Hiroshi NAKAHARA : Transformation of spherical tumor cells of the MTK-sarcomas into unusual amoeboid forms. Jap. Jour. Genet. 30(1955) : 71-77.

生体観察においてみられた MTK- 肉腫細胞の変形運動 (予報)*

中 原 皓**

北海道大学理学部動物学教室

昭和 29 年 6 月 25 日受領

UDC 591.81 : 576.4
616.—006

Résumé

The present author, while studying the course of division of living tumor cells of the MTK-sarcomas of rats by phase microscopy, has met with a remarkable transformation of spherical tumor cells into unusual shapes as seen in leucocytes and fibroblasts. The observations were carried out with the hanging-drop preparations mounted with fresh tumor ascites containing tumor cells at a temperature of 35°C.

The shapes of the tumor cells after transformation at 35°C is characteristic to the strain of the tumor. The tumor cells of the MTK-I showed a leucocyte-like feature in transformation, while those of the MTK-II and -III exhibited the shape of fibroblasts after transformation. By placing the transformed cells at low temperature, they become spherical in shape, but with the rise of temperature they transform again into unusual forms.

The transformed tumor cells are remarkable in containing filamentous mitochondria which show a parallel orientation along marked cytoplasmic flow. It was assumed after considerations that the transformation in shape of the tumor cells might be a phenomenon associated with a certain cellular activity in the course of the growth of the tumor.

腫瘍細胞の形態学的研究はシロネズミ及びハツカネズミにおける腹水腫瘍の発見と利用によつて著しい進歩をした。最近では固定材料による研究と共に、生きた材料を位相差顕微鏡によつて観察する方法 (Makino and Nakahara 1953 a, b) によつて、主として細胞の分裂、増殖及び異常分裂の研究が行われている (Makino and Nakahara 1953 a, Nakahara 1953, Tanaka 1953)。著者は MTK-肉腫の生体観察中、少数の腫瘍細胞が条件が適当と思われるにもかかわらず特異な変形及びアメーバ状の運動を行うことを見出した。又細胞質内の構造についても、興味深い多くの現象が観察された。癌細胞の生理的性質についてなんらかの資料を提供するように考えられるので、現在までに研究した MTK-肉腫の 3 つの系統についての観察結果をこゝにとりまとめて発表する。

稿を草するに当り、終始御懇篤な御指導と御校訂を賜つた牧野佐二郎教授に対し深甚なる感謝の意を表する。また数々の有益な御助言と御援助をいただいた田中達也、加納恭子両氏に対し併せて感謝の意を表する。

材料と方法：研究には腫瘍は MTK-肉腫-I、-II、及び -III の 3 系統を用い、当教室でシロネズミ *Rattus norvegicus* に累代移植を続けているものである。MTK 肉腫-I 及び -II は移植世代 100 代前後、-III は 50 代前後のものである。これら、腫瘍の一般的特性や、その発生については Tanaka

* 文部省科学研究費補助。 ** Zoological Institute, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

and Kanô 1951, 梅谷 1953, によつて報告されている。

観察は Makino and Nakahara 1953 b の方法によつた。即ち、ガラス管を細く伸して作つたピペットで腹水を吸い取り、注意して洗滌されたカバーガラス上にすばやく拡げて、流動パラフィンを満載したくぼみスライド上に伏せる。流動パラフィンは日本製 1 種類、米国製 2 種類使用したが、結果は変りはなかつた。観察温度は顕微鏡加温装置を用いて 35°C に保つて行つた。徐々に温度を降下或は上昇させる場合には、温度計を見ながら加温装置のスイッチを断続する方法をとつた。位相差顕微鏡及び写真撮影については中原 (1952b) と同様である。

観 察

封入した直後には変形した腫瘍細胞は見られない。 35°C に温度を保つて 20~40 分後になると、或る割合で変形した腫瘍細胞が現れる。球形のまゝの腫瘍細胞と、変形する細胞とは封入直後には同様な形態をしているので全く区別がつかない。

変形をする細胞は MTK-I 及び-III では全部静止期の細胞であり、-II では稀に分裂中の細胞にも生ずる。変形する細胞における核の数は 1 個であるが、極めて稀に 2 個のものも見られた。変形運動を行う細胞の腫瘍細胞全体に対する頻度は MTK-I, -II では 10% 内外、-III では約 30 % である。-III の場合の移植後日数による頻度の変化を 1 個体について記録した結果を第 1 表に示す。移植 1 日目に頻度が高く現れているが、この場合には変性した細胞が多いために確実なデータとはいえない。2 日目以後は大きな変化は見られない。変形した細胞の核内における仁の数は大体球形細胞におけるそれと一致するが、-II, -III では変形する細胞で、わずかに数の少ないものが多くなつてゐる。大体標準の大きさと思われる細胞から、それぞれ 200 個以上の細胞について仁の数をしらべ、その割合を第 2 表に示す。MTK-I では変形するもの、球形のもの共に 1~3 個、-II では球形のもの 1~4 個、変形するもの 1~3 個、-III では球形のもの 1~5 個、変形するもの 1~4 個である。

第 1 表 MTK-III における変形細胞の割合の移植後日数による変化

移 植 後 日 数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
全腫瘍細胞 100 に対する変形細胞数 (%)	60	29.5	28	37	27	27	26	21.5	30

第 1~3 図 MTK-I. negative contrast の位相差で撮影, 1200 $\times$. 同一の細胞を追跡したもの。温度は 35°C . 1 は封入後 45 分. 1 を 0' として, 2, 1', 3, 2'30". 矢印は同一の constriction ring を示す。

変形した細胞の形態は MTK-I, -II, -III, それぞれ異つてゐる。MTK-I では球形細胞の一端所から突起が出、その突起の中に元の細胞の内容全部が流入する (第 1~3 図)。このようにして出来た新しい細胞の表面から第 2 次、第 3 次の突起が生じ、次々に細胞の内容が流入する。そのため細胞はかなりの速度で移動する。突起の生ずる間隔の短い場合には細胞全体はいくつかの狭窄部で仕切られ分節状の形態となる。この変形のしくみは De Bruyn (1946) に見られた白血球のアメーバ運動と同様らしく観察された。彼のみたものゝうちで constriction ring と名づけられたものが、こゝに観察された MTK-I の変形細胞の狭窄に相同なものではないかと思われる。MTK-I ではギムザ染

第2表 MTK 肉腫-I,-II 及び-III における球形及び変形細胞の1個の核に含まれている仁の数の分布をそれぞれ百分比で示す

腫瘍		MTK—I		MTK—II		MTK—III	
細胞の型		球形	変形	球形	変形	球形	変形
仁の 数	1	44.0%	41.0	44.0	52.0	25.0	41.4
	2	38.0	36.0	37.0	42.0	36.0	38.4
	3	18.0	23.0	20.0	6.0	29.2	18.2
	4	—	—	3.0	—	6.2	2.0
	5	—	—	—	—	3.1	—

色をした場合にも稀にこのような形態が見られた。

MTK-II では細胞は始め 1~数ヶ所から突起を出して伸び始める。多くの場合最後には2方向に極を有する紡錘形の細胞となる。伸びてしまつてからは、温度を一定にしておけば、ほとんど形をかえない。

MTK-III は-II の場合とやゝ似ているが、細胞は2方向、或はいくつかの方向に突起を出して伸張する（第8, 9図）。細胞は伸びてしまつてから、温度を一定にしても、かなりの速度で形をかえている。-II,-III 共に伸びた細胞質突起の端部はカバーガラスの下面、或は他の細胞の表面に接合している。

第4図 MTK-III の変形した細胞を温度を変えながら追跡したもの。温度が低下するに従い球形に近づく23°C で、完全な球形となる。上段の数字は温度を、下段の数字は経過時間を分で示す。

すべての場合において、35°C 内外で上記のように変形していたものも、温度を低下させると、それに従い細胞は球形に近くなる。約 24°C ではすべての球形のものと、形態的に区別がつかなくなる。このようになったものを再び温度を上げると前に変形した細胞は再び必ず変形を始める（第4図）。

変形した細胞の細胞質内の含有物の状態は、MTK-I,-II,-III, 共にそれぞれの球形の細胞と大体一致している。ミトコンドリアは糸状乃至粒状で、核の凹陷部、（おそらく中心体の位置）に向つて放射状に配列している。これは球形の細胞でも変形したものでも同様であるが、変形したものはミトコンドリアはかなり糸状に長く、又その方向性も顕著である。ミトコンドリアはブラウン運動のため、写真には明瞭に現れていない。

MTK-III ではしばしば屈折の強い脂肪顆粒（Sudan III で生体染色されるもの）が現れる。これは数個~10 数個のものが、ブドー状に集合する傾向がある。球形の細胞にも、変形した細胞にも同様にみられる。球形の細胞では細胞の周辺部に、変形した細胞では細胞質突起の先端に近く位置する傾向がある。第9図にはこの顆粒がよく現われている。-I,-II でもこの顆粒は出現するが、-III より少く、ブドー状に集合することは全くない。

核の陥凹部は恐らく中心体の位置する部分と思われるが、その中央部は透明で顆粒は少い。その周辺を取巻くようにして比較的多くの顆粒と空胞が存在する。この部分の顆粒は前記の脂肪顆粒に比べればはるかに屈折が小さく、すべての細胞（球形と変形を含めて）に現れてくる。MTK-III では細胞によつて顆粒及び空胞の量に変異が多く、しばしば非常に大きな部分をしめ、時に空胞がブドウ状に集合している。これは球形のものでも変形のものでも同様である。MTK-II における変形し伸張した細胞で見たところでは、この顆粒は普通小さな球形であるが、それが時々1個ずつ三日月形に変り、その後消失する（第7図）。この時新しい空胞が形成されているように見える。この顆粒はメチレンブルー、或はトルイジンブルーによつてメタクロマジーを起す顆粒（外村、未発表）に相当するものであつて、空胞はいわゆる中性赤空胞に当るものと考えられる。

第 5, 6 図 MTK-III における原形質流動の位置と方向を矢印で示す。5 は球形細胞, 6 は変形した細胞。

の周辺に向つて放射状に流動のコースがある。この現象は MTK-I, -II, III, に共通であつて、コースの追跡は微細な粒子の動きを見ることによつて行うことが出来る（第 5, 6 図）。糸状のミトコンドリアはこのコースの方向に平行に配列している。ミトコンドリアは常にブラウン運動を行つていながらも、原形質と共に流動することはほとんどない。変形した細胞においては、-I では細胞のアメーバ状運動がはげしく、観察は困難であつた。

-II, -III では球形細胞の場合と全く同様で、中心体と思われる部分を中心とした、放射状の流れがみられる。原形質突起がかなり細長く伸びたものでも、その先端部まで原形質流動が到達するのが明瞭にみとめられる。この場合必ず方向性を持つた、ミトコンドリアが突起の中にまで配列している。伸張した細胞ではミトコンドリアの方向性が、著明になると同時に、原形質流動もかなり速くなつていようである。

考 察

Ludford (1951) によれば Mouse sarcoma 37 の細胞は血清中では球形を呈するが、凝固血漿中では細胞質の突起を有する fibroblast 状の形態に変るといふ。こゝにのべた観察結果もこれに似た現象であるが、変形する細胞は全体の小部分にすぎず、しかも自然の媒液である腹水中において、変形を起している点は Ludford の場合と異なるところである。

第 7~9 図 いずれも negative contrast の位相差で撮影。1200×。7. MTK 肉腫-II の変形細胞。封入後 139 分, 35°C。矢印は空胞を作りつゝあるメタクロマジー性顆粒。8. MTK-III, 封入後 235 分, 35°C。1 個の伸張した細胞と 2 個の球形細胞。9. MTK-III。封入後 90 分, 35°C。脂肪顆粒が著明。

上にのべたように、3系統の腹水肉腫において、それぞれ、異つた形の変形が異つた割合でみられる。即ち、MTK-I では De Bruyn (1946) のみた白血球の場合と同様な変化がみられ、MTK-II 及び -III では（両者の間にかかなりの差異がみられるが）、Lewis (1951) 其他の人々により観察されている fibroblast にみられるものとよく似ている。これらの変形した細胞が、腫瘍細胞そのものであることは前述の如く系統によつて一定した。又異つた系統では異なる形態をもつた3様の型が現れることゝ、また後にのべるように細胞質内の構造がそれぞれの系統における球形の細胞のもつ特徴をそのまま備えていることなどによつて明らかなることである。

このように腫瘍細胞にみる変形状態が腫瘍の系統によつて一定の型を示している事實は、それらの腫瘍が夫々に特徴ある腫瘍細胞の種族 (stem line of tumor cells) をもっている事實 (Makino 1952 a, b, Makino and Kanô 1953) を指示するものである。変形細胞にみられる系統による形態的差異は、あたかも個体における遺伝形質の如く、それぞれの stem cell の本質的な差異によつてもたらされたものと考えてもよいと思う。これらの変形した細胞が fibroblast や白血球の形態に似ているからといって、それぞれの腫瘍細胞がそれらの組織細胞に起源すると断定することはもちろん出来ない。

こゝで、この変形した細胞は、腫瘍細胞がもはや変性におち入る場合の一つの形態であるのか、或はまた活潑に増殖する過程の中に含まれる一つの過渡的な形態であるものか、は議論の起るところである。以下述べるいくつかの理由によつて、後者が正しいと判断したい。

Lewis (1951) は fibroblast の組織培養による観察において、偽足のある細胞が分裂に入る場合、偽足を引きこめて球形となり、分裂が終了すると再び偽足を出すのを見ている。Lewis は細胞が球形になるのは粘性度の低下によるものと考えた。今回の観察の場合、分裂時にある細胞で変形しているものは全くないか、或は極めて稀である。Lewis の如く変形している細胞が球形にもどつて分裂をはじめた例はまだ見ていないが、これは観察出来る時間の長さから考えて、たとえあつてもその機会をとらえるのは容易ではないと思われる。従つて分裂する細胞が変形細胞の中に見当らないからといって、その細胞がもはや増殖能を失つているとは考えたくない。変形した細胞が何かの刺激で容易に球形の細胞にもどることは、温度を低下させると球形の細胞と区別のつかない形態にもどること、又封入の直後や、固定染色した場合にはほとんどすべて球形細胞であることを見ても容易に考えられる。35°C の室内で封入操作を全部行つても始めは球形細胞ばかりであるところから、細胞の流動や機械的ショックでも球形化するかも知れない。恐らくは生体の腹水中では球形で、組織内に入つた場合に變形し、游走するのではないかとと思われる。

変形した細胞では MTK-II, -III に見られたように、原形質流動が球形のものに比べむしろ活潑である。それと共にミトコンドリアも球形のものに比べ長く伸張り原形質流動の方向に平行に並んでいる。岡田 (1953) は MTK-I においてヤース緑顆粒は大体粒状であると報告しているが、これは生体染色時における球形の細胞での観察と思われる。岡田は又これが細胞の代謝活動において有意義な役割をもつと考えている。ミトコンドリアの配列について、Pollister (1941) は細胞質蛋白分子の配列に従うと考え、その方向は細胞質内における拡散のコースを示すものとした。

Lewis (1951) は細胞における粘性度の傾斜と、原形質の流れによつてミトコンドリアは方向づけられると考えた。一方 Hughes (1952) は静止期の細胞におけるミトコンドリアの動きは、細胞質の流動に従属しているものではないと考えている。著者 (Nakahara 1952 a) はバッタの精母細胞で分裂後期におけるミトコンドリアの動きは細胞質の影響を受けていないことを結論した。さらに辻田 (1948) はカイコの腺細胞において、その分泌はミトコンドリアの直接の働きであると考えた。以上のようなミトコンドリアの細胞内の動きを考えるならば、変形細胞にみられる長く伸びたミトコンド

リアが顕著な方向性をもつこと、明瞭な原形質流動をともなっていることなどから細胞は極めて活潑な代謝活動を行っていると考えてもよいと思われる。そうして、現に生活しつつある細胞であることは疑いない。

中心体の周囲を取りまくようにして多くのメタクロマジー性の顆粒と若干の空胞が存在することは今回見たすべての腹水腫瘍細胞に発見され、変形した細胞においても同様であつた。これは Lasfargues and Di Fine (1950) が fibroblast において azure B 生体染色により golgi zone として検出したものにその位置形態が同様である。又岡田 (1953) の中性赤顆粒もほぼこの部分に位置している。メタクロマジーの現象は多糖類硫酸化合物の存在によることが多くの研究によつて明らかにされている。西田・佐野 (1953) は ヤマベの chloride cell においてメタクロマジー物質はゴルジ物質であるとしている。なお Schrader and Leuchtenberger (1951) は半翅類の一種でその精子形成過程におけるすべての時期の細胞においてゴルジ体に多糖類を検出している。腹水腫瘍のゴルジ体はまだ明瞭に検出されていないが、メタクロマジー顆粒はその位置から考えても、又上にのべた一連の研究結果から、少くともゴルジ体となんらかの関係にあるものと思われる。今回観察された MTK-II の変形した細胞において、メタクロマジー顆粒が空胞に変化する如き活動が見られたが、このことはこうした細胞においてメタクロマジー顆粒がかなり活潑な生理的活動を行つてゐることを示すものである。これが変形した腫瘍細胞によく観察されたことは、変形細胞におけるさかんな代謝活動を暗示するものと思われる。腫瘍におけるメタクロマジー顆粒、及び空胞の本質、ならびに、そのゴルジ体との関係については将来に残された興味深い問題である。

要 約

腹水肉腫 MTK-I, -II, -III の3系統の腫瘍細胞を生体観察している間に、球状をした腫瘍細胞のあるものがその本来の球状の形を変えてアメーバ状の運動を行うことが発見された。この腫瘍細胞の変形は MTK-I では白血球状、-II 及び -III ではその間にいくらかの相異があるが、fibroblast 状に変形する。

変形した細胞は温度を低下させるともとの球形にもどり、温度を上げると再び形を変え始める。

変形した腫瘍細胞におけるミトコンドリアは細長い糸状をなし、球形の腫瘍細胞に比べ顕著な方向性を有し、原形質流動も活潑に行われている。又メタクロマジー性の顆粒及び空胞は球形の細胞におけると同様に存在する。

これらの変形する腫瘍細胞は、退化変性の運命にある細胞ではなくして、増殖過程にある腫瘍細胞が静止期において何かの原因で現わす、ある種の過渡的な形態ではないかと考える。

文 献

- 1) De Bruyn, P.P.H. 1946. Anat. Rec. 95 : 177—191.
- 2) Hughes, A.F. 1952. Mitotic cycle. New York.
- 3) Lasfargues, E. and Di Fine, J. 1950. Anat. Rec. 106 : 29—35.
- 4) Lewis, W.H. 1951. Ann. New York Acad. Sci. 51 : 1287—1294.
- 5) Ludford, R.J. 1951. Cytology and Cell Physiology, 2nd edition : 373—418. Oxford.
- 6) Makino, S. 1952 a. Gann 43 : 17—34.
- 7) ——— 1952 b. Chromosoma 4 : 649—674.
- 8) Makino, S. and Kanô, K. 1953. Jour. Nat. Cancer Inst. 13 : 1213—1235.
- 9) Makino, S. und Nakahara, H. 1953 a. Zeitschr. f. Krebsforsch. 59 : 298—309.
- 10) ——— and ——— 1953 b. Cytologia 18 : 128—132.

- 11) Nakahara, H. 1952a. *Cytologia* 17 : 168—178.
- 12) ————1952b. 染色体 14—15 : 570—574.
- 13) ———— 1953. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI. Zool.* 11 : 473—480.
- 14) 西田秀夫・佐野誠三 1953. *科学* 23 : 584—585.
- 15) 岡田正 1953. *動維* 62 : 404—410.
- 16) Pollister, A.W. 1941. *Physiol. Zool.* 14 : 268—280.
- 17) Schrader, F. and Leuchtenberger, C. 1951. *Chromosoma* 4 : 404—428.
- 18) Tanaka, T. 1953. *Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. VI. Zool.* 11 : 509—514.
- 19) Tanaka, T. and Kanô, K. 1951. *Ibid.* 10 : 289—301.
- 20) 辻田光雄 1948. *蚕試報告* 12 : 649—666.
- 21) 梅谷実 1953. *動維* 62 : 416—420.