

位相差顕微鏡による異種移植の腫瘍細胞の観察

大 貫 泰 (北海道大学理学部動物学教室)

昭和 31 年 11 月 28 日受領

シロネズミの腹水腫瘍による異種移植実験は吉田(富)(1949)はじめ多数の研究者によつてなされている。いろいろな近縁動物に移植された腫瘍細胞の行動に関しては吉田(俊)(1952)の詳細な報告がある。また、異種移植された腫瘍の染色体調査は牧野(1952b)及び中原(1952)により行われている。それらの結果によると、異種の動物に移植された腫瘍細胞は、それぞれの腫瘍の種族細胞の分裂により或る程度増殖をするが、殆ど例外なく、すべての腫瘍細胞は宿主を殺すことなく消滅する。一方、薬品処理実験においては、完全にすべての被移植動物が治癒することはない。大部分の細胞が崩壊しても、必ず種族細胞が生き残つて分裂、増殖し、腫瘍が再発して動物は死に至ることが、牧野・田中(1953a, b), 田中・その他(1955)により観察されている。異種移植における腫瘍細胞消滅の過程は不明である。著者はその消滅の過程を位相差顕微鏡により生きた細胞において観察し、若干の結果を得たのでここに報告する。

稿を起すにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜つた牧野佐二郎教授に厚く御礼申し上げる。また、研究上種々の御助言を戴いた加納恭子、中原皓、外村晶、岡田正、中西宥の諸氏に深く感謝する。

材 料 と 方 法

研究には腫瘍はシロネズミ (*Rattus norvegicus*) の腹水腫瘍である吉田肉腫、MTK 肉腫 II 及び MTK 腫瘍 IV の 3 系統を用いた。吉田肉腫は浜崎系、約 100 代前後のもの、MTK 肉腫 II 及び MTK 腫瘍 IV はそれぞれ約 350, 100 代前後のもので、いずれも当教室でシロネズミに累代移植を続けているものである。これら腫瘍の一般特性やその発生については、田中・加納(1951), 牧野(1952b, 1956)により報告されている。異種動物としてはハツカネズミ (*Mus musculus*) を用い、系統は主として DBA/2 を用いたが、他に B72, C57, D, E, の各系統も使つた。移植はこれらの腫瘍の正常累代移植に用いられているガラスのピペットを用いてシロネズミの腹腔からハツカネズミの腹腔中に行つた。移植量は腫瘍移植後 3-4 日目のシロネズミの腹水約 0.2 cc を注入した。観察は牧野・中原(1953b)の流動パラフィン法により、位相差顕微鏡を用いて行つた。観察温度は加温装置により 35°C に保つた。また、分裂頻度及び腹水細胞の出現率を調べるためには acetic dahlia の押しつぶし法を用い、これに Giemsa 染色標本を併用した。実験は 12 回、ハツカネズミ計 30 頭を用いた。

観 察

ハツカネズミの腹腔中に移植された腫瘍細胞は、移植後、種族細胞の正常な分裂により 1-2 日目は高い分裂頻度を示して急激に増殖する。この分裂は全く正常で分裂時間はシロネズミ腹腔中の場合と同様である。3-4 日目にかけて細胞は殆ど純培養の状態に達するが、分裂頻度は徐々に減少する。4-5 日目になると増殖は極限に達し、分裂頻

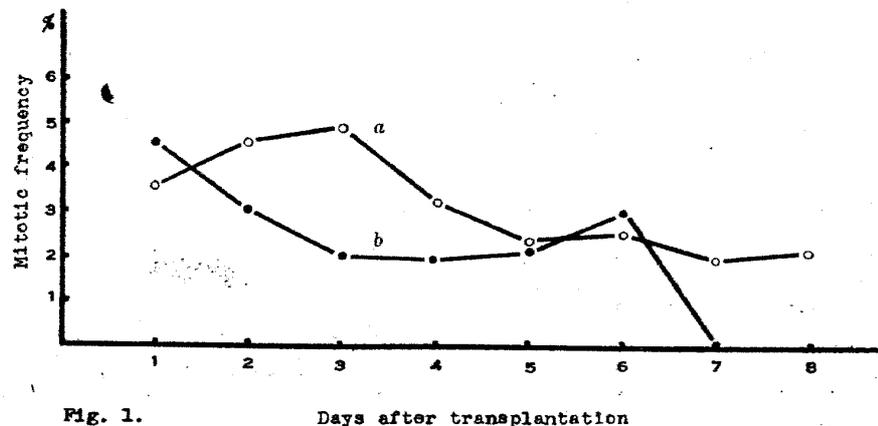


Fig. 1. Graphs showing daily frequencies of dividing tumor cells of the MTK-sarcoma II in peritoneal cavities of the rat (a) and the mouse (b).

度は最低となるが、徐々に変性し崩壊する細胞が出現するにつれて再びやや高くなる (Fig. 1)。この時期の細胞には細胞質中に屈折率の高い小顆粒が目立つものが多くなる。移植後5-6日目の或る時期になると、腫瘍細胞の変性過程は急激に進み、崩壊像の増加と共に細胞数は速かに減り、およそ15時間から20時間の間に殆ど完全に腫瘍細胞は消滅する (Fig. 1, 3)。一方、これと同時に、腹腔内の反応細胞は急激に増加し、盛に分裂し、活動して遂に純培養の状態に達する (Fig. 3, 12-15)。この急激な消滅過程の時期には約2時間毎に腹水を取り、流動パラフィン法により標本を作り、それぞれ2-3時間ずつ連続的に観察した。最初の中は、腫瘍細胞はやはり殆ど純培養に近い状態であるが、個々の細胞は屈折率の高い小顆粒や小空胞を含み、崩壊過程にあることを示している (Fig. 5)。これ

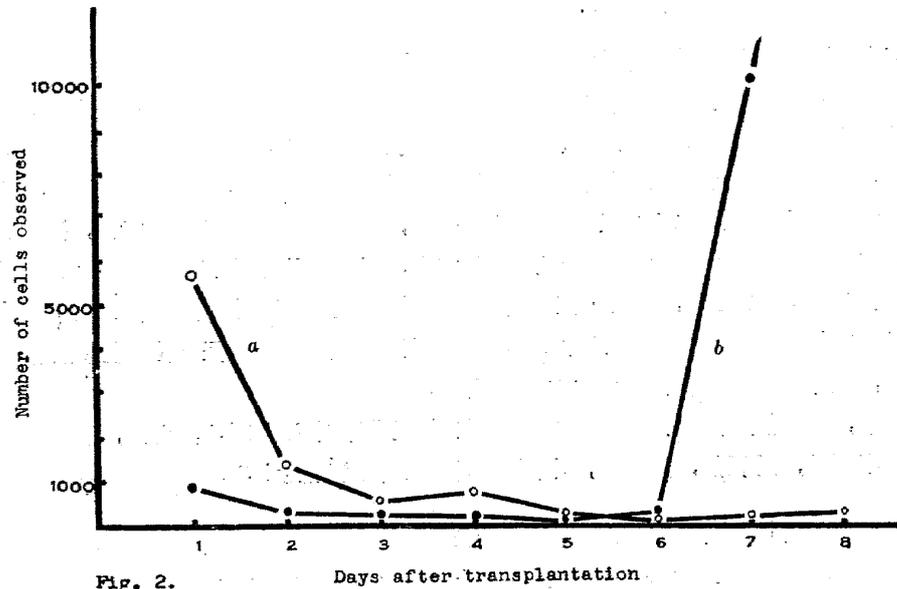


Fig. 2. *a*: numbers of leucocytes in the peritoneal cavity of the rat, observed in reference to 2000 tumor cells. *b*: the same in the peritoneal cavity of the mouse.

より2-4時間後には、腫瘍細胞はかなり急速に崩壊減少し、同時に白血球性の反応細胞が多数現われてくる。この時期になると、腫瘍細胞は細胞質の屈折率がやや高くなり、中原 (1955) のみたような変形運動するものが非常に多くなる (Fig. 5-6)。更に数時間後には、反応細胞の分裂と運動が烈しくなり、macrophages が多数観察される様になる (Fig. 7)。更に2-3時間後になると、腫瘍細胞の多くはピクノーシスをおこして崩壊し、その数は急激に減少し、反応細胞中に僅かに散見される様になる (Fig. 8-10)。その細胞はやや小型で屈折率高く、仁、核膜等は形態的には通常のものと同じだが、やや不明瞭である (Fig. 9-10)。また、細胞質中には小顆粒及び小型の空胞の見られるものが現われてくる (Fig. 11)。この時期には反応細胞の活動が最も活潑にな

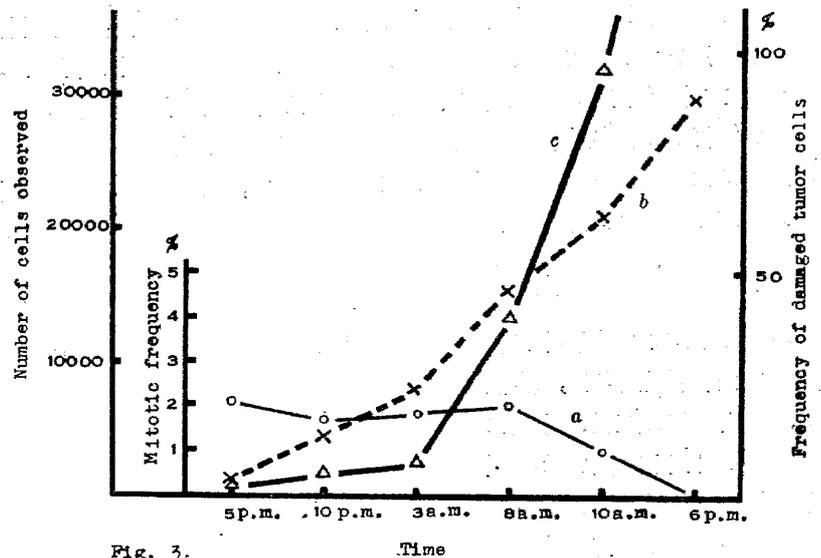
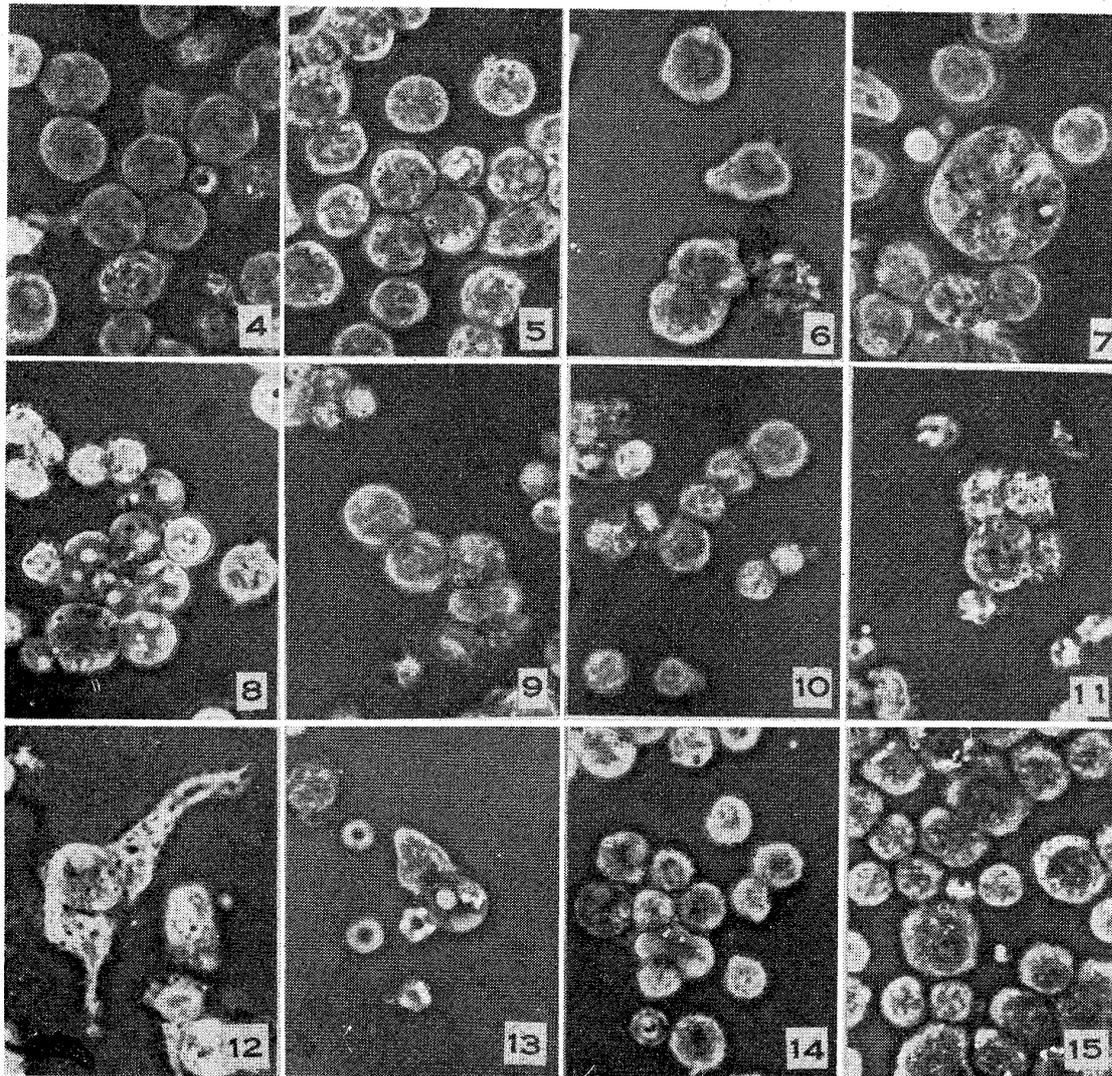


Fig. 3. Graphs illustrating the variation in number of tumor cells of the MTK-sarcoma II in degeneration process after the mouse transfer. *a*: mitotic frequency of regular dividing tumor cells. *b*: frequency of damaged tumor cells. *c*: number of leucocytes in the mouse peritoneal cavity, observed in reference to 2000 tumor cells.

り出現頻度も高くなる。そして盛に変形運動する反応細胞が残存腫瘍細胞を囲み、捕食するような状態が屢々認められる (Fig. 11-12)。更に時間が進むと、腫瘍細胞の崩壊像と考えられる少数の細胞の他はすべて反応細胞となり、特に淋巴球、単球等の活動が盛になる (Fig. 13-14)。またその中に、腫瘍細胞を貪食したと思われる細胞が見られる。

以上のような経過により腫瘍細胞は完全に消滅するが、消滅したと思われる時期に腹腔を開いてみても、大網の部分に通常のシロネズミの場合に見られるような浸潤性の腫瘍は全然認められない。時に、腹間膜の数ヶ所に乳白色の直径2-3耗の腫瘍細胞の塊が附着しているのを認めたが、これらの細胞は小型で正常のものも少なく、やがて崩壊消滅するものと考えられる。移植後、6日目或は7日目になると、腹水は非常に増



Figs. 4-15. Photomicrographs, $\times 660$. 4, tumor cells at the 5th day after mouse transfer, being in a pure culture condition. 5, first appearance of degeneration in tumor cells, showing bright granules and vacuoles in cytoplasm. 6, deforming cells. 7, typical macrophages, at the 6th day after inoculation. 8, tumor cells showing picnotic degeneration and many leucocytes. 9, small-sized survival tumor cells. 10, survival tumor cells in process of degeneration. 11-12, survival tumor cells, together with active leucocytes (macrophages). 13-14, disintegrating tumor cells together with leucocytes. 15, blood cells occurring in the mouse peritoneal cavity, the 7th day after inoculation.

殖した反応細胞のみによつて満たされ、腫瘍細胞は全然認められない (Fig. 15)。

考 察

牧野 (1952b, 1956) 及び Levan & Hauschka (1953) による腹水腫瘍の研究により、腫瘍には、それぞれ、その増殖の主体となる種族細胞の存在することが明かにされている。薬品処理実験において、種族細胞のあるものが抵抗型となつて残存し、再び分裂増殖して腫瘍の再発に与ることが、牧野・田中 (1953a, b), 田中・その他 (1955), 佐々木 (1956) により観察されている。その際の残存細胞は他の大部分の細胞が崩壊しているにもかかわらず、濃染した小型の細胞として残っている。また、牧野・中西 (1955) は、*in vitro* における腫瘍細胞に対する薬品の作用を位相差顕微鏡を用いて生きのまま観察しているが、腫瘍細胞は細胞質の blebbing, budding, vacuolization と核及び染色体の picnotic degeneration により崩壊すると述べている。然るに異種移植された腫瘍細胞は、*in vivo* 及び *in vitro* における薬品処理の時のように烈しい blebbing や budding を示すことなく、徐々に picnotic degeneration をなして崩壊し、最後に屈折率の高い小型の細胞のみが残る。これは、一見、薬品処理の場合と似ているが、この残存細胞も変性顆粒と小空胞を生じてやがて消滅し、動物は完全に治癒する。上記の差は如何なる原因によつて生ずるのか、本質的なことは全く不明であるが、観察の結果から二三の推論を行つてみる。

自然治癒する場合とそうでない場合との差を考えてみると、次のことがいえる。

- 1) 正常累代移植 (自然治癒する場合を除く) と異種移植との差: (1) 正常累代移植の場合には、移植末期に腹水が多量となり腫瘍細胞が腹水中に殆ど見られない状態になつた時にもすでに大網或は腹壁に大きな浸潤性の腫瘤を生じて転移しているが、異種の場合には全然みられない。(2) Fig. 2 に示すように反応細胞の出現頻度が異なる。
- 2) 薬品処理において再発する場合と異種移植との差: (1) 最後に残る少数細胞の形態的な差は殆ど認められない。(2) 薬品処理実験の場合には、やはりすでに浸潤性腫瘤を生じているが、異種の場合にはこれがない。また、宿主を殺すことなく薬品の作用を持続することはなかなか困難であるが、異種の場合には、腫瘍細胞に対し不利な環境を持続しうる。(3) ポドフィリンなどで処理し、腫瘍が再発する場合には、腫瘍細胞の減少と共に反応細胞が異常に増加することはないが、異種移植された腫瘍細胞が消滅する際には反応細胞が異常に増加し、殆ど純培養になる。

Goldie & Felix (1951) 及び外村 (1954) によれば、腹腔中に移植された腹水腫瘍が正常に増殖する場合には、腫瘍細胞の増加につれて、反応細胞が減少することが観察されている。また、Felix & Dalton (1955) はハツカネズミ (DBA/2) の腹水細胞中には macrophages が 30-45% 存在すると述べている。以上のことから、ハツカネズミの腹腔中に移植されたシロネズミの腹水腫瘍細胞は、極限まで増殖すると、他に転移浸潤出来ぬことと、宿主より生じた何等かの免疫的抗体か、或は腫瘍細胞自体が生じた代謝物質か何かによる環境の悪化と、反応細胞、特に macrophages の活動とにより崩壊、消滅するものと考えられる。

要 約

ハツカネズミの腹腔中に異種移植されたシロネズミの腹水腫瘍細胞は、はじめ急激に増殖し、3-4 日目で純培養の状態になるが、5-6 日目に或る極限に達すると、細胞質中に変性顆粒、小空胞を生じて崩壊過程をたどる。この間、ハツカネズミの白血球性反応細胞、特に macrophages の活動が活潑となり、腫瘍細胞は約 15-20 時間の間に急速に減少し、宿主を殺すことなく完全に消滅する。

文 献

- Felix, M. D. & A. J. Dalton 1955. J. Natl. Cancer Inst. 16: 415-445. Goldie, H. & M. D. Felix 1951. Cancer Res. 11: 73-80. Levan, A. & T. H. Hauschka 1953. J. Natl. Cancer

- Inst. **14**: 1-43. **Makino, S.** 1952. *Chromosoma* **4**: 649-674. ———— 1956. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **63**: 818-830. **Makino, S. & Y. Nakanishi** 1955. *Cytologia* **20**: 89-95. **Makino, S. & T. Tanaka** 1953a. *J. Natl. Cancer Inst.* **13**: 1185-1199. ———— & ———— 1953b. *Gann.* **44**: 39-46. **Nakahara, H.** 1952. *Jap. Jour. Genet.* **27**: 25-27. ———— 1955. *Jap. Jour. Genet.* **30**: 71-77. **Tanaka, T. & K. Kanô** 1951. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. IV, Zool.* **10**: 289-301. **Tanaka, T., K. Kanô, A. Tonomura, T. Okada & M. Umetani** 1955. *Gann* **46**: 15-26. **Tonomura, A.** 1954. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* **12**: 158-168. **Sasaki, M.** 1956. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI, Zool.* **12**: 433-441. **Yoshida, T., T. Wakahara & T. Nagata** 1948. *Gann* **39**: 101-103. **Yosida, T. H.** 1952. *Gann.* **43**: 35-43.

Résumé

Phase Microscopy Observations on the Degeneration Process of Rat Ascites Sarcoma Cells after Heteroplastic Transfer into Mice

Yasushi OIYUKI

Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo

The course of the degeneration process of tumor cells of Yoshida sarcoma, MTK-sarcoma II and MTK-IV tumor, after the heteroplastic transplantation into the mouse peritoneal cavity, was studied in the living condition by phase-contrast microscopy using hanging drop preparations made in combination of fluid paraffin. The tumor cells after inoculation in the peritoneal cavity of mice can survive for 5 to 6 days (sometimes 7 days) undergoing a considerable proliferation with the accumulation of the ascites in a remarkable degree. But they then rapidly disappear without killing hosts. The process of degeneration of tumor cells was studied with the samples taken at a 2-hour-interval at the time of disappearance. The tumor cells being in a pure culture condition at the 5th to 6th day after transfer suddenly undergo degeneration: they show remarkable granular bodies and small vacuoles in cytoplasm. Then these cells begin to disintegrate with the irregular transformation of cell-form following the formation of picnotic nuclei. The decrease in number of tumor cells in the peritoneal cavity is followed by the increase of the number of blood cells such as macrophages and lymphocytes. There are still survival small-sized tumor cells in the peritoneal cavity, and meanwhile they are all damaged by phagocytic leucocytes.