

琉球大学学術リポジトリ

[原著]長期継代マウス骨肉腫培養細胞の継代数と移植部位による造骨能の比較検討

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学医学部 公開日: 2014-07-18 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松井, 克明, 橋本, 公夫, 湯元, 東吉, Matsui, Katuaki, Hashimoto, Kimio, Yumoto, Tokichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016271

長期継代マウス骨肉腫培養細胞の継代数と 移植部位による造骨能の比較検討

琉球大学医学部第1病理学教室

(主任:伊藤悦男教授)

松井克明

鳥取大学医学部第1病理学教室

(主任:湯本東吉教授)

橋本公夫 湯本東吉

はじめに

実験骨肉腫の研究にとっての隘路は、本腫瘍の特徴である骨形成能の再現性が困難なことである。すなわち、骨肉腫の継代移植でその初期には明瞭な骨形成を示すが、継代を続けるとかなり早期より骨形成能がみられなくなることが知られている。私共はNZB系マウスに自然発生した骨肉腫の同系マウスへの背部継代移植や同肉腫の培養細胞株化とその戻し移植等について報告^{1) 2) 3)}してきたが、その結果でも上記と同様に早期から骨形成が失われた。しかし、継代移植腫瘍に由来する培養細胞の戻し移植によって発生した腫瘍の継代移植の方が原発腫瘍のそれより長期にわたって骨形成能を保持していた。³⁾

今回私共は、NZBマウス骨肉腫培養細胞株の長期継代培養後でも骨形成能を保持していたが、同一の骨肉腫培養細胞でもマウスへの戻し移植部位の違いによって骨形成に若干の差があることを観察したので、これらの成績について2・3の文献的考察を加えて報告する。

実験方法

培養細胞:一培養細胞は無菌的操作によって得た骨肉腫の小塊を細切し、37°C 1時間0.1%トリプシン液で処理して採取した。これらの培養細胞は、イーグルMEM粉末培地(日水製薬)に初期の培養では10%胎児牛血清(GIBCO)、培養継代の20代

経過後は10%仔牛血清(阪大微研)と100unit/mlのペニシリン(明治製薬)および0.292g/lのL-グルタミン(キシダ化学)を含有するように調整した培養液によって、5%CO₂インキュベーター(TOKIWA CO-1)内でプラスチックシャーレ(NUNCあるいは豊島製作所)を使って培養した。

培養細胞はその起源によって次のように6種に分けた。

a細胞:原発腫瘍の第2継代背部移植骨形成性腫瘍から採取した培養細胞。

b細胞:原発腫瘍の3継代背部移植非骨形成性腫瘍から採取した培養細胞。

c細胞:a細胞の培養第2代細胞をマウスの腹腔内に戻し移植した際に生じた血性腹水中から採取した培養細胞。

d細胞:a細胞の培養第2代細胞をマウスの腹腔内に戻し移植して発生した非骨形成性腫瘍から採取した培養細胞。

e細胞:原発腫瘍から得た培養細胞の戻し移植によって発生した背部腫瘍の第2継代背部移植骨形成性腫瘍から採取した培養細胞。

f細胞:原発腫瘍の第10継代背部移植非骨形成性腫瘍から採取した培養細胞。

これらの培養細胞の継代数は、トリプシン液を作用させる毎に1代ずつ加算した。

実験動物:一実験動物は鳥取大学医学部第1病理学教室で飼育しているNZB系マウスの主に生後2~3カ月令のものを使用した。これら全てのマウ

スは、一定の室温内で給水瓶をセットしたプラスチックケージを使用し固型飼料CE-2(日本クレア)によって飼育した。

使用したマウスは培養細胞の戻し移植部位によって、次のように4群に分けた。

- I 群：背部皮下に戻し移植したもの。
- II 群：腹腔内に戻し移植したもの。
- III 群：心臓内に戻し移植したもの。
- IV 群：尾静脈内に戻し移植したもの。

これら戻し移植した各マウスは死亡するまで観察し、それらの腫瘍ならびに主要臓器の組織標本を作成して検鏡した。それぞれのマウスの転移判定は、I 群では背部以外に、II 群では横隔膜より上部に、III 群では横隔膜より下部に腫瘍がみられた時に転移陽性としたが、IV 群では腫瘍形成の全てを転移として扱わなかった。

腫瘍組織は次のように4型に分類して検討した。

- A-1型：骨あるいは軟骨形成のあるもの。
- A-2型：骨および軟骨形成はほとんどないが、明瞭な類骨形成のみられるもの。
- B型：骨および類骨形成はほとんどないが、膠原線維の多いもの。
- C型：骨や類骨形成のみか膠原線維もほとんどなく、紡錘形細胞の増生が主体をなすもの。

実験結果

1. a細胞の培養継代数と戻し移植腫瘍の性状との関係について

実験成績はtable 1に示す通りである。移植方法は注射により、移植部位は全て背部皮下で、移植細胞数は培養5代が 3×10^4 個、他は 10^4 個ずつである。

培養細胞の5, 18, 60代それぞれの戻し移植率は共に100%であるが、103代では60%と低い。しかし、これら全体の移植率は87.5%である。戻し移植後の平均生存日数は、培養5代で157.5日、18代で79.3日、60代で109.6日、103代で249.3日であり、全移植成功例の平均生存日数は137.7日である。

腫瘍組織像をみると、培養細胞5代の戻し移植によって発生した腫瘍は、骨および軟骨形成が著しく、腫瘍組織の多くの部分を占め(Fig.1)原発腫瘍にきわめて類似している。問質にみられる

紡錘形細胞は、密に増生しているが、膠原線維はそれほど多くなく、多核巨細胞や核分裂像も少ない。しかし、肺転移巣でも明瞭な骨形成が認められる。培養18代の細胞の戻し移植腫瘍では、いずれのマウスにおいても最早や骨や軟骨形成はみられず、紡錘形細胞の柵状あるいは渦巻状の配列が主体をなしている。しかし、類骨形成は諸所で明瞭にみとめられ、膠原線維も比較的多く、特に多核巨細胞が多く集簇性傾向をもって散見される(Fig.2)。また、それぞれのマウスの各転移巣でも明瞭な類骨形成がみられる。培養60代の細胞の戻し移植腫瘍では、前述の5代、18代の2細胞による腫瘍と同様に膠原線維は変わらず存在しているが、類骨形成がずっと少なくなり、転移巣でもほとんど類骨形成がみられない。5例中4例の腫瘍で、その一部に血液を入れた不整な大小不同を示す管腔形成が集簇的にみられ、あたかも血管腫状を呈している(Fig.3)。多核巨細胞は少ないが散見され、やや核分裂像が目立つと共に腫瘍組織全体に占める壊死巣の割合が多くなってきている。また1例ずつではあるが、腫瘍組織の壊死部にCa沈着のあるものや腫瘍辺縁部で著しい多形性を示すものがある。培養103代の細胞による戻し移植腫瘍は、類骨形成をほとんど示さないが、組織像は60代の培養細胞によるそれと類似している。血管腫様所見を示すものが3例中2例にみられ、著しい多形性を示すものが1例ある。

5, 18, 60, 103代のそれぞれの戻し移植による転移率は50%, 100%, 40%, 0%で、移植成功例における平均転移率は53.8%と高率である。

2. aおよびf培養細胞の戻し移植部位(背部皮下、腹腔内、心臓、尾静脈)による腫瘍組織像の比較

実験成績はtable 2に示す通りである。各実験群共に移植細胞数は全て 10^4 個で、a細胞では培養18代を、f細胞では、I, II群で培養6代を、III, IV群で培養3代を使用している。

1) a細胞；移植率はIおよびII群で100%、III群で60%、IV群では50%で、全平均移植率が80%である。移植成功例の平均生存日数は、実験群の順にそれぞれ79.3日、51.3日、33日、110.3日であり、全群の平均生存日数は65.9日であり、心臓内に移植した群が一番短かく、尾静脈内に移植した

Table 2. Comparisons of implanted tumors of the cultured cells (a) of osteosarcoma, with regard to the difference of transplanted regions

Experimental group	Origin of cells	Number of cell passages	Implanted age(days)	Numbers of transplanted cells	Survival times (days)	Histopathological features of implanted tumors								Metastatic site	Others		
						Histologic type of tumors	Bone formation	Cartilage formation	Osteoid formation	Collagen fibers	Multinucleated giant cells	Mitosis	Necrosis				
I	a	18	10 ⁴	63	77	A-2	-	-	±	+	+	+	+	heart, thorax wall, mediastinum (osteoid formation in all of them)			
				63	97	A-2	-	-	+	+	+	+	±	lung, mesentery(osteoid formation in all of them)			
				63	89	A-2	-	-	+	±	±	±	+	+	lung(osteoid formation)	growing of multinucleated giant cells in the peripheral arm of tumor	
				65	54	A-2	-	-	+	±	+	+	±	±	heart, thorax wall, mediastinum (osteoid formation in all of them)		
II	a	18	10 ⁴	63	66	A-2	-	-	+	±	+	+	+	-			
				63	44	A-2	-	-	+	±	±	+	+	+	-		
				65	74	A-2	-	-	+	+	±	±	+	+	-		
				65	44	A-2	-	-	+	±	±	+	+	+	-		
				65	39	A-2	-	-	+	+	+	+	+	+	-		
				65	41	A-2	-	-	+	±	+	+	+	+	-		
III	a	18	10 ⁴	60	28	B	-	-	±	±	±	+	+	-			
				70	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful		
				70	37	C	-	-	-	±	-	+	-	-	-		
				72	34	A-2	-	-	+	±	±	+	+	+	-		
IV	a	18	10 ⁴	63	258	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful		
				63	143	A-1	+	-	+	+	+	+	+	±	(heart, mediastinum vertebral column)		
				63	90	A-2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	(lung)	
				63	98	A-2	±	-	+	+	+	+	+	+	+	(lung, vertebral column)	
				63	356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful	
				67	356	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful	
I	f	6	10 ⁴	76	201	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful			
				76	466	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful		
				94	67	C	-	-	-	±	-	+	+	+	spleen		
II	f	6	10 ⁴	71	26	C	-	-	-	-	±	+	+	-			
				71	26	C	-	-	-	-	±	+	±	±	-		
				71	56	C	-	-	-	-	-	+	+	+	-		
				75	33	C	-	-	-	-	+	+	+	+	-		
				91	26	C	-	-	-	-	±	+	±	±	-		
III	f	3	10 ⁴	39	17	C	-	-	-	-	-	±	+	-			
				40	17	C	-	-	-	-	-	+	±	±	-		
				57	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful	
				58	17	C	-	-	-	-	-	+	+	+	-		
IV	f	3	10 ⁴	121	43	C	-	-	-	-	±	+	+	(lung)			
				121	69	C	-	-	-	-	-	+	±	±	(lung, thrax wall, mediastinum, liver)		
				121	482	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful		
				124	482	-	-	-	-	-	-	-	-	-	not successful		
				126	69	C	-	-	-	±	+	+	+	+	(lung)		

群が一番長く生存している。組織学的には全群共に紡錘形細胞の柵状ないし渦巻き状の密な配列より成り、I群およびII群では類骨形成が同程度にみられて、この2群間にはほとんど差が認められない。III群では前記2群に比して全般に類骨形成が少ないが(Fig.4)、IV群では1例に明瞭な骨形成が認められる(Fig.5)。移植成功例における転移率はI群では100%でその全てに類骨形成を認めたが、IIおよびIII群では0%である。IV群で腫瘍形成のみられた臓器は、肺(3例中3例)脊椎骨(3例中2例)縦隔洞(3例中1例)である。

2) f細胞; 移植率はI群が33.3%, II群が100%, III群が75%, IV群が60%で、全平均移植率は70.6%とa細胞のそれより低率である。移植成功例の平均生存日数は、実験群の順に67日、33.4日、17日、60.3日で、全群の平均生存日数は38.8日とa細胞でのその約半分である。そして、a細胞と同様に心臓内に移植した群が最も生存日数が短い。組織学的にはいずれの群の腫瘍も類骨形成のみか膠原線維さえほとんどみられず、主体は未分化な紡錘形細胞の密な柵状配列より成っている(Fig.6)。また、II群とIV群では多核巨細胞が少数散見されるが、I群とIII群ではほとんど認められない。移植成功例の転移は、I群の1例にしかみられていない。IV群の腫瘍形成臓器は、肺が3例中3例、胸壁、縦隔洞、肝が3例中1例にみられている。

3. 培養細胞a, b, c, dおよびeのそれぞれにおける実験I群とII群の腫瘍組織の比較。

これらの実験成績はtable 3に示す通りである。移植細胞数はa細胞の2代が 10^5 個ずつ、同じく81代が 6.5×10^5 個で、他の細胞は全て 10^4 個ずつである。

1) a細胞; 培養2代の細胞ではI, II群共に移植率が100%で、平均生存日数はI群が24日、II群が29日とほとんど差がない。しかし、組織像ではI群に著しい多核巨細胞を認めるものの骨や類骨形成がみられない(Fig.7)のに対し、II群では5例中4例は明瞭な骨や類骨形成を示し(Fig.8)、主腫瘍部に骨形成のみられなかった1例でもその転移巣ではきれいな骨形成がみられる(Fig.9)。また、II群の1例で約2mlの血性腹水が認められている。そして、I群では転移がみられな

ったが、II群では60%の高率に転移を認める。

培養81代の細胞でみると、I, II群共に移植率は100%で、平均生存日数はI群が92.8日、II群では45.4日と短い。腫瘍組織像をみると、2代細胞と同様にI群では多核巨細胞が散見されるものの類骨形成さえみられず、5例中4例が血管腫様構造を示している。一方、II群では多核巨細胞はほとんどみられないが、明瞭な類骨形成が1例に、微少な類骨形成が3例に認められている。また、I群ではII群より核分裂像がやや多く散見され、壊死巣の腫瘍全体に占める割合が多くなっている。転移はI群で60%にみられるが、II群には認められない。

2) b細胞; 培養10代の細胞でみると、移植率はI, II群共に100%で、その平均生存日数はI群が90.2日、II群は50.3日である。組織学的にはI群で明瞭な類骨形成が2例と微小な類骨形成が3例にみられたが、II群ではいずれも微小な類骨形成しかみられない。しかし、II群の3例中2例で、浸潤した肝や脾の臓器内で明瞭な類骨形成がみられ、2群間で骨形成における顕著な差を見い出せない。I群では腫瘍組織の一部で、血管腫状を呈するものが3例ある。転移はI群の40%にみられるが、II群では認められない。

3) c細胞; 培養10代の細胞でみると、移植率はI, II群共に100%で、その平均生存日数はI群が86.2日、II群が39日である。組織学的にはI群の5例中1例に骨形成がみられるが、II群では4例中2例に骨形成がみられ、その程度は類骨形成も含めてI群より高度である。I群のあまり類骨形成を示さなかった1例の腫瘍組織の壊死部でCaの沈着がみられ、他の1例では血管腫様像がみられている。一方、II群では1例に約5mlの血性腹水が認められている。転移はI群の80%にみられたが、II群では認められない。

4) d細胞; 培養13代の細胞でみると、移植率はI群が75%、II群が100%でその平均生存日数はI群が94日、II群が43.4日である。組織像をみると、I群で骨形成が3例中1例にみられたのに対して、II群では5例中3例にみられ、その内の1例には高度の骨形成があり(Fig.10)、類骨形成の程度もI群より高度である。転移はI群の66.7%にみられ、その内の1例では類骨形成が肺で認

Table 4. Comparison of experimental group I and II

Experi- mental group	Ratio of incidence	Mean survival times (days)	Histologic type of tumor				Metastasis rate
			A - 1	A - 2	B	C	
I	85.2%	80.8	8.7%	26.1%	60.9%	4.3%	47.8%
II	100%	42.7	37.1%	25.9%	33.3%	3.7%	11.1%

められているが、II群には転移を認めない。

5) e細胞: 培養5代の細胞でみると、移植率はI群で40%と悪いが、II群は100%であり、平均生存日数はI群が79日、II群では51.4日である。組織学的にみると、I群では類骨形成さえほとんど認められないが(Fig.11)、II群の5例中1例にはあるが著しい骨形成がみられ(Fig.12)、もう1例には明瞭な類骨形成が認められている。また、I群では2例共に腫瘍組織の一部が血管腫状を呈している。転移は両群共にみられない。

総括ならびに考按

私共はNZBマウス自然発生骨肉腫培養細胞株について長期継代培養後でも、骨形成能を保持しているかどうかを調べる目的で、各継代培養細胞をNZBマウスに戻し移植してその骨形成能を検索した。その結果、移植率は103代の戻し移植で60%とやや低かったものの、他の代では全て100%と良好であったが、全体では90%弱とin vivoでの背部継代移植における95%以上の移植率³⁾と較べて少し劣っていた。in vivoの背部継代移植では継代と共に生存日数が短縮する傾向があったが、³⁾この実験では生存日数と培養継代との間に特別の相関はみられなかった。腫瘍組織像をみると、培

以上をまとめると、table 4に示す通りI群の移植率は85.2%で、II群では100%である。総平均生存日数はI群が80.8日、II群が約半分の42.7日である。腫瘍組織型をみると、I群ではB型が60.9%と圧倒的多数を占め、次いでA-2型が26.1%でA-1型とA-2型の合計でも34.8%と強であるのに対して、II群ではA-1型が37.1%と最も多く、A-2型も25.9%でA-1型とA-2型の合計では63%と過半数を越える。転移率はI群が47.8%と高率であるのに対して、II群では11.1%と低率である。

養5代の細胞の戻し移植腫瘍は、原発腫瘍^{1) 2)}にきわめて類似した著しい骨や軟骨形成を示しているが、18代になると類骨形成は著しいものの最早や骨形成は認められず、60代ではさらに類骨形成の程度が少なくなり、103代では類骨形成がほとんど認められなくなってきた。これは、in vivoでの背部継代移植でみられたと全く同様の变化で、³⁾腫瘍組織型がA-1型からA-2型へ、そしてB型を経てC型へと変貌する過程を辿っているようである。また、背部継代移植で継代と共に腫瘍組織の一部に骨肉腫と血管との密接な関係を証拠づけるとされる⁴⁾血管腫状の構造を示すものが多くみられたが、^{2), 3)}培養細胞の場合も継代につれて同様の傾向がみられた。腫瘍のvascularizationが腫瘍増

殖を導く必要なステップであると言われており、⁵⁾この細胞もtumor angiogenesis activityの高い細胞であるといえそうである。しかし、培養細胞の戻し移植の場合、103代でも膠原線維がかなり豊富で、しかも多核巨細胞も散見され、in vivoでの背部継代移植にみられた変化³⁾より骨形成能の衰退程度がゆるやかなようである。いずれにしてもtrypsin処置によってbone morphogenetic responseが失われると言われているので、⁶⁾骨形成能の失われる原因の1つとしてこの培養細胞がtrypsin処理によって継代培養され、trypsin処理後に移植されていることから、ますます骨形成能が発現しにくくなっているのではなからうかと推察している。また、転移は60代までしかみられず、腫瘍組織所見が一見未分化になるにつれて転移率が上昇した背部継代移植の結果³⁾とやや異なっていた。

次に、移植部位の違いによって、発生した腫瘍組織中の骨形成能の発現に差があるかどうかを同一起源の同一継代数の細胞を使って比較観察した。移植部位別の移植率は、背部皮下、腹腔内共に100%で、心臓内と尾静脈内ではそれぞれ60%と50%でかなり低率であった。藤田⁷⁾はラットの移植実験の結果、背部皮下が83.3%、大腿筋肉が68.9%、尾静脈が46.2%、腹腔内が40%と背部皮下への移植率が最も高かったと述べている。また、谷口⁸⁾もラットで、骨髄内移植率が49.4%、尾静脈内では47.4%であったと報告しているが、いずれも低率である。私共の例で本報告中の全体を集計すると、腹腔内移植が100%(38例中38例)、背部皮下が82.6%(46例中38例)、心臓内が75%(8例中6例)、尾静脈内が54.5%(11例中6例)と腹腔内が最も高率で、次いで背部皮下、心臓内、尾静脈内の順であるが、心臓、尾静脈等血管内接種では他の報告^{7),8)}と同様に低率であった。これは、技術的な問題と使用動物の種の違いによるのかも知れない。

組織学的には、a細胞、f細胞共にI群とII群との間に差がみられなかった。III群ではa細胞でも類骨形成があまりみられず、f細胞では膠原線維さえみられなかった。これは、他群に比して極端に生存日数が短いことに基因していると思われる。a細胞のIV群で、1例に明らかな骨形成がみられたが、例数が少なくて結論的な意見は出せ

ない。しかし、生存日数は143日と他よりかなり長かった。要するに、III群以外はa細胞、f細胞共に培養起源腫瘍の組織像ときわめて類似した像を示し、細胞固有の性格²⁾をほぼそのまま発現したに止まった。転移はI群でしか記録されなかったが、その原因の一つはII、III群では横隔膜を越えたもののみを転移として扱ったためと思われる。また、IV群では転移の判定が困難であり、発生した腫瘍は全て転移としなかった。

aおよびf細胞という2つの性格のやや異なる細胞によって、戻し移植部位別の比較をしたが、効率よく骨肉腫の性格を帯びた腫瘍組織を得るためには、手枝が簡単で移植率の良いことが必要である。しかし、IV群では尾静脈内に注射するのに相当な熟練を必要とするが、その割に移植率が悪く、III群では注射針を心臓に刺すとそれだけで6~7割のマウスが死んでしまい、実際に適確に心臓内に注入出来たかどうかの判定も困難で、これらは効率が悪過ぎる。II群は移植部位としての標的が大きく、誰にでも簡単に移植でき、移植率も高い。I群ではf細胞でたまたま移植率が低かったが、a細胞だけでは約90%と高率で直視下に移植目標があり、腫瘍の増大を直接確認できる利点がある。

そこで、このI群とII群ではどちらが骨形成にとって都合が良いのかをみる目的で、起源をやや異にする5種のNZBマウス骨肉腫培養細胞を同系マウスに移植して観察した。その結果、II群は移植率が100%と高率であること、その発生腫瘍は同一の培養細胞ではI群に比して骨形成能の発現が高度にみられる傾向にあること、生存日数はI群の約半分であるので結果が早く得られる等という利点がある。難点としては、発生腫瘍を直視下に観察できないことと容易に触知できないことである。

一方、I群では転移が高率にみられるので、骨肉腫の転移についての研究には好適であると言えそうである。転移の高率である原因の1つは、免疫異常のある宿主側の要因が挙げられる。^{2) 3)}II群で転移のみられなかった原因は、以前報告²⁾した背部継代移植において、生存日数の長いものに高い転移率が観察されているので、II群の生存日数が短いことも一因と思われる。しかし、例外とし

て培養2代の細胞を移植した生後2日令の幼仔マウスでは、Shimokawa⁹⁾の報告と同様にI, II群共に生存日数が極端に短かったにも拘らず、II群においては転移が認められた。さらに、この幼若例ではI, II群間で組織像の上でもI群よりII群で著しい骨形成がみられるという顕著な差が認められた。早急な結論は出せないが、骨形成能を発現させるには多分幼若マウスの腹腔内に移植するのが最も良い方法ではなかろうかと推察する。腹腔内に移植した方が骨形成能を発現し易い理由として、Hilberg¹⁰⁾のいう移植部位の局所性因子に強く影響されたためと考える。すなわち、Hanamura & Urist¹¹⁾は非常にvascularizedの大腿筋肉に移植すると、培養細胞はoriginal tumorよりも8~10倍の骨を産生し、avascular conditionはtumor boneの沈着に都合が悪いようだと言っている。私共の実験では腹腔内に移植したものに骨形成の傾向が強く現われたが、これは腹腔内が背部皮下に較べて血管の豊富な環境であるためとも言えるかも知れない。いずれにしても、現事点では常に骨形成を示す骨肉腫株を手に入れることは、非常に困難であると言わねばならない。

結 論

NZBマウス自然発生骨肉腫培養細胞株は、長期継代培養後でも同系マウスへの戻し移植で骨形成能を保持していた。また、移植部位別に骨形成能の発現性の程度を調べた結果、腹腔内に移植した場合、背部皮下移植に比して移植率は高率で、短期間に骨形成を認めることがわかった。心臓内あるいは尾静脈内でも同様に試みたが、手技が難しくしかも移植率も悪く、安定した成績をうることができなかった。一方、背部皮下への移植は高率に転移が認められ、骨肉腫の転移についての研究には背部皮下移植が適していると思われた。

(本論文の要旨は、第34回日本癌学会総会において発表した。なお、本研究は、文部省科学研究費の補助を受けた。)

参 考 文 献

- 1) Yumoto, T., Ando, K., Yoshida, H., Okamoto, S., Matsui, K. : Naturally occurring bone tumor in a NZB mouse. *Yonago Acta Medica* **18**, 145-153, 1974.
- 2) 松井克明：NZBマウスに自然発生した可移植性骨肉腫に関する研究、*米子医誌* **26**, 483-511, 1975.
- 3) 松井克明, 延々規夫, 稲田 治, 安藤和史, 湯本東吉：NZBマウス可移植性骨肉腫の長期継代移植について、*米子医誌* **29**, 380-390, 1978.
- 4) 堀江健也, 牧田元雄, 岡田衛生, 佐藤計人, 小林 進：骨肉腫の実験病理学的研究、*共済医報* **11**, 345-354, 1962.
- 5) Klagsbrun, M., Knighton, D., Folkman, J. : Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. *Cancer Res.* **36**, 110-114, 1976.
- 6) Amitani, K., Nakata, Y. : Establishment and alkaline phosphatase activity of clonal cell lines of murine osteosarcomas. *Clin. Orthop.* **133**, 164-167, 1975.
- 7) 藤田敏光：実験骨腫瘍の移植に関する研究 *日大医誌* **29**, 900-912, 1970.
- 8) 谷口定義：実験的骨腫瘍の骨髄内および血管内移植に関する研究、*日大医誌* **22**, 530-549, 1963.
- 9) Shimokawa, K. : Histological and histochemical findings transplantable osteosarcoma of mice. *Acta Histochem. Cytochem.* **7**, 112-125, 1974.
- 10) Hilberg, A.W. : Morphologic variation in an osteogenic sarcoma of the mouse when transplanted to the kidney. *J. Nat. Cancer Inst.* **16**, 951-959, 1956.
- 11) Hanamura, H., Urist, M.R. : Osteogenesis and chondrogenesis in transplants of Dunn and Ridgway osteosarcoma cell cultures. *Amer. J. Pathol.* **91**, 277-297, 1978.

Explanations of the pictures

Fig 1. Experimental group I. Transplanted tumor after 5 passages of cultured cell-a.

This area shows marked formation of bone and cartilage. H. E. X100.

Fig. 2. Experimental group I. Transplanted tumor after 18 passages of cultured cell-a.

Numerous multinucleated giant cells are seen in this area. H. E. X100.

Fig. 3. Experimental group I. Transplanted tumor after 60 passages of cultured cell-a.

Haemangiomatous lesions which is composed of irregular blood vessel like space are seen. H. E. X100.

Fig. 4. Experimental group III. Transplanted tumor after 18 passages of cultured cell-a.

Almost of the tumor cells are spindle-shaped, and osteoid formation is not seen. H.E. X100.

Fig. 5. Experimental group IV. Transplanted tumor after 18 passages of cultured cell-a.

Picture shows marked formation of bone. H. E. X100.

Fig. 6. Experimental group I. Transplanted tumor after 6 passages of cultured cell-f.

Almost of tumor cells are undifferentiated spindle cells and show cartwheel pattern or closely arranged palisading. H. E. X100.

Fig. 7. Experimental group I. Transplanted tumor after 2 passages of cultured cell-a.

Numerous giant cells are observed, but bone or osteoid formation are not seen. H.E. X100.

Fig. 8. Experimental group II. Transplanted tumor after 2 passages of cultured cell-a.

Picture shows marked formation of atypical neoplastic boney tissue. H. E. X100.

Fig. 9. Experimental group II. Transplanted tumor after 2 passages of cultured cell-a.

Picture shows bone fone formation in the metastatic tumor in the lung. H. E. X100.

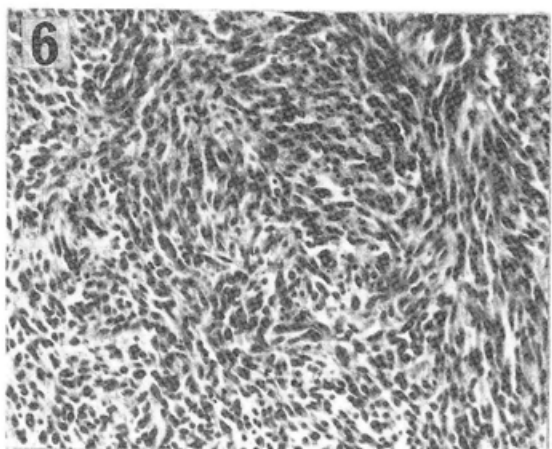
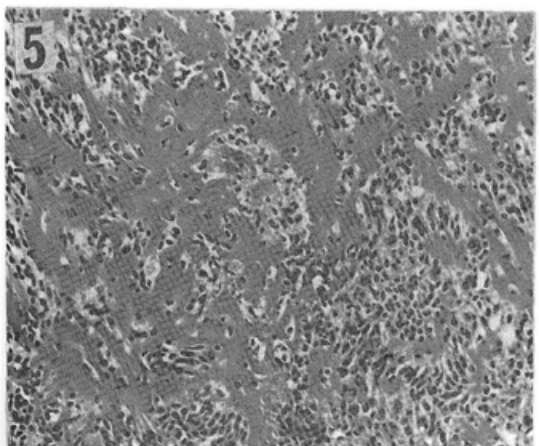
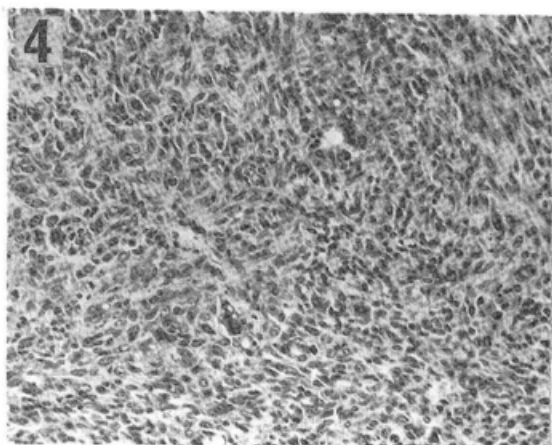
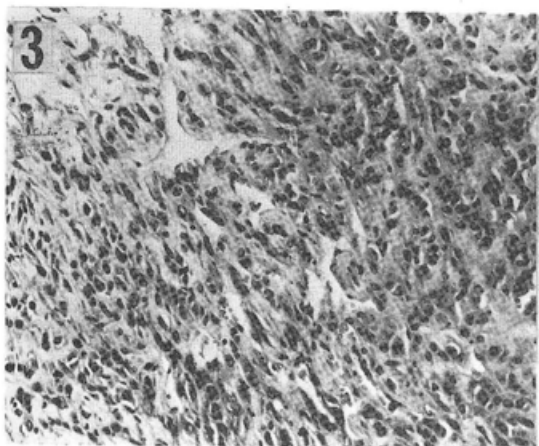
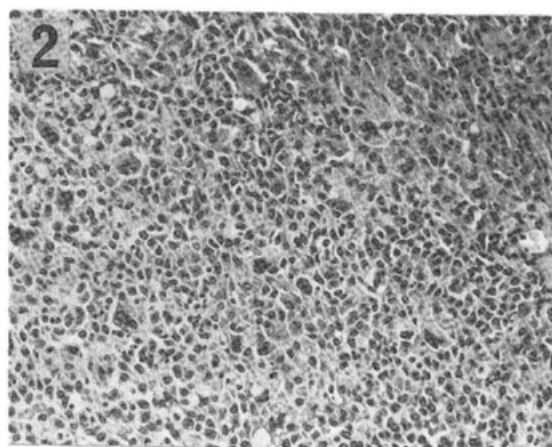
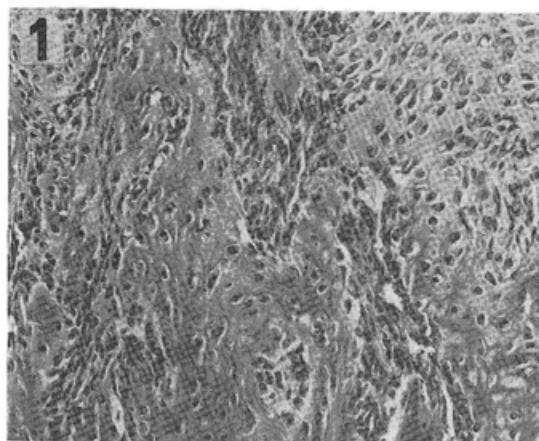
Fig. 10. Experimental group II. Transplanted tumor after 13 passages of cultured cell-d.

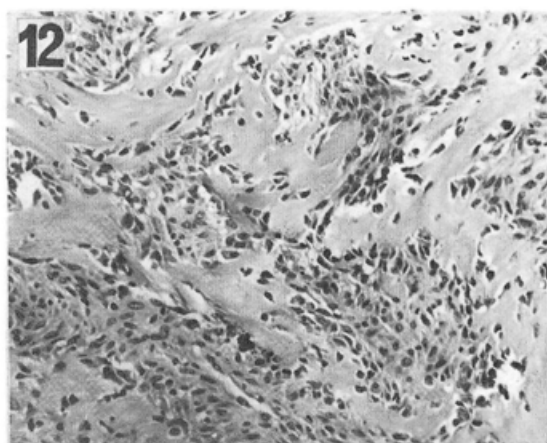
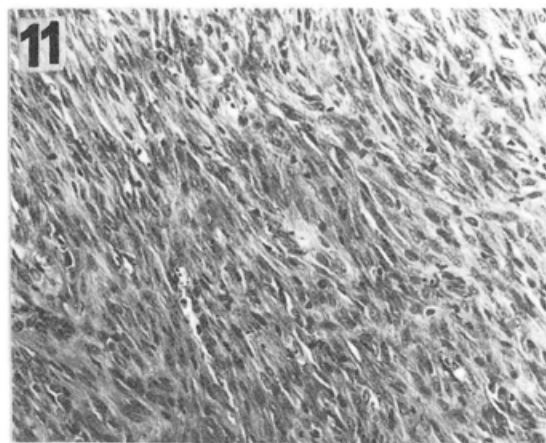
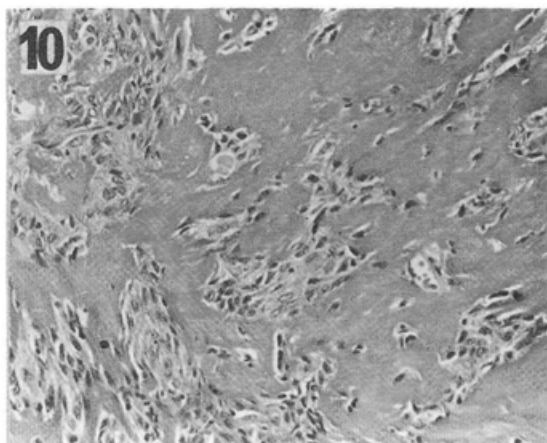
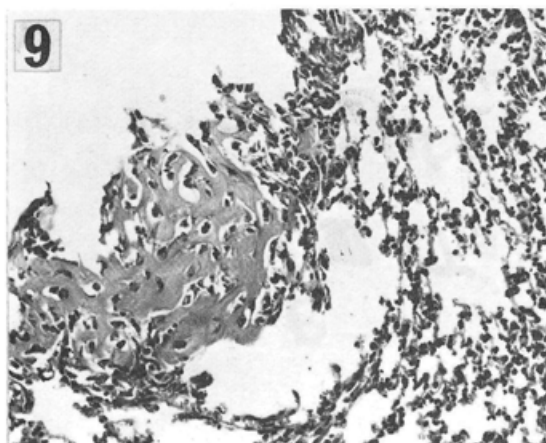
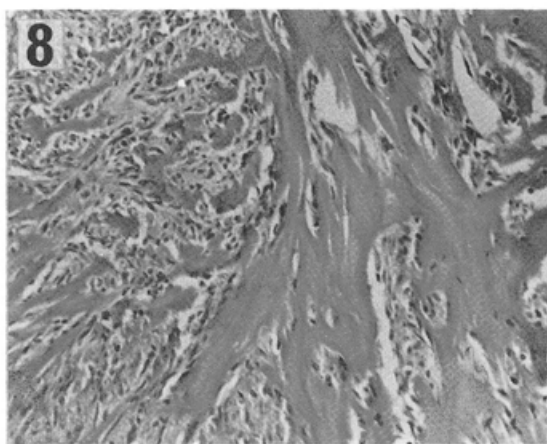
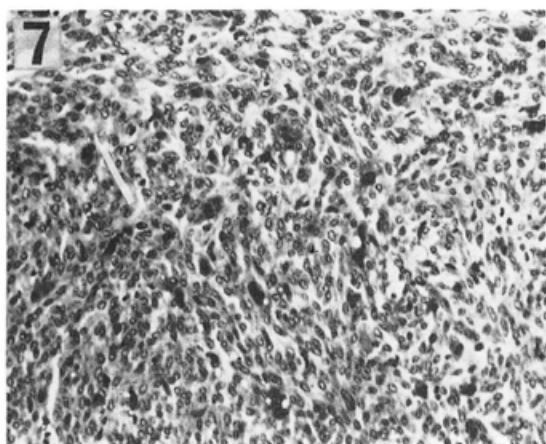
The tumor shows marked formation of boney tissue. H. E. X100.

Fig. 11. Experimental group I. Transplanted tumor after 5 passages of cultured cell-e.

Dominant composition of the tumor is palisading arrangement of spindle cells and formation of bone or osteoid are not seen. H. E. X100.

Fig. 12. Experimental group II. After 5 passages of cultured cell-e. The transplanted tumor reveals the faculty of bone formation. H. E. X100.





Comparative analysis of bone-forming ability of the long term Cultured cell lines, with regard to the number of cell passage and the difference of transplanted regions.

Katsuaki MATSUI

Department of Pathology(Director: Prof. Etsuo Ito)

School of Medicine, University of the Ryukyus.

Kimio HASHIMOTO

Tokichi YUMOTO

Department of Pathology (Director: Prof. Tokichi YUMOTO),

Tottori University School of Medicine.

Even after a long period of the passages, up to 3 years and 7 months, the established cell line derived from naturally occurred bone tumor in a NZB mouse still has the abilities of bone formation. The cell develops a tumor with variable degree of ossification by transplantation to the same strain mice.

We studied the frequencies of the appearance of bone formation in the transplanted tumors histopathologically.

Results obtained are as follows: At the group of intraperitoneal transplantation, the ratio of success transplantation case was 100%, higher than that of the dorsal subcutaneous transplantation group (82.6%). Simultaneously, we observed a tendency of more frequent appearance of the bone forming abilities at the intraperitoneal tumor, in spite of a short period. As to the average of survival time, the group transplanted on the back subcutaneously was 80.8 days and that of intraperitoneally transplanted group was about the half (42.7 days). Moreover, the abdominally transplanted tumors revealed bone or osteoid formation about 63%, while the back subcutaneous tumors were only 34.8%.

We have tried the direct transplantations into the ventricular space of the heart or the heart or the tail-vein of mice. The rate of success cases by those transplantation were low and each were 75% and 54.5% respectively. We found that those works are so difficult technically and not suitable methods for an experiment deals with bone sarcomas. On the other hand, we experienced a high rate of metastases (50%) in the group which was transplanted subcutaneously on the back. From those fact we presumed that the dorsal subcutan might be a suitable site for transplantation concerning to the study of metastasis of bone tumors.