骨・軟部腫瘍の組織培養

久留米大学整形外科

小宮節郎・中島雅典

宮城成圭

Tissue Culture of Bone and Soft Tissue Tumors

by

S. Komiya, M. Nakashima and S. Miyagi

Department of Orthopedic Surgery, Kurume University,
School of Medicine, Kurume, Japan

We have used tissue culture techniques chiefly on malignant tumor of bone or soft tissue for these three years. Recently, several interesting findings have been obtained using the methods of tissue culture with electron microscopy and histochemical techniques. This report deals with some of them. Cultured cells revealed the morphological similarity to those of original tumor tissues. Cultured cells of synovial cell sarcoma disclosed the biphasic pattern of spindle cells and epithelial-like elements.

In the case of malignant giant cell tumor of soft part, histiocyte like cells and fibroblast like cells were identified by electron microscopy. However the results that this tumor showed the positivity for α -naphthyl acetate esterase suggest the possibility of its histiocytic origin.

はじめに

近年、骨・軟部組織の組織培養が広くおこなわれており、病理形態学的研究や治療の実験モデルとしての有用性を発揮してきている。我々も、悪性腫瘍などを培養系に移して、それらの本態や組織起源、病因などの検索にあたっているが、今回は2、3の腫瘍に関する若干の知見を方法とともに併せ報告する。

材料および培養方法

実験材料には試験切除時あるいは未治療の腫瘍を手術場で無菌的に採取後、直ちに4°C Puck液に浸して培養室まで移送する。まず、腫瘍組織をPuck液にて数回洗浄し血液成分の混入をできるだけ防ぐ。次に、腫瘍組織を出血部・壊死部を除いた小塊にし、再びPuck液で数回洗浄する。その小塊をさらにPuck液を入れたシャーレ内にて1mm³程度の大きさにまで細切しよく洗浄する。これを37°CのPuck液で希釈した0.2%トリプシン+0.04% EDTA液中に37°Cの条件下で、約15分間、時々攪拌しながら静置

する。この細胞浮遊液をスピッツグラスに移し、Puck液で約2倍に希釈後、1,000 rpm、5分間遠心し、沈殿せしめる。上清を捨て、沈渣にEagleのMEM（日水製薬、東京）に牛胎児血清（GIBCO, U.S.A.）を10%の割に加えて作製した培養液を加えてよく攪拌し10⁶個/mlのオーダーになるようにする。この均等な細胞浮遊液を直径35mmのプラスチックシャーレ（Falcon, U.S.A.）に移し、CO₂ 5%, air 95%の混合ガスが流れる温度37°C、湿度95%のCO₂ incubator内で静置培養した（Fig. 1）。

以上の装作は全て、無菌的に行なわれた。

継代は、腫瘍細胞がシャーレ底面の8割からほぼ全面を覆い尽くす程度まで増殖した後に行なった。まず、37°Cに加温したPuck液で数回洗浄後、Puck液で希釈した0.1%トリプシン+0.02% EDTA液を約1.5ml加えて約5分間静置する。次に、シャーレ底面より剝離した腫瘍細胞浮遊液をスピッツグラスに移し、1,000 rpm、5分間遠心し、沈殿せしめる。上清を捨て、沈殿した腫瘍細胞集塊に3mlの培養液を加えて攪拌したのち、2個のシャーレに分注する。こ

Fig. 1 Method

れを第2代とする。以下、第3代、第4代……とし、細胞の増加に従い、直径 60 mm のプラスチックシャーレ、ガラス中角瓶、大角瓶へと培養していく。培養液交換は、週2回行なう。

培養細胞の観察は Nikon の位相差顕微鏡にて随時行なった。また、光学顕微鏡用試料作成には、Falcon 製 Lab-Tek を用い、固定後、ギムザ染色、パパニコロウ染色、H & E 染色を routine に行ない、他、各腫瘍に特有な染色もその都度併せ行なった。電顕観察用には 2 % グルタル液にて固定後、型通り脱水、エボン 812 に封理し JEM 100 S (日本電子製) にて観察した。

結 果

培養系に移された腫瘍細胞は直後よりシャーレ底面に定着し始め、24 時間後の電顕的観察によるとすでに original tumor tissue に類似した細胞形態並びに増殖様式を示しているものが多い。悪性例では総じて、個々の細胞は大きさ、形態に統一性を欠き配列も不規則で容易に重層化する傾向をもつ。今回は、興味

Fig. 2 Culture of synovial sarcoma showing cuboidal and spindle cells (×200)

Fig. 3 Synovial sarcoma. Culture showing a tubular arrangement of cuboidal cells (×400)

ある知見を得た3例についてのみ言及する。

Synovial Cell Sarcoma: fusiform な細胞とより cuboidal な細胞を主として認め、そのそれぞれが集団をなしている (Fig. 2)。一部に heaped up された細胞集団を作りそれから放射状に増殖する fusiform な細胞群を認める。また、cuboidal な細胞が数個集まって細い裂隙や小さな管腔様構造を呈することがある (Fig. 3)。これらは original tumor tissue にかなり類似した増殖様式といえる。培養細胞のコロイド鉄染色では cuboidal な細胞の胞体内に顆粒状に染まる所見をみる。トルイジンブルー染色では pH 4.1 に弱いながらもメタクロマジーを示す細胞群をみる。その中に特に強くメタクロマジーを示す細胞を散在的に認めることがあるが、これは original tumor tissue の光顕的・電顕的観察から mast cell であることが証明されている。

培養細胞の電顕的観察ではいくつかの細胞を認めて

いる。大別して round ないし polygonal な細胞と spindle な細胞である。前者は細胞表面に microvilli を多く有し一部に管腔様構造を呈する (Fig. 4)。一般に、ミトコンドリアの発達がよく、ライソゾームや脂肪滴、小空胞、フィラメント、拡張の少ない粗面小胞体、microtubules など認め、核は楕円形で核小体を有することが多い。これらの細胞群は緊密に接触し明らかなデスモゾームを細胞間に認めることが多い。さらに別の細胞群として、紡錘形でやや不整な核と疎な細胞質で特徴づけられるものもある。これらの所見は original tumor tissue の電顕学的特徴に非常に類似した所見である。培養系の 2, 3 の細胞に特徴的であったが、多数の perichromatin granule を認めることができた (Fig. 5)。

Malignant Giant Cell Tumor of Soft Part:
多核巨細胞と単核細胞を多数認める。多核巨細胞は形が円形に近いものから不整形まで多様の形態を示し一部には、偽足や長い針状の突起を認め、さらにそれらを介して 2 つの巨細胞が連結されている如き像もみる。単核細胞とはある距離を介しており、多核細胞の

細胞膜が陥入して単核細胞を取り囲もうとしている像や、あるいは単核細胞どうしが直接癒合し多核巨細胞化しているような像は認めることができない。多核巨細胞の表面には多数の microvilli を認め、胞体は豊富で小空胞を数多くみる。胞体のみが膨大し、細胞膜が破断して変性ないし壊死に陥っているものもある。核は 20 個内外で中心性に位置し、円形で、基質細胞と比べるとやや小さい。単核細胞は多角形のものが多く一部紡錘形のものがある。核は円形ないし多角形で偏心性で著明な核小体を有している (Fig. 6)。

培養細胞の α -naphthyl acetate esterase 染色では多核巨細胞は強陽性で特に中心性によく染まり、単核細胞は多角形の細胞の一部に強陽性を示すものがあり、他の多角形細胞と紡錘形細胞はそれより弱い陽性所見を示した。単核細胞もやはり核周辺が特に強まる傾向があった (Fig. 7)。

培養細胞の電顕的観察では多核巨細胞は 10 個前後の核を有している。その形は不整形で陥入像を示すことが多く、核クロマチンは核周濃厚なヘテロクロマチンで、simple nuclear body, 著明な核小体を有す

Fig. 4 Cultured synovial sarcoma cells showing an epithelial pattern. These cells contained a moderate number of mitochondria, electron dense granules, microfilaments, microvilli, and desmosomes.

Fig. 5 Synovial sarcoma, demonstrating the cell with numerous prominent pore annuli, some with a central dot.

Fig. 6 Culture of malignant giant cell tumor of soft part, showing polygonal, spindle, and multinucleated giant cells ($\times 400$)

る。一部、網状で大きな核小体をみる。核分裂像はみない。細胞質では、小型、楕円形、cristae 明瞭の electron dense なミトコンドリアがびまん性にみられるのが特徴的である。vesicle や vacuole は多数存在し、細胞膜下には pinocytotic vesicle や coated vesicle をみる。ライソゾームはそれほど多くなく、脂肪滴は少ない。粗面小胞体は非拡張性で辺

Fig. 7 Cultured cells of malignant giant cell tumor of soft part. All of these revealed strong activity of α -naphthyl acetate esterase, especially a multinucleated giant cell ($\times 100$)

縁にわずかに認めるのみである。グリコーゲンは認めず、遊離リボゾームは比較的多くみる。ゴルジ装置は核周にわずかに認める。細胞表面には多数の microvilli を認め、その villi どうしが癒合し細胞外のものを取り込むが如き像を一部にみる (Fig. 8)。

単核細胞は大別すると、histiocytic type と fib-

Fig. 8 Malignant giant cell tumor of soft part, demonstrating a multinucleated giant cell containing irregular nuclei with prominent nucleoli, a large number of mitochondria, vesicles and vacuoles, and microvilli.

Fig. 9 Cultured mononuclear cells of malignant giant cell tumor of soft part showing fibroblastic and histiocytic cells.

roblastic type の2つを認める。両者ともに核の不整が目立ち、陥入、偽封入体を見る。核小体は著明で1ないし2個認める。細胞質では若干の差異がある。前者は細胞膜表面に多数の microvilli を認め、pino-cytotic vesicle や coated vesicle を多くみる。さらに多数の空胞やライソゾーム、脂肪滴、胞体内フィラメントが特徴的である。粗面小胞体は非拡張性である。後者は、拡張し、なかに雲絮状の物質を容れる粗面小胞体の特徴づけられる (Fig. 9)。前者の細胞間にはデスモゾーム様の結合性を一部に認めた。単核細胞と多核巨細胞とは形態学的類似性は少なく、両者間の移行像も認めることはできなかった。

Giant Cell Tumor of Bone: soft part の malignant giant cell tumor と同様、多核巨細胞と単核細胞をみると、その細胞形態、増殖様式はお互い類似している。時日を重ねるうちに多核細胞を認め難くなり3週ほどで殆んど見い出せなくなる例が多かったが、6代目、約90日後でも、小さく、核数は3ないし4個と少ないが多核巨細胞をみた例がある。その電顕学的観察を行っていないためそれが original の多核巨細胞に類似したものか否かは検討し得ていない。今後の課題と考えている。一方、単核細胞は紡錘形の細胞が主体をなし、多角形の細胞を混じている (Fig. 10)。

組織化学的観察では、酸性フォスファターゼ染色は、多核巨細胞は強陽性、多角形細胞は陽性、紡錘形細胞は弱陽性である。 β -グルクロニダーゼ染色もほぼ同様の結果を得ている。 α -naphthyl acetate esterase 染色では、多角形細胞が強陽性、多核巨細胞は陽性、紡錘形細胞は弱陽性のものと陰性のものとが混

Fig. 10 Giant cell tumor of bone showing polygonal, spindle, and multinucleated giant cells ($\times 100$)

在する。アルカリフォスファターゼ染色は陰性である。

考 按

培養系に移行された腫瘍細胞はその直後よりシャーレ底面に定着し増殖を開始する。その増殖様式は original tissue に類似するが、継代を重ねるに従い次第に様相を異にする場合がある。しかし、電顕観察によると original cell にかなり類似した所見を示す場合が多く、また組織化学による染色結果も original tissue のそれに類似することが殆んどであり、組織培養により、病理学的検索や治療などの実験モデルとして活用することは有用と思われる。

今回は3例のみを取り上げたが、滑膜肉腫は培養系でも two cell pattern を残しており、組織化学的検索から酸性ムコ多糖 (ヒアルロン酸と考えられる) が弱陽性ながらも存在し、電顕的観察ではいわゆる epithelial cell と stromal cell に相当する細胞を見い出すことができた。Epithelial cell は管腔様構造をなし microvilli を有し細胞間にはデスモゾームをみた。これは諸家の報告と一致した所見である¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁶⁾。

Malignant giant cell tumor of soft part の多核巨細胞は histiocytic type の単核細胞とは microvilli の存在、核の形状で類似していたが、細胞内器官に関しては全く様相を異にしていた。さらに単核細胞どうしの癒合や多核巨細胞への癒合像はなく、今回の研究では多核巨細胞の起源を単核細胞に求めることはできなかった。一方、単核細胞は histiocytic type と fibroblastic type に大別され、前者の細胞を数多くみたが、その組織起源に関しては α -naphthyl acetate esterase 染色に陽性を示すことから、マクロファージ、及び単球にあると考えている。多核巨細胞に関しては、単核基質細胞の癒合による可能性の他に、骨巨細胞腫や他の良性・悪性腫瘍中に存在する良性多核巨細胞とそれほど形態的差異がないことからすれば、ただ単に免疫学的反応から出現しているということも考えられなくはないと思われる。

骨巨細胞腫に関しては電顕的観察を行っていないため十分な検討はできないが、継代を重ねても polygonal な細胞が存在し、組織化学の結果からも histiocytic origin を示す所見を得たが、一部には α -naphthyl acetate esterase 染色陰性の細胞が存在

し、また著者の骨巨細胞腫の電顕的観察では⁵⁾、未分化間葉系の細胞をみていることから、多核巨細胞の問題も含めてこの腫瘍の本態・組織起源の解明にはさらに今後の検索が必要である。

ま と め

1. 当教室で行なっている組織培養について報告した。

2. 組織培養された腫瘍細胞は、組織化学的、電顕的観察から original tumor tissue に類似した所見を示し、形態的観察や種々の実験モデルに役立ち得ると思われた。

3. 供覧した3例については、滑膜肉腫は biphasic pattern を示し、malignant giant cell tumor of soft part は histiocyte like cell と fibroblast like cell をみるが、組織化学的には histiocyte に近い origin をもつものと思われた。また、骨巨細胞腫は未分化間葉系細胞か histiocyte が origin と思われるが、解明には更に今後の検討が必要である。

参 考 文 献

- 1) Alvarez-Fernandez, E., and Escalona-Zapata, J.: Monophasic mesenchymal synovial sarcoma. Its identification by tissue culture. *Cancer* 47: 628-635, 1981.
- 2) Dische, F. E., Darby, A. J., and Howard, E. R.: Malignant synovioma. Electron microscopical findings in three patients and review of the literature. *J. Pathol.* 124: 149-155, 1978.
- 3) Fernandez, B. B., and Hernandez, F. J.: Poorly differentiated synovial sarcoma. A light and electron microscopic study. *Arch. Path. Lab. Med.* 100: 221-223, 1976.
- 4) Gabbiani, G., Kaye, G. I., Lattes, R., and Majno, G.: Synovial sarcoma. Electron microscopic study of a typical case. *Cancer* 28: 1031-1039, 1971.
- 5) Komiya, S.: Electron microscopy of bone tumors—osteosarcoma, chondrosarcoma, and giant cell tumor of bone. *J. Jpn. Orthop. Ass.* 56, 635-657, 1982.

- 6) Nunez-Alonso, C., Gashti, E. N., and Christ, M. L.: Maxillofacial synovial sarcoma. Light- and electron-microscopic study of two cases. *Amer. J. Clin. Path.* 3: 23-30, 1979.

質 問 鳥取大学整形外科 森本 兼人

①我々の教室でも synovial sarcoma 2例

1例は biphasic type 1例は monophasic typeで最近組織培養を始めたが、monophasic typeで診断の補助となるものがないものかどうか、例えば組織培養中の hyaluronic acid あるいは mucine とかなどは測定を行っていないか。

解 答 久留米大学整形外科 小宮 節郎

tissue culture での synovial cell の確認が可能かという御質問に関して

—mesothelioma や Adenoid cystic carcinoma などでは培養液を生化学的に分析しヒアルロン酸が高値であったという論文をみます。Synovial cell sarcoma の培養でも同様の検索は可能と思われます。

解 答 久留米大学整形外科 小宮 節郎

1. 「Malignant giant cell tumor of soft part」というのは tendon sheath 発生の giant cell tumor の悪性化したものなのか、それとも、giant cell type の MFH なのか」という御質問に対して

—喉頭に発生し大腿へ転移したと思われる非常に稀な giant cell type の malignant histiocytic fibrous histiocytoma です。

2. 「MFH も giant cell tumor of bone も histiocytic origin と私は考えておりますが先生の御意見は？」に対して

—MFH は詳しく検索しておりませんのではっきり申し上げられません。giant cell tumor of bone は、電顕上で未分化細胞と思われる細胞を数少ないが認め、凍結切片での α -naphthyl acetate esterase 染色でも negative の細胞を一部にみとめ未分化間葉系細胞をその origin とする可能性もあります。