

マウス yolk sac 由来と考えられる実験的奇形腫の 性状について

大阪大学医学部病理学教室

勝瀬 健 覚道 健一 北村 旦

大阪大学医学部附属病院病理部

桜井 幹 己

Experimental Teratoma Derived from Mouse Yolk Sac

Ken KATSUSE, Kenichi KAKUDO and Hajime KITAMURA

Department of Pathology, Osaka University Medical School, Osaka

Masami SAKURAI

Department of Pathology, Osaka University Hospital, Osaka

概要 妊娠11~18日目, BALB/c, ICR 系マウスを用い, 何らの発癌物質を使わず, 単なる手術的方法 (fetectomy) により高頻度に成熟型奇形腫の発生を認めた. 発生頻度はマウスの strain などの要素と fetectomy の時期に大きく影響をうけ, BALB/c マウスの方が ICR 系マウスよりも発生頻度が高く, 又妊娠時期の早い時期に fetectomy が行なわれた方が発生頻度が高かった. しかし妊娠17~18日目において fetectomy をうけた中からも奇形腫の発生がみられ, これは奇形腫の発生源と考えられる yolk sac が妊娠末期においても, なお分化能を失わずにあるということを証明するものである. 発生した奇形腫は, 術後3カ月以上を経ると嚢腫状となり, 腫瘍的増殖はみられなかつた. これはこの方法により得られた奇形腫が, 真の意味での腫瘍ではなく, 発生上の産物であるということを示すものと思われる. 発生した奇形腫を有する BALB/c マウスの血清及び嚢腫内容物の AFP は全例陰性であつた.

Synopsis By using no carcinogens, well differentiated teratomas were induced in BALB/c nu/+, +/- and ICR strain of mice. On the 11th to 18th day of gestation, mice were laparotomized and all fetuses were removed from uterus, leaving placentas in situ and fetal membranes were protruded into peritoneal cavity. After 5 to 139 days of operation, extrauterine tumors developed in twenty five mice of fifty fetectomized mice. In BALB/c nu/+ mice the tumor developed in six of ten, in +/- mice eighteen of twenty five and in ICR mice only one of fifteen.

The tumors were all histologically well differentiated teratomas, some contained tissues derived from one germ layer and others from two or three germ layers but no undifferentiated cells.

The teratomas became cystic, so we call, endodermal cysts on histological examination during rather long term observations. We concluded that these induced tumors were not genuine tumors in real pathologic means but only well differentiated tissues derived from the yolk sac on developmental stage.

Alpha-fetoprotein (AFP) in serum or in cystic contents of the tumor bearing mice were not detected by double immunodiffusion method.

Key words: Experimental teratoma • Mice • Yolk sac • AFP

緒 言

マウスの奇形腫の実験モデルとして, これまで Stevens et al. により, 大きくわけて3系統のモデルが確立されている. 第1は自然発生奇形腫であり, 129系マウスの約1%の頻度に睪丸に奇形

腫の発生が認められ¹²⁾, さらにその亜系においては30%の頻度にみられる¹⁵⁾.

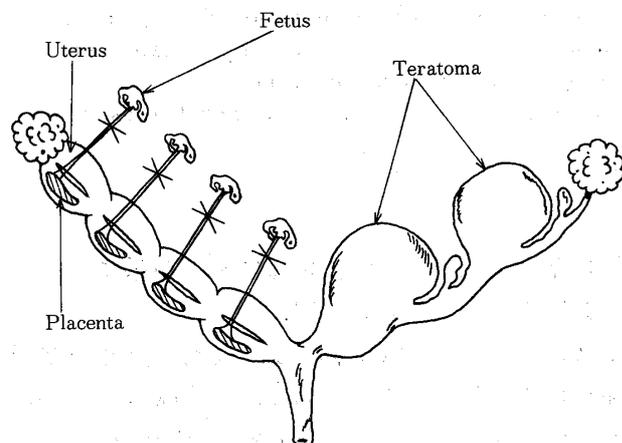
又, LT マウスの卵巣には, 50%の頻度で奇形腫が認められている¹⁶⁾. 第2は, 妊娠11~13日目の胎児の genital ridge を成熟する isogenic マウ

スの臍丸に移植してみられる奇形腫である¹³⁾。第3は、妊娠5～8日目の embryo を臍丸¹⁴⁾、腎被膜下³⁾、脾臓などに移植することによりみられる奇形腫である。一方ラットにおいては、Sobis et al.¹⁰⁾、Sakashita et al.⁹⁾ が妊娠12日目胎児の yolk sac を腹腔内にひき出すことにより、奇形腫及び α -fetoprotein (AFP と略す) 産生 yolk sac tumor の発生をみている。今回我々は、この方法をマウスに用い、奇形腫の発生を認めた⁵⁾ ので、発生した奇形腫の性状、発生頻度、腫瘍の比較的長期にわたる観察及び腫瘍を有するマウスの血清の有無などを検討し、若干の文献的考察を加え報告する。

研究方法

当教室において飼育している BALB/c nu/+ マウス10匹、BALB/c +/+ マウス25匹、ICR 系マウス15匹 (総て成熟♀マウス) の計50匹が用いられた。マウスを mating させ、陰に plug が発見された日を妊娠0日とし、妊娠11～18日目のマウスをエーテル麻酔下に開腹し図1のように子宮壁をピンセットで切開し、卵膜を破つた後、胎盤はそのまま、卵膜を腹腔内に露出せしめ、子宮壁は開いたまま、閉腹した。術後5～139日目に全例屠殺し、肉眼的に腫瘍の有無、腫瘍の大きさを記録し、次いで10%ホルマリン固定、パラフィン包埋の後 HE 染色により組織学的検索を行なった。又、発生した腫瘍を有する BALB/c マウスの血

図1 fetectomy (左) 及び術後発生した奇形腫 (右)



清10検体と、囊腫の内容液2検体を採取し AFP の有無を Ouchterlony 法にて定性を行なった。(Ouchterlony 法の感度は 10^4 ng/ml と考えられる。) なお、これに用いられた抗 AFP 血清は、東日本学園大薬学部渡部博之教授より提供していただいた。紙上にて深謝いたします。

研究成績

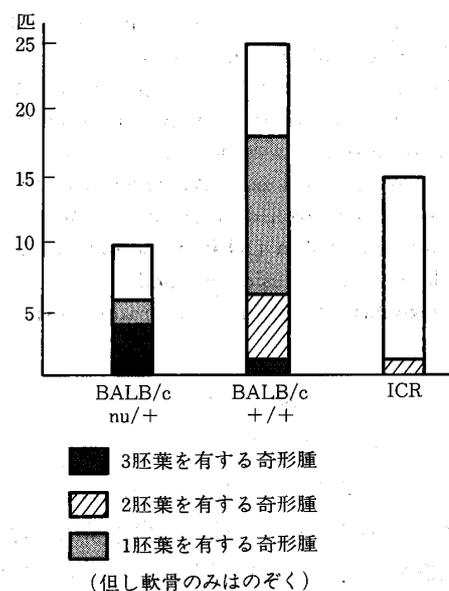
1. 腫瘍の肉眼的特徴

発生した腫瘍 (写真1) は、表面平滑で、周囲とは、被膜により完全に分離され、各子宮角に1～数个みられ、大きさは、0.3～1.5cm で卵巣との連続性はみられない。剖面では fetectomy 後比較的新しい物では、白色充実性であり、時に石灰化を思わせる灰白色の硬い部分がみられた。又 fetectomy 後日数を経たものでは、腫瘍の一部に黄色透明液を含む囊腫状部分が認められることが多かつた (写真2)。子宮内に残された胎盤は、黄白色の硬い結節となり、数カ月間吸収されずに残る場合もみられた。腫瘍と母体の各組織との着は注意深い操作により完全に剝離された。

2. 発生した奇形腫の発生頻度

奇形腫の発生頻度は図2に示すように、BALB/c nu/+ マウスでは、10匹中3胚葉成分を有する奇形腫が4匹 (40%) に、1胚葉成分を有する奇

図2 奇形腫発生頻度



形腫が2匹(20%)に認められた。

BALB/c +/+マウスの場合には25匹中3胚葉成分を有する奇形腫が1匹(4%)に、2胚葉成分を有する奇形腫が5匹(20%)にみられた他、1胚葉成分を有する奇形腫は12匹(48%)に認められた。ICR系マウスでは、2胚葉成分を有する奇形腫が1匹(6.7%)にみられた他は、脂肪の中に軟骨組織を認めたものが5匹存在したが、これは組織の変性過程とも考えられるので、奇形腫とは考えなかつた。全体として50匹中25匹(50%)に奇形腫の発生がみられ、そのうち3胚葉成分を有するものは、5匹(10%)に認められた。BALB/c系マウスでは、奇形腫の発生頻度に殆ど差異はみられないが、ICR系マウスと比較すると、前者が後者よりも著明に奇形腫の発生が高い

図3 奇形腫の発生と fetectomy 時の妊娠時期の関係

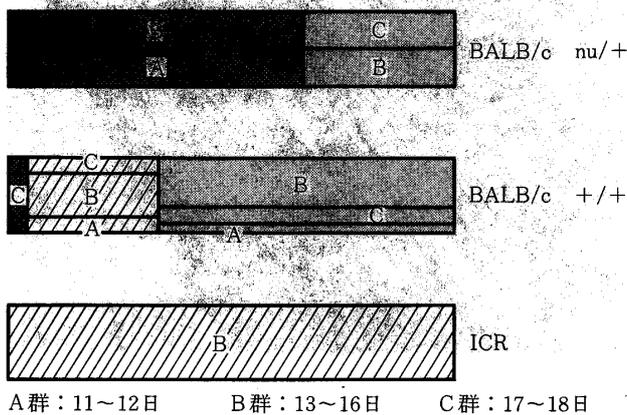


表1 BALB/c マウスにみられた3胚葉成分を有する奇形腫の組織構成

	Pregnant (day)	Days after operation (day)	Ectoderm	Mesoderm	Endoderm
1	14	15	Epidermal cyst	cartilage, bone marrow, bone	alveolus, endodermal cyst (containing yolk sac)
2	12	25	nervous tissue, epidermal cyst	cartilage, bone, bone marrow, fat	gut
3	14	28	nervous tissue	cartilage, muscle	gut
4	11	37	nervous tissue, epidermal cyst	cartilage, bone, muscle, bone marrow	gut
5*	17	48	epidermal cyst	cartilage	endodermal cyst

*印以外は総て nu/+マウス *印 +/+マウス

といえる。次に奇形腫の発生と fetectomy 時の妊娠時期の関係を調べたものが図3である。妊娠時期を3期に分け、A群；11～12日目、B群；13～16日目、C群；17～18日目とすると、BALB/c nu/+マウスでは、3胚葉成分を有する4匹はA、B群であり、1胚葉成分を有する2匹はB、C群であつた。BALB/c +/+マウスでは、3胚葉成分を有した1匹はC群で、2胚葉成分を有した12匹は、A群、B群及びC群であつた。

3. BALB/c +/+マウスでみられた奇形腫を有する血清及び囊腫内容液の AFP 定性

奇形腫を有するマウスの血清10検体、及び囊腫内容液2検体の Ouchterlony 法⁶⁾による測定の結果は全例とも negative であつた。なお control に使用した胎児の抽出液は positive であつた。

4. 発生した奇形腫の組織学的検討

写真3は妊娠12日目に fetectomy を施行し、術後25日目に屠殺したマウスにみられた奇形腫の超低倍像である。奇形腫は明らかに子宮外に存在し、神経、脂肪、骨髄、筋肉、類皮嚢胞よりなつており、他の結節には明らかな腸管もみられた。写真4、5、6は、それぞれの強拡大像である。写真7は妊娠14日目に fetectomy 施行、術後15日目に屠殺したマウスにみられた奇形腫の一部であるが、これは明らかに肺胞上皮である。この奇形腫は他に写真8のような hobnail 像を示す yolk sac 的な部分もみられたが、いずれもよく分

写真1 BALB/c nu/+妊娠11日目に fetectomy を行ない術後37日で屠殺したマウスにみられた3胚葉を有する奇形腫 (矢印)

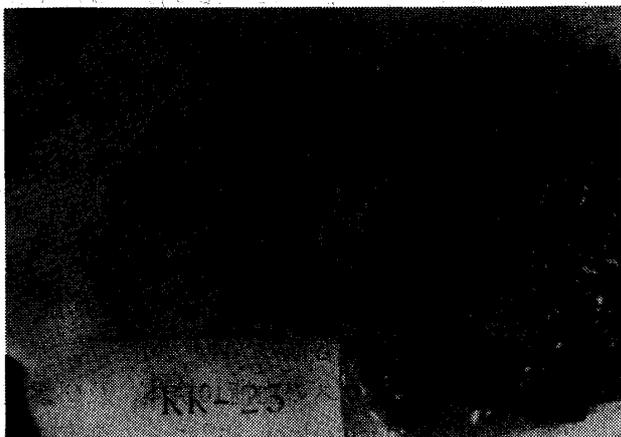


写真4 発生した奇形腫にみられた神経組織 (×100)

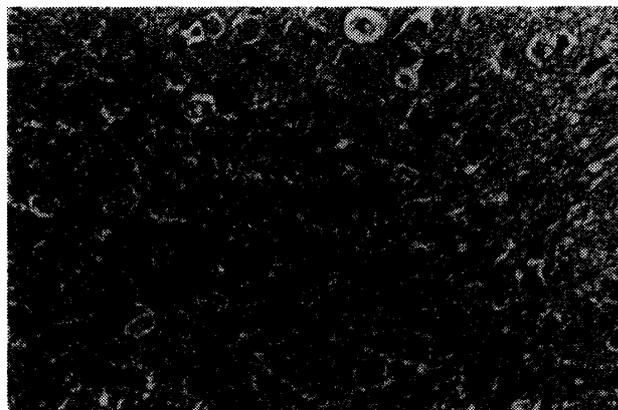


写真2 BALB/c +/+ 妊娠15日目に fetectomy を行ない術後106日目で屠殺したマウスにみられた囊胞 (矢印)



写真5 同じく Dermoid cyst. (×100)

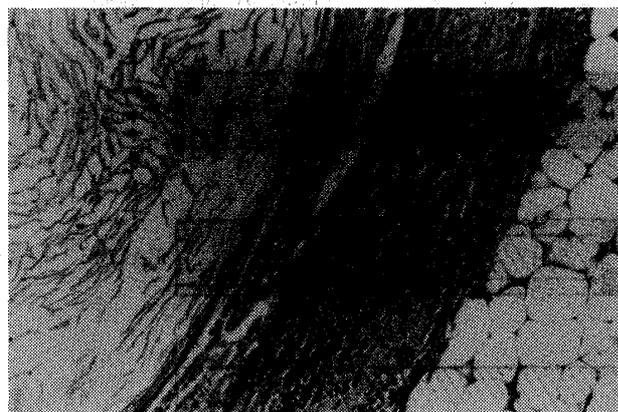


写真3 発生した奇形腫の超低倍写真
U:Uterus. B:Bone marrow. D:Dermoid cyst.
F:Fat tissue. N:Nervous tissue.



写真6 同じく腸管 (×100)

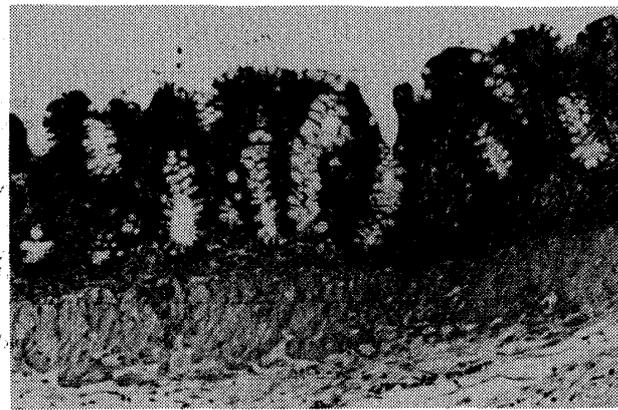


写真7 同じく肺胞上皮 (×100)

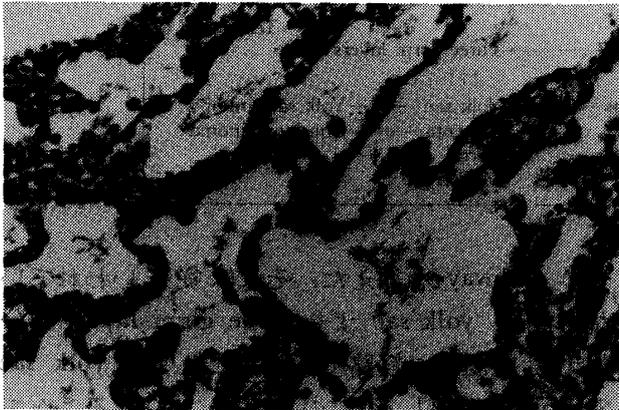


写真8 Hobnail pattern を示す yolk sac element (矢印)

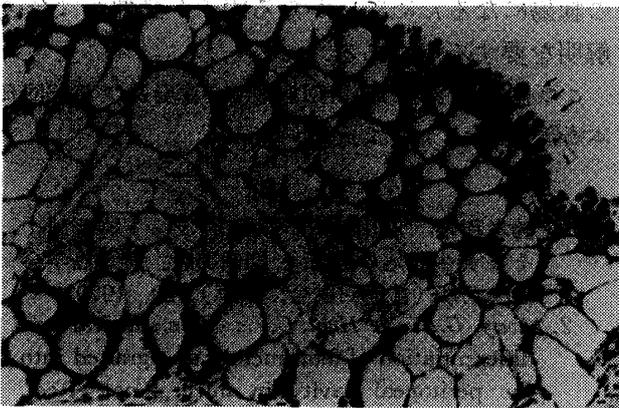


写真9 術後長期間を経たマウスにみられる endodermal cysts の超低倍写真



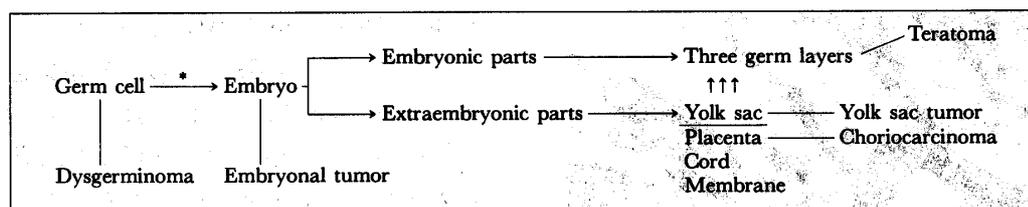
化した組織より構成されており、未分化細胞よりなる部分はみられなかった。fetectomy 後、長期間経たものにみられた嚢胞の組織像は写真9に示すように、薄い結合組織の表面に腺上皮が並ん

でいるが、一部はすでに剝脱している。これはいわゆる endodermal cyst といわれているものである。発生した奇形腫のうち、3胚葉を有する奇形腫の組織の詳細は、表1に示す。BALB/c nu/+, +/+, ICR 系マウスなどの間には発生した奇形腫の組織学的差異はみられなかった。

考 案

yolk sac は、マウスでは胎生5~6日目に、extraembryonic endoderm として発生し、母体側の parietal yolk sac, 胎児側の visceral yolk sac の2つの部分に分けられる。この yolk sac の分化能に関しては、今日までさまざまな報告がある^{1),2),5),7),8),10)}。Payne et al.⁷⁾ は、ラットの妊娠15日目 yolk sac をとり出し、母体の omentum に固定し、4~12W 後に屠殺したところ、12匹中7匹に 5cm にもなる大きな嚢胞を得、その内腔は粘液産生上皮に被れていたとのべている。一方 Avery et al.²⁾ はマウスの卵膜を omentum に固定し、allogeneic host と isogeneic host で、その生着状態を観察したところ、前者では、拒絶反応により、細胞は消失したという。後者では、いわゆる“biological clock”に一致する時期までは、卵膜のそれぞれの構成細胞は退化せずに存在したが、決してそれ以上の分化はみられなかったとのべ、yolk sac の分化能については否定的であった。Pierce et al.⁸⁾ は、妊娠9~12日目マウスの yolk sac を parietal, visceral に分け、それぞれを皮下に移植したところ、前者からは、何らの分化した組織は得られなかったが、後者からは、gut, bone, squamous epithelium よりなる、いわゆる高分化奇形腫を得ている。その後 Vandeputte and Sobis¹²⁾ は、ラットで妊娠12日目に fetectomy を行ない、子宮内で Molony virus に感染させたところ、yolk sac 由来と考えられる腫瘍を作る事に成功した。彼らは更に、何らの carcinogen を用いず単なる fetectomy という手術操作のみで yolk sac 由来の奇形腫を得ている^{10),11)}。しかしこれらの腫瘍からは、残念ながら移植可能な腫瘍は出現せず、総て高度に分化した組織よりなるものであった。その後 Sakashita et al.⁹⁾ は、

表2 Jimmerson and Woodruff: Am. J. Obstet. Gynecol., 127: 73, 1977 より転載追加



* Fertilization or parthenogenesis

Vandeputte et al. の上記方法を用い、同じくラットで実験を行なったところ、分化型奇形腫の他に、AFP 産生 yolk sac tumor を得、今日まで継代移植されている。我々の今回の実験は、彼等と同じ操作をマウスに用いたのであるが、確かに高頻度に奇形腫の発生を認めたが、未分化細胞を有する継代可能な腫瘍はみられなかつた。そもそも各組織の移植実験では、ラット、マウスいずれも strain によりその成否が決まることは、これまでも報告されてきており、今回の我々の実験においても、それは確認された。又今回の実験で重要な結果は yolk sac の分化能と、発生時期についてであり、これまで妊娠15日目以後での yolk sac の分化の報告はなかつたが、今回の実験により妊娠18日目の yolk sac から奇形腫の発生がみられた事実より、yolk sac は、妊娠末期に到るまでなお分化能を有することが示された。これはきわめて興味ある事実である。次に著者らは、今回発生した腫瘍を奇形腫、すなわち teratoma という言葉で呼ぶのが適切かどうかを考えてみた。最長139日間の観察により、発生した腫瘍は囊腫状となり、腫瘍的性格は失われてゆく傾向があり、Vandeputte et al. の方法で得られたものは、yolk sac derived, well differentiated tissues と呼ぶのがふさわしいと考えられる。さて単なる fetectomy のみで、なぜ Sakashita et al. の実験で得られた yolk sac tumor が発生するかは、現在のところ全く不明であるが、最近鈴木ら³⁾が、ラットを用いた同様の方法においても何ら未分化細胞を有する奇形腫の発生はみられていない。

さて以上の結果を含めて、いわゆる奇形腫群腫瘍 (Teratoid tumor) の発生病理に関して、Teilum, Jimmerson et al. の模式図⁴⁾に著者らは、一

つの pathway を加えた。それは従来いわれていなかった、yolk sac より three germ layers に分化する (竹) の経路であり、これより yolk sac も totipotent cell の一つとして、そこから yolk sac tumor, teratoma, teratocarcinoma が発生しても良いことを示している。そしてそれぞれの腫瘍になるためにいかなる因子が必要かは今後解明を要する点である。

この論文の要旨は第67回病理学会総会及び第38回日本癌学会総会において発表した。

文 献

1. 鈴木利光, 石川 忍: 実験的ラット奇形腫; その発生母地の解析と抑制実験. 日本癌学会総会記事 (第38回総会, 東京), 20, 1979.
2. Avery, G.B. and Hunt, C.V.: The survival and differentiation of fetal membranes grafted into the peritoneal cavity in mice. *Anat. Rec.*, 160: 751, 1968.
3. Damjanov, I., Solter, D., Belicza, M. and Skreb, N.: Teratomas obtained through extrauterine growth of seven day-old mouse embryos. *J. Nat. Cancer Inst.*, 46: 471, 1971.
4. Jimmerson, G.K. and Woodruff, J.D.: Endodermal sinus tumor. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 127: 73, 1977.
5. Katsuse, K., Kakudo, K., Sakurai, M. and Kitamura, H.: Experimental teratoid tumor after fetectomy in mice. *Gann*, 69: 447, 1978.
6. Ouchterlony, O.: Antigen-antibody reactions in gels. *Arkiv. Kem. Min. Geol.*, B26: 1, 1949.
7. Payne, J.M. and Payne, S.: Placental grafts in rats. *Nature*, 185: 402, 1960.
8. Pierce, G.B. Jr., Bullock, W.K. and Huntington, R.W. Jr.: Yolk sac tumors of the testes. *Cancer*, 25: 644, 1970.
9. Sakashita, S., Tsukada, Y., Tsuji, I. and Hirai, H.: Experimental yolk-sac tumors produced by fetectomy without virus infection in rats. *Int. J. Cancer*, 20: 83, 1977.
10. Sobis, H. and Vandeputte, M.: Development of

- teratomas from displaced visceral yolk sac. *Int. J. Cancer*, 13: 444, 1974.
11. *Sobis, H. and Vandeputte, M.*: Sequential morphological study of teratomas derived from displaced yolk sac. *Dev. Biol.*, 45: 276, 1975.
 12. *Stevens, L.C. and Little, C.C.*: Spontaneous testicular tumors in an inbred strain of mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 40: 1080, 1954.
 13. *Stevens, L.C.*: Experimental production of testicular teratomas in mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 52: 654, 1964.
 14. *Stevens, L.C.*: The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev. Biol.*, 21: 364, 1970.
 15. *Stevens, L.C.*: A new inbred subline of mice (129/ter Sv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *J. Nat. Cancer Inst.*, 50: 235, 1973.
 16. *Stevens, L.C. and Varnum, D.S.*: The development of teratomas from parthenogenetically activated ovarian mouse eggs. *Dev. Biol.*, 37: 369, 1974.
 17. *Vandeputte, M. and Sobis, H.*: In utero tumor induction by murine sarcoma virus (Molony) in the rat. I. Biological characteristics. *Int. J. Cancer*, 11: 543, 1973.

(No. 4716 昭55・6・6 受付)