ヒト歯肉由来悪性黒色腫培養細胞に関する実験的研究

田川 俊郎

Experimental studies on cultured cells of malignant melanoma in human gingiva

Toshirou TAGAWA

I. 緒 言

ヒト悪性腫瘍の組織培養の試みは、古くは Carrel, Burrow (1911)¹⁾の線維軟骨腫に始まるといわれているが、Gey ら (1952)²⁾の HeLa 細胞株の確立が今日のヒト悪性腫瘍培養法を急速に進展させた。

その後、培養技術、器材、抗生物質、培養液等の進歩改良に伴い、1960年頃から組織培養法は着実に発展している。

悪性腫瘍の組織培養は、腫瘍細胞分化の研究、放射線治療、各種薬剤の開発、腫瘍ウィルスをはじめとする原因の追求、臨床腫瘍免疫の分野など、細胞レベルでの腫瘍研究のあらゆる領域に利用されている。

特に一定の増殖を維持する細胞株の樹立は、*in vitro*での再現性のある実験資料を随時提供する点で意義深い。しかし株化に至るまでの経過は長く、種々の要因によりかなりの困難を伴うことが多い。なかでもヒト悪性腫瘍の培養、株化は難しいとされている³⁾。

このように組織培養は、きわめて有用な研究方法であるが、培養条件が *in vivo* と異なるために、細胞の機能や状態が必ずしも *in vivo* の状況を再現しているとはいえない。この欠点を解決する手段として、生体内培養があり、同種の細胞についてはよく用いられている。しかしこの方法では、ヒト由来 *in vitro* 系細胞または臨床材料に応用するのは不可能かあるいは各種の前処置を必要とする。

ヌードマウスは Flanagan (1966)⁴⁾が発見し、Pantelouris (1968)⁵⁾により胸腺の欠損が指摘された突然変異種で、この免疫不全状態が種々の研究に用いられている。なかでも Rygaard と Povlsen (1969)⁶⁾が最初にヒト癌の移植に成功して以来、幅広く利用されている。

以上述べてきたごとく、目的とする腫瘍細胞を *in vitro*

あるいは *in vivo* で株化させ得るならば、多くの知見をもたらすと考えられる。

悪性黒色腫よりの細胞培養は、古くは Takano (1929)⁷⁾によって試みられている。またその臨床所見から本腫瘍の細胞培養は、容易であろうと考えられているが、以後多くの研究者が各種の培養法を応用して細胞学的側面をとらえているにもかかわらず、これらの多くは、一時的初代培養で短期間の観察に止まり、継代系培養細胞株として報告され、かつ *in vitro*→*in vivo* の各種実験に応用されている例は少ない。

一方口腔領域由来黒色腫の細胞培養については、Brown (1968)⁸⁾が最初に報告し、結城⁹⁾らの報告もあるが、いずれも10世代内外あるいは初代培養細胞に関するもののみで、株化されるに至っていない。

著者はすでに、上顎前歯部歯肉原発の黒色腫症例で、転移が確認された胸水中細胞の初期培養所見について報告した¹⁰⁾。その後株化を試み、現在まで、初代培養以後2年半経過し、継代数は130代を越え株化樹立したと判定した。さらに前述の観点からヌードマウスへの移植および形成された腫瘍、腹水からの細胞培養、累代移植などを行いヒト歯肉由来悪性黒色腫の *in vitro*→*in vivo* 実験系の確立を図った。

II. 実験材料ならびに実験方法

第1項 細胞培養

(1) 培養材料

すでに報告した¹⁰⁾59歳男性で、左側上顎前歯部に原発巣を有する悪性黒色腫末期患者の胸水から採取した細胞を培養材料とした。対照として59歳男性で、下顎骨折症例に肋骨骨折を合併し、胸水貯溜が観察された例、および55歳女性で乳癌末期に胸水貯溜をきたしたそれぞれの胸水を採取し、黒色腫症例と同様の方法で培養を行った。

(2) 培養液

Eagle's MEM (阪大微研, Penicillin G 100 Unit, 硫酸 Streptomycin 100 mg/l 含有) および RPMI 1640 (GIBCO 社) に牛胎児血清 (GIBCO 社) を20%の割

三重大学医学部口腔外科学教室 (主任: 村田睦男教授)

Department of Oral Surgery, School of Medicine, Mie University (Chief: Prof. Mutsuo Murata)

受付日: 昭和56年2月16日

合に含有させ pH 7.3~7.5 に調整して使用した。

(3) 培養法

本実験はすべて閉鎖系で行い、電気孵卵器（白井松社製）37°C±0.5°C 中で保温した。培養角瓶は短冊川に小型、継代用に大四角（池本理科社製）、MA 30（フラット社製）を用い、ガラス器具類は 160°C 1 時間乾熱滅菌、シリコンゴム栓は 120°C 1.2 気圧で 45 分間高圧滅菌した。

① 重複培養

小型試験管（池本理科社製、B₄A）に細胞浮遊液をおのおの 1.5 ml ずつ分注し九型培養管斜位台に固定後、7 日間の増殖度を測定した。細胞数の算定は、おのおの 3 本の試験管を任意に抽出し、0.25% トリブシン（阪大微研）で細胞を単離（単離率 95% 以上）、Burker-Turk 血球計算板を用いて、1 本につき 3 回全細胞数を数え平均値をとった。

② 巡回培養

巡回培養器（Gyrotory shaker, Model G₂, New Brunswick 社製）を使用し、細胞数 1~9×10⁵/ml を三角フラスコ（Pyrex 社製、20 ml）に 4 ml ずつ分注後、回転数 75 rpm/min. で細胞塊を形成させた。

(4) 形態学的観察法

① 顕微鏡観察

培養全経過を通じて、主として倒立位相差顕微鏡により、逐次細胞形態、細胞集団の増殖様式を観察記録するとともに、適時短冊培養し、H-E 染色、Jacobson 染色⁽¹⁾、Dopa 反応（Fitzpatrick 法）⁽²⁾、Combed Dopa-Premelanin 反応⁽³⁾を行い検鏡観察した。

② 電顕観察

培養液交換後、培養瓶底面に付着している細胞を 5.4% 蔗糖加里ン酸緩衝液で洗浄し、2.5% グルタルアルデヒドで 1 時間 1 次固定、上記洗浄液で洗浄後、1% オスミウム酸で 1 時間 2 次固定した。次いでラバークリーナーで細胞を剝し、1,000 回転 10 分間遠沈後、細胞塊を形成させた。包埋はエタノール系列による脱水後、Epon に包埋、重合は 60°C で 48~72 時間行い、超薄切片を作製した。ウラニールアセテート、酢酸鉛にて重染色を施した後、検鏡観察、写真撮影を行った。

(5) 染色体標本作製法

標本作製の前に培養液を交換し、翌日 4 μg/ml のコレセミド（SIGMA 社製）を含む培養液に交換後、6~8 時間培養、低張液（0.075 MKCl）処理を行い、カルノア液にて固定後、速やかに乾燥した。次いで MacIlvain 緩衝液にて標本を洗浄し 50 μg/ml Quinacrine mustard dihydrochloride（SIGMA 社製）染色液で 15 分間染色、流水で軽く洗い、緩衝液 I、II、III におおの通し、カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡下で観察、写真撮影した。

(6) 凍結保存および融解培養法

0.25% トリブシンにより細胞浮遊液を作製し、遠沈操作にてトリブシンを除去、継代培養液に 10% Dimethyl sulfoxide, DMSO（和光純薬）を添加した液で、1~2×10⁶個/ml の浮遊液とした後、滅菌済みミニチューブ 2 ml（WHEATON 社製）に 1 ml ずつ分注し 0°C 30分、-20°C 60分、-80°C 120分と順次移し -196°C（液体窒素内、DR-17 容器ダイア工業社製）で保存を図った。融解培養手順は 37°C で速やかに融解し、直ちに氷水中で温度を下げ遠心操作にて DMSO 加培養液を除去後、従来の培地を加え 24 時間後に再度培地の交換を行った。

第 2 項 ヌードマウスへの移植

(1) 実験動物および飼育法

BALB/c (nu/nu) の遺伝子背景を有するヌードマウス（日本クレア社）を用い、本学動物センター内（室温 25±2°C、湿度 35±5%）の Laminar flow Iso-Rack 中で飼育した。ケージおよび給水器はポリカーボネイト製、床敷は電気かんた屑を使用、飼料は CMF（オリエンタル酵母社製）、飲料水は水道水をそれぞれ自由摂取として給与した。なおケージおよび床敷は 20 日間、水道水は 30 分間高圧滅菌、飼料は 100°C で 30 分間乾熱滅菌、また飼育器具は週 1 回交換、管理は可及的に、実験操作はすべて無菌的に行った。

(2) 移植材料および方法

本実験で株化樹立した黒色腫培養細胞株を 0.25% トリブシンにより分散後、遠沈操作にてトリブシンを除去、PBS（一）にて 2~3 回洗浄後皮内反応用注射針に 19G 針をつけ、腹腔内および背部皮下に注入した。

果代移植はエーテル麻酔下に腫瘤を摘出し、約 3 mm³ の小片に細切後細胞移植針（径 3.5 mm×9.5 mm、日本クレア社製）にて背部皮下のみに移植、創部はミシールのクリップにより閉鎖した。

(3) 形成腫瘤測定法

移植後形成された腫瘤は経時的に幅（a mm）、長さ（b mm）をスライドキャリパーで測定し $w = \frac{a^2 \times b}{2}$ （w = mg）⁽⁴⁾ の式に代入し重量として換算した。体重測定はマウス天秤（日本クレア CL 4501）にて測定した。

(4) 形態学的観察法

① 顕微鏡観察

通法に従い 10% ホルマリン固定後、H-E 染色し検鏡観察した。また Dopa 反応（Fitzpatrick 法）も適時行った。

② 電顕観察

形成された腫瘤の辺縁部を資料として採取後、直ちに 5.4% 蔗糖加クエン酸緩衝液で 2 ないし数回洗浄、2.5% グルタルアルデヒドにて 2 時間 1 次固定を行った。同様の緩衝液で 3 時間洗浄し、1% オスミウム酸で 1 時間 2 次固定、洗浄後アルコールアセトン系列で脱水、Epon 包埋は 60°C で 48~72 時間行い、以下通法に従い超薄切

片を作製し、ウラニールアセテート、酢酸鉛にて重染色を施した後、検鏡写真撮影した。

第3項 ヌードマウスに形成された腫瘍および腹水の培養

(1) 培養材料

培養材料は、MEM で継代を続した細胞株 (50代) をヌードマウスに移植後 10 週めの腫瘍 および RPMI 1640 で維持してきた細胞株 (50代) 移植後 10 週めの腹水である。

(2) 培養液および培養法

培養液は RPMI 1640 に牛胎児血清を 20% 含有させたもので、pH および培養系は患者資料と同様である。固型腫瘍は、① 原片培養法すなわち摘出した組織を鋭利なメスで 1mm³ の小片に細切し、PBS (+) にて洗浄血球成分を可及的に取り除き、培養瓶底面に静置、孵卵器中に放置後原片が浮遊しないように静かに培養液を加える方法と、② 細切した組織片を PBS (-) にて洗浄後、0.25%トリプシンおよびマグネチックスターラーにて化学的、機械的に分散し、白金製細胞濾過器 #80 および #150 (池本理化社製) を通し均一な細胞浮遊液とした後、初代培養を開始した。腹水よりの培養は先に報告した方法¹⁰⁾と同様に、腹水を培養液中に 1/2 残すように調整後開始した。

III. 成 績

第1項 細胞培養

(1) 培養経過

初代培養は、1978年5月17日に行い10日後に培養液の半量を交換し、最初の継代は1か月後に施行した。この時点で RPMI 1640 液を MEM と同時に使用し、以後並行して維持している。継代は PBS (+) で洗浄後ラバーポリスマンまたは 0.25%トリプシンで培養瓶底面より細胞を剝離、2 瓶に分割する手順で行っている。培養液交換は、初期 1 年間は週 2 回としていたが、現在は週 1 回の割合で行っている (表 1)。MEM 群と RPMI 群の継代操作時に認められた差は、RPMI 群が機械的、化学的ともに剝離分散されやすい点であり、両群ともに約 15 分で培養瓶底面に付着する。途中細菌、真菌等の感染により 2・3 の培体を失ったが、現在 (1980 年 11 月 13 日) MEM 群、RPMI 群ともに 130 代に達しなおよく増殖を繰り返している。

(2) 光顕所見

① 黒色腫よりの所見

細胞形態は、一般的に紡錘形および多角形上皮様細胞からなるが、円形、扇子状、長三角形など、多種多様に表現しうる形を示し特に円形の細胞はメラニンと思われる顆粒を有しているのが散見された。培養初期にはこれら各種形態を有する細胞が混在していたが、継代を重ね

るにつれて紡錘形線維芽細胞様を中心とした形態をとるようになり、この傾向は MEM 群において特に強く観察された。細胞質は単極、双極、あるいは多極性の突起を有しており、その先端の多くは蕾状であった。双極性細胞の多くは核が一側に偏在し、また単核あるいは多核の巨細胞が培養全経過を通じて観察された。これらは一般的に周囲を他の細胞に囲繞された状態で存在していたが、紡錘形細胞が細胞の細胞質内に侵入しているかのように思われる所見も認められた。細胞質内および核

表 1 培養経過

1978年	5月17日	初代培養	M 7.3 $\leq$ PH < 7.5
	5月27日	培養液交換	
		* M: Eagle's MEM + 20% fcs	
	6月24日	継代	
		M, R * R: RPMI 1640 + 20% fcs	
		継代	: 週 1 回
		培養液交換	: 週 2 回
1979年	5月24日	培養液交換	: 週 1 回
1980年	11月13日	M 131 代, R 131 代

写真 1 位相差像 3 代 (×200)

写真 2 位相差像 36 代 (×100)

写真 3 位相差像36代 (×200)

写真 4 119代 (Jacobson 染色, ×200)

写真 5 120代 (Combed Dopa-Premelanin 染色, ×200)

写真 6 (Jacobson 染色, ×200)

写真 7 位相差像 (×100)

写真 8 電顕像 (×20,000)

内には Jacobson 染色, Dopa 反応, Combed Dopa-Premelanin 反応においてもメラニンと思われる顆粒は明確に観察されなかった。核は円形または卵円形で、その辺縁は比較的平滑であり2ないし数個の明確な仁を有している。

増殖様式は個々の細胞が criss cross しあい、contact inhibition の欠如が多数観察された。またこれらが重なりあってブドウの房状集塊を形成するコロニー様増殖と

その周囲への遊出を繰り返しており、均一な単層状にはならない(写真1～5)。

② 対照例よりの所見

i) 肋骨骨折から胸水貯溜をきたした症例の培養所見では、少数の線維芽細胞様細胞の培養瓶底面への付着が認められたのみで、継代されるに至らなかった。写真6は1週間めの光顕像である。

ii) 乳癌患者からの例では、血球成分のみで上皮様あるいは線維芽細胞様細胞の付着増殖は観察されなかつ

写真 9 電顕像 (×10,000)

図 1

た。写真7は1週間の位相差像である。

(3) 電顕所見

以上述べてきたように細胞群は腫瘍性の増殖様式を示すが、光顕的にはメラニン顆粒は確認されなかったの
で、さらに電顕観察を行った。

写真8は初代培養細胞の電顕像で、ゴルジ装置が2か所にみられ、Toda¹⁵⁾の分類による Stage II, IIIあるいはIVの Premelanosome が認められる。核膜は凹凸不整でクロマチンは不均等に分布している。また各細胞間にはデスモゾームによる結合方式は認められない。

写真9は26代めの細胞であり、細胞質内には Stage I またはIIの Premelanosome が観察されるのみで、継代に伴って melanosome 形成能の低下がうかがわれる所見を呈している。

(4) 染色体所見

図1は3代めの分裂中期細胞100個についてその染色体数を調べたもので、数は37～43の間に分布しモードは41を示している。写真10はQバンドパターンでいくつかの異常染色体が観察され、強い蛍光を発するY染色体の存在は、本細胞群は男性由来であることを示している。

写真 10

図 2 増殖曲線

(5) 増殖曲線

MEM および RPMI 群で50代めについて、同一ロットの血清を使用して重複培養法により増殖曲線を求めた。1週間の経時的推移は図2のごとくで、片対数グラフにプロットしたものである。MEM 群では、24時間後 9.8×10^4 個、72時間後 11.2×10^4 個、120時間後 15.2×10^4 個、168時間後 20.0×10^4 個であり Doubling time は 68.5 時間であった。RPMI 群では、それぞれ 1.4×10^4 個、 3.0×10^4 個、 5.8×10^4 個、 14.6×10^4 個であり Doubling time は 50.0 時間を示していた。これらの結果をグラフ上から観察すると、MEM 群では2日目頃より増殖度が強くなり1週間後にはプラトーに達しつつある所見を示しているが、RPMI 群では5日目頃より増殖が強くなりその後1週間を経てもなおよく増殖する傾向にある(図2)。

写真 11 (H-E 染色, ×100)

写真 12 電顕像 (×10,000)

(6) 旋回培養所見

旋回培養時に形成される細胞集塊は、球形あるいは長楕円形であり、表面は凸凹不整で本細胞群を静置した場合に観察されるコロニー様細胞集塊に類似しており、約1週間で1mm前後の径となる。さらに本培養法を持続すると細胞集塊の大きさは縮小する。

MEM 群, RPMI 群ともに93代目を単離し細胞数 $1 \times 10^5/\text{ml}$ として、1週間旋回培養後に形成された細胞塊数は、 $25 \mu\text{l}$ 中それぞれ15個および3個であり MEM 群の集塊形成能の強さを示していた。写真11は MEM 群の光顕所見で、各細胞間の結合は粗で中心部は壊死に陥っており、管腔形成等の特異的所見は認められない。写真12は同様に93代 (MEM) の1週間後の旋回培養細胞の電顕所見であるが、細胞質内には Stage II, III の Premelanosome が認められ円形を呈するミトコンドリアが細胞質全体に分布し細胞機能の活発さを示した多数の空胞も観察される。核は円形で、大きな仁および核内封入体がみられクロマチンは均等に分布している。

(7) 凍結融解後の所見

形態学的あるいは増殖様式ともに融解前と同様であり変化は認めなかった。

図 3

表 2 着床率

	HMG-M85	HMG-R85	HMG-Gu-7
皮下	5/6	1/6	4/5
腹腔内 (腫瘍)	6/6	2/6	4/5
計	6/6	2/6	5/5

以上培養材料、増殖様式、培養期間、電顕所見、染色体検索等により、ヒト歯肉由来悪性黒色腫培養細胞株を樹立したと判定した。本細胞株の名称を Human Malignant Melanoma from Gingiva の頭文字をとって H-MG と命名した。以下 HMG と略記し、HMG-M5 は MEM で培養を継続している5代目を意味し、HMG-R10 は RPMI での10代目を意味する。また培養操作上、旋回培養所見などから HMG-R 群がより本来の形質を保持していると思われた。

第2項 ヌードマウスへの HMG の移植および果代

本実験で株化された HMG に *in vivo* で腫瘍形成能があるか否かについて、さらに各種実験の基礎データを得る目的で2~3の検討を加えた。

(1) 体 重

図3は本学動物センター内での未処置ヌードマウス7匹の体重平均値を経時的に示したもので、安定した成長発育がみられ、8週頃より22.0g前後の値をとるようになる。また Wasting Syndrome で死亡する例は Laminar flow Iso-Rack 中では観察されなかった。

(2) HMG のヌードマウスへの移植

HMG-M55, -R55 をそれぞれ細胞数 1×10^6 個、6~8週齢のヌードマウス背部皮下および腹腔内に注入した。約10週後に MEM 群については3頭中1頭に腫瘍形成のみが、一方 RPMI 群では3頭中1頭に腹水の貯溜のみが観察された。次いで、HMG-M85, HMG-R85 を5週齢ヌードマウスのおおの6頭に 1×10^6 個ずつ、

背部皮下および腹腔内に注入した。両群ともに腹水化はみられず、腹腔内では固型の腫瘍として発育する様式が観察された。着床率は表2に示すように MEM 群 100%, RPMI 群 33.3% であった。一般的に腫瘍形成の有無が触診により確認しうる大きさは、 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ (13.5 mg) 以上でありこの大きさに達するまでには平均 64 日を必要とし、安定した増殖を示すまでには 86 日 ($146 \pm 14.4\text{ mg}$) を要し、その後順調に発育し、106 日で $66.0 \pm 19.3\text{ mg}$ となる (図4)。

図4 HMG-M85の移植

(3) 累代移植

(2) で形成された109日めの腫瘍組織 (HMG-M85 山米) を5週齢10頭の背部皮下に累代した。移植された組織片の多くは約1週間で肉眼的には確認できなくなり、図5に示すように腫瘍は17日め頃より測定可能となる。その後25日め ($62.8 \pm 28.5\text{ mg}$) 頃より安定した増殖を示すようになる。体重は移植後17日めから19日めにかけて一時減少し、1か月後から暫次減少し2か月めから再度増加が認められたが、これは腫瘍の急激な増殖を意味する。4か月後には、腫瘍上部の皮膚には圧迫による血管の怒張や出血、潰瘍形成がみられ、初期には観察されなかった周囲組織との癒着が認められるようになる。また腫瘍重量は宿主ヌードマウスよりも重くなるが、現在までのところ転移形成は確認していない。形成された腫瘍は灰白色で、分葉状の発育をし、断面は中心部で出血

写真 13 摘出腫瘍 (移植後131日)

図5 累代移植

写真 14 (H-E 染色, $\times 200$) 写真 15 電顕像 ($\times 20,000$) 写真 16 (Jacobson 染色, $\times 200$) 写真 17 位相差像 ($\times 200$)

図 6 増殖曲線

壊死が観察された (写真13).

(4) 形成腫瘍の形態観察

① 光顕所見

腫瘍組織は粗な結合組織に被われて、ヌードマウス由来の血管をとりこんでいる。腫瘍細胞は細胞質に乏しく

紡錘形、類円形、方形で異型核を有する巨細胞、有糸分裂像が認められる (写真 14)。また下部筋組織へ侵入している所見もみられ、amelanotic ではあるが原発巣や肺転移巣と類似した組織型を示している。

② 電顕所見

一般的に細胞質内には種々の Premelanosome がみられ、その数は HMG に比して多い。核縁は凹凸不整で、大きな仁を有しクロマチンの分布は不均等である (写真 15)。

第3項 形成腫瘍および腹水よりの培養、ならびに再移植

(1) 固型腫瘍よりの培養所見

原片培養では良い成績は得られなかった。しかしトリプシンおよびマグネチックスターラーによる分散法では、HMG に類似した所見が得られ、HMG に比してコロニー様増殖が目立った。現在継代数は 20 代を越え HMG にちなんで、HMGnu と命名した。写真 16 は HMGnu 6 代めの細胞で、核内に空胞が観察される。図 6 は HMGnu 3 代および 11 代について重複培養し、経時的变化を示したものである。3 代めは、48 時間後 4.4×10^4 個、120 時間後 7.9×10^4 個、168 時間後 10.1×10^4 個、11 代めは 24 時間後 6.5×10^4 個、72 時間後 $11.5 \times$

10^4 個, 168 時間後 32.9×10^4 個であり, それぞれ Doubling time は 72 時間, 79 時間で, 1 週間の増殖度は H-MG-R と類似している.

(2) 腹水よりの培養所見

多角形, 上皮様配列を有する細胞が目立ち HMG 初期に比して紡錘形, 樹枝状突起を有する細胞は少数であった (写真 17). また上皮様細胞で細胞質内にメラニンと思われる顆粒を多数含有する細胞も観察されたが, 継代維持できなかった.

(3) HMGnu のヌードマウスへの移植

HMGnu-7 をヌードマウス 5 頭の背部皮下および腹腔内へ HMG 移植時と同数 (1×10^6 個) 注入した. 移植後 6 週頃より腫瘍の形成が認められ, HMG に比して 1 か月程早く, 着床率は表 2 に示すごとく 100% であるが腹水化はみられなかった.

III. 総括および考察

ヒト悪性腫瘍の組織培養は年々盛んになり, わが国の各施設で樹立維持されているヒト癌細胞培養細胞株 (リンパ芽球様細胞株を除く) だけでも 149 株に達するとされている¹⁶⁾. 一方ヒト悪性黒色腫の培養は, Takano⁷⁾により 1926 年初めて, 同種および異種血清が培養細胞におよぼす検討の一部として行われたもので, すでにこのときメラニンという特異的のマーカを有することを理由に, 培養上広範な研究を行いうるとしている.

その後 Foley ら¹⁷⁾の報告をはじめわが国では春日らの HMV 株他 7 株の記載¹⁶⁾があるが, 歯肉由来黒色腫細胞株についての報告は, 著者の渉猟した限りでは見当たらない.

1. 細胞株

多くの報告で, 細胞株あるいは細胞系などの用語が混用されており, まず細胞株に関する一般的な概念との関係から HMG について考察する.

山田¹⁸⁾は, 細胞株について日本語としての「株」は「株化する」などのように培養内で無限増殖性を獲得し, その性質が一部でも明らかとなって安定した培養細胞となることを意味することが多く, 他方で細胞株としての特長づけの意味でも用いられ, 米国組織培養学会 (TCA) の cell strain (細胞株), cell line (細胞系) を区別しないときは株として表現している. また日本組織培養学会の細胞株に関する規定によると¹⁹⁾, 細胞株 (established cell line) は少なくとも 50 代の継代または 1 年以上にわたって増殖を維持した細胞としている.

樹立 (株化) (establishment) については, みかけ上限りなく安定に増殖し続ける状態に達すること¹⁸⁾とされ, この時期については不明確で, Fogh²⁰⁾によれば経験豊かな 2~3 人の cultrist が持続する発育能を有すると判定した時であり, 明確な規定はできないとしている.

る.

これらいくつかの基準はあるが, HMG は 2 年半以上 130 代を越え, 電顕観察により Premelanosome が確認される, さらにヌードマウスに腫瘍形成能を有するなどの点から, 黒色腫培養細胞株と断定してよいと考える. また TCA¹⁸⁾の定義に従えば, continuous あるいは established melanoma cell line と表現しうるが, cell strain とは表現しがたい.

2. 培養液, 血清, 培養法

本実験では, Eagle's MEM “単層用” 培地および, Moore ら²¹⁾により白血病用として開発され, 細胞自身の増殖様式を許し, 単層, 浮遊培養が可能であるとされる RPMI 1640 の 2 種を 2 代以降並行して使用した. HMG は浮遊細胞系として増殖しなかったが, 巡回培養による集塊形成能, 継代時にみられる培養瓶底面からの剝離度, 継代に伴う形態変化, Doubling time, ヌードマウス移植後の腹水化の可否さらに腹水よりの培養所見などを総合すると RPMI 1640 が Eagle's MEM よりも本来の形質を保持させていると考えられる. しかし Motoi ら²²⁾は, 皮膚原発例の腹水から Eagle's MEM を使用し, 付着性ではあるが, メラニン形成能を有する PL 14 株を 200 代 4 年半にわたって継代維持しており, 分化形質については, MEM は必ずしも保持し得ないとはいいがたい. 今後も継代を続け他の培養液についても増殖様式, 分化形質の保持あるいは発現につき検討を加える必要がある.

細胞培養時, 少数例を除いて血清は必要不可欠であるが, 近年にみられる価格の上昇, 各ロット間, 動物種や年齢差による成績のばらつきなど多くの問題点を有している. 特にヒト悪性腫瘍を培養資料とする場合大きな障害となり, ヒト癌細胞培養に有効な山根²³⁾のいう無血清培地の開発が望まれる.

体細胞の分離培養法には, 原片 (explant) 培養法と細胞分散法 (cell dispersion method) とがあり, 培養材料が十分かつ充実性で比較的軟らかい場合は分散法が有利であるとされている. HMG により形成されたヌードマウス腫瘍組織初代培養をこれら 2 種の培養法により試みた結果, 細胞分散法で良好な成績を得ている. 原片培養については, explant 材料の採取部位すなわちヌードマウスに形成される腫瘍の中心部の多くは壊死に陥っている点を十分認識して着手する必要がある, HMG では径約 2 cm を越えると壊死に陥る傾向にある.

3. 細胞形態および色素形成能

黒色腫細胞株の細胞形態は報告者^{22, 24-26)}により各種の表現がされている. これらを総括すると, 色素形成能の有無により, 色素形成性 (melanotic), 無色素性 (amelanotic), 次いで細胞の配列様式, 形態から上皮様 (epithelial), 線維芽細胞様 (fibroblastic), 円形 (round), 紡錘形 (spindle), 立方形 (cuboid), 三角形 (triangle)

さらに細胞質突起の形状により、単極性、双極性、多極性 (uni-, bi-, multi-polar), 樹枝状 (dendritic) などの用語が各種組み合わせられている。HMG については初期には多角形、樹枝状を中心とした細胞形態がみられたが、継代するにつれて、紡錘形、線維芽細胞様の細胞が多数を占めるようになってきている。

細胞形態と分化能すなわちメラニン合成能については、dendritic な細胞がメラニン合成能が強いとする報告^{24,25)}もあるが、Liao ら²⁶⁾は dendritic な例でも amelanotic な場合もあるとしており、HMG でも dendritic な細胞が観察されたが、amelanotic であった。また佐藤³⁰⁾は amelanotic クローンは一様に紡錘形を呈するとしている。Kovářík ら²⁸⁾は、組織培養された細胞の形態は、細胞密度、細胞周期、代謝活性等の種々の要因により変化を受けることを留意すべきであるとしており、細胞形態と機能発現については明確な結論は出ない。

色素形成能に影響を与える因子として ACTH, MSH 等のホルモン、紫外線、エックス線、培養温度、培地、培養法などが考えられている。これらの中で Fu³¹⁾は B16 黒色腫培養細胞株に ACTH, MSH を低濃度 (0.2~0.5 $\mu\text{g/ml}$) 作用させ、わずかなメラニン産生の増加、温度 (4°C)、1-B-D-Arabinofranosyl、寒天培地、旋回培養で促進を観察している。著者は HMG の旋回培養所見で、Premelanosome の増加を観察しており、これら各種薬剤および要因を考慮したメラニン形成機構の追求を行う必要があると考えている。

4. 電顕所見

melanocyte におけるチロシナーゼ生成とメラニン生成の場である Premelanosome とは独立した膜系においておのおの行われており、正常な場合この両者の協調がうまく行われて、Premelanosome 内にメラニンの形成が進行していくと考えられている³²⁾。このため Dopa 反応と Premelanosome 形成は必ずしも平行しない。Dopa 反応が陰性で amelanotic な場合は電顕観察が診断上有力な根拠となるとされており、Toshima ら³³⁾はヒト悪性黒色腫細胞株の amelanotic type について、Premelanosome の初期段階を越えないとしている。Maul³⁴⁾は同様にヒト黒色腫の Premelanosome はジグザグ状または格子状蛋白質構造から鑑別しようと述べている。HMG は amelanotic であり、細胞質内に Stage I~Ⅲの Premelanosome を認め melanocyte 由来であるとの診断根拠とした。また Kanzaki ら³⁵⁾は培養黒色腫細胞膜下に microfilament を観察し、SMMF と名づけて細胞分化度との関連性を示唆しているが、HMG には認めていない。

Epstein らにより Burkitt lymphoma の培養細胞中に新しいヘルペスウィルス (EB ウィルス) が発見されたことは、ヒト癌ウィルス探索に方向性を与え、ヒト悪

性腫瘍培養時ウィルスの検索を無視できなくした。Whitehead ら³⁶⁾は黒色腫培養細胞について EB ウィルスを検索し (-) であったとしているが、HMG についても検討を加えたいと考えている。

5. 染色体

染色体分析により、遺伝学的に癌細胞と同定することについていまだ結論が出ていないが、腫瘍細胞の多くは数的あるいは構造上の異常を有する。また培養細胞の染色体は正常細胞でも培養するにつれてモードが変化することがあり、培養細胞をとり扱う上で留意すべき点である。McCulloch ら³⁷⁾のヒト由来黒色腫細胞系 8 例についての検討によれば、モードは 48~87 であり、各系に共通するマーカー染色体は認めていない。HMG の染色体数は 37~43 で、モードは 41 と少ないが、腫瘍細胞の染色体数は必ずしも多いとは限らず、吉田肉腫³⁸⁾の腫瘍細胞の染色体数は 40 で正常の 42 よりも少ない。しかしヒト悪性腫瘍培養細胞株の文献的検討で Bilder³⁹⁾は 46~59 にモードを有する例が多いとし、HMG のモード 41 は特徴的な所見と思われる。一方動物の黒色腫培養細胞株で、amelanotic クローンの染色体数は melanotic クローンに比して少ないとの報告⁴⁰⁾があり、HMG は amelanotic で染色体数が少ないなどの類似性があり興味ある所見である。さらにマーカー染色体と思われる染色体がいくつか見出されているので、今後さらに検討する予定である。

人癌の樹立経過中や樹立細胞株の継代時に他の細胞株の混交が起こる危険性についての指摘がある⁴⁰⁾。Muir ら⁴¹⁾は 8 例のヒト由来悪性黒色腫細胞にマウス L 細胞の混交例を報告し、同じ培養器内で培養を行ったためであろうと述べている。なお HMG には染色体分析の結果他の細胞の混入は認めていない。

6. ヌードマウスへの移植

ヌードマウスの出現は、ヒト腫瘍組織や培養細胞株を自由に適時移植しかつ果代移植系として維持することを可能とし、*in vivo* での腫瘍細胞の性状、増殖と分化、治療さらに癌の原因など広範な研究に、同一腫瘍の供給源を保ち再現性のある実験系を提供する点で画期的であるといえる。

本研究における HMG のヌードマウス移植で、初期には着床率は低値であった。しかし以後の実験では、維持培養液の差による相異はあったが高い値を示した。また組織像では、光顕的に amelanotic であるが、原発巣、肺転移巣と類似した組織型を示し、*in vitro* では電顕的に継代に伴う脱分化がみられたにもかかわらず、ヌードマウス移植により再分化が観察された。このような長期培養細胞株のヌードマウス移植による再分化は、骨腫瘍、悪性絨毛上皮腫⁴²⁾などの機能性腫瘍にも観察されている。黒色腫培養細胞株については、組織再構成のみがみられた例⁴³⁾、元の組織よりも高い分化度を示した例⁴⁴⁾

の報告がある。

ヌードマウスに移植された悪性腫瘍は、転移形成や浸潤増殖を起こさない⁴⁵⁾とされていたが、黒色腫には転移する株や cachexy を起こして腫瘍死させる株も知られている⁴⁶⁾。HMG では、転移形成は確認していないが、移植下部筋組織へ侵入している所見がみられた。SEKI 株では、移植後 1～2 週頃より著明な体重減少がみられ、cachexy に陥ったと報告されている⁴⁶⁾が、HMG では累代移植後 3 週頃頃に体重の一時減少が観察され、また多くの場合移植後 1 週間から 10 日間の潜伏期があり、この時期になんらかの変化が起きていると推察される。

細胞株を移植後形成される腫瘍組織中の血管はヌードマウス由来と考えられ、腫瘍細胞には血管を新生させる因子を有するとする説⁴⁷⁾と考えあわせると興味深い。HMG により形成される腫瘍周囲には血管系が良く発達しており、各種実験ではこれらのことを考慮し、腫瘍形成部位、薬剤投与方法、期間などを慎重に検討する必要がある。

大星⁴²⁾はヌードマウスに形成された腫瘍を再度培養した場合、成功率は高いとしており、黒色腫細胞株について再培養し、Plating efficiency は元株より高いとする報告もある⁴⁸⁾。HMGnu の培養経過は HMG と同様であり、Doubling time は同じか幾分早い値を示している。培養細胞は継代を重ねるにつれて、その多くは脱分化することが知られており、細胞株を初期の培養状態にもどす点からもヌードマウスは有用である。

HMGnu を再移植した場合 HMG よりも着床が確認されるまでの期間は短く、成功率も高い。これは移植操作、培養操作を繰り返すことにより、HMG 中の腫瘍形成能の強い細胞の選択が行われていると考えられる。一方累代移植により腫瘍形成能を失う例も知られている。

最近岡本ら⁴⁹⁾は皮膚原発の悪性黒色腫同一転移巢から、melanotic type と amelanotic type の 2 種のヌードマウス移植系を分離確立している。さらにこれらに応用した治療実験で、DTIC は melanotic type の発育を完全に阻止したが、amelanotic type については無効であり、Melphalan がその発育を完全に阻止したと報告している。われわれの臨床例では DTIC を含む各種抗癌剤を投与した結果、原発巣の縮小と退色を認めたが、その後 amelanotic な腫瘍の増大が観察された。また剖検所見でも心臓を除く他の転移巣は amelanotic であり前記治療実験との相関を示している。このことより治療に際しては、melanotic, amelanotic か否かの臨床所見を加味して慎重に対処する必要がある。

以上 HMG のヌードマウス移植により、腫瘍形成能の確認、再分化、再培養による培養経過の再現、さらに HMGnu の再移植による腫瘍形成期間の短縮化が観察された。

臨床材料からの同一腫瘍を一方では培養株化し、さらにヌードマウスに移植腫瘍化することは、制癌剤のスクリーニングあるいは投与方法の検討等、*in vitro*, *in vivo* の各種実験を可能とし多くの知見をもたらすものと考えられる。

V. 結 論

黒色腫は皮膚、粘膜の腫瘍中最も悪性とされ、現在その症例数は増加している。著者は臨床材料より口腔粘膜由来黒色腫の *in vitro*・*in vivo* 実験系の確立を図り以下の結論を得た。

1) 59 歳男性、前歯部歯肉悪性黒色腫で、転移が確認された胸水中の細胞を培養し、2 年半以上 130 数代にわたって継代維持し、株化樹立した。また本細胞株は、Eagle's MEM, RPMI 1640 の 2 種の培養液で並行して維持しており、10% DMSO を加えて凍結保存可能である。

2) 本細胞株は原発組織、位相差顕微鏡観察での増殖様式等により腫瘍細胞と考えられる。

3) 光学顕微鏡観察では、多角形、円形、紡錘形、樹枝状突起を有する細胞から成り Dopa 反応、Combed Dopa-Premelanin 反応では (+) と判定できず、amelanotic である。

4) 電子顕微鏡観察では、Premelanosome が認められ、黒色腫由来細胞であることが確認された。

5) Doubling time は、MEM 群 68.5 時間 RPMI 群 50.0 時間であった。

6) 染色体分析では、数は 37～43 の範囲に分布しており、モードは 41 を示し、マーカー染色体の存在が示唆された。

7) 本細胞株をヒト歯肉由来悪性黒色腫培養細胞株、Human Malignant Melanoma from Gingiva の頭文字をとって HMG と命名する。

8) 対照として外傷および乳癌患者よりの胸水を資料として培養を試みたが、線維芽細胞様細胞が一部観察されたのみで、継代するに至らなかった。

9) HMG のヌードマウス移植により、固型腫瘍化、腹水腫瘍化が認められ、固型腫瘍は現在累代 3 代に至っているが、腹水系は累代できなかった。

10) HMG 移植後 9～10 週で腫瘍形成が観察され、累代では 2～3 週で認められる。

11) 形成された腫瘍は、amelanotic ではあるが原発巣、肺転移巣と類似の組織型を示す。また電顕観察により Premelanosome が確認された。

12) 培養液 RPMI 1640 と Eagle's MEM の比較では、① 継代に伴う形態変化、② 巡回培養での集塊形成能、③ ヌードマウス移植による腹水化の可否、④ 増殖能、⑤ 継代時の細胞分散度などから RPMI 1640 の方がより HMG の本来の形質を保持させることが示され

た。

13) ノードマウスに形成された腫瘍を原片培養および細胞分散法で培養を行ったが、後者の方が良好な結果を得ており、本細胞系を HMG のノードマウス経由という意味で HMGnu と命名した。

14) HMGnu は HMG と同様の培養経過をたどり、ノードマウスへの再移植では HMG よりも早期に腫瘤形成が観察される。

以上のごとく著者はヒト歯肉由来悪性黒色腫培養細胞株の樹立と *in vitro*→*in vivo* 実験系の確立を意図した。これら多面的実験系は黒色腫分化機構の追求、各種治療実験に有用であると思う。

稿を終るにあたり、終始ご懸念なるご指導、ご校閲を賜った恩師村田睦男教授に深く感謝いたします。またご助言、ご指導いただきました、本学病理学教室 矢谷隆一講師、ノードマウス飼育管理などにつきご教示いただきました本学動物実験施設志村圭志郎助教授に感謝の意を表します。さらに本研究にご協力いただいた本学口腔外科学教室諸兄姉に感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第 24 回日本口腔外科学会総会（於名古屋）、第 34 回日本口腔科学会総会（於岡山）、第 7 回国際口腔外科学会（於 Dublin, Ireland）、第 25 回日本口腔外科学会総会（於徳島）において発表した。

引用文献

- 1) Carrel, A., Burrow, M.T.: Cultivation *in vitro* of malignant tumors. J Exp Med 13: 571 1911.
- 2) Gey, G.O., et al.: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res 12: 264 1952.
- 3) Donald, J.G., et al.: *In vitro* cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst 51: 1417 1973.
- 4) Flanagan, S.P.: "Nude," a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. Genet Res Camb 8: 295 1966.
- 5) Pantelouris, E.M.: Absence of thymus in a mouse mutant. Nature 217: 370 1968.
- 6) Rygaard, J., Povlsen, C.O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "Nude" mice. Acta Path Microbiol Scand 77: 758 1969.
- 7) Takano, Y.: Züchtungsversuche mit menschlichen Melanosarcom. Transact Jap Path Soci 19: 262 1929.
- 8) Brown, M.M.L., et al.: Human oral malignant melanoma in cell culture. Cancer 19: 648 1966.
- 9) 結城勝彦, 他: 口腔腫瘍組織の初代培養細胞。組織培養 4: 525 1978.
- 10) 田川俊郎, 他: 上顎前歯部悪性黒色腫患者胸水より採取した細胞の培養所見について。日口外誌 27: 331 1981.
- 11) 中井準之助編: 組織培養—基礎と応用—, 初版, 朝倉書店, 東京, 1964, 163頁.
- 12) 武内忠男編: 酵素組織化学, 初版, 朝倉書店, 東京, 1974, 166頁.
- 13) Mishima, Y.: New technique for comprehensive demonstration of melanin, premelanin, and tyrosinase sites. J Inve Derm 34: 355 1960.
- 14) Overjera, A.A., et al.: Proceedings of the second international workshop on nude mice. 1 ed, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977, p 453.
- 15) Toda, K., Fitzpatrick, T.B.: Biology of normal and abnormal melanocytes. 1 ed, University of Tokyo Press, Tokyo, 1971, p 277.
- 16) 大星章一, 他: 日本で樹立維持されているヒト癌細胞培養株。蛋白質核酸酵素 23: 697 1978.
- 17) Foley, G.E., et al.: Isolation and serial propagation of malignant and normal cells in semi-defined media. Origins of CCRF cell lines. Cancer Res 20: 930 1960.
- 18) 山田正篤: 培養細胞株の系統生物としての特性。組織培養 6: 75 1980.
- 19) 葛西四朗: 口腔組織における細胞株化の方法。歯界展望 43: 1130 1974.
- 20) Fogh, J.: Human tumor cells *in vitro*. 1 ed, Plenum Press, New York, 1975, p 123.
- 21) Moore, G.E., et al.: Culture of normal human leukocytes. JAMA 199: 519 1967.
- 22) Motoi, M., et al.: A melanin-producing cell line derived from ascites of a patient with malignant melanoma. Gann 69: 103 1978.
- 23) 山根 稔: 組織培養の発展とその将来性。第 20 回日本医学会総会学術講演要旨 179 1979.
- 24) Cobb, J.P., et al.: Studies on human melanoma cells in tissue culture. I Growth characteristics and cytology. Cancer Res 20: 858 1960.
- 25) Romsdahl, M.M., et al.: Establishment and biologic properties of human malignant melanoma cell lines grown *in vitro*. Surg Forum 18: 78 1967.
- 26) Liao, S.K.: Characterization of human malignant melanoma cell lines. I. Morphology and growth characteristics in culture. J Nat Cancer Inst 54: 1037 1975.
- 27) Oizilbash, A.H., et al.: Characterization of human malignant melanoma cell lines. IV. Cytologic and histochemical characteristics. Acta Cytologica 21: 147 1977.

- 28) Kovářík, J., et al.: Establishment of cell line derived from human malignant melanoma. *Neoplasma* 25: 701 1978.
- 29) Pope, J.H., et al.: Human malignant melanoma cell lines. *Pathology* 11: 191 1979.
- 30) 佐藤静治, 他: 培養メラノーマ細胞におけるメラニン産生の調節. *組織培養* 4: 320 1978.
- 31) Hu, F.: Biology of normal and abnormal melanocytes. 1 ed, University of Tokyo Press, Tokyo, 1971, p 303.
- 32) 小川和朗, 他編: 細胞学大系. 細胞学各論 7, 初版, 朝倉書店, 東京, 1978, 250頁.
- 33) Toshima, S., et al.: Ultrastructure of human melanoma in cell culture. Electron microscopic studies. *Cancer* 21: 202 1968.
- 34) Maul, G.G.: Golgi-melanosome relationship in human melanoma *in vitro*. *J Ultrastruct Res* 26: 163 1969.
- 35) Kanzaki, T., et al.: Human malignant melanoma *in vivo* and *in vitro*. *J Natl Cancer Inst* 59: 775 1977.
- 36) Whitehead, R.H., et al.: Tissue culture studies on human malignant melanoma. *Pigment cell* 1: 382 1973.
- 37) McCulloch, P.B., et al.: Common and individually specific chromosomal characteristics of cultured human melanoma. *Cancer Res* 36: 398 1976.
- 38) 吉田俊秀: 癌細胞の染色体. *綜合臨床* 19: 832 1970.
- 39) Bilder, J.L.: Human tumor cells *in vitro*. 1 ed, Plenum Press, New York, 1975, p 382.
- 40) 大星章一, 菅野晴夫編: 人癌細胞の培養. 初版, 朝倉書店, 東京, 1975, 102頁.
- 41) Muir, P.D., et al.: Contamination of human melanoma cell lines by mouse L cells. *Pathology* 9: 301 1977.
- 42) 大星章一, 菅野晴夫編: 人癌細胞の培養. 初版, 朝倉書店, 東京, 1975, 296頁.
- 43) Kuga, N., et al.: Heterotransplantation of cultured human cancer cells and human cancer tissues into nude mice. *Gann* 66: 547 1975.
- 44) Giovanella, B.C., et al.: Heterotransplantation of human malignant tumors in "Nude" thymusless mice. II. Malignant tumors induced by injection of cell cultures derived from human solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 52: 921 1974.
- 45) Povlsen, C.O., et al.: Heterotransplantation of human adeno carcinoma of the colon and rectum to the mouse mutant nude. *Acta Path Microbiol Scand Section A* 79: 159 1971.
- 46) Kondo, Y., et al.: Proceedings of the second international workshop on nude mice. 1 ed, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977, p 441.
- 47) Folkman, J., et al.: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 133: 275 1971.
- 48) Giovanella, B.C., et al.: Development of invasive tumors in the "Nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 48: 1531 1972.
- 49) 岡本嘉六, 他: ヒト悪性黒色腫の研究におけるヌードマウス可移植腫 (Endo 株). *癌と化学療法* 7: 931 1980.