原 著

ヒト卵巣 immature teratoma 細胞の培養とその性状

東北大学医学部産科学婦人科学教室

上原 茂樹 土岐 利彦 丹野ひで子 及川 和子
 星合 昊 矢嶋 聰 鈴木 雅洲

東北大学農学部家畜繁殖学教室

堀内 俊孝

ヒト卵巣 immature teratoma 由来細胞を培養し、その性状について検討を加え、以下の結果を得た。

- 1) 昭和57年1月6日、17歳の患者の手術時摘出病巣より材料を得て初代培養に供した。
- 2) 初代培養、継代培養を通して細胞の増殖は順調で、現在6代目に至っている。
- 3) 原病巣は neuroglia 様組織と neuroepithelium 様組織によってその大部分が占められる。
- 4) 培養下にある細胞のうち未分化と推測されるのは neuroglia 様組織由来のもので、その colony 上に形成される細胞塊は in vitro での分化能をもち、plastic dish に付着後外周より線維芽様細胞、神経様細胞の発生をみる。
- 5) 細胞塊の超微形態観察では、junction, microvilli, filament, 分泌顆粒などをもたない未分化な細胞によって形成されていることがわかったが、細胞の種類は複数であることが推測された。
- 6) 細胞塊を形成する細胞は、ほかの培養細胞と比べて細胞診上のいわゆる悪性基準を満たすものが多かった。

Key words: Immature teratoma—Tissue culture—Morphology—Differentiation

I. 緒 言

immature teratoma は germ cell tumors の1組織分類であり、したがってその腫瘍の性格は、germ cell tu-

Culture and characterization of human ovarian immature teratoma cell

Shigeki UEHARA, M.D., Toshihiko TOKI, M.D., Hideko TANNO, C.T., J.S.C., Kazuko OIKAWA, C.T., I.S.C., Hiroshi HOSHIAI, M.D., Akira YAJIMA, M.D., F.I.A.C. and Masakuni SUZUKI, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine

Toshitaka HORIUCHI, Ph.D.

Laboratory of Animal Reproduction, Tohoku University
 論文別刷請求先 ☎980 仙台市星陵町1の1 東北大学医学
 部産科学婦人科学教室

昭和57年8月12日受付

mors として総称されるほかの腫瘍と類似している。一般に germ cell tumors は胚細胞の腫瘍化によって発生するので、将来形成される器官を構成する。多潜能性、分化能を有する細胞を含んでいる。とくに immature teratoma は、内・外・中の3胚葉由来の未熟組織よりなる複雑な構成を示し、従来 malignant teratoma, teratocarcinoma とも呼ばれていた^{1,14)}。

teratoma に関する in vitro での研究は、従来 mice 由来のものが主として使用されており、とくに F9 や PCC 細胞などは分化誘導物質や哺乳動物の初期発生の研究材料としての利用価値が高い⁹⁾。これに対してヒト由来の teratoma 細胞についての報告は、それほど多くはないのが現状である。

今回われわれは、ヒト immature teratoma 細胞を培養し、その過程で特徴ある増殖形態や各種細胞への分化

像を観察した。得られた知見を中心にして teratoma の発生・発育に関する若干の考察を加えたので報告する。

II. 研究方法

1. 症例

○原○美, 17 歳, 0 妊 0 産.

主 訴: 腹部膨満, 咳嗽.

家族歴: 特記すべきことはない.

既往歴: 特記すべきことはない.

月経歴: 初経は 11 歳で, 以後 30 日型の整順な月経周期を示す.

現病歴: 昭和 56 年 11 月頃より腹部膨満感を自覚し, 同時に咳嗽・喀痰を訴えるようになった. このため近医を受診し, 卵巣腫瘍および腹水貯留の診断のもとに当科を紹介され, 同年 12 月 17 日入院となった.

入院後経過: 臍高にまで及ぶ成人頭大の下腹部腫瘍が触知され, 同時に腹水, 胸水の貯留が認められた. 昭和 57 年 1 月 6 日手術施行.

開腹時所見: 右卵巣から発生したほぼ成人頭大の軟らかな, しかも周囲組織との癒着のみられない腫瘍が下腹部全体を占めていた. 左卵巣にも鶯卵大, 嚢胞性の腫瘍の形成が認められたが, 右側と同様に周囲との癒着はみられなかった.

子宮は正常大で, 外見上の異常はなく, また大網, 腸管漿膜面, 後腹膜などに転移巣はみられなかった. しかしこの時, 黄色の漿液性の腹水が 5,600 ml 採取された.

右側付属器切除および左側卵巣腫瘍核出術を行って閉腹した.

2. 組織診, 細胞診

摘出された右側卵巣腫瘍からは H-E, PAS 染色などを用いて組織標本を作成し, また腹水, 胸水の細胞診は, Papanicolaou 染色および May-Giemsa 染色によって鏡検した.

3. 培養方法

手術時摘出された右側卵巣腫瘍より組織片を無菌的に採取し, 鋏で細切後, 培地で 1,500 unit/ml に調製した Dispase (三光純薬) 液に入れ, 37°C, 30 分間攪拌しながら incubation し分散させた. 次に pipet を用い浮遊細胞, 浮遊組織片を回収し, 培養液で 2 度洗浄したのち, CO₂ incubator (37°C, 5%CO₂, 95%air) 内, plastic dish (Falcon) 上での静置培養に供した. なお培養液は, Eagle's Minimam Essential Medium (MEM, Gibco) に 20% ウシ胎児血清 (Flow) を添加し, さらに 0.1 mg/ml aminobenzylpenicillin を加え, pH は NaHCO₃,

Hepes 液で約 7.4 に調整したものを用いた. また継代操作は, 0.1 mg/ml Pronase P (科研化学), 0.2 mg/ml EDTA (同仁化学) を含む PBS (Phosphate Buffered Saline) で短時間処理後, ただちに 1,000 unit/ml の Dispase を含む培地を加え, 細胞の単離をなるべく避けるようにし, 1 個の dish より 2 個に分配する方法を用いた.

4. クローニング法

初代培養中に多数の colony の形成が得られ, それらは重積増殖を示した. その周囲には線維芽様細胞も増殖していたため, colony を単離する目的で cloning を行った. すなわち 0.1% trypsin (Difco) を含む PBS に 2 mm 四方の濾紙片を浸し, それを colony 上に乗せ, 10 分間 37°C で incubation し, 剝離した細胞塊を濾紙片に付着させ, 別の新しい dish に移した.

5. 培養細胞の形態的観察

培養中の細胞は染色することなく, 位相差倒立顕微鏡を用いて観察したほか, 悪性度の判定のためには Papanicolaou 染色を, また原病巣との比較のためには PAS 染色を施行した.

継代培養中に形成された細胞塊は, その内部構造をみる目的で, pipet を用いて培地で洗い落すようにして剝離させ, 0.1 M Na-cacodylate buffer に溶いた 2.5% glutaraldehyde で固定し, 1% OsO₄ による後固定, acetone 系列による脱水, Epon 812 による包埋の手順でブロックを作り, 光学顕微鏡用切片, 超薄切片を作製した. 光顕用には toluidine blue, 電顕用には uranylacetate, lead citrate で染色した.

III. 研究結果

1. 病理組織学的所見, 細胞診所見

組織学的検索の結果, 本腫瘍の大部分が, neuroglia neuroepithelium に類似の組織によって占められており, ほかの部分はずかな squamous epithelium, columnar epithelium, あるいは lymph nodule 類似の構造により形成されていた. すなわちこの腫瘍は, 未分化な組織が主体であって, 分化度が広範囲にわたる異なった組織によって構築されており, 毛髪や軟骨・骨などの成熟組織が全く存在しないことから, 典型的な immature teratoma であるといつてよからう (写真 1). neuroglia 様組織は小型な細胞の不規則な配列によって特徴づけられ, その周囲には neuroepithelium 様組織が発達しているが, この neuroepithelium 様組織は単独で存在している部分もある.

写真 1 右卵巣の原病巣病理組織像
neuroglia 様組織の周囲に neuroepithelium 様組織が発達している。(H-E 染色, $\times 100$)

写真 3 原病巣組織の PAS 染色像
neuroepithelium 様組織に PAS 陽性細胞がみられるが、neuroglia 様組織にはみられない。(×100)

写真 2 には、neuroglia 様細胞が epithelium 状の細胞に移行している箇所を示した。

写真 3 は PAS 染色標本である。neuroepithelium 様組織中に PAS 陽性細胞が散在性に認められ、とくに neuroglia 様組織と接していない部分に PAS 陽性細胞の多い印象をうける。

腹水、胸水より得た細胞診標本では、横のつながりをもつ neuroepithelium 様細胞、塊状になった neuroglia 様細胞が認められはするが、これらの細胞診所見のみからこの腫瘍を immature teratoma と診断することには、なお問題がある(写真 4)。

2. 培養経過

昭和 57 年 1 月 6 日の初代培養開始後、腫瘍細胞、とくに neuroglia 様細胞由来と思われる colony とその周囲に線維芽様細胞の発達をみるようになった。colony は重積して増殖し、線維芽様細胞に妨げられ横への拡大は緩徐であった。colony の直径が約 3 mm を越えた時点

写真 2 neuroglia 様細胞が上皮状の細胞に移行している。(H-E 染色, $\times 200$)

写真 4 腹水より得た細胞診標本

細胞が横につながりをもつ neuroepithelium 様組織に似る部分、塊状になった neuroglia 様組織に似る部分がみられる。(Papanicolaou 染色, $\times 200$)

で cloning が施行され、colony 形成細胞のみの培養系にすることができた。cloning 以後も細胞は順調な増殖を示し、細胞が confluent になった昭和 57 年 3 月 11 日継代培養に移した。そののちも細胞は緩徐ではあるが確実に増殖しており、昭和 57 年 8 月 1 日で継代 6 代目に至っている。

3. 培養細胞の形態

neuroglia 様細胞由来と考えられる培養細胞は小型円形～多角形で、敷石状の配列を示す。しかもその colony は、周辺部で上皮性細胞様の形態をとる(写真 6)とともに、重積増殖し、小型球形の細胞の密な集塊を形成する(写真 5)。さらに別の形状で重積する球状の細胞塊も認められ、これらは互いに線維様の構造で連結しているものもある(写真 6)。この球状の細胞塊は細菌培養用 plastic dish 上で培養すると付着することなく増殖し、さらに組織培養用 dish 上では付着後周囲より分化したと考えられる神経様細胞、線維芽様細胞の発生をみる。

写真 5 培養細胞のcolony上に形成された重積細胞の集塊。小型の細胞よりなっている。(×250)

写真 6 未分化な細胞のcolony上に形成された細胞塊(球状)。これらは線維状の構造で連結している。またcolonyの周囲の細胞は上皮性に近い形態をとっている。(×250)

写真 7 剥離した細胞塊(×100)

写真 8 付着した細胞塊の外周より分化した細胞の発生をみる。(×250)

写真 9 未分化な細胞の増殖と同時に分化した細胞も増えてきている。(×250)

写真 10 培養細胞のPapanicolaou染色標本(×200)

写真7～9にこれらの発生過程を示した。細胞集塊より単層に拡大する分化した細胞がみられる。

培養細胞のPapanicolaou染色では、細胞塊を形成している細胞は、いわゆる悪性細胞の診断基準を満たしているものが多かった(写真10)。一方細胞塊以外の比較

的散在性にみられる細胞の大部分は、典型的な悪性所見を呈しているとはいえない。すなわち少なくとも細胞診上の基準をもってすれば、分化した細胞の悪性度は低く、未分化な集塊を形成する細胞は高いといえる。

また培養細胞のPAS染色では、全くPAS陽性物質

写真 11 培養細胞の電顕像

細胞質が比較的大きめで小器官の発達のある細胞。(×5,000)

写真 12 培養細胞の電顕像

細胞質が小さく小器官の未発達な細胞。(×5,000)

の存在を認めることはできなかった。

さらに分化傾向を示す幹細胞と考えられる性格をもつ細胞塊断面の形態観察によると、細胞塊は光顕的には核の大きさ、染色性の異なる2~3種類の細胞の混在によって形成されていることが明かであった。電顕的には細胞質が比較的大きめで小器官の豊富なものと、細胞質が小さく小器官の未発達な細胞のあることがわかった。junction, microvilli, 分泌顆粒, filament など分化細胞を示す構造はなかった(写真11, 12)。

IV. 考 察

teratoma 由来細胞の分化能は、形態観察を始めとして、alkaline phosphatase^{3,4,17)}, acid phosphatase³⁾, plasminogen activator^{13,15)} などの酵素, fibronectin¹⁶⁾, α -fetoprotein¹²⁾ などのタンパク質, F9²⁾, PCC 4⁷⁾ などの細胞表面抗原を指標にした研究が主体となっている。これらのなかで、ヒト teratoma 由来細胞株を用いた Hogan ら⁵⁾, Holden ら⁶⁾ による報告は、細胞表面抗原 F9 に関するものであり、とくに分化形態についての詳細な記載は、Zeuthen¹⁷⁾ らの報告に限られるといえる。しかし Zeuthen らにより樹立された PA 1 株は腹水由来のものであるのに対し、われわれの細胞は原病巣組織由来である。したがってその組織学的所見と培養細胞の形態とを容易に比較できるという特徴をもっている。

原病巣の組織中で特に neuroglia 様組織に注目すれば、概してこの組織の周囲には neuroepithelium 様組織が存在しており、しかも部分的には glia 様細胞と epithelium 様細胞間での移行像が認められる。

この移行、すなわち分化は in vitro の培養系においても観察された。培養中に形成された colony の多くは、写真5に示したような小型細胞によって形成されてお

り、これは培養初期の過程より glia 様細胞に由来すると考えられた。この colony 形成細胞が in vitro で分化している様子は、写真6の周囲部分で認められ、glia 様細胞が次第に大きくなって、上皮性と考えられる細胞に変化してきている。

in vitro における teratoma 由来細胞の形態面での分化傾向は、mouse 由来の細胞を用いた Nicolas ら^{10,11)}, Martin ら⁸⁾ の報告によっても明かである。また Zeuthen ら¹⁷⁾ は、ヒト由来 PA 1 細胞培養系を用いて細胞塊が大きくなれば外周の細胞と内部の細胞間の形態に差が生じ、また付着させた場合には外周に内胚葉性と推定できる細胞が出現したと報告している。

われわれの培養細胞もこれらの成績と同様の分化能を示したことは、前述したとおりである。glia 様細胞が epithelium 様細胞に分化する以外に、原病巣ではみられないような分化能を in vitro で示すともいい得る。しかしその起源である細胞塊の超微形態観察で、個々の細胞には、わずかであるが形態的差異を認めたことは、細胞塊中の個々の細胞の分化傾向、ひいては幹細胞の本態を究明する上で極めて重大な意味をもつと思われるが、詳細はなお不明である。

さらに in vitro における分化傾向を観察して考えられることは、前述してきたように、glia 様組織が、幹細胞としての性格を有するということである。この推測は、in vitro の結果を in vivo に結びつけることとなり断言はできないが、今後の研究が期待できる点といえる。

本培養細胞の分化の仕方は原病巣では、PAS 陽性物質の存在が認められたのに対し、in vitro ではそれが認められず、したがって両者間での分化の mechanism は必ずしも同一ではない可能性もある。

形態的な観察、すなわち培養細胞が PAS 陽性物質を

もたない種々の細胞へ分化する傾向を有することからも、この両者間の不一致性は推測されるところである。その原因としては、培養細胞が cloning されたもので、PAS 陽性物質を産生する細胞への分化能をもともと有していない細胞であった可能性、継代によって細胞の分化能に変化が生じた可能性、あるいは *in vivo* と *in vitro* での環境の差異が分化能を変化させた可能性などが考えられる。

V. 結 語

われわれが樹立したヒト immature teratoma 由来細胞の培養経過およびその性状について報告するとともに、その分化能に関して考察した。

Summary

Cultured cells derived from human ovarian immature teratoma were characterized. The results were as follows;

- 1) Tissues and cells obtained from the ovarian immature teratoma patient of 17 years old were primarily cultured.
- 2) Cultured cells well grew through 6 times subculturing from primary culture.
- 3) Major part of the original tumor consisted of neuroglia and neuroepithelium like tissues.
- 4) Cultured cells derived from neuroglia like tissue were thought as undifferentiated because they transformed to epithelial cells *in vitro*.
- 5) Fibroblast or nerve like cells were developed from the culturing cell-mass that was formed on the colony of the undifferentiated cells.
- 6) Electron-microscopical observation revealed that the cell-mass consisted of 2~3 kinds of undifferentiated cells which had no junction, microvilli, filament or secreting granule.
- 7) Cells that formed the cell-mass were judged as cytopathologically malignant, but other cultured cells were not.

文 献

- 1) Abell, M.R. : Ovarian neoplasms of childhood and adolescence, 586~626, Pathology of the female genital tract, Springer-Verlag, New York, 1977.
- 2) Artzt, K., Dubois, P., Bennett, D., Condamine, H., Babinet, C. and Jacob, F. : Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70 : 2988~2992, 1973.
- 3) Avner, P., Dubois, P., Nicolas, J.F., Jakob, H., Gaillard, J. and Jacob, F. : Mouse teratocarcinoma; Carbon source utilisation patterns for growth and *in vitro* differentiation, Exptl. Cell Res., 105 : 39~50, 1977.
- 4) Bernstine, E.G., Hooper, M.L., Grandchamp, S. and Ephrussi, B. : Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 70 : 3899~3903, 1973.
- 5) Hogan, B., Fellous, M., Avner, P.R. and Jacob, F. : Isolation of a human teratoma cell line which expresses F9 antigen, Nature, 270 : 515~518, 1977.
- 6) Holden, S., Bernard, O., Artzt, K., Whitmore, W.F. and Bemet, D. : Human and mouse embryonal carcinoma cells in culture share an embryonic antigen (F9), Nature, 270 : 518~520, 1977.
- 7) Köhler, G. and Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, Nature, 256 : 495~497, 1975.
- 8) Martin, G.R. and Evans, M.J. : The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivative in tissue culture, Cell, 2 : 163~172, 1974.
- 9) 村松 喬 : テラトーマ, 431~444, 哺乳動物の初期発生 (基礎理論と実験法), 理工学社, 東京, 1981.
- 10) Nicolas, J.F., Dubois, P., Jakob, H., Gaillard, J. and Jacob, F. : Têratocarcinome de la Souris; Différenciation en Culture d'une Lignée de Cellules Primitives à Potentialités Multiples, Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 126A : 3~22, 1975.
- 11) Nicolas, J.F., Avner, P., Gaillard, J., Guenet, J.L., Jakob, H. and Jacob, F. : Cell lines derived from teratocarcinoma, Cancer Res., 36 : 4224~4231, 1976.
- 12) Sakashita, S., Hirai, H., Nishi, S., Nakamura, K. and Tsuji, I. : α -fetoprotein synthesis in tissue culture of human testicular tumors and examination of experimental yolk sac tumors in the rat, Cancer Res., 36 : 4232~4237, 1976.
- 13) Sherman, M.I., Strickland, S. and Reich, E. : Differentiation of early mouse embryonic and teratocarcinoma cell *in vitro*; plasminogen activator production, Cancer Res., 36 : 4208~4216, 1976.
- 14) 寺島芳輝, 大川 清 : 胚細胞腫瘍の特殊性とその取扱いは, 82~108, 卵巣腫瘍・卵管癌と絨毛性疾患 (産婦人科 Mook, No. 10), 金原出版, 東京, 1980.
- 15) Topp, W., Hall, J.D., Marsden, M., Teresky, A.K.,

- Rifkin, D., Levine, A.J. and Pollack, R. : In vitro differentiation of teratomas and the distribution of creatine phosphokinase and plasminogen activator in teratocarcinoma derived cells, *Cancer Res.*, 36 : 4217~4223, 1976.
- 16) Zetter, B.R. and Martin, G.R. : Expression of a high molecular weight cell surface glycoprotein (LETS protein) by preimplantation mouse embryos and teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.)*, 75 : 2324~2328, 1978.
- 17) Zeuthen, J., Norgaard, J.O.R., Avner, P., Fellous, M., Wartiovaara, J., Vaheri, A., Rosen, A. and Giovanella, B.C. : Characterization of a human ovarian teratocarcinoma derived cell line, *Int. J. Cancer*, 25 : 19~32, 1980.
-