Susumu TAKAYAMA: Existence of a stem-cell lineage in an infectious venereal tumor of the dog. Jap. Jour. Genet. 33 (1958): 56~64

犬外陰部腫瘍の染色体研究*

高山 獎

北海道大学理学部動物学教室

昭和33年2月1日受領

UDC: 576.312:591.2.006

Résumé

Recent investigations with rat ascites tumors have revealed the occurrence of a stem-lineage(or -lineages)of tumor cells which are primary contributors to the neoplastic growth, and maintain the genetic pattern of each tumor. The stem-cells are generally characterized by a very pronounced constancy with specific chromosome-number mode and by a particular ideogram which is persistent through from cell to cell by the regular mitotic behavior of the chromosomes during serial transfers. The present paper is to report the data which strongly support the stem-cell concept, by finding in the venereal tumor of a dog the existence of a population of tumor cells that are characterized by a high frequency of occurrence, and by a particular chromosome pattern.

The chromosomes were observed in tumor cells occurring in the body fluid from the surface of the venereal tumor of a female dog with the water-pretreatment and acetic dahlia squash technique.

Out of 146 tumor cells under study the cells containing 60 chromosomes were found at the highest frequency (32%), though frequent variations fall between 57 and 61. The ideogram of the most frequent tumor cells is characterized by the constant existence of 14 V- or J-shaped chromosomes and 46 rod-shaped ones (Figs. 11-16). It is then apparent that the most frequently occurring tumor cells which possess characteristic chromosome-number mode along with a particular ideogram from a stem-cell lineage, the members of which serve as the primary progenitors of this tumor.

The normal somatic chromosomes of the dog were investigated in cells from the lung culture according to the roller tube method. The somatic complement comprises 77 rod-shaped elements and a large V-shaped one, the X-element (Fig. 17). The difference of the chromosome pattern is thus strikingly remarkable between the somatic cell of the dog and the stem-cell of the venereal tumor studied here.

It is interesting to note that the chromosomes of the present tumor show a considerable difference, either in number or in morphology, from those of the dog venereal tumor of similar nature which was studied by Watanabe and Azuma (1956) in Nagasaki.

犬の伝染性外陰部腫瘍については、既に前世紀末に Smith, G. B. and Washbourn, J. W. (1898) の報告があり、本邦においても山極が1908年にその存在を報し、それ以来いくつかの研究がなされて来た。最近 Watanabe (1956) は、初めてその染色体研究を行つて核型を分析

し、更に染色体数の頻度の一つの頂点を発見し、シロネズミの腹水癌において Makino(1951b, 1952a, b), Makino & Tanaka (1953a, b), Levan & Hauschka (1952, 1953), Makino & Kanô (1953, 1955), Makino & Tonomura (1955), Makino (1956, 1957) が明らかにした種族細胞の概念 (Stem-cell theory) を以つて、この伝搬性外陰部腫瘍に於ける種族細胞の存在を暗示するに至つた。

Fig. 1. External view of the venereal tumor of a female dog.

Fig. 2. Parenchyma cells of the tumor locating under the vaginal mucosa and connective tissue. $\times 500$.

Figs. 3-5. Metaphase plate of tumor cells showing 14 V- and J-shaped elements.

Fig. 6. Metaphase plate of a cell from lung culture of a normal young male dog. $\times 200$.

著者は 1956 年末以来、自宅の飼犬に上記の研究者等が報告しているものと、臨床上同一と思われる外陰部腫瘍を発見し、主としてその染色体研究を行い、渡辺と若干の異なる結果を得た。更に対照として組織培養により、犬の正常肺組織の分裂細胞からその染色体を調べて、腫瘍との間に比較を行つた。その結果をここに報告する。

稿を草するに当り、終始御懇切なる御教示を賜つた牧野佐二郎教授に深甚なる謝意を捧げる。また種々の御指導を頂いた田中達也講師、加納恭子氏、佐々木本道氏に、更に組織培養にあつて直接の御世話を下さつた堀浩氏に厚く御礼申し上げる。

材 料 及 び 方 法

材料：雌の雑種犬。腫瘍発見当時 4 才 10 ヶ月で 4 回の出産経験を有し、更に 5 回目は外陰部腫瘍の発病中にあつた。出産した 10 頭の仔犬が正常であつたことから、この腫瘍は外部生殖器のみに限定されていることが察知される。腫瘍は腔口にあつて最初クルミ大、赤色顆粒状の組織塊であつたが、次第に増大し、約 10 ヶ月後の現在、直径約 7 cm の腫瘍瘤となつて腔口から突出している。形状不規則で多くの肉襞、出血竈を有し、その間隙及び表面には常に乳白色の分泌液が、若干の血液と混入して落溜している（第 1 図）。この分泌液中に多数の腫瘍細胞、中性白血球、リンパ球等が混在するが、各々の割合は一定せず、殆んど 100% に近い腫瘍細胞を見る場合もあれば、然らざることもある。染色体観察はこの分泌液中に浮遊している細胞において行つた。観察方法は、染色体には主として水処理ダーリア法によつた。即ち、腫瘍瘤の表面及び組織襞の中に落溜している分泌液をピペットで吸入して時計皿にとり、これに約 2 倍量の蒸留水を加え、約 30 分そのままに放置し、その適量をスライドグラスに移して等量のアセテックダーリアを加え、12 分放置して固定染色し、拇指で強圧して染色体を分散させ、カバーの周囲をバルサムパラフィンで封ずる。

分泌液中の細胞観察はギムザ染色による塗抹標本で行つた。腫瘍の組織学的調査には、腫瘍塊の表面から小片を切取り、10% のフォルマリン又はスーザ液で固定し、ヘマトキシリン・エオジンで染色したパラフィン薄片標本を使用した。

正常体細胞は組織培養法によつて観察して。生後約 2 週間の雄犬の肺組織を、カバースリップ上でプラズマクロット（鶏プラズマ及び等量の 50% 鶏胚浸出液）中に植え、50% 鶏胚浸出液、馬血清、タイロード氏液を 1:2:2 に混合した培養液 2 ml を用い、普通のローラーチューブ法（37°C、チューブ回転数毎時 15 回）で培養した。3 日及至 4 日後、成長帯を削離し、水処理、ダーリア染色、押つぶし標本を作り、観察に供した。

観 察 結 果

1) 腫 瘍 細 胞

細胞分裂：分裂頻度は分泌液を採取した腫瘍表面の部位によつて、または時期によつてかなりの差違が見られた。5 枚の位置的、あるいは時間的に異なる標本に於て、腫瘍細胞 2000 を計つて得た結果は第 1 表の如くである。即ち分裂頻度は 0.7% から 2.35% まで変化し、平均値は 1.35% である。分裂の時期的に見ると概して前期が最も多く、次いで中期、終期、後期の順となり、前期、中期に比して後期、終期はかなり少い。異常分裂はそれほど顕著ではなく、多極分裂や染色体粘着が見られたに過ぎない。

Table 1. Number and frequency of mitotic cells from 2000 tumor cells observed in five samplings.

Stage	Sampling				
	A	B	C	D	E
Prophase	23	11	17	8	4
Meta.	22	18	14	5	10
Ana.	1	0	1	0	0
Telo.	1	1	0	0	1
Total	47	20	32	13	15
%	2.35	1.5	1.6	0.65	0.75

染色体数：染色体数の決定は分散状態良好の中期核板 146 箇を選んで行つた。染色体数は 53 から 70 までの範囲の変化を示している。第 2 表に見られる如く、53 の染色体を持つ細胞 2 箇から、染色体数 60 をもつ細胞が 47（最高）に達し、62 以上をもつ細胞数は急激に減少する。染色体数 60 を有する細胞の頻度は、観察した全中期核板の 32% にあたり、その前後の細胞数の頻度（染色体数 59 で 12.3%，61 で 19.2%）に比して比較的明確な頂点を示して

Table 2. Variation of chromosome numbers and frequency distribution in the venereal tumor here observed.

Chromosome numbers	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	70	91	116	118
Number of cells observed	2	3	5	2	13	15	18	47	28	4	1	2	1	1	1	1	1	1

いる（第 18 図）。この他に 91, 116, 118 の染色体を持つ細胞 3 箇を観察した。この中、後者の 2 例は凡そ基本数の 2 倍にあたる。かかる染色体数の高い細胞は他にも発見されたが、染色体の固定不良で正確な数の決定には至らなかつた。腫瘍細胞の基本染色体数 60 は、養内 (1928) 牧野 (1949) が正常の生殖細胞で見た染色体数 78 よりも 18 箇少ない。

染色体の形態：特に明瞭な中期核板 22 箇のスケッチによつて核型を調べた。染色体の長さはその収縮の度合（細胞の時期、染色の条件）により各核板毎にかなりの変化がある。第 7-9, 11-16 図に示す如く特に特徴的な V 又は J 形の染色体がどの中期核板にも必ず 14 箇見られ、残りの 46 箇の染色体は棒状か又は非常に棒状に近い J 形の染色体である¹⁾。但し極く小型の染色体の形態は正確には判定し難いのでこのグループに入れた。V, J 形のグループの染色体をその長さの順に配列すると、最初の 2 個が J 形染色体で、3, 4 番目はその両腕が殆んど同長の 1 対の V 形染色体である。5 番目以下は染色体の収縮の度合により明確には序列を決定し得なかつた。同一核板においては、最長の染色体は最小のもの約 7 倍にあたる。

2) 正常培養細胞

3 日及至 4 日間培養した正常肺組織の成長帯にはかなりの分裂像が見られた。その染色体を観察したが、腫瘍の分泌液中に遊離している腫瘍細胞と異り、染色体の展開分散が不良である

1) 第 15 図に於いては、この特徴的な V 又は J 形の染色体が 13 箇で 1 箇不足しているが、これは恐らく染色体のほぐれが不十分な為に棒状のグループに混入しているものと思われる。同じようなケースはネズミやハツカネズミの場合にも少くない。現在のテクニックではさけ難い弱点である。

Figs. 7-9. Drawings of metaphase plates of tumor cells. $\times 1800$.

Fig. 7. Showing 61 chromosomes with 14 V- and J-shaped elements.

Fig. 8, 9. Showing 60 chromosomes with 14 V- and J-shaped elements.

Fig. 10. Metaphase plate of a cell from lung culture of a normal young male dog. $\times 1800$.

Figs. 11-16. Stem-cell ideograms of the venereal tumor.

Figs. 11, 13, 14. Showing 60 chromosomes with 14 V- and J-elements.

Figs. 12, 16. Showing 61 chromosomes with 14 V- and J-elements.

Fig. 15. Showing 62 chromosomes with 13 V- and J-elements.

Fig. 17. Ideogram of a cell from the lung culture of a normal male dog, showing 78 chromosomes consisting young of one V- and 77 rod-shaped elements.

上に、長さに於いても腫瘍細胞より小型であるため、観察はかなり困難であつた。比較的明瞭な中期核板数例の中から最良の 1 例を選んで染色体数とその形態の観察に供した（第 6, 10, 17 図）。

染色体数は 78 箇、38 対の相同染色体と 2 箇の不对染色体から成つている。その形態を見ると、ただ 1 箇の V 型染色体の他はすべて棒状か、それに非常に近い形態を有する染色体で（J 形？）あつた。この両腕の長さが若干異なる V 型染色体は 78 箇の中、最大である。一方これと共にやはり対をなさない最小の棒状染色体が見られた。養内（1928）、牧野（1949）の結果に照してそれ等の 2 箇は性染色体と考えられ、前者が X 染色体、後者が Y 染色体と思われる。棒状染色体中最大の 1 対は他の棒状染色体に比してかなり大型で、X 染色体と大差がない（第 17 図）。

考 察

犬の伝搬性、又は転移植性外陰部腫瘍に関しては 1898 年以来多くの研究報告があるが、その病理学的名称は研究者により種々異論があるようである。即ち Smith & Washbourn(1898)、今牧（1932）、Bloom, Paff & Noback（1951）、渡辺（1953, 54, 55, 56）等はこれを円形細胞肉腫と報じ、Wade,（1908）は蜂窩状肉腫、又 Crile & Beebe（1908）はリンパ肉腫と記載している。しかしながら斯く種々の名称を以つて呼ばれる該腫瘍は、原発が殆んどすべて雌雄両性の外陰部である事、転移が近接のリンパ系を除き殆んど起らぬ事、移植又は交尾による伝搬が可能である事等、臨床上幾つかの特異な共通点を持つている。著者の観察した例もまた以上の症状と大体一致している。それはヘマトキシリン・エオジン染色標本による組織学的観察に於いてもいえるところで、第 2 図に示す如く腔粘膜と結合組織の下に、腫瘍実質細胞が不規則な排列を以つて充実し、所々に結締組織、毛細管の介在するのが見られる。それ故著者がここに報告した例は、上記の研究者達が対称とした腫瘍と同一もしくは極く類似せるものとみなし得ると思われる。

しかしながら、その染色体について渡辺（1956）が長崎で得た結果と比較すると、そこに若干の差違が見出される。渡辺の場合は、染色体数 54 の細胞が最高頻度を示しているのに対し、著者の例では、60 箇の染色体数を有する細胞が全観察例 146 の 32% を占め、最高値を示している（第 18 図）。また染色体の形態についてみれば、渡辺（1956）が観察した長崎の例では V 形染色体が 2 乃至 4 箇で、J 形染色体は見られていないが、著者の観察した腫瘍においては常に少なくとも 14 箇の特徴的な V 及び J 形染類体が存在した（第 7-9, 11-16 図）。この様に全く同一でないにしても類似の性状をもつ腫瘍の細胞が異つた染色体構成を持つている事は、これを細胞遺伝学的に考察する時、細胞の腫瘍化に関して甚だ重要、且つ多岐に展開し得る問題を内含しているものと考えられる。

一方、組織培養によつて観察した正常細胞の染色体の結果は、染色体数 78、唯 1 箇の V 型染色体の他は、すべて棒状、またはそれに甚だ近い形態の染色体であり、養内（1928）、牧野（1949）、及び Hsu & Pomerat（1953）の報告と殆んど一致している。

これを腫瘍細胞の染色体構成と比較してみると著しい相違が見られる。即ち、腫瘍細胞では、その基本数は 60 であつて正常細胞より 18 箇減少している。形態的に見ると、正常細胞では V 形のものは X 染色体唯 1 箇であるのに対し、腫瘍細胞に於いては、少なくとも 14 箇の顕著な V 及び J 形の染色体が出現している。このように腫瘍細胞に、母体では存在しなかつた V 形及び J 形染色体が出現することは、例えば MTK 腹水肉腫 I・II、吉田腹水肉腫等各

Fig. 18. Diagram showing the variation of chromosome numbers and the frequency distribution in tumor cells from the dog venereal tumor.

種のシロネズミ腹水肉腫 (Makino 1957) にみられる如く、腫瘍細胞にはむしろ普通の現象であるが、この腫瘍にみられるように、染色体数が母体のそれより甚だしく減少して基本数を作っていることは新しい現象である。観察した中期核板中、染色体数 61 を有するものもまた、特徴的な V・J 形染色体の数には変化がなく 14 箇認められたので、この 1 箇の差は恐らく微小な染色体の出現によると推定される。

牧野 (1957) は各種のシロネズミ腹水腫瘍の研究から、腫瘍の種族細胞説 (stem-cell theory) をたて、且つ実験的に種族細胞 (stem-cells) の存在を証明した。この説によれば腫瘍の増殖、転移及び伝搬は、その腫瘍を構成している特有な腫瘍細胞の分裂、増殖によるものである。その腫瘍細胞は染色体数、染色体形態は体細胞とは異つた特有なもので、その核型の一定性は、正規の細胞分裂によつて、変化することなく保持される。かかる細胞がその腫瘍の種族細胞 (stem-cells) で、その分裂増殖によつて腫瘍の成長、転移及び伝搬が行われる。ここに報告した犬外陰部腫瘍に於いても、上記の如く 14 箇の特徴的な V 形及び J 形染色体を含む 60 箇の染色体をもつた細胞群が、観察した全細胞の 32% という比較的高い頻度を以つて出現していることから、かかる染色体構成をもつた細胞がこの外陰部腫瘍の増殖伝搬をつかさどる種族細胞であると考えられる。更に長崎に於いて渡辺 (1956) が観察した例では、臨床的には著者の観察したものと殆んど同一で染色体構成は異つているが、やはり一定の核型をもつた腫瘍が存在する。

興味あることは著者の観察した北海道の 1 例と、渡辺 (1956) のみた長崎の 1 例とが、同じ性状の腫瘍でありながらその種族細胞の染色体型が異なるという点である。これはシロネズミの腹水系腫瘍において牧野 (1957) が観察している一連の研究結果と同断の現象であつて、腫

瘍の細胞遺伝学上注目すべき点で、種族細胞説が腫瘍一般に適合する事を示す事実であるといえよう。

摘 要

1) 1頭の雌犬に発生した伝搬性外陰部腫瘍の細胞学的研究、特に染色体研究を行い、正常細胞の染色体と比較した。

2) 腫瘍の表面にたまつている分泌液中に遊離している腫瘍細胞に於いて染色体を観察した。観察した146箇の細胞のうち、染色体数60の細胞が32%で最高値を占め、分析し得た殆んどすべての核板で、14箇の特徴的なV及びJ形染色体が認められた。シロネズミにおける既往の研究結果に照し、かかる染色体構成を有する細胞がこの腫瘍の種族細胞(stem-cells)と推定される。

3) 組織培養による雄犬の正常肺組織の細胞では78箇の染色体が観察された。そのうち1箇はV形染色体(X染色体)で、他はすべて棒状か、それに非常に近い形態を有する染色体であつた。腫瘍細胞と正常細胞との間には、染色体構成に上記の如き顕著な差違が認められた。

4) 渡辺(1956)が長崎に於いて同様な犬の外陰部腫瘍に於いて染色体を観察しているが、著者のみた結果と比較し、染色体数においても形態においても著しい相違が発見された。同様な腫瘍が染色体構成を全く異にする種族細胞によつて構成されていることは、シロネズミにおいて発見されている同様な現象を強く支持するもので、種族細胞の説を裏付ける結果である。

参 考 文 献

(ここに記入されない文献は Makino (1957) 参照)

- Bloom, F., G. H. Paff and C. R. Noback, 1951 The transmissible venereal tumor of the dogs. Studies indicating that tumor cells are mature end cells of reticulus-endothelial origin. *Am. J. Path.* 27: 119
- Crile, G. W., and S. Beebe 1908. Transfusion of blood in the transplantable lymphosarcoma of dogs. *J. Med. Res.* 18: 386-405.
- Hsu, T. C., and Pomerat, C. M. 1953. Mammalian chromosomes in vitro II, A method for spreading the chromatosomes of cells in tissue culture. *Jour. Heredity.* 44: 23-29.
- Imamaki, K. 1932. Über vergleichende Pathologie der Hundegeschwülste (3. Mitteilung). Ein Beitrag zur Kenntnis der transplantablen Rundzellen-sarkoma bei Hunden. *Gann* 26: 29-333.
- Makino, S. 1957. The chromosome cytology of the ascites tumors of rats, with special reference to the concept of the stemline cell. *Intern. Review of Cytology.* 6: 25-84.
- Minouchi, O. 1928. The spermatogenesis of the dog, with special reference to meiosis. *Jap. Jour. Zool.* 1
- Smith, G. B. & J. W. Washbourn, 1898. Infective venereal tumor in dogs. *Path. & Bact.* 5: 99-110.
- Watanabe, F. & Azuma, M. 1956. Cytological confirmation of fluid infection in the venereal tumor of dogs. *Gann* 47: 23-35.
- Watanabe, F., T. Hosaka, & M. Azuma 1955. Study of the clinically so-called infectious venereal sarcoma of dogs. III. Chromosomes of free sarcoma cells on the secretion

from the venereal sarcoma of dogs, with particular regard to aqueous infection by transmission of free tumor cells. *Gann* 46:404-406.

Watanabe, F., and K. Hata, 1953. Study of the clinically socalled infectious venereal sarcoma of dogs. I. Tumor cells in the secretion from the ulcerated surface of the venereal tumors. *Gann*. 44: 189-191.

Watanabe, F., and K. Urano, 1954. Study of the clinically socalled infectious venereal sarcoma of dogs. II. Histological observation of venereal tumors of dogs. *Gann* 45: 331-333.

Wade, H. 1908. An experimental investigation of infective sarcoma of the dog, with a consideration of its relationship to cancer *Journ. Path. Bact.* 12: 384

山極勝三郎, 1908. 移植シ得ベキ犬ノ腔腫瘍, 癌 3: 475-477.