培養ヒト皮膚線維芽細胞の形態学的, 免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的検討

—Fibrohistiocytoid cell 及び悪性線維性組織球腫との類似性について—

高木 理彰¹⁾, 山川 光徳¹⁾, 今井 大¹⁾
須田 昭男²⁾, 渡辺 好博²⁾

1) 山形大学医学部第二病理

2) 山形大学医学部整形外科

(平成元年 7 月 21 日受付)
(平成元年 9 月 13 日受理)

Morphological, immunocytochemical and enzyme-cytochemical studies of cultured human dermal fibroblasts

—similarities to the “Fibrohistiocytoid cell” and malignant fibrous histiocytoma—

MICHIAKI TAKAGI¹⁾, MITSUNORI YAMAKAWA¹⁾, YUTAKA IMAI¹⁾
AKIO SUDA²⁾ and YOSHIHIRO WATANABE²⁾

1) Second Department of Pathology, Yamagata University School of Medicine

2) Department of Orthopedic Surgery, Yamagata University School of Medicine

We have recently reported that the existence of a specific cell type, called the “Fibrohistiocytoid(FH) cell”, which was found in a variety of chronic inflammatory tissues. This FH cell includes a series of cell types from metamorphosized fibroblast to a certain cell type which resembles a histiocytic fibroblast. In this study, to examine whether cultured human dermal fibroblast(FB) was transformed into a FH cell, it was studied using morphological, immunocytochemical and enzyme-cytochemical techniques. Three different population doubling level(PDL), 2-4 PDL, 15-20 PDL and 30-35 PDL FBs were examined. Morphologically, FBs had a short spindle shaped or elliptical cell body, an irregular shaped nucleus, fragmented rough endoplasmic reticula distributed in a dendritic pattern and a few dense bodies, especially marked in 15-20 PDL and 30-35 PDL FBs, but did not have monocyte/macrophage-specific characteristics of pseudopodia, multivesicular bodies and phagosomes. Cytochemically, all three different PDL FBs showed the positive reaction to α_1 -naphthyl butyrate esterase and acid phosphatase, and further only both of 15-20 PDL and 30-35 PDL FBs revealed the increasing immunoreactivity to α_1 -antitrypsin, α_1 -antichymotrypsin, lysozyme and ferritin. Moreover, the immunoreactivity to HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ was induced on 2-4 PDL and 15-20 PDL FBs treated with interferon-gamma. It has been considered that these immuno- and enzyme-cytochemical markers were found in FH cells as well as histiocytes in vivo, but

never found in non-inflammatory fibroblasts *in vivo*. These data suggested that FBs under a certain condition *in vitro* expressed the analogous phenotype to FH cells. It seemed that FH cell might be a transformed fibroblast. Furthermore, we also evaluated the similarity of FBs to MFH tumor cells *in vivo* and *in vitro* in the same way. MFH tumor cells revealed some similar phenotypes not only to FH cells but also FBs, suggesting that MFH might be originated from FH cells.

Key words: cultured human dermal fibroblast, fibrohistiocytoid cell, malignant fibrous histiocytoma

はじめに

著者らは、反応性リンパ節過形成、慢性骨髓炎、褥瘡、慢性胃潰瘍、慢性腹膜炎及び食道癌の間質内の線維芽細胞が、組織球様の性質に類似する細胞に変態することを観察し、これら一連の細胞を“Fibrohistiocytoid cell (以下 FH cell)”と命名した¹⁾²⁾³⁾⁴⁾。FH cell は、形態学的に短紡錘形ないし橢円形の細胞で、核小体の明瞭な橢円形ないし卵円形の核を有し、主として樹枝状の配列を示す断片化した粗面小胞体 (以下 rER) を有する。免疫組織化学的及び酵素組織化学的には、class II MHC 抗原陽性で、 α_1 -antitrypsin (以下 AT), α_1 -antichymotrypsin (以下 ACT), lysozyme (以下 LYZ), α -naphthyl butyrate esterase (以下 ANBE) の組織球 (ないしは単球/マクロファージ) 系のマーカーに一部反応性を有する細胞である。さらに我々は悪性線維性組織球腫 (以下 MFH) の形態学的、免疫組織化学的及び酵素組織化学的検討より、MFH に認められる腫瘍細胞が、FH cell と類似性を有することを報告してきた¹⁾⁴⁾。

今回、*in vitro* の線維芽細胞が、FH cell 類似の性状を発現しうるか否かを知る目的で、継代時期の異なる培養ヒト線維芽細胞の表現形質を形態学的、免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的に検討した。その結果、継代を重ねた培養ヒト皮膚線維芽細胞に、FH cell との類似性を認めたので報告する。また MFH 由来の初代培養細胞についても同様の検討を加え、その類似性について検討を加えた。

材料及び方法

1. ヒト皮膚線維芽細胞の培養

4 名の健常者 (27歳, 28歳, 29歳, 32歳の男性 4 名) より皮膚を無菌的に採取し、Mitsui ら⁵⁾の報告に

従って、皮膚片を細切し explant culture を行った。5 日から 7 日目で皮膚片から周囲に向かって活発に分裂増殖する細胞集団が出現した。2 週から 3 週で培養フラスコ底に単層の細胞層が形成され、この時点で皮膚片とそれに近接する細胞を機械的に除去した後、フラスコに残った細胞を trypsin (Mochida, 200U/ml) を用いて継代培養を行った。Nikaido⁶⁾らの報告に準じて、継代培養初期、中期、後期に相当する 3 つの異なる分裂令 (population doubling level, 以下 PDL) の細胞、即ち、それぞれ 2~4 PDL, 15~20PDL 及び 30~35PDL の細胞を実験に用いた。培養条件を Table 1 に示した。各 PDL に達した細胞は、 5×10^3 cells/chamber (Labtec 8 chambers/slide, Miles) に調整後、2~5 日間単層培養した。ついで interferon (以下 IFN)- γ 添加群、Interleukin (以下 IL)-4 添加群及び無添加群に分けて、再度 2~5 日間培養したものを以下の形態学的、免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的検索に用いた。さらに 2~4 PDL, 15~20PDL 及び 30~35PDL の単層培養細胞を、Enami⁷⁾の方法に従ってコラーゲンゲル包埋三次元培養を行い、細胞の性状を観察した。 $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ cells/ml に調整した細胞を、コラーゲンゲルに包埋し、5 日間培養した後、IFN- γ 添加群、IL-4 添加群及び無添加群に分けて、さらに 5 日間培養したものを以下に述べる形態学的、免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的検索に用いた。

2. ヒト末梢血リンパ球—単球の培養

同じ健常者の末梢血より Ficoll-paque を用いて、リンパ球—単球分画を分離し、 1×10^6 cells/chamber に調整後、壁吸着性を利用して得られた単核球を 3~5 日間単層培養した。またリンパ球—単球分画を 5×10^6 cells/ml に調整した後、3~7 日間、コラーゲンゲル包埋培養を行った。

3. MFH 組織由来細胞の初代培養

Table 1 Culture condition

Medium:	1:1 mixture of Ham's F-12 and Dulbecco's modified-minimum essential medium(Nissui) containing 10% fetal bovine serum(Gibco).
Flasks:	1) 25cm ² flasks(Corning) for primary cultures and passages. 2) Labtec 8 chambers/slide (Miles Sci.Lab.) for monolayer culture. 3) multidish (24 well, Corning) for collagen gel culture.
Agents:	1) Trypsilin (200U/ml, Mochida). 2) Collagenase (Type- I, Sigma). 3) Collagen gel (0.3% Cell matrix type 1-A, Nitta). 4) IFN- γ (10, 100, 1000U/ml, Japan Chemical Research). 5) IL-4 (10, 100, 1000U/ml, Zenzyme). 6) Ficol-paque (Pharmacia).
Incubation:	humidified 95% air and 5% CO ₂ at 37°C.

病理組織学的に striform type と診断された MFH 2 例(31歳, 男性, 及び46歳, 男性)を用いた。組織学的に変性, 壊死のないことを確認した腫瘍組織を細切後, collagenase (1mg/ml) による60分間の連続処理(37°C, 20分間, 計3回)を行い, Table 1 に示す培養液を用いて, 得られた細胞を 2×10^4 cells/chamber に調整し, 10~15日間培養した。培養終了5日前より, Table 1 に示した濃度にて IFN- γ 添加群, IL-4 添加群及び無添加群を作成した。

4. 形態学的観察

培養期間中は, 単層培養, コラーゲンゲル培養とも倒立位相差顕微鏡にて観察を行った。単層培養細胞を, メタノール固定(室温, 15分)し, May-Giemsa 染色後観察した。コラーゲンゲル包埋培養細胞については, periodate-lysine- (4%) paraformaldehyde (以下 PLP) 固定(室温, 4時間)をした後, アルコール脱水, キンロール透徹を経て, パラフィン切片とし, ヘマトキシリン・エオジン染色後, 光顕的に観察した。電顕的には, 常法に従い, グルタルアルデハイドとオスミウム酸による二重固定後, エポン包埋超薄切片とし, 鉛-ウラン電子重染色したものを電顕的に観察した。

5. 免疫細胞化学的観察

免疫間接ペルオキシダーゼ法⁸⁾を用い, 免疫細胞化学的検討を行った。単層培養細胞を 0.01M リン酸緩衝液 (pH7.4) で洗浄後, PLP 固定液を用い, 固定(4°C, 15分間)した。コラーゲンゲル包埋培養細胞については, PLP 固定(4°C, 6時間)後, 庶

糖・グリセロール含有 PBS で洗浄し, OCT コンパウンド (Miles Sci. Lab.) にて包埋後, 凍結切片としたものと, PLP 固定-パラフィン包埋切片としたものを実験に用いた。次に, 単層培養細胞及び凍結切片については, 50mM 過ヨウ素酸で処理(4°C, 10分間)し, またパラフィン包埋切片は0.3%過酸化水素水添加メタノールで処理(4°C, 30分間)することで内因性のペルオキシダーゼ活性を抑えた。次に, 各1次抗体を4°Cにて12時間反応させ, 2次抗体は, 室温にて2時間反応させた。用いた抗体とその希釈濃度は, Table 2 に示した。希釈濃度の決定にあたっては, 反応性リンパ節過形成及び慢性関節リウマチの滑膜病変の各組織を4% PLP 固定後, 凍結切片ないしパラフィン包埋切片として, 各種抗体に対する陽性像を対照とした。陰性対照として, 1次抗体に代えて正常ウサギ血清或は正常マウス IgG ないし IgM を用いた。培養線維芽細胞に陰性反応の抗体に対しては, さらに ABC 法⁹⁾を用いて反応性を再検討した。また単層培養の線維芽細胞に対して, Yamada¹⁰⁾らの方法に従って抗羊赤血球家兔 IgG (日本抗体研究所) による感作羊赤血球 (東洋血清) を用い, Fc レセプターを介した免疫貪食能 (以下 EA) を検討した。さらに抗羊赤血球家兔 IgM (日本抗体研究所), マウス血清と感作羊赤血球を用いて, 補体レセプターを介した免疫貪食能 (以下 EAC) も検討した。

6. 酵素細胞化学的観察

Table 3 に示す方法に準じ, 単層培養細胞及びコ

Table 2 List of antisera used

Antibody	Dilution	Source
Rabbit anti-human		
Ferritin	1/100	DAKOpatts
Isozyme	1/100	
α_1 -antitrypsin	1/100	
α_1 -antichymotrypsin	1/100	
Factor VIII-related antigen	1/100	
Mouse monoclonal anti-human		
CD35	1/ 10	DAKOpatts
HLA-DR	1/ 10	
CD15, CD14(LeuM3), CD11c, Leu1	1/ 30	Becton-Dckinson
HLA-DP, HLA-DQ	1/ 10	
CD21, CD11	1/ 10	
CD11b, CD14(MO2)	1/ 10	Coulter Clone
HLA-A, B, C	1/ 10	Seratech
OKT9	1/100	Ortho Diagnostic
α - & β -prolyl hydroxylase	1/ 50	Fuji Chemical Industries
Type I Procollagen C-terminal	1/ 50	Chemical International
Rat monoclonal anti human		
Type I Procollagen A-terminal	1/50	Chemical International
Peroxidase-conjugated swine anti-rat Ig.	1/100	DAKOpatts
Peroxidase-conjugated rabbit anti-rat Ig.	1/100	
Peroxidase-conjugated rabbit anti-rat Ig.	1/100	
ABC kit (peroxidase)		Vector Laboratories, Inc.

Table 3 Enzyme cytochemical analysis

Peroxidase	Kaplow, L.S., et al(1975) ¹¹⁾ .
α -naphthyl butyrate esterase	Yam, C.T., et al(1971) ¹²⁾ .
Acid phosphatase	Barka, T., et al(1972) ¹³⁾ .
Alkaline phosphatase	Nanba, K., et al(1977) ¹⁴⁾ .

ラーゲンゲル包埋培養細胞について Peroxidase(以下 PO), α -naphthyl butyrate esterase (以下 ANBE), Alkaline phosphatase (以下 AlPase) 及び Acid phosphatase (以下 AcPase) 染色後, 光顕的に検索した。

結 果

1. 形態学的観察

はじめに単層培養下のヒト皮膚線維芽細胞の位相

差顕微鏡像を観察した。2～4 PDL の細胞は比較的均一の大きさで, 長紡錘形の形態をとり, 細胞がシートを形成した (Fig.1a)。15～20PDL, 30～35 PDL (Fig.1b) の細胞は, 2～4 PDL の細胞に比べて大型のものが多く, 形も不均一であり, 長紡錘形, 短紡錘形, 一部楕円形を示す細胞も観察された。この形態の不均一化傾向は, PDL の進んだ時期の細胞により顕著に認められた。コラーゲンゲル包埋培養後の細胞でも同様に形態の不均一化傾向が認められ

Fig. 1 Phase contrast microphotographs showing cultured dermal fibroblasts (Fig. 1a: 4PDL, Fig. 1b: 35PDL) in a monolayer culture. Four PDL fibroblasts are mainly composed of long spindle shaped cells, whereas thirty-five PDL fibroblasts contains various shaped, long or short spindle and elliptical cells. (Fig. 1a-1b; x235).

た。コラーゲンゲル包埋培養の細胞を電顕的に観察すると、2～4 PDLの線維芽細胞は、ほとんどがFig.2aに示すごとく核小体が明瞭で楕円形の核を有する長紡錘形の細胞であった。一方、15～20PDL、30～35PDLの細胞の中には、短紡錘形ないし楕円形の細胞で、核の偏在や陥入、樹枝状配列を示すrERの断片化傾向や細胞質内空胞の増加を示す細胞が認められ、さらに一次ライソゾームの増加傾向のほかdense bodyも時に観察された。この傾向は30～35 PDLの細胞により顕著であった(Fig.2b)。三次元培養において15～20PDLないし30～35PDLの培養線維芽細胞の電顕的観察結果を、in vivoの線維芽細胞、FH cell、組織球と比較し、Table 4にまとめて示した。

2. 免疫細胞化学的観察

単層培養における各継代時期の全ての線維芽細胞は、コラーゲンの中間代謝産物 type I procollagen の A-terminal (以下 PC-A) 及び C-terminal (以下 PC-C) を認識する抗体に対して陽性反応を示した(Fig.3a)。一方末梢血単核球はいずれも陰性であった(Fig.3b)。またコラーゲン合成系酵素とされる α -subunit-prolyl hydroxylase (以下 α PH) に対しては、各PDLの線維芽細胞の一部(10～20%)が、 β -subunit prolyl hydroxylase (以下 β PH) については、各PDL全ての線維芽細胞が陽性反応を示した。また単核球は全て α PH及び β PHに対して陰性であった。一方、Ferritin (以下 FER) や単球/マクロファージ系細胞のマーカーとされている

LYZ, AT, ACT に対して、2～4 PDLの細胞では明かな反応を認めなかったが、15～20PDL及び30～35PDLの細胞は、弱陽性反応を示した。しかし、これらの反応は、単核球にみられる陽性反応に比して弱かった(Fig.4a-c)。CD15(Leu M1), CD14(Leu M3, Mo2), CD11c(Leu M5), CD11b(Mo1), CD35 (CR1), CD21 (CR2), CD11 (CR3), CD5 (Leu1) は、一部の単核球に陽性反応を認めたが、各PDLの線維芽細胞は全て陰性であった。OKT9に対しては、2～4 PDL及び15～20PDLの線維芽細胞及び一部の単核球に弱陽性所見を認めた(0～10%)。Factor VIII-related antigen (以下 Factor VIII) に反応性を示す細胞は認められなかった。また class I MHC 抗原の HLA-A, B, C に対して各PDLの線維芽細胞が陽性を示したが、class II MHC 抗原(以下 class II 抗原)の HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ に対しては各PDLの線維芽細胞は全て陰性で、単核球にのみ陽性所見を認めた。しかし、10-1000U/ml の濃度の IFN- γ 処理により、2～4 PDL及び15～20PDLの細胞に、それぞれ HLA-DR(100%), HLA-DP (100%), HLA-DQ (5～20%) に対する陽性反応が認められた(Fig.5)。また class II 抗原以外には、IFN- γ の添加により、光顕的に反応性的変化が認められたものはなかった。一方、IL-4 に反応して、class II 抗原に陽性反応を示す細胞は認められなかった。Fc レセプター及び補体レセプターを介した免疫食能、EA 及び EAC を有する細胞は、一部の単核球に認められたが、各PDLの線維芽細胞

Fig. 2a An electron microphotograph showing a four PDL fibroblast cultured in collagen gel. The fibroblast had a long spindle shaped cell body, suggesting that, though any intracytoplasmic vacuoles or dilatated rERs are found, the morphology of this cell is so called fibroblastic form. x5000, bar=1 μ m.

Fig. 2b An electron microphotograph showing a long term cultured, thirty-five PDL fibroblast in collagen gel. The cell body is roundish as when serial sections carried out. A complicated nucleus(N) is found. Rough endoplasmic reticula are fragmented and distributed in a branching pattern(arrow). Several dense bodies (arrow heads) and pseudopodia-like cytoplasmic extensions(double arrows) are also observed. x5000, bar=1 μ m.

には認められなかった。またコラーゲンゲル包埋培養細胞でも単層培養と同様の免疫染色性が認められた。以上の結果を Table 5 にまとめて示した。

3. 酵素細胞化学的観察

単層培養における各 PDL の線維芽細胞には PO 陽性反応を認めなかった。全ての PDL で一部に ANBE 陽性反応を示す細胞が認められ、特に短紡錘形ないし楕円形の細胞に陽性反応を認めることが多かった。しかし末梢血単球と比較すると陽性反応は弱かった (Fig.6a-b)。AcPase 陽性反応は継代時期を問わず全ての細胞に認められ、とりわけ、短紡錘形ないし楕円形を示す細胞に強く認められた。

AlPase 陽性反応を示す細胞は、2~4 PDL と 15~20PDL の一部の細胞に認められた (2~5%)

(Fig.7)。単核球は、PO 弱陽性、ANBE 陰性、AcPase 強陽性で AlPase は陰性ないし稀に弱陽性細胞を認めた。酵素細胞化学的染色においては IFN- γ 及び IL-4 添加による線維芽細胞及び末梢血単核球の反応性の変化は認められなかった。また、コラーゲンゲル包埋培養細胞についても単層培養と同様の傾向が認められた。以上の結果を Table 5 にまとめて示した。

4. MFH より得られた初代培養細胞に対する検索

Table 4 Comparison of ultrastructural characteristics between *in vitro* fibroblast and *in vivo* fibroblast. FH cell and histiocyte

	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i> ***)		
	Fibroblast**)	Fibroblast	F H cell	Histiocyte
Shape	elongated, short spindle, elliptical.	large, elongated.	short spindle, elliptical, angular.	irregular.
Nucleus	oval, elliptical, irregular.	oval, elliptical.	oval, elliptical irregular.	reniform.
Nucleolus	one or two, oval, large.	one or two, oval, large.	one or two, oval, large.	one or a few small.
rER	+/# fragmented, branching.	‡	+/# fragmented, branching, dendritic.	+
Mitochondria	+	+	+, smaller	+
Ribosome	‡, disperse.	‡	‡, disperse	+
Primary lysosome	+/#	+	+/#	‡
Secondary lysosome	-/+	-	-/+	+/#
Dense body	+	-	+	‡
Microfilament	-/+	+	-/+	-/+
Pseudopodia	-/+	-	-	‡

FB: Fibroblast, **): 15-20 & 30-35 PDL, FH cell: Fibrohistiocytoid cell, rER: rough endoplasmic reticulum. -: negative, +: positive, ‡: moderate in degree, #: marked in degree. -/+: often appeared, +/#: some were negative and others were positive moderately, +/+: some were positive and others were moderately positive.

***): Imai, Y., et al. J. Jpn. Soc. R.E.S. 28: 67-81, 1988.

位相差顕微鏡でMFHより得られた細胞を観察すると、その多くが短紡錘形ないし楕円形の大型の細胞で、核が大きく、核小体が明瞭な細胞であった (Fig.8)。この細胞は、免疫細胞化学的にPC-A, PC-C, α PH, β PH に対して中等度ないし強陽性反応を示した (Fig.9)。FER, LYZ, AT, ACT に対しても陽性反応を示した (Fig.10)。OKT9 に対しては弱陽性, Factor VIII, CD15, CD14, CD11c, CD11b, CD35, CD21, CD11, CD5 に対して、大型で短紡錘形ないし楕円形の細胞は陰性であった。また HLA-A, B, C は中等度陽性, HLA-DR は弱陽性, HLA-DP 及び HLA-DQ は陰性であった。IFN- γ の添加

により、HLA-DR (100%) 及び HLA-DP (100%) に対する反応性が認められ、一部の細胞に HLA-DQ (10~20%) に対する陽性反応も認めたが、IL-4 の添加による変化は認められなかった。また IFN- γ の添加による明かな反応性の変化は、class II 抗原以外には認められなかった。EA ないし EAC を示す細胞もほとんど認められなかった (0.5%以下)。酵素細胞化学的には、大型で短紡錘形ないし楕円形の細胞は、PO 陰性, ANBE 陽性, AcPase 陽性, AlPase 陽性であった。これらのマーカーは、IFN- γ の添加により明かな変化を示さなかった。

Fig. 3 Immunostains to type I procollagen C-terminal. Eighteen PDL fibroblasts are positive(Fig. 3a), whereas cultured mononuclear adherent cells are negative(Fig. 3b). Counterstained with methyl green. (Fig. 3a & 3b; x340).

Fig. 4 Immunostains for α_1 -antitrypsin. No marked immunostain is observed in four PDL fibroblasts(Fig. 4a), whereas weakly positive reaction is observed in eighteen PDL fibroblasts(Fig. 4b). The reaction is, however, fainter in comparison with that of cultured mononuclear adherent cells(Fig. 4c). Counterstained with hematoxylin. (Fig. 4a, 4b & 4c; x340).

考 察

培養線維芽細胞は、形態学的には粗面小胞体のよく発達した細胞質と楕円形の核をもった細胞で、機能的にはコラーゲン産生能を有し、栄養に耐え、

正常細胞の中で最も継代培養が容易とされている¹⁵⁾。その反面、培養系で線維芽細胞とみなされている細胞は、生体内の線維細胞が線維芽細胞に blast 化し、増殖したものなのか、少数ながら存在する線維芽細胞が選択的に増殖したものなのかすら明確な

Table 5 Comparison of immuno- and enzyme-cytochemical observations between in vitro and in vivo

	in vitro					in vivo****)			
	FB			MNC	MFH	FB	FH	HC	MFH
	2~4	15~20	30~35			(Granulation)			
PC-A	++	++	+	-	+	ND	ND	ND	ND
PC-C	++	++	+	-	+	ND	ND	ND	ND
α PH	-/+	-/+	-/+	-	+	ND	ND	ND	ND
β PH	++	++	+	-/+	++	ND	ND	ND	ND
Ferritin	-	-/+	-/+	++	+	-/+	+	++	+
Lysozyme	-	-/+	-/+	++	+	-	-/+	++	-/+
AT	-	-/+	-/+	+	+	-	-/+	+	+
ACT	-	-/+	-/+	+	+	-	-/+	+	+
CD15(LeuM1)	-	-	-	-/+	-	-	-	-/+	-
CD14(LeuM3)	-	-	-	-/+	-	-	-	-/+	-
CD11c(LeuM5)	-	-	-	-/+	-	-	-/+	++	-/+
CD11b(Mo1)	-	-	-	-/+	-	-	-	++	-
CD14(Mo2)	-	-	-	-/+	-	-	-	++	-
CD5(Leu1)	-	-	-	-/+	-	-	-	-	-
Factor VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OKT9	-/+	-/+	-	-/+	-/+	-/+	++	++	++
HLA-A,B,C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
HLA-DR	-(+)	-(+)	-	+	-/(+)	-	-/++	++	++
HLA-DP	-(+)	-(+)	-	+	-(+)	-	-/++	++	++
HLA-DQ	-(+)	-(+)	-	+	-(+)	-	-/++	++	-/++
CD35(CR1)	-	-	-	-/+	-	-	-	++	-
CD21(CR2)	-	-	-	-/+	-	-	-	++	-
CD11(CR3)	-	-	-	-/+	-	ND	ND	ND	ND
EA	-	-	-	-/+	-	ND	ND	ND	ND
EAC	-	-	-	-/+	-	ND	ND	ND	ND
PO	-	-	-	+	-	-	-	++	-
ANBE	-/+	-/+	-/+	++	-/+	+	++	++	++
AcPase	+	+	+	++	++	-/+	+	+	++
AlPase	-/+	-/+	-	-	+	-	+	++	-/+

FB: Fibroblast, FH: Fibrohistiocytoid cell, MNC: blood mononuclear adherent cell, HC: Histiocyte (or Macrophage), -: negative, $\pm$: weakly positive, +: positive, ++: moderate in degree, +++: marked in degree, -/+ : often positive, -/++: some were negative and others were moderately, (+): positive after IFN- γ treatment, ND: not done.

***): Imai, Y., et al. J. Jpn. Soc. R.E.S. 28: 67-81, 1988.

報告はない。さらに由来臓器によっては、ホルモン感受性、形態、増殖性などが異なるとの報告もある⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾。また培養線維芽細胞の表現形質の変化に関しては、種々の酵素処理や薬剤の添加による組織球

様への形態変化¹⁸⁾、細胞の膜表面の蛋白や糖鎖の変化¹⁹⁾、lysosomal enzyme の産生の増加²⁰⁾²¹⁾、異物貪食能の上昇²²⁾等が報告されている。しかし、その意義については未だ十分な検討はなされていない。

Fig. 5 Immunostains to HLA-DR. Positive reaction is not observed in non-treated four PDL fibroblasts (Fig. 5a), but almost all the fibroblasts show positive reactions with treatment of IFN- γ (100U/ml)(Fig. 5b). Counterstained with hematoxylin. (Fig. 5a & 5b; x680).

Fig. 6 Cytochemical stainings with α -naphtyl butyrate esterase. Two fifteen PDL fibroblasts show positive reaction(Fig. 6a), whereas almost all the mononuclear adherent cells are strongly positive(Fig. 6b). Counterstained with hematoxylin. (Fig. 6a & 6b; x680).

一方、我々は線維芽細胞より transform して線維芽細胞と組織球の中間の性状を示すようになった細胞が、慢性炎症の場存在することを見だし、これを FH cell と定義してきた。我々は、FH cell が線維芽細胞より transform した細胞であるとすれば、in vitro の線維芽細胞から FH cell の性状を有する細胞を得られる可能性があるとの仮説を立てた。そこで健康者皮膚より得られた培養線維芽細胞をトリプシンによって継代し、PDL の異なる細胞の

表現形質と、class II 抗原誘導能を有する IFN- γ と IL-4 の添加による表現形質の変化を観察した。得られた結果より、in vitro における継代時期の異なる線維芽細胞と、in vivo における線維芽細胞、FH cell、組織球の性状との比較検討を試みた。健康者ヒト線維芽細胞は、染色体レベルの変化が少なく、正二倍体を保ったまま継代培養が可能なことや²³⁾²⁴⁾、ヒトの病理組織との免疫化学的な比較検討が可能な理由から、これを検索材料に用いた。

Fig. 7 A positive AlPase staining in two four PDL fibroblasts (arrows). Counterstained with safranin O. x680

Fig. 8 A phase-contrast photograph of MFH-derived cells in primary culture. Almost all the cells are large and short spindle or elliptical, and have a large nucleus (arrow) and prominent nucleoli. x460.

Fig. 9 Positive immunoreaction to type I procollagen C-terminal in MFH-derived cells. Counterstained with methyl green. x340.

Fig. 10 Positive immunoreaction to ferritin in MFH-derived cells. Counterstained with methyl green. x340.

検索にあたっては、単層培養下で継代された異なるPDLの線維芽細胞、即ち2～4PDL、15～20PDL及び30～35PDLの細胞の表現形質を形態学的、免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的に検討した。形態学的に観察すると、培養初期には、ほぼ均一な紡錘形で小型の細胞集団が単層を形成したが、PDLが進むにつれて、細胞の大小不同が目立つようになり、大型の細胞も多数混在していた。線維芽細胞を

継代し続けると細胞内蛋白量が増加するとの報告²⁵⁾²⁶⁾があり、この結果は、細胞の大型化現象と関連するものと考えられた。一方、免疫細胞化学的には、検索した各PDLの細胞は、コラーゲン合成系の酵素である α PHや β PHに対する免疫染色性が認められ、またコラーゲン中間代謝産物であるPC-AやPC-Cに対する反応性が全ての細胞に観察された。従って、実験に用いた線維芽細胞は、コラーゲ

ン合成能を有する細胞と考えられた。酵素細胞化学的に AcPase 活性が全ての細胞に認められ、とりわけ比較的大型の短紡錘形ないし楕円形の細胞に強く観察された。AlPase 活性も一部の細胞に認められた。これらの酵素は *in vivo* において、炎症などの非生理的条件下の活性化された線維芽細胞に認められる変化とされている¹¹⁴⁾²⁷⁾。また、単球／マクロファージ系のマーカーとされる ANBE¹²⁾²⁸⁾ に対して弱陽性を示す細胞も観察された。この反応性は血中単球の反応性より弱い、多くの短紡錘形ないし楕円形の細胞にも認められる傾向があった。今回の検索では光顕的に各 PDL の線維芽細胞に PO 活性を認めなかった。しかし電顕レベルにおける PO 活性の局在の有無が単球／マクロファージ系細胞の有用なマーカーとする報告もあることから²⁸⁾²⁹⁾、今後、電顕的検討も必要と思われる。免疫細胞化学的にも、15~20PDL 以降の細胞には血中単球よりは弱い、FER, LYZ, AT, ACT に対して明かに反応する細胞が観察された。しかし、血管内皮細胞のマーカーとされる Factor VIII や、単球／マクロファージ系のマーカーとされる CD15, CD14, CD11c, CD11b は継代期間中の全ての線維芽細胞に陰性であった。また、さらに、リンパ球のマーカーとされる CD5 や、補体レセプターのマーカーとされる CD35, CD21, CD11 にも陰性であった。サイトメガロウィルスによって形質転換した培養線維芽細胞に Fc レセプターを認めた報告³⁰⁾や、また線維芽細胞のある細胞株に補体レセプターの発現を認めた報告³¹⁾もある。一方では、継代された線維芽細胞は膜の性状が変化し、それ自体、赤血球凝集能を有するとの報告もある¹⁹⁾。従って、ロゼット形成による Fc レセプターもしくは補体レセプターの検出法は、非特異的な凝集反応が存在するために、あまり適切でないと考えられる。そこで、今回は、Fc レセプターと補体レセプターを介した赤血球の細胞内への取り込み、即ち、Yamada の方法による EA 及び EAC の有無について検索した。その結果、EA 及び EAC を一部の末梢血の単核球に認めたが、継代培養線維芽細胞ではいずれも貪食反応を認めなかった。

従来、*in vivo* では、FER に対する反応性は非炎症下の線維芽細胞には認められず、また ANBE, LYZ, AT, ACT に対する反応性は単球／マクロファージに有意な所見とされてきた¹¹⁴⁾²⁸⁾。一方、FH cell は AcPase や一部 AlPase 活性を示し、ANBE, LYZ, AT, ACT, FER に対しても反応性を有する

細胞で、15~20PDL 及び30~35PDL の単層培養下の線維芽細胞の中にも、同様の表現形質を有する細胞が観察された (Table 5)。また、細胞外基質の主要構成成分をなすコラーゲンを有した三次元培養と比較すると、単層培養は *in vivo* の形態を反映しにくいとの報告もある³²⁾。そこで、トリプシンで継代され、単層培養されてきた細胞をコラーゲンを有して一時的に三次元下で培養し、その形態観察もあわせて試みた。特に電顕的な観察においては、継代を経るにつれて培養細胞の中に短紡錘形ないし楕円形の形態、また時に核の陥入を示す不整形の核、樹枝状配列を示す断片化した粗面小胞体の存在、さらに一次ライソゾームの増加傾向のほか、時に dense body 等が観察され、これらの所見は、*in vivo* の慢性炎症の場にみられる FH cell の特徴¹⁾²⁾³⁾⁴⁾に類似するものと思われる。以上の形態学的、免疫細胞化学的並びに酵素細胞化学的検索から、単層培養及びコラーゲン培養下で観察された線維芽細胞の表現形質は、慢性炎症の場に存在する FH cell と類似性を示すものと考えられた。近年、トリプシンは細胞膜のみならず、細胞の核にまで作用して、細胞に変化をもたらすとの報告もある³³⁾。トリプシンにより継代、培養される細胞の環境は、*in vivo* の正常な環境と比べ、すこぶる非生理的なものと考えられるが、この環境自体が、慢性炎症の場で線維芽細胞の変態を生じせしめる因子の一つに近似しているのかもしれない。

今回、培養皮膚線維芽細胞は、IFN- γ 無添加では、HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ の class II 抗原が陰性であった。IFN- γ 添加後、30~35PDL の細胞では、class II 抗原は依然陰性であったが、2~4PDL 及び 15~20PDL の細胞に class II 抗原が認められた。しかし、単球／マクロファージ系の細胞株に class II 抗原の発現を誘導するとされる IL-4³⁴⁾に対しては、class II 抗原の陽性化が認められなかった。また近年、IFN- γ で処理した継代中期の class II 抗原陽性の培養皮膚線維芽細胞が、T cell のクローナルな増殖を引き起こすとの報告がある³⁵⁾³⁶⁾。他方、*in vivo* の FH cell に class II 抗原の発現が認められることから、FH cell の抗原提示細胞としての可能性も示唆されている¹¹⁴⁾³⁷⁾。これらは、線維芽細胞が単に組織の支持細胞としてだけでなく、炎症の場において抗原提示細胞として免疫応答に積極的に関与する可能性を示唆するものと考えられる。また、IFN- γ が活性化 T cell によって産生されるとの報

告³⁸⁾³⁹⁾からすると、一つの可能性としては、*in vivo*における FH cell の class II 抗原の発現は、慢性炎症の場に同時に存在し、IFN- γ 産生能を有する T cell を介して行われるのかもしれない。

さらに、我々は病理組織学的に MFH と診断された腫瘍組織より細胞を分離し、その初代培養細胞と継代培養した線維芽細胞との表現形質の比較検討も合わせて行った。腫瘍組織より分離された初代培養細胞には、若干の間質の細胞が混在すると思われるが、分離直後は腫瘍細胞がその多数を占めると考えられている。今回、分離培養された細胞の中に、短紡錘形ないし楕円形の大型の細胞で、大型の核と、明瞭な核小体を有する細胞が多数観察された。この細胞の形態学的特徴は、非腫瘍性のマクロファージとは異なり、また組織を初代培養した際に増殖しやすい線維芽細胞と異なることから、これらを腫瘍細胞とみなした。これらの細胞の免疫及び酵素細胞化学的観察では、コラーゲン合成に関わる α PH, β -PH, PC-A, PC-C の他に、LYZ, AT, ACT, FER, ANBE, AlPase, AcPase など、継代 15~20PDL 以降の培養線維芽細胞に観察された表現形質と類似していた。また、一部に HLA-DR に対する反応を認めたほか、IFN- γ の処理によって HLA-DR に対する反応性が増強され、HLA-DP, HLA-DQ に対する反応性も認められた (Table 5)。MFH については病理形態学的に多くの検討がなされ、組織球⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾、線維芽細胞⁴³⁾⁴⁴⁾、未分化間葉系細胞⁴⁵⁾⁴⁶⁾、血管内皮細胞⁴⁷⁾、血管周細胞⁴⁸⁾等がこの腫瘍細胞の起源と考えられている。ヒト MFH 腫瘍組織から得られた培養細胞を用いた報告では、形態学的並びに酵素細胞化学的検討より組織球との類似性を見だし、組織球由来の腫瘍とする報告がある⁴⁰⁾。また最近では、免疫組織化学的検討も盛んに行われるようになったが、報告により結果はまちまちで、未だ定説をみていな

い。今回、MFH の腫瘍細胞を培養条件下に移行して、免疫及び酵素細胞化学的検討を加えたところ、*in vivo* の MFH に観察される所見と同様の表現形質を有していた。さらに継代を重ねた培養線維芽細胞にもこれらの形質が維持もしくは誘導されることを合わせると、継代培養線維芽細胞と FH cell との類似性に加え、今回の MFH 由来の細胞培養を用いた検討は、継代線維芽細胞と MFH との類似性をも示唆する所見と思われた。従って、FH cell が MFH の起源細胞である可能性を示唆してきた我々の報告¹⁾⁴⁾を、今回の検討はさらに支持するものと思われた。

結 語

継代ヒト皮膚線維芽細胞の形態学的、免疫細胞化学的及び酵素細胞化学的検討において、継代中の線維芽細胞が、慢性炎症の場に存在する FH cell に類似する形質を表現しうることが観察された。この結果は、FH cell が線維芽細胞より変態した細胞であることを支持するものと考えられた。また継代を重ねた線維芽細胞が、*in vivo* の MFH の腫瘍細胞や MFH の初代培養細胞とも類似性を示したことから、FH cell が MFH の腫瘍細胞の起源細胞である可能性をも示唆する所見と考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際して、多大な御協力をいただきました山形大学医学部第二病理学教室員・技官各位に心より感謝申し上げますとともに、実験に際しての症例の御提供を賜りました山形大学医学部整形外科科学講座、並びに細胞培養の御指導を賜りました組織培養記念研究所 高岡聡子先生、獨協医科大学組織培養室 間中研一先生、秋元一三先生に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Imai, Y., Yamakawa, M., Sato, T. and Suda, A.: Malignant fibrous histiocytoma: similarities to the "Fibrohistiocytoid cells" in chronic inflammation. *Virchows Archiv A [Pathol Anat]*. 414: 285-298, 1989
- 2) Imai, Y., Terashima, K., Matsuda, M., Dobashi, M., Maeda, K. and Kasajima, T.: Reticulum cell and dendritic cell-Origin and Function-. *Rec.*

- Adv. RES Res.* 21: 51-81, 1983
- 3) 佐藤俊浩, 山川光徳, 今井 大, 石川 誠: 食道癌の間質細胞に関する細胞化学的、電顕的、免疫組織化学的検討. *日本網内系学会誌* 28: 1-14, 1988
- 4) 今井 大, 山川光徳, 佐藤俊浩: 悪性線維性組織球腫の形態学的、酵素組織化学的及び免疫組織化学的検討—慢性炎症における "Fibrohistiocytoid cell" との類似性について—. *日本網内系学会誌* 28: 67-81,

- 1988
- 5) Mitsui, Y., Yamamoto, K., Yamamoto, M. and Matsuoka, K.: Cell surface change in senescent and Werner's syndrome fibroblasts: their role in proliferation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 190: 567-585, 1985
 - 6) Nikaido, O., Ban, S. and Sugawara, T.: Aging phenomena (eds., Oota, K., et al), Plenum Publ. Corp., New York & London, pp.303-311, 1978
 - 7) Enami, J., Enami, S., Kawamura, K., Kohmoto, K., Hata, M., Koezuka, M. and Koga, M.: Growth and differentiation of mammary epithelial cells in culture (eds. Enami, J., & Ham, R. G.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp125-135, 1987
 - 8) Farr, A.G. and Nakane, P.K.: Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies: A brief review. *J. Immunol. Method* 47:129-144, 1981
 - 9) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H.: Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29: 577-580, 1981
 - 10) 山田 亮: マクロファージの機能と機能測定法—新しいマクロファージの免疫生物学—(野本亀久雄編) 菜根出版 東京 pp66-71, 1985
 - 11) Kaplow, L.S.: Substitute for benzidine in myeloperoxidase stains. *Am. J. Clin. Pathol.* 63: 451, 1975
 - 12) Yam, C.T., Li, C.Y. and Crosby W.H.: Cytochemical identification of monocytes and granulocytes. *Am. J. Pathol.* 55: 283-290, 1971
 - 13) Nanba, K., Jaffe, E.S., Soban, E.J., Braylan, R.C. and Berard, C.W.: Hairy cell leukemia: Enzyme histochemical characterization with special reference to splenic stromal change. *Cancer* 39: 2323-2336, 1977.
 - 14) Barka, T. and Anderson P.J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 10: 741-753, 1963
 - 15) 三井洋司: 正常細胞の分離と培養—線維芽細胞—, 機能細胞の分離と培養, (三井洋司他編) 丸善 東京 pp59-67, 1986
 - 16) Aizawa, S., Mitsui Y., Kurimoto, F. and Matsuoka, M.: Cell surface changes accompanying aging in human diploid fibroblasts: Effects of tissue, donor, age and genotype. *Mechanism of Aging and Development* 13: 297-306, 1980
 - 17) Fujimori, K., Matsuda, M., Imai, Y. and Hiroi, M.: The ultrastructural Study of Human Endometrial Stromal Cells and Decidual Cells. *J. Clin. Electron Microscopy* 17: 133-159, 1984
 - 18) Fumarola, D., Jillico, E., Miragliotta, G. and Magliulo, E.: Influence of lipopolysaccharide from *Pasteurella multocida* on fibroblasts cultured in vitro. *IRCS Med. Sic.* 10: 647-648, 1982
 - 19) Aizawa, S., Mitsui, M., Kurimoto, F. and Nomura, K.: Cell surface changes accompanying aging in human diploid fibroblasts. V. Role of major cell surface protein and surface negative charge in aging and transformation associated changes in concanavalin A-mediated red blood cell adsorption. *Exp. Cell Res.* 127: 143-157, 1980
 - 20) Krawisz, B.R., Florine, L.D. and Scott, R.E.: Differentiation of fibroblast-like cells into macrophage. *Cancer Res.* 41: 2891-2899, 1981
 - 21) Lundgren, E.: Conditions for induction of alkaline phosphatase in cultured human skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 110: 25-30, 1977
 - 22) Mishima, H., Yasumoto, K., Nishida, T. and Otori, T.: Fibronectin enhances the phagocytic activity of cultured rabbit keratinocytes. *Invest. Ophthalm. & Vis. Sci.* 28: 1521-1526, 1987
 - 23) Barber, B.: The ethics of experimentation with human subjects. *Sci. Am.* 234: 25-31, 1976
 - 24) 井出利憲: ヒト線維芽細胞の immortalization—とくに細胞増殖の機構との関係について—組織培養 14: 33-37, 1988
 - 25) Schneider E.L. and Shorr, S.: Alteration in cellular RNAs during the vitro life span of cultured human fibroblasts. *Cell* 6: 179-184, 1975
 - 26) Matsuoka, K. and Mitsui, Y.: Changes in cell-surface glycosaminoglycans in human diploid fibroblasts in vitro aging. *Mechanism of Aging and Development* 15: 153-163, 1981

- 27) Yokoyama, M. and Jeffery P.C.: An ultracytochemical and ultrastructural study of epithelial cells in ductuli efferentes of chinese hamster. *J. Histochem. Cytochem.* 19:766-774, 1971
- 28) 亀崎 洋: 単核食細胞系のマーカー: 細胞化学的, 免疫細胞化学的マーカー, *日本臨床*47: 560-563, 1989
- 29) Daems, W.T.: Peritoneal macrophages. In: *The Reticuloendothelial System. 1. Morphology* (ed. by Carr, I. & Daems, W.T.), p57-127, Plenum Press, New York-London, 1980
- 30) Keller, R., Peitchel, R., Goldman, J.N. and Goldman, M.: An IgG - Fc receptor induced cytomegalovirus-infected human fibroblasts. *J. Immunol.* 116:722-777, 1976
- 31) Ueki, K., Fukushima, Y. and Kimoto, T.: C₃b and C₃d reseptor sites on human diploid fibroblasts. *Virchows Arch. B[Cell Pathol.]* 21:13-15, 1976
- 32) Yang, Y., Richard, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelca, D. and Nandi, S.: Sustained growth and three - dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cell embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:3401-3405, 1979.
- 33) 加治和彦: 培養環境, 組織培養15: 36-39, 1989
- 34) Stuart, P.M., Zlotnik, A. and Woodward J.G.: Induction of class I and class II MHC antigen expression on murine bone marrow-derived macrophages by IL-4 (B cell stimulatory factor I). *J. Immunol.* 140:1542-1547, 1988
- 35) Geppert T.D. and Lipsky P.E.: Dissection of the antigen presenting function of tissue cells in duced to express HLA-DR by gamma interferon. *J. Rheumatol.* 14:59-62, 1987
- 36) Maurer, D.H., Hanke, J.H., Mickelson, E., Rich, R.R. and Pollack, M.S: Differential presentation of HLA-DR, DQ, and DP restriction elements by interferon- γ treated dermal fibroblast. *J. Immunol.* 139:715-723, 1987
- 37) Takagi, M., Yamakawa, M., Narabayashi, I., Tajima, K., Ohe, S., Imai, Y. and Satoh, T.: Characterization of cultured human dermal fibroblasts. *結合組織*20: 218-219, 1988
- 38) Steeg, P.S., Moore R.N. and Oppenheim J.J.: Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by products of activated T cells. *J. Exp. Med.* 152:1734-1744, 1980
- 39) Steeg P.S., Johnson H.M. and Oppenheim, J.J.: Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphine with immune interferon activity. *J. Exp. Med* 156:1780-1792, 1982
- 40) Tanaka, H., Mori, Y. and Akedo, H.: Histiocytic differntiation of mouse malignant fibrous histiocytoma-like tumor cells by culturing with sodium butyrate. *Cell Biology International Reports* 6:85-90, 1982
- 41) Strauchen, J.A. and Dimitriu-Bona, A: Expression of monocyte/macrophage differentiation antigens detected with monoclonal antibodies. *Am. J. Pathol.* 124:303-309, 1986
- 42) Hagari, Y. and Yumoto, T.: Experimental tumors of myxoid malignant fibrous histiocytoma and hyaluronic acid production. *Acta Pathol. Jpn.* 37:973-988, 1987
- 43) Hoffman, M.A. and Dickersin, G.R.: Malignant fibrous histiocytoma: An ultrastructural study of eleven cases. *Human Pathol.* 14:913-922, 1983
- 44) Wood G.S., Beckstead J.H. and Turner R.P.: Malignant fibrous histiocytoma tumor cells resemble fibroblasts. *Am. J. Surg. Pathol.* 10:323, 1983
- 45) Roholl P.J.M., Kleyne, J., Basten, C.D.H.-van, Putte, S.C.J.-van-der and Unnik, J.A.M.-van: A study to analyze the origin of tumor cells in malignant fibrous histiocytomas. *Cancer* 56: 2809-2815, 1985
- 46) Roholl P.J.M., Kleyne, J., Elbers, H., Vegt, M.C.D.-van-der, Albus-Lutter, C.H. and Unnik, J.A.M.-van: Characterization of tumor cells in malignant fibrous histiocytomas and other softtissue tumors, in comparison with malignant histiocytes. 1. Immunohistochemical study on paraffin sections. *J. Pathol.* 147:87-95, 1985
- 47) Beranek, J.T.: Controversial histogenesis of the malignant histiocytoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 82:677-678, 1987
- 48) Harris, M.: The structure of benign and malignant fibrous histiocytomas. *Histopathol.* 4:29-44, 1980