合⁴⁴⁾ 等が述べている通りであつて母腫瘍組織並びに復元腫瘍組織共に全く相異なく復元腫瘍は母腫瘍とその腫瘍性が同一であることを示した。その他 PAS 染色にて間質の結合組織線維が淡赤色に、Feulgen 核質反応で核が特異的に濃青色に、Sudan

Ⅲ染色で被膜下脂肪球が鮮紅色に、鉄ヘマトキシリン染色で糸粒体が淡青黒色に染色せられているが、之等の染色態度も全く原腫瘍組織と同様であつた。以上の結果から長期培養によつて増生した細胞は Bashford 癌細胞であることを証明し得た。

第5章 結 論

廻転培養法によつて Bashford 癌の培養を行い、5代継代し、3ヶ月間の長期培養に成功し、次の結論を得た。

- 1) 長期培養に於ける細胞核数の増加の推移よりみて、一培養管当り 30×10^4 の細胞を植えた場合は4日目毎の培養液の交換と15~20日目毎の植継ぎを行う必要を認めた。
- 2) 長期継代培養せる癌細胞は培養初期のものに比して胞体は細長くなり網眼状の増生を示した。位

相差顕微鏡所見では核膜は肥厚し、糸粒体は減少し、Golgi 野の増大が認められたが、腫瘍細胞としての特性をそのまま保持していた。

- 3) 長期継代培養せる癌細胞のマウスへの復元は培養後15, 20, 30, 50日目に夫々行い、いずれも元の腫瘍と全く同一の腫瘍を形成した。

擧筆するに当り御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木教授並びに角南講師に深甚の謝意を表する。

(本論文の要旨は第17回日本癌学会総会並びに第4回組織培養学会に於いて発表した)。

参 考 文 献

- 1) Carrel, A. & Burrows, M. T.: *J. Exp. Med.*, **13**, 387~396, 1911.
- 2) Carrel, A.: *J. Exp. Med.*, **17**, 14~19, 1913.
- 3) Carrel, A.: *J. Exp. Med.*, **38**, 407~418, 1923.
- 4) Champy, C.: *Arch. morphol. gén. et exper.*, fasc. 4, 1922.
- 5) Coman, D. R.: *Cancer Res.*: Vol. 2, 618~625, 1942.
- 6) Earle, W. R.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **4**, 165~212, 1943.
- 7) Enterline, H. J. and Coman, D. R.: *Cancer*, Vol. 3, 1033~1038, 1950.
- 8) Evance, V. J., Earle, W. R., Sanford, K. K., Shannon, J. E., Waltz, H. K.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **11**, 907~927, 1951.
- 9) Fischer, A.: *Z. Krebsforschg.*, **26**, 228, 1928.
- 10) Fischer, A. & Davidsohn, F.: *Nature*, **143**, 436, 1939.
- 11) Gey, G. O.: *Am. J. Cancer*, **17**, 752, 1933.
- 12) Gey, G. O., Coffman, W. D., & Kubicek, M. T.: *Cancer Res.*, **12**, 264~265, 1952.
- 13) Harrison, R. G.: *Anat. Rec.*, **I**, 116~118, 1907.
- 14) Jacoby, F.: *J. Physiol.*, **90**, 23, 1937.
- 15) Lambert, R. A. & Hanes, F. M.: *Proc. Soc. Exp. Med. & Biol.* **8**, 113, 1911.
- 16) Lewis, M. R. & Lewis, W. H.: *Am. J. Cancer*, **16**, 1153~1183, 1932.
- 17) Lewis, W. H.: *Science*, **81**, 545~553, 1935.
- 18) Ludford, R. J.: *Roy. Soc. London Proc.*, ser B, **112**, 250~293, 1933.
- 19) Lumsden, th.: *Lancet*, **210**, 907, 1924.
- 20) Maitland, H. B. & Maitland, M. C.: *Lancet*, **215**, 596~597, 1928.
- 21) Maximow, A.: *Pub. Contrib. Embryol.*, **16**, No. 80, 47, 1925.
- 22) Meier, R.: *Biochem. Ztschr.*, **231**, 253~259, 1931.
- 23) Moorhead, P. S. and Hsu, T. C.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **16**, No. 5, 1047~1066, 1957.
- 24) Parker, R. C., *J. Exp. Med.*, **55**, 713~734, 1932.
- 25) Pomerat, C. M., & I. Castero.: *Amer. J. Anat.*, **89**, 405~467, 1951.
- 26) Pomerat, C. M. & I. Castero.: *Amer. J. Anat.*, **99**, 221~247, 1956.
- 27) Pybus, F. C. and Fawns, H. T.: *J. path. Bact.*, **34**, 39~44, 1931.
- 28) Sanford, K. K., Earle, W. R., & dikely, G. D.: *J. Nat. Cancer Inst.*, **9**, 229~246, 1949.
- 29) Samford, K. K., Earle, W. R., Shelton, E.,

- Schilling, E. L., Duchesne, E. M., Likely, G. D., & Becker, M. M.: J. Nat. Cancer Inst., 11, 351~375, 1950.
- 30) Sanford, K. K., Earle, W. R., Evance, V. J., Waltz, H. K., & Shannon, J. E.: J. Nat. Cancer Inst., 11, 773~795, 1951.
- 31) Tinonen, S., & Therman, E.: Cancer Res., 10, 431~439, 1950.
- 32) Willer, E. N., & Jacoby, F.: J. Exp. Biol., 13, 237~248, 1936.
- 33) 海野源太郎, 武田進: 癌, 42, 219~221, 1951.
- 34) 勝田甫: Japan J. Exp. Med., 24, 125~139, 1954.
- 35) 勝田甫: 組織培養法, 納谷書店, 1955.
- 36) 木村哲二: 癌, 14, 45~60, 1920.
- 37) 木村廉: 組織培養 (改訂版), 共立出版, 1955.
- 38) 篠崎芳郎: 日微病誌, 31, 8, 919~1012, 1937.
- 39) 武田進: 腫瘍細胞, 永井書店, 1956.
- 40) 服部銈三: 日微病誌, 24, 71, 89, 105, 1930.
- 41) 藤浪得二: Acta Schol. Med. Univ. Kyoto, 31, 39, 1953.
- 42) 牧野佐二郎, 他: Cytologia 18, 128~132, 1953.
- 43) 吉田富三: 吉田肉腫, 寧楽書房, 1949.
- 44) 和合平之助: 癌, 15, 155~158, 1921.

水津論文附図説明

- 写真 1. 3ヶ月間継代培養せる Bashford 癌細胞. H. E. 染色 (×100)
- 写真 2. 同位相差顕微鏡像 (DLL×100)
- 写真 3. 培養5日目の Bashford 癌細胞 (DM×1000)
- 写真 4. 同, H. F. 染色像 (×400)
- 写真 5. 3ヶ月間継代培養せる Bashford 癌細胞 (DM×1000)
- 写真 6. 同, H. E. 染色像 (×400)
- 写真 7. 培養前の Bashford 癌母組織切片標本像. H. E. 染色 (×100)
- 写真 8. 同, (×400)
- 写真 9. 50日間継代培養後マウスに復元せる腫瘍の切片標本. H. E. 染色 (×100)
- 写真 10. 同, (×400)

Studies on Bashford's Carcinoma by Tissue Culture

Part 3. Bashford's carcinoma tissue culture by roller-tube method repeated successively for a long period of time and its retransplantation back to its host animal.

By

Akira Suizu

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

In the roller-tube Bashford's carcinoma tissue culture the author succeeded in culturing five successive generations for as long as three consecutive months, and obtained the following results.

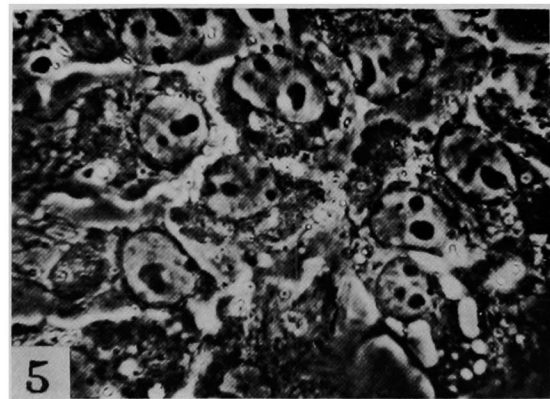
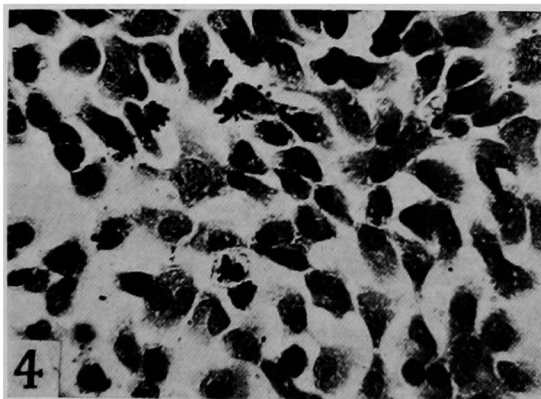
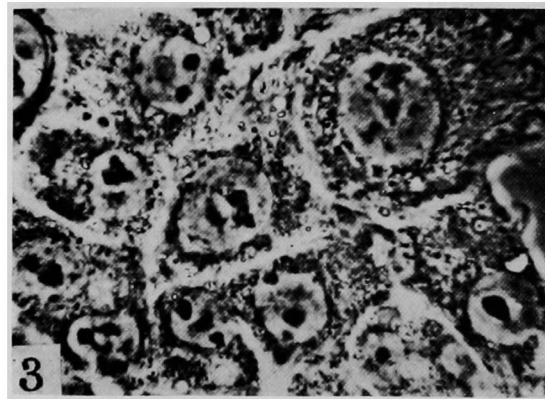
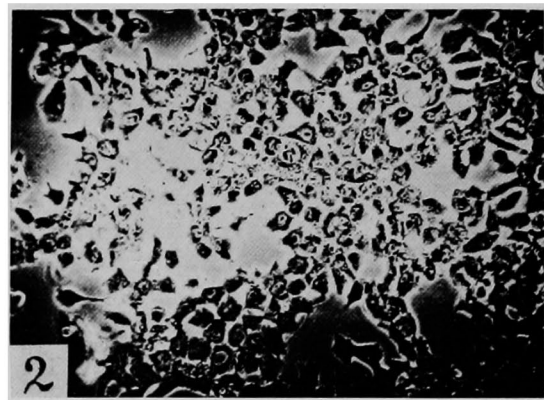
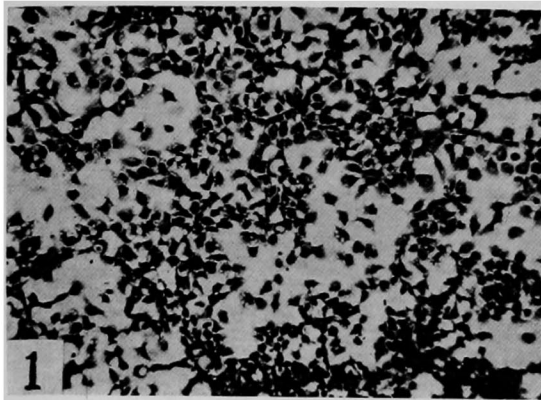
1. Judging from the change in the increasing number of nuclei in long successive culture, when 30×10^4 cells are transplanted in one culture field, it is necessary to replace

the medium every four days with fresh one and the tissue must be replanted every once in 15—20 days.

2. Those cancer cells cultured successively for a long period of time are more slender and have formed meshworks as compared with those at early stage of culter. In the observation under the phasecontrast microscope the thickening of nuclear membrane, a decreased number of mitochondria, and the enlargement of Golgi's apparatus can be recognized, but they still maintain specific characteristics of tumor cells.

3. In retransplanting the cancer cells cultured successively for a long time back to mice on 15th, 20th, and 50th days of culture, it has been possible to produce tumors exactly identical with the original ones in each retransplantation.

水津論文附図



水 津 論 文 附 図

